HAL
open science

Biodisponibilité et dynamique de partition de métaux traces aux interphases microbiennes : effets de complexation intracellulaire et application aux biosenseurs bactériens

Romain Présent

To cite this version:

Romain Présent. Biodisponibilité et dynamique de partition de métaux traces aux interphases microbiennes : effets de complexation intracellulaire et application aux biosenseurs bactériens. Interfaces continentales, environnement. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0181 . tel-01976724

HAL Id: tel-01976724

https://theses.hal.science/tel-01976724v1

Submitted on 10 Jan 2019

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Biodisponibilité et Dynamique de Partition de Métaux Traces aux Interphases Microbiennes: Effets de Complexation Intracellulaire et Application aux Biosenseurs Bactériens

pour l'obtention du grade de

Docteur en Géosciences

de la Faculté des Sciences de l'Université de Lorraine

Thèse

présentée par

Romain M. Présent

Soutenue publiquement le 29 juin 2018 devant la commission d'examen

HASSLER Christel	Rapporteur	DEFSE – Université de Genève
LABADIE Pierre	Rapporteur	EPOC – Université de Bordeaux
THOUAND Gerald	Examinateur	GEPEA – Université de Nantes
BILLARD Patrick	Examinateur	LIEC – Université de Lorraine
DUVAL Jérôme	Directeur de thèse	LIEC – Université de Lorraine
ROTUREAU Elise	Co-directrice de thèse	LIEC – Université de Lorraine
PAGNOUT Christophe	Invité	LIEC – Université de Lorraine

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Université de Lorraine

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

Table des matières

Introduction **4**

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique **5**

1.1 Problématique générale **6**

1.1.1 Définitions 6

1.1.2 Stratégies d'évaluation de la toxicité des métaux 8

1.2 Modèles thermodynamiques développés pour la détermination de la bioassimilation des métaux **9**

1.2.1 Free Ion Activity Model 9

1.2.2 Gill Surface Interaction Model 10

1.2.3 Biotic Ligand Model 11

1.2.4 Extension du modèle BLM 13

1.2.5 Limitations et critiques du modèle BLM 14

1.3 Modèles fondés sur la quantification des flux de métaux aux interfaces biologiques **15**

1.3.1 Concept de labilité 15

1.3.2 Mécanisme d'Eigen-Fuoss pour des ligands moléculaires 18

1.3.3 Mécanisme d'Eigen étendu aux ligands particulaires 20

1.3.4 Particules molles 21

1.3.5 Impact de la densité de charge sur les cinétiques d'association/dissociation du métal avec une nanoparticule molle 23

1.3.6 Impact de la taille des particules sur les cinétiques d'association des métaux avec les sites réactifs 24

1.3.7 Conséquences de la dynamique de complexation des métaux avec des ligands particulaires sur l'évaluation de la labilité à une interface accumulatrice de métaux 26

1.3.8 Conséquences sur la biodisponibilité des métaux 27

1.4 Approche théorique fondée sur une équation généralisée de Best . . . **29**

1.4.1 Cadre du modèle 30

1.4.2 Extension du modèle : excrétion du métal 33

1.4.3 Relation entre dynamique de partition des métaux et tests de toxicité par inhibition de croissance 35

1.5 Utilisation de biosenseurs comme outils de mesure de la dynamique de partition et de la biodisponibilité des métaux **36**

1.6 Bilan et axes de recherche **38**

Chapitre 2 : Matériels et méthodes expérimentales **45**

2.1 Présentation des souches d'*Escherichia coli* utilisées **46**

2.1.1 Plasmide pMalc2-MT 47

2.1.2 Plasmide P_{zntA}-pUCD615 48

2.1.3 Bilan des modifications génétiques effectuées sur *Escherichia coli* 48
2.2 Présentation des milieux d'exposition et des protocoles de culture employés 49
2.2.1 Milieux d'exposition des bactéries au Cd(II) 49
2.2.2 Protocoles de culture bactérienne 50
2.3 Fonctionnement du système bactérien reporteur luminescent sensible au Cd(II) 51
2.3.1 Souches biosenseurs constitutives 52
2.4 Suivi cinétique de la bioluminescence par luminomètre 52
2.5 Dénombrement des cellules en suspension 54
2.5.1 Comptage par cytométrie à flux continu 54
2.5.2 Vérification de la viabilité des cellules après exposition au Cd(II) 55
2.6 Purification de la protéine MBP-MT 55
2.7 Quantification des concentrations en Cd(II) en solution par des techniques électroanalytiques 56
2.7.1 Quantification des concentrations libres et labiles en Cd(II) par Stripping Chronopotentiometry (SCP) 56
2.7.2 Quantification de la concentration libre en Cd(II) par Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES) 58
2.7.3 Dispositif expérimental et préparation de l'électrode 59
2.7.4 Suivi cinétique de déplétion de Cd(II) en solution par SCP 60
2.7.5 Détermination des constantes de stabilité du complexe Cd(II)–MTc 60
2.7.6 Détermination des isothermes d'adsorption de Cd(II) sur les surfaces bactériennes 61
2.8 Détermination de la quantité adsorbée de cadmium sur les membranes bactériennes par Spectrométrie d'Absorption Atomique 62
2.9 Évaluation de la taille des cellules par Microscopie à Force Atomique 62
2.10 Évaluation des propriétés de surface des particules par mesure de la mobilité électrophorétique 64
2.10.1 Origine de la charge surfacique ou volumique - Double Couche Electrique 64
2.10.2 Mobilité électrophorétique des particules 65
2.10.3 Principe de la microélectrophorèse sur la mesure de la mobilité des bactéries 67

Chapitre 3 : Évaluation de la dynamique de partition des métaux aux interfaces microbiennes : impacts de la complexation intracellulaire 70

Chapitre 4 : Impact de la métallothionéine intracellulaire sur l'internalisation biologique et la dynamique de partition de métaux aux interfaces bactériennes 119

Chapitre 5 : Que perçoit un biosenseur bactérien luminescent spécifique à la détection de métaux ? Résultats de la confrontation entre la théorie fondée sur l'évaluation des flux et données expérimentales 149

Conclusion 179

Perspectives 181

Annexes 187

Table des figures

1.1 Diagramme schématique du modèle BLM 12
1.2 Représentation du flux de diffusion des espèces métalliques (J_{diff}) depuis le milieu vers la surface accumulatrice et du flux cinétique (J_{kin}) provenant de la dissociation de M du complexe ML 15
1.3 Représentation schématique des régimes caractéristiques des complexes métalliques 17
1.4 Évolution des concentrations en M et ML en fonction de la distance avec la surface accumulatrice, dans le cas dynamique et statique. 18
1.5 Représentation schématique d'une particule molle 20
1.6 Répartition des sites ligands moléculaires (1) et particulaires (2) 22
1.7 Représentation du mécanisme d'Eigen dans le cas d'une complexation de M par un site ligand porté par une particule 22
1.8 Profil du potentiel électrostatique d'une NP molle dans le régime de haute densité de charge (à gauche) et faible densité de charges (droite). 24
1.9 Constante d'association k_{a} de M avec un site ligand porté par une particule en fonction de la taille de particule r_{p} et de la constante cinétique de deshydratation k_{w} 25
1.10 Représentation schématique des processus de complexation dynamique des métaux en présence de ligand moléculaire (à gauche) et particulaire (à droite) à une interface consommatrice de métaux 26
1.11 Représentation schématique de l'interface cellule/milieu 30
1.12 Exemple de profils de déplétion de M ($c^*_{\text{M}}(t)/c^*_{\text{M}}(0)$) en fonction du temps (adimensionnalisé sous la forme t/τ_{d}) 34
1.13 Dépendance au temps de l'émission de photons à différentes concentrations en Cd(II) initiales mesurée par luminométrie 37

2.1 Représentation des différences des LPS sur souches mutées (schéma de Pagnout. C) 47
2.2 Fonctionnement d'un biosenseur luminescent pour la détection de Cd(II) extracellulaire 51
2.3 **(A)** Schéma d'un luminomètre à microplaques.
(B) Répartition des différentes conditions d'exposition des biosenseurs sur une microplaque 52
2.4 Exemple de cinétiques d'émission de photons mesurées par le luminomètre avec la souche JW3596 exposée à différentes concentrations de Cd(II) c^*_{M} 53
2.5 Principe de fonctionnement d'un cytomètre à flux continu équipé d'un trieur de cellules marquées par fluorescence 54
2.6 Représentation schématique d'une dilution en cascade 55
2.7 Représentation schématique du protocole de purification de la MBP-MT de la solution (schéma de Flayac J.) 56
2.8 **(A)** Exemple de courbe $E = f(t)$ obtenue à l'issue de l'étape de réoxydation
(B) Dérivée du résultat brut $dt/dE = f(E)$ 57
2.9 Exemple de calibration par SCP reliant le temps de réoxydation τ^* à la concentration de métal libre et labile c^*_{M} 58
2.10 Représentation schématique d'un montage voltammétrique 59

2.12 Représentation de la distribution ionique et du potentiel électrostatique dans l'environnement proche des surfaces dures 64
2.13 Illustration des flux de liquide contenu dans une cellule de mesure fermée sous l'action d'un champ électrique 65
2.14 Représentation de la distribution ionique et du potentiel électrostatique dans l'environnement proche des surfaces dures 66

Acronymes

AFM	Atomic Force Microscopy
AGNES	Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping
ATP	Adénosine TriPhosphate
BLM	Biotic Ligand Model
CRPG	Centre de Recherche Pétrographiques et Géochimiques
DCE	Double Couche Electrique
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ETM	Elements Traces Metalliques
FIAM	Free Ion Activity Model
FMN	Flavine MonoNucléotide
$FMNH_2$	forme réduite de la Flavine MonoNucléotide
FT	Flow Through
GFP	Green Fluorescent Protein
GPES	General Purpose for Electrochemical System
GSIM	Gill Surface Interaction Model
HMM	Heavy Metal Medium
IC_{50}	half maximal Inhibitory Concentration
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	Luria Broth
LC_{50}	median Lethal Concentration
MBP	Maltose Binding Protein
MBP-MT	Maltose Binding Protein - MetalloThionéine
MOPS	acide 3-MOrpholino-1-PropaneSulfonique
MT	Métallothionéine
NADPH	Forme réduite de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
nGGM	new Glycerol-Glycerophosphate Medium
RDE	Rotative Disk Electrode
ROS	Reactive oxygen species
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
SCP	Stripping Chronopotentiometry
TMF	Thin Mercury Film
TMFE	Thin Mercury Film Electrode
UFC	Unité Formant de Colonie

Liste des principaux symboles

Symbole	Signification	Unité
a	Distance d'approche de centre à centre de charge la plus proche entre M et L avant la formation de complexe de sphère externe	m
a	Rayon du coeur dur imperméable au solvant d'une particule	m
a	Rayon de la cellule ($a + d = r_0$)	m
Bn	Nombre de biodisponibilité	$\varnothing$
c_{L}	Concentration en ligand	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$c_{\mathrm{L,t}}$	Concentration totale en ligand	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
c_{M}	Concentration en métal libre	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
c^*_{M}	Concentration en métal libre en solution	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$c^*_{\mathrm{M^0}}$	Concentration constante de cadmium dans le film de mercure	$\mathrm{mol\,L^{-1}}$
c^0_{M}	Concentration en Cd(II) à la surface de l'électrode	$\mathrm{mol\,L^{-1}}$
$c^*_{\mathrm{M}}(0)$	Concentration de métal en solution à $t = 0$	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$c^0_{\mathrm{M^0}}$	Concentration en cadmium amalgamé dans l'électrode de mercure	$\mathrm{mol\,L^{-1}}$
c^a_{M}	Concentration en M aux abords de la surface	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
c_{ML}	Concentration en complexe métallique	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$\bar{c}^a_{\mathrm{M}}(t)$	est égal à $c^a_{\mathrm{M}}/K_{\mathrm{M}}$	$\varnothing$
$\bar{c}_{\mathrm{M}}$	Concentration en métal libre moyennée sur le volume totale de la solution considérée	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$\bar{c}_{\mathrm{MS}}$	Concentration en complexe Metal - Site réactif MS	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$\bar{c}^{\lambda}_{\mathrm{MS}}$	Concentration moyenne en complexes métal-site réactif dans la couche de réaction macroscopique	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$\bar{c}^{\lambda}_{\mathrm{S}}$	Concentration moyenne de sites ligands dans la zone opérationnelle de la couche réactionnelle à l'échelle macroscopique	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
d	Epaisseur de surstructures/couche molle qui recouvre la cellule/particule	m
d	Déflexion du levier (AFM)	m
$\bar{D}$	Coefficient de diffusion moyen des différentes formes de M pondérées par leurs concentrations respectives	$\mathrm{m\,s^{-1}}$
$\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}/\mathrm{dt}$	Dérivée temporelle de la luminescence	$\mathrm{cts\ s^{-2}}$
D_{M}	Coefficient de diffusion du métal	$\mathrm{m^2\,s^{-1}}$
$D_{\mathrm{M,out}}$	Coefficient de diffusion du métal dans le milieu	$\mathrm{m^2\,s^{-1}}$
D_{p}	Coefficient de diffusion de la particule	$\mathrm{m^2\,s^{-1}}$

Symbole	Signification	Unité
e	Charge élémentaire d'un électron	C
$E^{0'}$	Potentiel standard du couple redox	V
E_1	Potentiel appliqué	V
E_d	Potentiel de déposition appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence	V
F	Constante de Faraday	$\mathrm{C\,mol^{-1}}$
f_B	Facteur d'accumulation de Boltzmann	$\varnothing$
$\bar{f}_{\mathrm{el,(a\ ou\ d)}}$	Facteur qui corrige la diffusion de M vers la particule de l'accélération/ralentissement qui dépend du profil de potentiel électrostatique à travers l'interface particule-milieu	$\varnothing$
F	Force d'interaction entre la pointe et la surface	N
I_d^*	Courant de déposition du métal dans l'amalgame de mercure	A
I_s	Courant de réoxydation du métal depuis l'amalgame de mercure vers la solution	A
J_diff	Flux de diffusion des espèces métalliques depuis le milieu vers une surface accumulatrice	$\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$
J_diff^*	Flux de diffusion maximal de toutes les espèces métalliques présentes en solution (libre en solution, libre dans la couche molle de la particule, le complexe métallique de sphère interne MS...)	$\varnothing$
J_e	Flux d'excrétion de métal depuis le milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire	$\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$
J_kin	Flux de métal provenant de la libération de M par dissociation du complexe ML dans l'environnement proche de la surface accumulatrice	$\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$
J_M	Flux de métal depuis le milieu vers la surface biologique	$\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$
J_u	Flux d'internalisation des métaux	$\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$
J_u^*	Flux d'internalisation maximal des métaux	$\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$
K	Constante de stabilité du complexe	$\mathrm{m^3\,mol^{-1}}$
K'	Constante de stabilité apparente du complexe $= \bar{K}^*$	$\varnothing$
$\bar{K}^*$	Constante de stabilité apparente du complexe ($= K'$)	$\varnothing$
k_a	Constante cinétique d'association de M avec L	$\mathrm{m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}}$
k_a'	Constante cinétique d'association apparente de M avec L	$\mathrm{s^{-1}}$
k_a^os	Constantes d'association de sphère externe de M sur un ligand L	$\mathrm{m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}}$
$k_\mathrm{a,p}$	Constante cinétique d'association d'un métal avec une particule	$\mathrm{m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}}$
k_B	Constante de Boltzmann	$\mathrm{J\,K^{-1}}$
k_c	Constante de raideur du levier (AFM)	$\mathrm{N\,m^{-1}}$
k_d	Constante cinétique de dissociation de M avec L	$\mathrm{s^{-1}}$
k_d^os	Constantes de dissociation de sphère externe de M à partir d'un ligand L	$\mathrm{s^{-1}}$
$k_\mathrm{d,p}$	Constante cinétique de dissociation d'un métal avec une particule	$\mathrm{s^{-1}}$
k_e	Constante cinétique d'excrétion	$\mathrm{s^{-1}}$

Symbole	Signification	Unité
K_{H}	Coefficient d'adsorption de Henry	m
c_{s}	Concentration intraparticulaire de sites réactifs (pour des complexants nanoparticulaires 3D)	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
k_{int}	Constante cinétique d'internalisation	$\mathrm{s^{-1}}$
K_{int}	Constante de stabilité intrinsèque des complexes de sphère interne	$\mathrm{m^3\,mol^{-1}}$
K_{M}	Constante de Michaelis-Menten	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
K^{os}	Constante de stabilité du complexe de sphère externe	$\mathrm{m^3\,mol^{-1}}$
k_{w}	Constante de déshydratation du métal M	$\mathrm{s^{-1}}$
l_C	Distance de séparation des sites réactifs chargés	m
l_{DL}	Epaisseur de la double couche électrique intraparticulaire	m
N_{ox}	Quantité de métal réoxydé dans le milieu après une étape de stripping	mole
N_{red}	Quantité de métal amalgamé dans le film de mercure après l'étape de réduction	mole
N_{S}	Nombre de sites portés par une particule	$\varnothing$
R	Constante des gaz parfaits	$\mathrm{J\,mol^{-1}\,K^{-1}}$
r_0	Rayon de la surface accumulatrice/électrode	m
r_{c}	Rayon d'une cellule de Kuwabara	m
r_{p}	Rayon total d'une particule	m
R_{S}	Résistance au passage transmembranaire de M depuis le milieu extérieur vers le milieu intracellulaire	$\mathrm{m\,s^{-1}}$
R_{T}	Résistance au transport de M depuis le milieu vers la biosurface	$\mathrm{m\,s^{-1}}$
S_{a}	Surface du microorganisme	$\mathrm{m^2}$
T	Température	K
t_{d}	Temps de déposition du métal dans l'amalgame de mercure	s
U^{os}	Energie d'interaction électrostatique entre M et L	$\varnothing$
V_{p}	Volume d'une cellule	$\mathrm{m^3}$
V_{soft}	Volume de la couche molle qui englobe le microorganisme	$\mathrm{m^3}$
Y	Ratio des concentration $c^*_{\mathrm{M^0}}/c^*_{\mathrm{M}}$ exprimé par l'équation de Nernst	$\varnothing$
y_{D}	Potentiel électrostatique de Donnan à l'équilibre	$\varnothing$
z_{L}	Valence du ligand	$\varnothing$
z_{M}	Valence du métal	$\varnothing$
α	Paramètre d'hétérogénéité de distribution de charge et de matériel membranaire perméable	$\varnothing$
β_{a}	Facteur d'accumulation de Boltzmann	$\varnothing$
β_{D}	Facteur d'accumulation de Boltzmann dans les conditions de Donnan	$\varnothing$
δ	Epaisseur de la couche de diffusion	m
$\bar{\delta}$	Epaisseur de la couche de diffusion moyenne à l'échelle macroscopique	m

Symbole	Signification	Unité
γ	Facteur (compris entre 0 et 1) qui reflète le degré d'exclusion d'une nanoparticule de la couche de réaction macroscopique	$\varnothing$
Γ_{M}	Concentration surfacique de métal adsorbé	$\mathrm{mol\,m^{-2}}$
ε	Permittivité relative de l'eau	$\varnothing$
ε_{o}	Permittivité diélectrique du vide	$\mathrm{C^2\,J^{-1}\,m^{-1}}$
κ	Réciproque de la longueur de Debye	$\mathrm{m^{-1}}$
κ_{m}^{-1}	Epaisseur de la longueur de Debye dans la couche molle	m
ξ	Variable d'intégration muette	$\varnothing$
$1/\lambda$	Longueur de pénétration du fluide dans la couche molle d'une particule	m
$\bar{\lambda}$	Epaisseur de la couche de réaction de la surface accumulatrice macroscopique	m
μ	Epaisseur de la couche de réaction, dans laquelle la libération de M provenant de la dissociation du complexe ML aux abords de la surface accumulatrice participe au flux de métal	m
ρ	Densité volumique de charge dans une particule	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
ρ_{D}	Densité volumique de charge dans les conditions de Donnan	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
ρ_{DL}	Densité volumique de charge dans la double couche électrique	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
$\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$	Concentration de sites réactifs portés par la protéine intracellulaire	$\mathrm{mol\,m^{-3}}$
τ_{M}	Fenêtre temporelle pendant laquelle le métal est sous forme libre	s
τ_{L}	Temps caractéristique du passage transmembranaire de M	s
τ_{E}	Temps caractéristique du transport de M à travers le milieu jusque dans le milieu intracellulaire	s
τ^*	Temps de réoxydation des ions métalliques depuis l'amalgame vers la solution	s
τ_{d}	Temps caractéristique de déplétion des métaux du milieu	s
$\phi_{\mathrm{u}}(t)$	Concentration de métal total internalisé	$\mathrm{mol\,m^{-2}}$
ϕ_{u}^0	Concentration de métal total internalisé à $t = 0$	$\mathrm{mol\,m^{-2}}$
φ	Fraction volumique en cellules	$\varnothing$
φ^*	Fraction volumique critique en cellules	$\varnothing$
ψ_{D}	Potentiel électrostatique de Donnan	V
$\psi^{*\mathrm{OS}}$	Potentiel électrostatique au niveau de la sphère externe des complexes de surface formés	V
ζ	Potentiel électrostatique au plan de cisaillement (potentiel zêta)	V
Ω_1	Paramètre adimensionnel qui dépend de la distribution du potentiel électrostatique à travers la biointerface	$\varnothing$
Ω_2	Paramètre adimensionnel qui dépend de la distribution du potentiel électrostatique à travers la biointerface	$\varnothing$

Sachez vous éloigner car,
lorsque vous reviendrez à votre travail,
votre jugement sera plus sûr.

LÉONARD DE VINCI

Remerciements

Tout d'abord, je remercie mes rapporteurs, Mme Christel Hassler, Professeure à l'Université de Genève et M. Pierre Labadie, Chercheur CNRS à l'Université de Bordeaux. Je remercie également mes examinateurs qui ont accepté d'évaluer mes travaux de recherche : M. Gérald Thouand, Professeur à l'Université de Nantes et Patrick Billard, Maître de Conférences à l'Université de Lorraine, avec un remerciement particulier à ce dernier pour m'avoir épaulé tout au long de cette thèse sur la partie microbiologie, nos échanges sur le sujet ont toujours été riches d'enseignement. Enfin, je remercie Christophe Pagnout de son aide et de sa présence parmi les membres du jury. Merci à Fabien Thomas, directeur du LIEC à mon arrivée et à Christian Mustin, directeur adjoint, de m'avoir accueilli dans les locaux du LIEC Charmois et Aiguillettes.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse Jérôme Duval pour m'avoir guidé sur ce beau sujet interdisciplinaire. J'ai énormément appris grâce à ses conseils et sa passion pour ses travaux de recherche. Je remercie aussi ma co-directrice de thèse Elise Rotureau pour son soutien et son aide au quotidien, notamment dans les journées de manipe à rallonge, à traverser le laboratoire de long en large, à régler les nombreux problèmes de voltammétrie... La liste est longue !

J'adresse un merci tout particulier à Renaud Gley qui m'a beaucoup aidé pour les manipes, qui démarraient souvent tôt le matin et se prolongeaient jusque tard le soir, de m'avoir soutenu dans les moments difficiles et d'avoir supporté mes changements d'humeur ! J'ai apprécié ces trois années dans lesquelles on a aussi passé du bon temps en randonnée accompagné de nos alsaciens préférés Laurie Wolff la baroudeuse et Anthony Luttmann notre apiculteur rêveur, à refaire le monde, boire des bières, du vin et manger du fromage. Je remercie également tous mes collègues et amis avec lesquels j'ai partagé des bons moments au repas du midi et au bar (et parfois en randonnée !) : Fabrice Fraysse (le toulousaing !), Noémie Janot, Bert-Jan Groenenberg, Isabella Zelano, Hélène Guénet, Maxime Geaymond, Alba Otero-Fariña, Elise Vouriot, Erwin Henry, Tiffany Guyonnet (Tiff !), Céline Caillet et Céline Clanché. Merci aux anciens doctorants du Charmois Mathieu Le Meur, Hussein Kanbar, Mariam Moussa, Tarek Arraj pour les conversations que l'on a pu avoir entre deux manipes.

Je remercie bien sûr tout le personnel du LIEC Charmois et d'OTELO que je n'ai pas encore cité pour l'aide apportée à de nombreuses reprises et qui ont tous contribué au bon déroulement de cette thèse : Audrey Beaussart, Isabelle Bihannic, Emmanuelle Montarges-Pelletier et Manuel Pelletier (ManuE et Manu !), Christophe Gautier, Allan Bauer (merci pour tes coups de main !), Angelina Razafitianamaharavo, Marc Offroy, Tatiana Görner, Paulo Pinheiro, Sophie Fournier, Sophie Romain, Christine Aussenac, Yves Waldvogel, Dominique Marandon, Pierre-Yves Arnould et Elisabeth Meyer. Un merci tout particulier à Caroline François pour son soutien dans les périodes difficiles. Merci à toute l'équipe du LCPME Charmois pour m'avoir hébergé et aidé sur mes premières manipes de microbio !

Mes nombreux passages à Aiguillettes m'ont permis de faire de belles rencontres, de passer de beaux week-ends dans les Vosges, de bons moments à la cafet' le midi ou en pause. La bonne humeur et l'ambiance agréable de travail étaient toujours au rendez-vous. En espérant n'oublier personne, je remercie bien sûr tous les doctorants/post-doctorants qui se sont succédés :

Quentin Vinvent (Quentinou), Charlotte Berthelot (je ne t'oublie pas Robin Dagois !), notre président Fadi Hajj, Amélia Bourceret (Mélo), Johanne Cennerazzo (Jojo), Dimitri Ubersfeld (Dimi), Romain Vallée (Chouchou), Nicolas Grosjean (Nini), Céline Gaullier, Kevin Billaudel, Florian Lemmel, Hu Ruyho (Yuyu), Axel Lebreton, Clotilde Johansson, Aurélie Oswald, Marine Boulanger et Bérénice Ranc. Je salue les doctorants du LSE que j'ai pu rencontrer au cours des quelques soirées passées en votre compagnie : Anne Blanchart, Clémentine Lapie et Séverine Lopez.

Je n'oublie pas tous les permanents du site : Thierry Béguiristain (Titi), Cécile Lorentz, Aurélie Cébron, Christine Friry, Anne Poszwa, Damien Blaudez, Alexis De Junet, Coralie Biache, Asfaw Zegeye, Sylvie Dousset, Pierre Faure, Laurence Mansuy-Huault, Corinne Leyval, Géraldine Kitzinger, David Billet et Hervé Marmier. Je remercie aussi Bénédicte Sohm et Justine Flayac de Bridoux pour leur aide apportée sur la purification de métallothionéine.

Le soutien de mon entourage a joué un rôle primordial dans la réussite de cette thèse. J'ai la chance d'avoir beaucoup d'amis, rencontrés notamment au cours de ma scolarité à l'ENGEES, en prépa ATS à Dijon, en BTS à Cosne-sur-Loire, ou dans ma ville d'origine de Joigny. Je ne peux pas tous les citer car la liste serait trop longue. Merci à tous pour votre soutien et vos encouragements. Je tiens à en nommer certains qui m'ont aidé dans la dernière droite de rédaction de ce manuscrit, notamment Roman Duprey et Romain Machavoine. Je salue les petits Dreure, (le Jean-Claude, la Gisèle et l'Eloïse) pour l'amitié et le soutien qu'ils apportent depuis toujours à ma famille et moi, ils ont participé à ma réussite.

Enfin, je tiens à remercier ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes études, et spécialement Aurélien Présent, mon cousin avec qui j'ai partagé la plus grande partie. Je remercie mes parents pour leurs encouragements et leur soutien sans faille depuis le début, toujours prêts à m'aider quelles que soient les difficultés rencontrées.

La rédaction de ce manuscrit clôt non sans soulagement plus de trois ans de travail et d'efforts particulièrement intenses. La thèse est une remarquable expérience professionnelle et de vie, un véritable ascenseur émotionnel, avec constamment des doutes, des remises en question, des succès, des joies et des déceptions. Je termine mon propos par cette image qui à mon sens résume bien la vie d'un doctorant :

FIGURE 1 – Issue du site `http://phdcomics.com`

Introduction Générale

Au cours du siècle dernier, la demande sans cesse croissante des ressources métalliques dans les pays développés et en voie de développement a accru les risques d'exposition des organismes vivants aux métaux [1]. En effet, les activités anthropiques comme la production agricole intensive, la métallurgie, la gestion des déchets industriels et domestiques sont des sources de contamination métallique dans l'environnement [2]. Cette contamination entre dans les cycles biogéochimiques des métaux, lesquels impliquent les organismes vivants comme les microorganismes. Les processus aux interfaces biologiques qui régissent l'interaction de ces métaux avec les microorganismes dépendent de la nature des espèces métalliques, des conditions physicochimiques du milieu, des organismes et des réponses cellulaires associées. Dans certaines conditions biophysicochimiques, l'exposition des microorganismes aux métaux peut aussi constituer un stress et induire des effets toxiques. Dans un contexte environnemental, la complexité des processus aux interfaces est plus grande du fait de la variabilité des conditions physicochimiques qui induisent des situations hors-équilibre dans les milieux d'exposition [3]. L'établissement du lien entre ces processus aux interfaces et la toxicité d'un métal envers un organisme constitue un défi scientifique majeur. La prédiction de la toxicité des métaux dans l'environnement nécessite de prendre en compte l'ensemble des processus biophysicochimiques aux interfaces qui gouvernent l'assimilation des métaux, à savoir : les conditions physicochimiques des milieux, les différences structurelles des membranes biologiques des microorganismes et la réponse cellulaire subséquente à une adsorption et/ou une internalisation des métaux dans le compartiment intracellulaire.

Dans la littérature, plusieurs méthodes ont été décrites afin d'évaluer la toxicité des métaux envers les organismes. Une première approche fondée sur des tests dose-réponse consiste à exposer dans des conditions précises un organisme modèle à un contaminant métallique et à en mesurer les effets toxiques. Afin de limiter la variabilité des résultats, ces tests ont été standardisés. Plusieurs modèles thermodynamiques ont également été développés afin de déterminer la spéciation des métaux dans le milieu d'exposition et conséquemment, de lier la concentration en complexes métalliques formés sur les sites ligands biotiques avec la mesure des effets toxiques obtenus par les tests dose-réponse. Bien que ces tests prouvent leur utilité dans l'estimation d'une concentration métallique à partir de laquelle les effets toxiques sont observés, ces derniers ne renseignent pas sur les processus dynamiques aux interfaces qui génèrent les effets toxiques, et ne sont valables que dans des conditions restreintes d'exposition aux métaux. Une deuxième approche fondée sur l'évaluation des flux de métaux aux interfaces biologiques tient compte de la dynamique des processus aux interfaces tels que (i) le transport des espèces métalliques depuis le milieu vers la biosurface, (ii) le passage transmembranaire des métaux et (iii) la déplétion des métaux du milieu. Dans l'expression des flux des espèces métalliques, cette approche prend en considération la perturbation de la dynamique de complexation des espèces métalliques aux abords de la surface biologique accumulatrice de métaux (due à la consommation des ions métalliques par un microorganisme) et des effets électrostatiques (entre autres) du système à l'échelle des interfaces.

Dans ces deux approches, la réponse cellulaire à l'échelle moléculaire est souvent omise, bien qu'essentielle dans la compréhension des processus aux interfaces qui mènent à l'assimilation

des métaux. En fonction de la nature des organismes et des espèces métalliques, les réponses cellulaires varient. Certaines ont pour but de faciliter l'assimilation des métaux via par exemple la production de transporteurs membranaires et de composés organiques (comme des sidérophores ou de l'acide oxalique) dans la phase extracellulaire, ou de limiter leur intégration dans les cycles biochimiques cellulaires par le déclenchement de mécanismes de résistance. Plusieurs de ces mécanismes ont été identifiés comme le piégeage extra/intracellulaire des métaux (métallothionéines, inclusions, granules extracellulaires), les fortes capacités d'adsorption membranaire et la production de pompes efflux de métaux. Ainsi, la modification de la dynamique de partition des métaux aux interfaces et leur biodisponibilité par les réponses cellulaires doivent être prises en compte.

Les différents processus physicochimiques ou biologiques opérant dans le milieu extracellulaire, au niveau de l'interface biologique et dans le milieu intracellulaire sont interdépendants et conditionnent la biodisponibilité des métaux envers les organismes. De récents travaux [4, 5, 6] fondés sur cette définition de la biodisponibilité ont été menés par l'usage systématique d'un couplage entre développement théorique et confrontation avec des mesures expérimentales. Cette stratégie de recherche a permis de reconstituer la dynamique de partition des métaux à une interface biologique en tenant compte du flux de diffusion conductif des espèces métalliques vers la biosurface, de l'adsorption des métaux et du flux d'internalisation. Récemment, la théorie décrite ci-desssus a été étendue afin de prédire l'impact de la réponse cellulaire à un stress métallique par excrétion des métaux internalisés vers le milieu extracellulaire [5].

En conséquence, les objectifs de ces travaux de thèse sont d'accroître les connaissances sur la dynamique de partition des métaux et de leur biodisponibilité aux interfaces microbiennes par (i) l'extension d'un modèle théorique à des situations de réponses cellulaires comme la complexation intracellulaire des métaux (ii) l'utilisation d'un biosenseur bactérien visant à évaluer cette dynamique de biopartition interfaciale des métaux et leur biodisponibilité. La méthodologie systématiquement utilisée repose sur le couplage entre développement théorique et confrontation avec des mesures expérimentales. L'organisation du manuscrit de thèse suit le plan suivant :

Le premier chapitre constitue une synthèse bibliographique des travaux publiés sur l'évaluation de la biodisponibilité des métaux traces de l'environnement. Nous verrons que cette biodisponibilité détermine en partie la toxicité des métaux envers les organismes. Deux approches décrites dans la littérature sont passées en revue, l'une fondée sur la détermination de la quantité de métal sorbée à la surface biologique dans des conditions d'équilibre thermodynamique, l'autre sur l'évaluation des flux de métaux depuis le milieu vers la surface biologique et le milieu intracellulaire dans des conditions d'équilibre et hors-équilibre. L'un des modèles appartenant à cette dernière approche sera détaillé. Brièvement, l'intérêt des biosenseurs dans l'évaluation de la biodisponibilité des métaux envers une cellule sera discuté. Le deuxième chapitre est consacré à la description des différents travaux expérimentaux menés dans le cadre de cette thèse. Plus précisément, des détails sont apportés sur les souches bactériennes modèles génétiquement modifiées et qui expriment (i) une protéine fortement chélatante de métaux au niveau intracellulaire et (ii) différentes tailles de lipopolysaccharides de surface. Différentes techniques ont été utilisées afin de déterminer les capacités d'internalisation et de complexation intracellulaire de Cd(II) par les bactéries ainsi que leurs propriétés de surface telles que les capacités de biosorption des métaux, les propriétés électrostatiques d'interfaces microbiennes et leur morphologie.

Le chapitre 3 est consacré à l'analyse de la dynamique de partition des métaux aux interfaces bactériennes en présence de chélatants intracellulaires. Pour ce faire, un modèle théorique fondé sur une approche d'évaluation des flux de métaux aux interfaces biologiques (décrit dans le paragraphe 1.4 du chapitre 1) a été étendu afin d'interpréter mécanistiquement et quantitativement l'impact de ces chélatants sur la dynamique de partition des métaux. L'extension de ce formalisme a consisté à intégrer l'impact d'une complexation intracellulaire des métaux dans le compartiment intracellulaire sur la dynamique de partition des métaux, à l'échelle de la suspension bactérienne. La dynamique de complexation des métaux dans le milieu intracellulaire

induite par des ligands protéiques a été rationalisée selon le mécanisme d'Eigen généralisé [7, 8, 9].

Dans le chapitre 4, ce modèle théorique a été confronté à des données expérimentales issues de l'exposition de deux souches d'*Escherichia coli* à une solution faiblement complexante et contenant des ions cadmium. Ces deux souches ont été mutées afin de limiter leurs capacités d'excrétion, et l'une d'entre elles comporte des protéines fortement chélatrices de métaux dans le compartiment intracellulaire. Le suivi cinétique de la déplétion des métaux dans le milieu extracellulaire par des techniques électrochimiques a été effectué à différentes fractions volumiques en cellules. L'exploitation de ces données a permis de reconstituer la dynamique de partition des métaux aux interfaces bactériennes, et a mis en évidence l'impact significatif d'une complexation intracellulaire sur les flux de métaux aux interfaces microbiennes.

Un dernier chapitre (chapitre 5) offre un nouvel outil d'interprétation de la biodisponibilité des métaux envers une cellule bactérienne par l'exploitation de données expérimentales issues de biosenseurs luminescents sensibles aux métaux. En posant l'hypothèse que le signal biosenseur reflète les flux d'internalisation des métaux depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, un nouveau développement théorique a été couplé au formalisme précédemment décrit. Ce couplage a également été confronté avec succès à des données expérimentales issues de l'exposition de cadmium à des biosenseurs construits à partir de trois souches mutantes d'*Escherichia coli* possédant différentes tailles de lipopolysaccharides de surface.

Enfin, une conclusion du manuscrit synthétisera les avancées principales réalisées ainsi que les perspectives envisagées.

En fin de manuscrit, une annexe est jointe afin de rappeler brièvement les bases de la microbiologie nécessaires à la compréhension de ce manuscrit. Une des publications scientifiques à laquelle j'ai participé est également ajoutée.

Références

[1] Nordberg, G. F., Fowler, B. A. et Nordberg, M. *Handbook on the toxicology of metals*. Fourth. T. I & II. Academic Press, 2015, p. 1–1385.

[2] Gadd, G. M. « Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation ». In : *Microbiology* 156.3 (2010), p. 609–643.

[3] Bjerregaard, P., Andersen, C. B. I. et Andersen, O. « Ecotoxicology of Metals - Sources, Transport, and Effects on the Ecosystem ». In : *Handbook on the Toxicology of Metals*. Fourth. Academic Press, 2015. Chap. 21, p. 425–459.

[4] Duval, J. F. L. et Rotureau, E. « Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases: impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 16.16 (2014), p. 7401–7416.

[5] Rotureau, E., Billard, P. et Duval, J. F. L. « Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal depletion kinetics at various cell concentrations: theory and application ». In : *Environmental Science and Technology* 49.2 (2015), p. 990–998.

[6] Duval, J. F. L., Paquet, N., Lavoie, M. et Fortin, C. « Dynamics of metal partitioning at the cell-solution interface: implications for toxicity assessment under growth-inhibiting conditions ». In : *Environmental Science and Technology* 49.11 (2015), p. 6625–6636.

[7] Van Leeuwen, H. P. et Buffle, J. « Chemodynamics of aquatic metal complexes: from small ligands to colloids ». In : *Environmental Science & Technology* 43.19 (2009), p. 7175–7183.

[8] Duval, J. F. L. « Metal Speciation Dynamics in Soft Colloidal Ligand Suspensions. Electrostatic and Site Distribution Aspects ». In : *The Journal of Physical Chemistry A* 113.11 (2009), p. 2275–2293.

[9] Buffle, J., Zhang, Z. et Startchev, K. « Metal Flux and Dynamic Speciation at (Bio)interfaces. Part I: Critical Evaluation and Compilation of Physicochemical Parameters for Complexes with Simple Ligands and Fulvic/Humic Substances ». In : *Environmental Science & Technology* 41.22 (2007), p. 7609–7620.

1 | Synthèse bibliographique

1.1 Problématique générale **6**
1.1.1 Définitions 6
1.1.2 Stratégies d'évaluation de la toxicité des métaux 8
1.2 Modèles thermodynamiques développés pour la détermination de la bioassimilation des métaux **9**
1.2.1 Free Ion Activity Model 9
1.2.2 Gill Surface Interaction Model 10
1.2.3 Biotic Ligand Model 11
1.2.4 Extension du modèle BLM 13
1.2.5 Limitations et critiques du modèle BLM 14
1.3 Modèles fondés sur la quantification des flux de métaux aux interfaces biologiques **15**
1.3.1 Concept de labilité 15
1.3.2 Mécanisme d'Eigen-Fuoss pour des ligands moléculaires 18
1.3.3 Mécanisme d'Eigen étendu aux ligands particulaires 20
1.3.4 Particules molles 21
1.3.5 Impact de la densité de charge sur les cinétiques d'association/dissociation du métal avec une nanoparticule molle 23
1.3.6 Impact de la taille des particules sur les cinétiques d'association des métaux avec les sites réactifs 24
1.3.7 Conséquences de la dynamique de complexation des métaux avec des ligands particulaires sur l'évaluation de la labilité à une interface accumulatrice de métaux 26
1.3.8 Conséquences sur la biodisponibilité des métaux 27
1.4 Approche théorique fondée sur une équation généralisée de Best . . . **29**
1.4.1 Cadre du modèle 30
1.4.2 Extension du modèle : excrétion du métal 33
1.4.3 Relation entre dynamique de partition des métaux et tests de toxicité par inhibition de croissance 35
1.5 Utilisation de biosenseurs comme outils de mesure de la dynamique de partition et de la biodisponibilité des métaux **36**
1.6 Bilan et axes de recherche **38**

Dans ce chapitre bibliographique seront présentés les principales notions et concepts nécessaires à la compréhension du manuscrit. Ce chapitre est organisé de la façon suivante : la première partie est dédiée à la définition des termes de métaux traces et de biodisponibilité, et à la description de la stratégie employée pour l'évaluation de leur toxicité. Une deuxième partie est consacrée à l'évaluation de la biodisponibilité des métaux par une approche thermodynamique. Trois modèles décrits dans la littérature seront commentés et leurs limites seront mises en évidence. Nous nous pencherons ensuite sur une seconde approche de la biodisponibilité fondée sur l'évaluation des flux de métaux aux interfaces consommatrices. Dans cette partie, les concepts théoriques de labilité et de dynamique de complexation des métaux aux interfaces accumulatrices en présence ou non de nanoparticules seront détaillés. Une quatrième partie sera destinée à l'explication de l'approche théorique développée au laboratoire afin de reconstituer la dynamique de partition des métaux aux biointerfaces, et dont les possibilités ont été étendues à l'occasion de cette thèse. Puis, une présentation succincte du fonctionnement de senseurs biologiques sensibles aux métaux et capables d'évaluer leur biodisponibilité sera réalisée. Enfin, une dernière partie annoncera les deux grands axes de travail autour desquels s'articulent ces travaux de recherche.

1.1 Problématique générale

1.1.1 Définitions

Dans les sciences environnementales, les Éléments Traces Métalliques (ETM) font référence aux éléments d'origine naturelle ou anthropique trouvés à de faibles concentrations qui perturbent le fonctionnement cellulaire des organismes vivants [1]. Le rôle des métaux est prédominant chez les organismes vivants. On estime en effet qu'un quart à un tiers des protéines comportent des ions métalliques dont le rôle est essentiel à leur fonctionnement [2]. Certains comme le Fe sont fréquemment liés à des protéines impliquées dans le transfert d'électrons et le métabolisme de l'oxygène. D'autres sont des cofacteurs d'enzymes indispensables pour la catalyse de certaines réactions, comme le Mn utilisé par les superoxydes dismutases présentes dans les bactéries photosynthétiques ou encore le Ni présent dans neufs enzymes différentes (uréase, hydrogénase et les superoxydes dismutases). Toutefois, il est important de distinguer ici les métaux dits "toxiques" (parfois appelés métaux lourds) des métaux essentiels à l'activité cellulaire (les oligoéléments), comme le Fe, le Cu, le Co, le Mn et le Zn. Ces derniers entrent dans la composition de protéines nécessaires à la physiologie de la cellule dans une gamme de concentrations donnée [2]. Le Zn par exemple est nécessaire à l'activité des ARN et ADN polymérases, pour son rôle structurel dans certaines protéines, et son association avec les ribosomes. En revanche, les métaux comme le Pb, le Hg ou encore l'Al ne jouent aucun rôle dans l'activité cellulaire [3] et peuvent occasionner des effets dits "toxiques", même à faible concentration. La distinction entre ces métaux essentiels et toxiques peut parfois être plus délicate pour certains éléments comme le Cd. Ce dernier engendre des effets "toxiques" chez la plupart des organismes vivants, bien que dans de rares cas (microalgues), le Cd est devenu un cofacteur de substitution du Zn [4, 5]. Afin de conserver des concentrations intracellulaires constantes en oligoéléments, les cellules biologiques ont développé au fil de l'évolution des mécanismes qui permettent de réguler ces concentrations. L'ensemble de ces mécanismes est regroupé sous le terme d'homéostasie. Elle consiste à la régulation des concentrations intracellulaires des métaux afin d'assurer le bon fonctionnement des cellules. Pour ce faire, de nombreux processus peuvent être modulés, comme le transport des métaux depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (et vice-versa) ou le stockage intracellulaire des métaux. Les cellules sont également capables de ralentir certains processus biologiques dépendant des métaux ou encore d'activer d'autres voies métaboliques alternatives non dépendantes de la présence de métaux [6]. L'homeostasie du Zn intracellulaire permet par exemple de réguler les concentrations intracellulaires dans des environ-

nements où les concentrations en Zn sont faibles ou élevées, ce qui permet aux cellules d'éviter une carence ou des concentrations élevées toxiques [7]. Dans la littérature, le terme de "toxicité" d'un métal envers une cellule est défini comme étant sa capacité à altérer la physiologie de la cellule, par une adsorption simple et/ou par son internalisation. Dans la plupart des cas, le métal doit pénétrer le milieu intracellulaire pour induire une toxicité [8]. Divers mécanismes mènent à l'internalisation des métaux. La ressemblance de certains cations métalliques essentiels avec les ETM en terme de taille et de charge (comme Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+}) facilite leur internalisation au moyen de pompes actives. Pour de fortes concentrations en métaux dans le milieu extracellulaire, des transporteurs non spécifiques peuvent également permettre leur passage transmembranaire de façon passive. Une fois dans le milieu intracellulaire, trois voies d'actions des métaux internalisés menant à une toxicité ont été identifiées [8]. Premièrement, les cations métalliques qui ont un nombre atomique élevé (Cd^{2+}, Hg^{2+} et Ag^{+}) ont tendance à se lier avec des groupes thiol (groupement -SH) portés par des enzymes et à prendre la place des oligoéléments (Cd^{2+} avec Zn^{2+} et Ca^{2+} par exemple) au cœur des protéines, ce qui perturbe leur fonctionnement. Deuxièmement, pour les bactéries Gram négatif, les métaux lourds peuvent se lier au glutathion, une protéine riche en groupe thiol. Le complexe ainsi formé est oxydé par l'oxygène dissous pour former du bisglutathion oxydé, à son tour réduit par une réaction impliquant le cofacteur NADPH. Cette augmentation de la consommation du cofacteur entraîne un stress oxydatif délétère pour la physiologie de la cellule. Enfin, des oxyanions peuvent se complexer avec des métaux et former des radicaux.

Contrairement à certains polluants organiques, les métaux ne peuvent pas être dégradés. Plusieurs mécanismes de défense fréquemment actifs simultanément ont été développés par les cellules pour limiter les effets toxiques des métaux internalisés [3, 8] :

- l'excrétion des métaux présents dans le cytoplasme vers le milieu extracellulaire par la production de pompes efflux (détails dans les chapitres 3 et 4),
- le stockage intracellulaire par complexation des métaux par des protéines chélatrices riches en groupe thiol (le glutathion ou la métallothionéine par exemple, cf. Chapitre 3 et 4),
- la formation de précipités/d'inclusions dans le milieu intracellulaire (glutathion, phytochelatines),
- la complexation/précipitation des métaux sur la biosurface,
- la complexation/précipitation dans le milieu extracellulaire par la sécretion de phytochélatines, polysaccharides, sidérophores, acide oxalique, etc.,
- la réduction de l'état d'oxydation de certains ions (réduction du Cr(VI) en Cr(III) par exemple, voir [9]),
- la volatilisation de certains métaux traces par méthylation (Hg et Se) [3].

Cependant, les mécanismes cités ci-dessus peuvent aussi être utilisés à dessein par les microorganismes afin de faciliter l'assimilation de métaux traces indispensables à leur croissance. Par exemple, certaines bactéries et certains champignons sont capables d'excréter des sidérophores dans le milieu extracellulaire. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire qui de part leur grande affinité avec le Fe(III) sont capables de le complexer et de faciliter son transport vers le microorganisme [3]. Le champignon *Aspergillus niger* quant à lui est capable de dégrader des roches comme le feldspath par la production d'acide oxalique afin d'en récupérer certains métaux comme le Fe, le Cu et le Ca [10, 11, 12].

En milieu aqueux, la toxicité d'un métal M envers un organisme dépend de différents facteurs (biotiques et abiotiques) telles que la nature du métal, son interaction avec la membrane biologique, son assimilation et la réponse biologique de l'organisme. La spéciation du métal, c'est-à-dire les différentes formes physiques et chimiques possibles que peut prendre un métal en solution est également un facteur à prendre en compte. L'évaluation de la toxicité des métaux implique donc de comprendre dans le détail le couplage des processus biophysicochimiques qui ont lieu aux interfaces afin de déterminer la biodisponibilité d'un métal. En fonction des champs

disciplinaires concernés, le terme de biodisponibilité renvoie toutefois à plusieurs définitions. Historiquement, il provient du domaine médical, souvent assimilé uniquement à l'absorption de molécules dans le corps ou les tissus. Cette définition est proche de celle décrite par Peijnenburg et al. [13] comme étant la "biodisponibilité toxicologique", qui correspond au processus d'assimilation des métaux en lien avec la physiologie de l'organisme, à la compartimentalisation dans les tissus et dans les cellules, et à la détoxification de l'organisme. La définition de la biodisponibilité au sens général, adoptée par Peijnenburg, est plus large [13]. Il définit la fraction biodisponible d'une espèce chimique comme étant la "fraction de la quantité totale d'une espèce chimique présente dans un compartiment environnemental spécifique dans une gamme de temps donnée, directement ou indirectement assimilable à partir du milieu environnant ou de la nourriture". Il insiste sur le fait que la biodisponibilité d'une espèce chimique doit être perçue comme un processus dynamique en deux phases : une phase de désorption physicochimique d'une matrice et une phase d'assimilation propre à la biologie de l'organisme. Cette dernière définition est proche de celle du Conseil National de Recherche des USA *, qui en 2003 adopte une définition des processus de biodisponibilité dans les sols et les sédiments. Celle-ci tient compte de la désorption des contaminants du sol et des sédiments, des conditions physicochimiques du milieu qui permettent le transfert des contaminants jusqu'aux surfaces biologiques, de leur assimilation et de leur accumulation dans les tissus.

Dans ce manuscrit, la définition de la biodisponibilité d'un métal envers un organisme vivant est identique à celle adoptée par van Leeuwen et al. [14, 15] qui la définit comme la capacité d'un métal sous forme libre ou issu de la dissociation de complexes provenant du milieu environnant à potentiellement s'adsorber et/ou être internalisé par une cellule biologique dans une gamme de temps donnée. Van Leeuwen utilise un paramètre de biodisponibilité introduit par Bosma [16] qui compare le temps caractéristique du transfert du métal à travers le milieu vers la surface avec celui du passage transmembranaire. Ces processus aux interfaces qui gouvernent la biodisponibilité de M envers un organisme seront détaillés dans le paragraphe 1.3. Les processus qui peuvent limiter l'assimilation d'un métal M et conditionnent sa biodisponibilité sont :

- le transfert réactif d'espèces métalliques (sous forme libre ou complexée) depuis le milieu extracellulaire vers la biosurface par diffusion et/ou cinétique réactionnelle (qui sont fonction des conditions physicochimiques du milieu extracellulaire en lien avec les propriétés interfaciales de la biomembrane),
- sa dynamique de complexation aux abords de la biomembrane avec un site biotique réactif,
- son adsorption et/ou son passage transmembranaire.

Dans la suite du manuscrit, les processus aux biointerfaces qui mènent à la biodisponibilité seront explicités plus en détail au paragraphe 1.4.

1.1.2 Stratégies d'évaluation de la toxicité des métaux

Jusqu'au début des années 2000, l'évaluation de la toxicité des métaux s'appuyait sur l'observation de la réponse biologique des organismes à un stress métallique. Les expérimentations conduites reposent sur des tests dit de dose-réponse. Il en existe différentes variantes, mais toutes suivent le même principe. En laboratoire, des indicateurs biologiques (algues, macrophytes, zooplanctons, insectes, bivalves, poissons, gastropodes et amphibiens) sont exposés à une large gamme de concentrations en métaux dans diverses conditions physicochimiques sur une période variable de 1 jour à 1 mois. La réponse des organismes à un stress métallique est observée par des indicateurs biologiques (taux de mortalité, inhibition de croissance) en fonction de la concentration en solution du métal. Les valeurs retenues dans ces tests sont, en règle générale, des concentrations soit létales pour lesquelles 50% de la population testée meurt (LC_{50}), soit qui

*. National Research Council

inhibent la croissance de 50% d'une population (IC_{50}). Les résultats de ces tests constituent des bases de données sur lesquelles se reposent les agences de réglementations environnementales pour fixer des seuils de concentration à ne pas dépasser. À partir du milieu des années 1990, ces tests ont été standardisés afin de limiter les variations interlaboratoires. Par ces tests, un lien direct est établi entre la concentration totale en métal et la réponse biologique. De nombreuses études sur l'écotoxicité ont ainsi été publiées sur la base des tests dose-réponse. Cependant, il est apparu de façon évidente que ces tests ne reflètent pas suffisamment la réalité des conditions d'exposition environnementales pour être représentatifs [17, 18]. En présence de ligands moléculaires et particulaires, la variabilité spatiale et temporelle des conditions physicochimiques dans les milieux naturels (pH, force ionique et température) modifient la spéciation des métaux. De plus, il existe des effets de compétition au niveau des interfaces biologiques entres les cations métalliques non toxiques (Ca^{2+}, Mg^{2+}) et toxiques (Pb^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}). Enfin, la toxicité est dépendante de l'organisme vivant, de l'âge de l'organisme et d'autres facteurs (génétique, genre, nutritionnel). Elle dépend aussi du type d'exposition du métal aux organismes, soit aigu (exposition à des concentrations pour lesquelles les effets toxiques sont rapidement mesurables) soit chronique (exposition à des concentrations non létales, mais à des temps longs). Par cette complexité, la compréhension de la biodisponibilité d'un métal pour une surface biologique est apparue alors comme l'un des éléments clefs pour comprendre les mécanismes d'assimilation des métaux et de leurs effets toxiques potentiels. Le besoin de développer des nouvelles méthodologies plus représentatives des interactions métaux-organismes vivants dans un milieu aquatique naturel s'est rapidement imposé.

De façon indépendante, l'analyse de la spéciation des ions dans les eaux s'est améliorée et des modèles thermodynamiques ont été développés. Ces modèles permettent d'évaluer la spéciation des métaux en présence de ligands moléculaires et particulaires d'origine organique (WHAM [19], NICA-DONNAN [20]) et minérale (MINTEQA2 [21]), en utilisant les constantes de stabilité des complexes connues et en tenant compte des conditions physicochimiques.

1.2 Modèles thermodynamiques développés pour la détermination de la bioassimilation des métaux

Afin de mieux comprendre les processus biophysicochimiques aux interfaces menant à la toxicité, plusieurs modèles thermodynamiques ont été développés pour tenter de relier la formation de complexes métalliques sur des sites ligands biotiques avec les résultats de test dose-réponse.

1.2.1 Free Ion Activity Model

Le Free Ion Activity Model (FIAM) est l'un des premiers modèles théoriques de calcul de la concentration d'un métal et de sa spéciation [22]. Pour ce modèle, la biodisponibilité d'un métal est fonction uniquement de la concentration en métal libre, en ligand et des constantes de stabilité des complexes métal-ligand moléculaire et métal - site ligand biotique. La notion de biodisponibilité est différente de celle adoptée dans ce manuscrit (voir paragraphe 1.1.1). Le modèle est fondé sur les hypothèses suivantes :

- la membrane plasmique est l'unique lieu de complexation considéré à la surface cellulaire,
- l'interaction du métal ou du complexe métallique avec la biomembrane peut être décrite par une réaction de complexation,
- la réponse biologique de la cellule est uniquement dépendante de la concentration en complexes formés par l'association de M avec un site ligand à la surface menant au passage transmembranaire de M vers le compartiment intracellulaire,

- le temps de transport entre la solution et la surface de la cellule est beaucoup plus rapide que le temps nécessaire à l'internalisation du métal par la cellule,
- dans les gammes de concentrations faibles proches de celles rencontrées dans l'environnement (inférieure à la concentration en sites réactifs), la concentration de sites surfaciques libres demeure constante au cours du temps et la variation de la concentration en complexes surfaciques est fonction de la concentration en métal en solution,
- la biomembrane n'est pas détériorée pendant l'exposition.

Le modèle FIAM repose sur trois équations qui reflètent la spéciation du métal en solution en présence de ligands inorganiques, à savoir :

- la complexation de M avec un ligand moléculaire L en solution, qu'il soit organique ou inorganique (on suppose que seuls des complexes 1 : 1 sont formés). Par simplicité de notation, les valences des composés ne sont pas indiquées.

$$\begin{aligned} M + L &\leftrightarrows ML \\ K_1[M] &= \frac{[ML]}{[L]} \end{aligned} \tag{1.1}$$

  où ML représente le complexe métal - ligand et K_1 la constante de stabilité du complexe.
- la réaction de complexation du métal libre sur les sites ligands de la biosurface.

$$\begin{aligned} M + X_{cell} &\leftrightarrows MX_{cell} \\ \{MX_{cell}\} &= K_2 \{X_{cell}\} [M] \end{aligned} \tag{1.2}$$

  où $\{MX_{cell}\}$ et $\{X_{cell}\}$ sont la concentration en métal des complexes de surface et en sites réactifs de surface, respectivement, et K_2 la constante de stabilité du complexe formé.
- la réaction de complexation entre un complexe métallique et les sites ligands de la biosurface.

$$\begin{aligned} ML + X_{cell} &\leftrightarrows MX_{cell} + L \\ \{MX_{cell}\} &= K_3 \frac{\{X_{cell}\} [ML]}{[L]} \\ \{MX_{cell}\} &= K_1 K_3 \{X_{cell}\} [M] \end{aligned} \tag{1.3}$$

  où K_3 la constante de stabilité du complexe formé.

À l'issue de la modélisation, la spéciation du métal à l'équilibre thermodynamique est déterminée pour une gamme de concentrations en métal total et peut être comparée à des données issues de tests toxicologiques dose-réponse. Dans la littérature, les succès de FIAM concernent principalement quelques conditions d'expositions simples, peu représentatives des conditions physicochimiques trouvées dans l'environnement [23, 24, 25]. De plus, les réponses biologiques d'adaptation des organismes à un stress métallique ne sont pas prises en compte [26].

1.2.2 Gill Surface Interaction Model

Un modèle similaire connu sous le nom de Gill Surface Interaction Model (GSIM) est développé par Pagenkopf [27] dans le but de prédire la concentration effective des éléments traces métalliques liés à la surface biotique qui mène à la mortalité des poissons. En effet, suite aux travaux de Smith [28] qui montrent que le transfert des ions entre le milieu et les fluides internes

du poisson s'effectue principalement par les branchies, Pagenkopf a fait l'hypotèse que la mortalité des poissons provient de l'altération des fonctions respiratoires par l'atteinte d'un seuil de concentration en éléments traces métalliques adsorbés à la surface des branchies.

Les hypothèses posées pour l'application de ce modèle sont :

- l'existence d'une compétition des métaux avec Mg^{2+}, Ca^{2+} et H^{+},
- la toxicité est fonction de la nature d'un métal ou d'un mélange d'ions métalliques,
- l'échelle de temps des tests dose-réponse est grande par rapport à l'échelle de temps des échanges de métaux entre les branchies et l'eau,
- les surfaces des branchies ont une capacité d'interaction finie par unité de poids,
- le métal sous forme libre et/ou sous forme d'hydroxyde peut être fixé sur un site biotique,
- la spéciation inclut uniquement le métal sous forme libre ou complexée avec des ligands inorganiques.

De la même manière que dans le modèle FIAM, les équations posées proviennent du calcul des constantes de complexation du métal avec les sites ligands biotiques, en considérant que la spéciation à l'équilibre du métal détermine sa biodisponibilité. Dans son article, Pagenkopf compare avec succès les résultats de son modèle avec différentes données issues de précédentes études de toxicité pour plusieurs espèces de poissons et différents métaux (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} et Pb^{2+}) testés indépendamment et dans un mélange multicontaminants métalliques. Plus tard, Playle et al. [29] mettra en exergue la diminution de la toxicité du métal avec l'augmentation de la dureté de l'eau par effet de compétition des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} avec les métaux traces. Ces études ont aussi permis d'évaluer la densité de sites ligands et les constantes de stabilité des complexes métalliques formés lors de l'association des métaux aux sites biotiques.

1.2.3 Biotic Ligand Model

Au début des années 2000, D. M. Toro, P. R. Paquin et R. C. Santore ont mis au point le Biotic Ligand Model (BLM), qui peut être considéré comme le modèle réunissant les deux précédentes approches [30, 31, 32]. En effet, l'hypothèse majeure du modèle FIAM repose sur un seuil de concentration critique en métal lié à la surface biologique à partir duquel un effet toxique apparaît. Ce postulat est complété par l'idée novatrice du modèle GSIM qu'il existe une compétition des ions métalliques avec les autres cations à la surface biologique. De la même manière que ces prédécesseurs, le modèle BLM considère que la fraction de métal biodisponible pour un organisme équivaut à la quantité de métal libre en solution à l'équilibre thermodynamique, et est responsable de la toxicité aiguë des métaux envers un organisme par complexation de ceux-ci avec les sites ligands biotiques. Les métaux complexés dans le milieu extracellulaire par des ligands moléculaires et particulaires n'interviennent pas dans l'assimilation du métal. Il est alors considéré que la présence de ces complexes, dits inertes, dans l'extracellulaire revient à une situation où la concentration en métal à laquelle sont exposés les organismes est plus faible. Les autres hypothèses sur lesquelles reposent BLM sont :

- le temps de transport des métaux sous forme libre ou complexée depuis la solution vers la surface de la cellule et la dissociation d'un complexe métallique aux abords de la biosurface sont considérés comme très rapide par rapport au temps nécessaire à l'internalisation du métal par la cellule. L'équilibre thermodynamique entre la membrane biologique et le milieu est donc maintenu,
- la membrane plasmique (considérée homogène en terme de composition chimique) est l'unique site d'interaction des ions métalliques avec les organismes,
- la complexation des métaux sur les sites ligands biotiques est uniquement du type 1 : 1, et la concentration de ces derniers est constante au cours du temps,

- la complexation des ions métalliques sur les sites d'interaction est en compétition avec les ions Ca^{2+}, Mg^{2+} et H^+, ce qui diminue la concentration en métal fixé sur les sites ligands biotiques,
- les protéines qui permettent le passage transmembranaire des métaux libres ne s'altèrent pas et leur concentration est constante au cours du temps (pas de dégradation/synthèse),
- la réponse biologique de la cellule est linéairement dépendante de la concentration en complexes formés par l'association de M libre avec un site ligand biotique,
- la toxicité est fonction de la nature d'un métal ou d'une mixture d'ions métalliques.

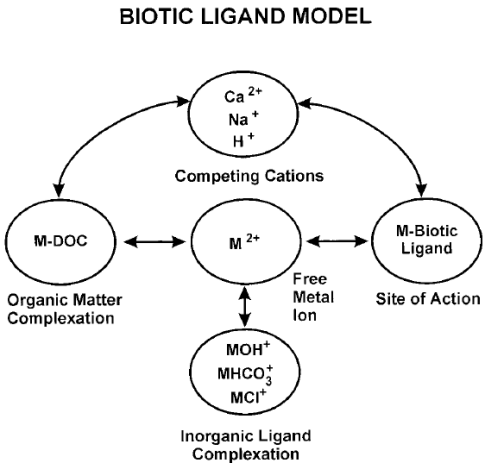


FIGURE 1.1 – Diagramme schématique du modèle BLM, d'après Di Toro et al. [31]

Plusieurs modèles de spéciation à l'équilibre sont utilisés dans le modèle BLM, en fonction de la nature des ligands considérés. La spéciation des métaux avec les ligands inorganiques moléculaires est déterminée par MINTEQA2, tandis que celle avec les ligands moléculaires et particulaires est prédite par Windermere Humic Aqueous Model (WHAM). Ce dernier simule également la compétition des cations avec les métaux sur les sites ligands portés par les particules organiques et par la membrane biologique des organismes. Enfin, les interactions métaux libres - sites ligands biotiques sont décrits par des équations similaires à celle présentée en 1.2 et par des expressions de conservation de la masse [31].

Parce que la toxicité d'un métal envers un organisme est considérée proportionnelle à la concentration de complexes métalliques formés avec les sites ligands biotiques, des tests de dose-réponse sont réalisés. Les tests de dose-réponse sont effectués de la façon suivante : une série de solutions contenant un nombre identique d'organismes vivants est préparée à des concentrations croissantes de métaux libres. L'exposition des organismes aux métaux pendant un temps fixe (généralement entre 24h et 96h) génère une mortalité des organismes (par simplicité, nous considérons ici uniquement la mortalité comme mesure de la toxicité des métaux envers les organismes). Chaque série de batchs préparée dans une condition physicochimique donnée permet d'établir une courbe de mortalité exprimée en pourcentage en fonction de la concentration en métal total $c^*_{\mathrm{M,T}}$, ou libre $c^*_{\mathrm{M,F}}$ en solution. Pour chaque série, la concentration libre pour laquelle 50% de la population meurt (Lethal Concentration at 50% ou LC_{50}) est relevée.

La détermination des constantes de complexation d'un cation avec un site ligand biotique est déterminée par la variation des concentrations en cations, comme expliqué ci-après [33]. Afin de déterminer la dépendance des LC_{50} avec les concentrations d'un cation en particulier (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+, HCO_3^-), des séries de batchs sont préparées dans une gamme de concentrations du cation cible (c^*_{c}). Ainsi, à chaque LC_{50} mesurée correspond une concentration en cations cibles. La dépendance des LC_{50} en fonction de c^*_{c} pour chaque cation testé est supposée linéaire, dont les paramètres (pente m et ordonnée à l'origine p) de la droite moyenne sont obtenus par régression linéaire. Enfin, d'après l'approche théorique de BLM, il existe une relation entre

les ratios des paramètres m/p pour chaque cation et les constantes de stabilité des complexes formés par les cations sur les ligands biotiques. Ces paramètres sont calculés par la résolution d'un produit matriciel. L'hypothèse principale de BLM qui considère qu'une relation linéaire existe entre la LC_{50} et le taux d'occupation des sites biotiques par le métal peut alors être vérifiée.

Les premiers résultats de cette approche ont été publiés en 2001 par Di Toro et al. [31], qui ont pu prédire des valeurs de LC_{50} pour des poissons et des daphnies exposés à un milieu artificiel contaminé par du cuivre et de l'argent, en déterminant les constantes de complexation des métaux sur les sites biotiques. Par l'évaluation de ces constantes, les auteurs espèrent limiter le nombre de tests dose-réponse à effectuer pour définir des seuils de concentrations pertinents. C'est pourquoi les auteurs de cette étude ont soumis au comité consultatif scientifique de l'EPA en 1999 un rapport qui propose cette approche comme solution alternative aux tests de dose-réponse seuls. À l'époque, l'EPA a répondu positivement en encourageant les auteurs à poursuivre les recherches dans ce sens, et envisageait de modifier ses recommandations sur les critères de qualité des eaux en se fondant sur cette approche. En 2007, l'EPA a effectivement modifié la concentration seuil du cuivre dans les eaux [34] en se fondant sur ce modèle. D'autres modifications sont envisagées pour d'autres métaux comme l'argent, le plomb et le cadmium.

1.2.4 Extension du modèle BLM

Dans leurs études initiales, les auteurs du modèle BLM s'étaient limités à la détermination de LC_{50} pour l'exposition d'ions Cu^{2+} et Ag^{+} à des poissons et des daphnies dans une gamme de concentrations connues en ions Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+}, HCO_3^{-}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, de Dissolved Organic Carbon (DOC) et pour une gamme de pH [35, 31, 30]. Ce modèle a été de nombreuses fois étendu afin de prendre en considération différents facteurs qui influent sur la toxicité des contaminants métalliques sur les organismes. Seules quelques extensions seront citées ici :

- Paquin et al. ont couplé BLM au Sodium Balance Model (SBM), un modèle qui relie la concentration de sodium régulée biologiquement dans différents compartiments de l'organisme à un temps de survie [36]. Cette régulation des concentrations de sodium peut être perturbée par non seulement une exposition à des métaux, mais aussi uniquement par la variation des concentrations en H^{+}, Ca^{2+} et Na^{+}.
- De Schamphelaere et al. ont repris des données expérimentales d'exposition du Cu(II) à des daphnies [37] pour lesquels BLM a confirmé que l'association des métaux libres sur les sites ligands biotiques expliquait la toxicité constatée à des pH < 8. Au delà de ce pH, l'association des métaux libres sur les sites biotiques n'expliquait pas la toxicité observée. C'est pourquoi dans cette extension [33] les auteurs ont posé puis confirmé l'hypothèse que la complexation des ions $CuOH^{+}$ et $CuCO_3$, en plus des cations précédemment considérés avec les sites biotiques à des pH > 8, expliquait la toxicité des métaux dans les conditions physicochimiques testées.
- suite à de précédents travaux montrant l'importance du temps d'exposition sur la toxicité d'un métal envers un organisme, Hatano et al. se sont appuyés sur BLM couplé au Damage Assessment Model (DAM), qui consiste à établir une relation entre les dommages cumulés occasionnés par les métaux sur l'organisme avec une probabilité de survie [38]. La confrontation de données issues de tests dose-réponse avec ces deux modèles couplés permettent de déterminer des EC_{50} (Half maximal Effective Concentration) par l'ajustement de deux paramètres : un taux d'accumulation k (h^{-1}) du métal dans les tissus (dépendant du métal) et un paramètre d'inhibition de passage transmembranaire des métaux à $t = 0$ (correspond au début de l'exposition des métaux aux organismes testés).
- Thakali et al. ont proposé une version de BLM qui permet de simuler l'inhibition de croissance racinaire de l'orge, version confirmée par la comparaison avec des résultats expérimentaux [39].

Malgré ces modèles étendus et ces applications à d'autres organismes, ceux-ci restent établis sur le calcul de la spéciation des métaux à l'équilibre thermodynamique, que l'on soit en présence ou non de DOC, de plusieurs métaux, dans le cas d'une exposition aiguë.

1.2.5 Limitations et critiques du modèle BLM

La détermination des concentrations totales en métaux et de leur spéciation à l'équilibre thermodynamique constitue une première approche dans la compréhension des processus d'assimilation des métaux par des organismes vivants. Ces approches à l'équilibre comme le modèle BLM ont été largement employées sur des échantillons reconstitués et naturels, et décrits dans la littérature. Ils ont été aussi critiqués à plusieurs reprises [40, 41, 42, 43] pour leurs insuffisances à représenter de manière fidèle les conditions naturelles. Les défauts inhérents aux modèles tels que FIAM/BLM ont été énumérés dans Slaveykova et al. [44]. Les principales failles sont énummérées dans la liste non exhaustive ci-dessous.

Les approches à l'équilibre thermodynamique ne tiennent pas compte de :

- la possible différence de concentration entre l'environnement proche de la biomembrane et le milieu, due à la diffusion de M depuis la solution vers la surface biologique dans le compartiment extracellulaire [41, 44, 16, 40],
- la limitation de l'internalisation des métaux qui peut être aussi due :
  - au flux de dissociation des métaux complexés sur des ligands présents dans l'extracellulaire aux abords de la biomembrane,
  - au flux de passage transmembranaire des métaux du côté extracellulaire vers le côté intracellulaire (par saturation des sites d'internalisation par exemple),
- l'hétérogénéité des sites ligands biotiques comme :
  - la distinction entre les sites de complexation actifs (menant à l'internalisation) et passifs (complexation simple). Ces derniers sont majoritaires [45, 46],
  - la variation des constantes de complexation des sites biotiques en fonction des conditions physicochimiques du milieu (par la variation de la force ionique, pH [47] et/ou de la concentration en métal),
  - l'activation simultanée de plusieurs transporteurs spécifiques à un ion métallique particulier (homéostasie du Zn par exemple [43, 48]),
- des effets de température sur d'une part, les cinétiques d'association/dissociation de M avec un ligand L et la diffusion des espèces métalliques vers l'interface [49] (voir article en annexes) et d'autre part, l'activité métabolique de la cellule,
- la modification des propriétés chimiques et biologiques des membranes pendant l'exposition (synthèse et dégradation de protéines de transport, altération de la perméabilité via la modification de la charge surfacique membranaire et/ou de la température [43]),
- le rôle synergique de certains ions métalliques (comme le Cu^{2+}, voir [43, 48]) avec les métaux toxiques dans une solution métallique contenant un mélange de métaux,
- la spéciation des métaux dans le compartiment intracellulaire et sa variation au cours du temps,
- la croissance/mortalité des organismes,
- les mécanismes de défense cellulaire mis en place par les cellules lors de leur exposition à des métaux (voir paragraphe 1.1.1).

1.3 Modèles fondés sur la quantification des flux de métaux aux interfaces biologiques

Afin de mieux comprendre les processus aux interfaces biologiques qui régissent la biodisponibilité des métaux, une seconde approche fondée sur la quantification des flux aux interfaces accumulatrices a été initiée en 1999 par Van Leeuwen et al. [15], puis étendue par [50, 51, 52] (ces travaux seront détaillés au paragraphe 1.3.8). Cette approche considère que l'assimilation des métaux par une surface accumulatrice est fonction de la disponibilité chimique (qui dépend de la dynamique de spéciation des métaux) puis biologique (qui dépend des capacités de sorption de la membrane, de passage transmembranaire et de la chemodynamique intracellulaire des métaux).

La disponibilité chimique des métaux est conditionnée par la contribution de (i) la diffusion des espèces métalliques contenues dans la couche de diffusion δ depuis le milieu vers une surface accumulatrice de métaux (via le flux de diffusion de M et ML, J_{diff}), et (ii) la dissociation de M du complexe métallique ML aux abords de la surface accumulatrice (via le flux de dissociation J_{kin}). Une illustration de ces processus est donnée ci-dessous :

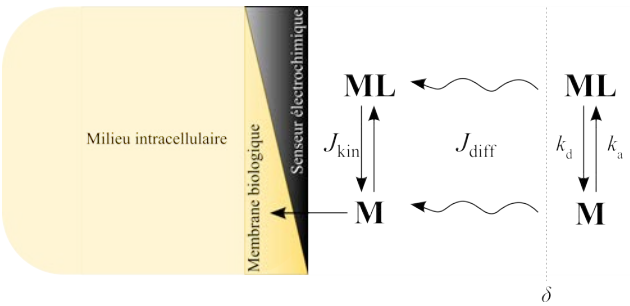


FIGURE 1.2 – Représentation du flux de diffusion des espèces métalliques (J_{diff}) depuis le milieu vers la surface accumulatrice et du flux cinétique (J_{kin}) provenant de la dissociation de M du complexe ML. k_{a} et k_{d} sont respectivement les constantes d'association et de dissociation du complexe ML. L'épaisseur de la couche de diffusion est délimitée par δ.

L'analyse des processus qui régissent la disponibilité chimique des métaux envers une cellule biologique est possible par l'utilisation de techniques électrochimiques de type chronopotentiométrie. Ces techniques reposent sur la réduction d'ions métalliques par une électrode. Les mécanismes de transport et de dynamique de spéciation des espèces métalliques sont analogues à ceux rencontrés avec une membrane biologique. Ainsi, à condition que l'épaisseur de la couche de diffusion de la cellule biologique soit semblable à celle de l'électrode utilisée, la chronopotentiométrie permet de déterminer :

- les flux de diffusion J_{diff} des métaux du milieu vers la membrane biologique,
- le flux de dissociation J_{kin} de M du complexe ML vers la membrane biologique.

La suite de cette section (du paragraphe 1.3.1 au paragraphe 1.3.7 inclus) sera consacrée à la description de la théorie sur la dynamique de spéciation des métaux en présence de ligands moléculaires/particulaires développés pour ces techniques électrochimiques.

1.3.1 Concept de labilité

Considérons la situation où un métal M s'associe avec un ligand moléculaire L en solution pour former un complexe métallique ML :

$$\mathrm{M} + \mathrm{L} \underset{k_\mathrm{d}}{\overset{k_\mathrm{a}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M}$$

Par souci de simplicité, les charges des espèces ioniques ne sont pas représentées. Les constantes cinétiques d'association k_a ($\mathrm{m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}}$) et de dissociation k_d ($\mathrm{s^{-1}}$) du complexe ML sont liées par la constante de stabilité K ($\mathrm{m^3\,mol^{-1}}$) :

$$K = \frac{k_\mathrm{a}}{k_\mathrm{d}} = \frac{c_\mathrm{ML}}{c_\mathrm{M} c_\mathrm{L}} \tag{1.4}$$

avec c_ML, c_M et c_L ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) respectivement les concentrations en solution du complexe ML, de métal libre M et de ligand libre.

Pour la suite, les hypothèses suivantes sont posées :

- un ligand L ne réagit qu'avec un métal M par une complexation 1 : 1
- $c_\mathrm{L} \gg c_\mathrm{M}$

La première hypothèse est posée uniquement par souci de simplification des notations. Dans la réalité, la complexation de M avec un ligand L peut être de 2 : 1 ou 3 : 1. La seconde hypothèse est raisonnable dans un contexte environnemental, où les concentrations en ligands moléculaires et particulaires sont en excès par rapport aux concentrations en métaux traces.

L'excès de ligands considéré implique que la fraction de ligand liée avec les métaux $\mathrm{c_{ML}}$ est négligeable par rapport à la concentration totale en ligand $c_\mathrm{L,t}$. $\mathrm{c_L}$ peut donc être considérée constante, d'où la définition de la constante de stabilité apparente du complexe K' (sans dimension) :

$$K' = K c_\mathrm{L} = \frac{c_\mathrm{ML}}{c_\mathrm{M}} \tag{1.5}$$

De façon analogue, k_a' ($\mathrm{s^{-1}}$) est définie comme étant :

$$k'_\mathrm{a} = k_\mathrm{a} c_\mathrm{L} \tag{1.6}$$

Soit un système composé d'une interface consommatrice de métaux plongée dans une solution en présence de métaux et de ligands. La consommation des ions métalliques par l'interface engendre une diffusion de M et des complexes ML. Cette diffusion s'opère sur une distance δ (m) qui varie en fonction du coefficient de diffusion de M et de ML, de l'hydrodynamisme du milieu, de la taille du complexe ML, de la surface accumulatrice et du temps. La diffusion des espèces métalliques M et ML à travers le milieu vers la surface accumulatrice est mathématiquement décrite par un flux d'ions métalliques J_diff ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) donné par l'expression :

$$J_\mathrm{diff} = \frac{c_\mathrm{M} D_\mathrm{M}}{\left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_0}\right)^{-1}} \tag{1.7}$$

avec D_M ($\mathrm{m^2\,s^{-1}}$) le coefficient de diffusion du métal, δ l'épaisseur de la couche de diffusion et r_0 (m) le rayon de l'électrode.

Il existe un second flux de métal dit cinétique J_kin ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) provenant de la libération d'ions métalliques sous forme libre par dissociation du complexe ML dans l'environnement proche

de la membrane, suivi d'une accumulation de M à la surface accumulatrice. L'expression de J_{kin} est donnée par :

$$J_{\mathrm{kin}} = k_{\mathrm{d}} c_{\mathrm{ML}} \left(\frac{D_{\mathrm{M}}}{k'_{\mathrm{a}}} \right)^{1/2} \tag{1.8}$$

L'établissement d'une couche de diffusion stable n'est pas immédiat. Il s'effectue dans un régime dit transitoire pour lequel les flux de métaux vers la surface biologique varient en fonction du temps. Puis, les flux de métaux tendent à se réguler et deviennent indépendants du temps, pour atteindre un régime dit stationnaire. L'épaisseur de la couche de diffusion δ est seulement une approximation, qui mathématiquement permet de relier le courant et les flux de métaux libres avec les concentrations de surface et dans le milieu [53].

Dans cette couche de diffusion se situe une autre couche dite de réaction qui correspond à une région fictive dans laquelle la dissociation du complexe ML en M survient. L'expression de l'épaisseur μ (m) de cette couche de réaction s'écrit :

$$\mu = (D_{\mathrm{M}} \tau_{\mathrm{M}})^{1/2} = \left(\frac{D_{\mathrm{M}}}{k'_{\mathrm{a}}} \right)^{1/2} \tag{1.9}$$

avec τ_{M} (s) la fenêtre temporelle pendant laquelle le métal est sous forme libre.

Lorsque les cinétiques d'association et de dissociation du complexe ML sont très lentes par rapport au temps caractéristique de mesure pendant lequel M traverse le milieu jusqu'à la surface accumulatrice ($k_{\mathrm{a}}'^{-1}$ et $k_{\mathrm{d}}^{-1} \gg t$), le complexe est considéré statique. Dans cette situation, la contribution du complexe ML dans l'assimilation globale de M est nulle. Seul le métal sous forme libre diffuse vers la surface accumulatrice, en établissant un gradient de concentration dans la couche de réaction. En revanche, lorsque ML contribue à l'assimilation globale des métaux par une interface, la dynamique est contrôlée soit par le transfert de ML dans la couche de diffusion via le flux de diffusion J_{diff}, soit par la cinétique de dissociation de ML dans la couche de réaction de la surface accumulatrice via le flux cinétique J_{kin}. Pour déterminer si un système est statique ou dynamique, puis labile ou non-labile, van Leeuwen [54] propose le schéma ci-dessous :

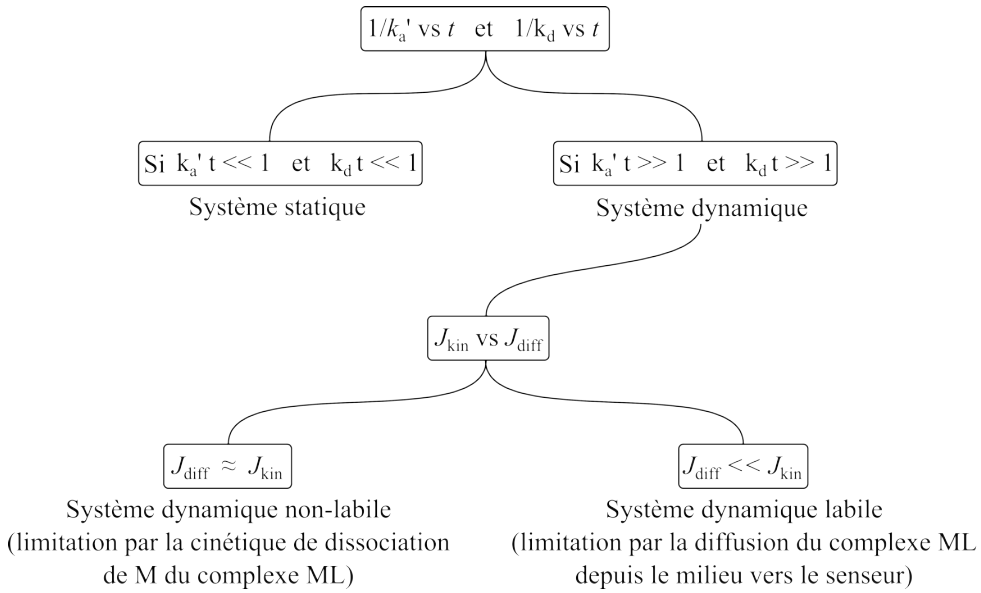


FIGURE 1.3 – Représentation schématique des régimes caractéristiques des complexes métalliques, adapté de [55]

Mathématiquement parlant, le cas dynamique correspond à des cinétiques d'association et de dissociation très rapides par rapport au temps de mesure ($k_a'^{-1}$ et $k_d^{-1} \ll t$). Dans ce cas, deux situations appelées labile et non-labile sont possibles. La distinction entre les deux repose sur la comparaison entre J_{diff} et J_{kin} :

- Lorsque $J_{diff} \approx J_{kin}$, l'assimilation des métaux par la surface accumulatrice est limitée par la cinétique de dissociation de ML dans la couche de réaction (cas dit non-labile). Un gradient de concentration ML s'établit dans la couche de diffusion, et la fraction de métal provenant du complexe ML participe à l'accumulation globale de M.
- Lorsque $J_{diff} \ll J_{kin}$, l'accumulation des métaux est limitée par la diffusion de M et du complexe ML (cas dit labile). Un gradient de concentration de ML et M est établi dans la couche de diffusion.

La variation de c_M et c_{ML} avec la distance du métal à l'électrode dans le cas statique et dynamique est représentée dans le graphique ci-dessous.

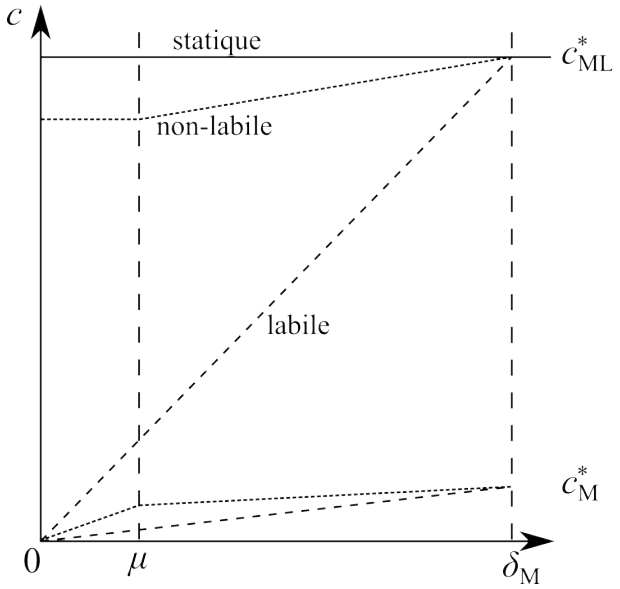


FIGURE 1.4 – Évolution des concentrations en M et ML en fonction de la distance avec la surface accumulatrice, dans le cas dynamique et statique. [56]

Dans le cas des ligands moléculaires, les constantes cinétiques d'association k_a et de dissociation k_d qui régissent la complexation dynamique de M avec un ligand correspondent en réalité à la succession de deux étapes décrites par le mécanisme d'Eigen-Fuoss, détaillé dans le paragraphe suivant.

1.3.2 Mécanisme d'Eigen-Fuoss pour des ligands moléculaires

Ce mécanisme est utilisé pour décrire les cinétiques de complexation des ions dans les milieux aqueux [55]. La première étape (1) consiste en la formation d'un complexe de sphère externe, suivie par une étape limitante de formation de complexe de sphère interne (2). L'élimination d'une molécule d'eau de la couche d'hydratation interne à partir de $M(H_2O)_6{}^{2+}$ permet à M d'établir une liaison covalente avec le ligand L. La théorie d'Eigen permet d'estimer le taux de formation de complexe à partir de la nature du métal, de la charge et de la taille du ligand, quelque soit la nature chimique de ce dernier.

Les deux étapes du schéma d'Eigen impliquées dans la formation d'un complexe métallique

par l'association d'un ion métallique $M(H_2O)_6{}^{2+}$ en solution et d'un ligand L^- sont illustrées ci-dessous :

$$M(H_2O)_6^{2+} + L^- \overset{K^{os}}{\rightleftharpoons} \{M(H_2O)_6 \bullet L^+\} \xrightarrow{k_w} M(H_2O)_5L^+ + H_2O$$

où k_w (s^{-1}) est la constante de déshydratation du métal M associé à l'étape (2) décrite plus loin. Cette étape limite cinétiquement la formation du complexe ML de sphère interne. K^{os} ($m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}$) est la constante de stabilité de formation du complexe de sphère externe, étape cinétiquement rapide et uniquement dépendante des interactions électrostatiques entre $M(H_2O)_6^{2+}$ et L^-. L'expression de K^{os} correspond au ratio des constantes de sphère externe d'association k_a^{os} ($m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}$) et de dissociation k_d^{os} (s^{-1}), donnée par l'équation de Fuoss [57] :

$$K^{os} = \frac{4\pi N_{Av} a^3}{3} \exp(-U^{os}) \tag{1.10}$$

avec a (m) la distance d'approche de centre à centre de charge la plus proche entre M et L avant la formation de complexe de sphère externe et le nombre d'Avogadro N_{Av} (mol^{-1}). Ces constantes dépendent de l'énergie d'interaction électrostatique U^{os} (sans dimension) entre M et L :

$$U^{os} = \frac{z_M z_L e^2}{4\pi\varepsilon\varepsilon_0 a k_B T}\left(1 - \frac{\kappa a}{1+\kappa a}\right) \tag{1.11}$$

où z_M et z_L (sans dimension) correspondent aux valences respectives de M et L, e (C) la charge élémentaire d'un électron, ε ($C\,J^{-1}\,m^{-1}$) et $\varepsilon_\circ$ ($C^2\,J^{-1}\,m^{-2}$) la permittivité du milieu et la permittivité diélectrique du vide, respectivement. k_B ($J\,K^{-1}$) est la constante de Boltzmann, T (K) la température et κ (m^{-1}) la réciproque de la longueur de Debye (décrite ci dessous).

Dans l'équation 1.11, le premier terme représente l'énergie de Coulomb entre M et L, tandis que le second (entre parenthèses) corrige l'expression de l'effet d'écrantage des charges dû à la présence d'électrolyte.

La longueur de Debye, κ^{-1} (m), impliquée dans 1.11 est calculée à partir de l'expression :

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon\varepsilon_0 RT}{F^2 \sum_i z_i^2 c_i^*}\right)^{1/2} \tag{1.12}$$

où R ($J\,mol^{-1}\,K^{-1}$) est la constante des gaz parfaits, F ($C\,mol^{-1}$) est la constante de Faraday et $\sum_i z_i^2 c_i^*$ fait référence à la somme de tous les ions du milieu en tenant compte de leurs charges et de leurs concentrations.

La constante cinétique de déshydratation k_w impliquée dans l'étape (2) limite cinétiquement l'association de M avec L. Celle-ci est indépendante de L et fonction de la nature de M. Ses valeurs sont déjà connues dans la littérature [22] :

Ions métalliques	k_w (s^{-1})
Pb^{2+}	7×10^9
Hg^{2+}	2×10^9
Cu^{2+}	1×10^9
Ca^{2+}	6×10^8
Cd^{2+}	3×10^8
Zn^{2+}	7×10^7
Mn^{2+}	3×10^7
Fe^{2+}	4×10^6
Co^{2+}	2×10^6
Ni^{2+}	3×10^4
Fe^{3+}	2×10^2
Al^{2+}	1
Cr^{3+}	5×10^{-7}

TABLE 1.1 – Constantes de déshydratation k_w des cations métalliques

Dans le cas général, l'élimination d'une molécule d'eau par M est beaucoup plus lente que la dissociation du complexe de sphère externe. Ainsi :

$$k_d^{os} >> k_w : k_a \approx K^{os} k_w \tag{1.13}$$

1.3.3 Mécanisme d'Eigen étendu aux ligands particulaires

Dans l'environnement, il existe une grande variété de particules d'origine minérale ou organique (acides humiques, polysaccharides, microorganismes, etc). Les colloïdes sont, en règle générale, définis comme étant des particules dispersées dans un milieu solide, liquide ou gazeux de tailles comprises entre 1nm et 1µm. Cette définition est adoptée par l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) et reprise par Lyklema dans son livre [58]. Toutefois, ces derniers précisent que cette définition ne fait pas le consensus parmi les scientifiques. Au sens large, les colloïdes sont définis comme étant des entités liquides, solides ou gazeuses chargées électriquement et dispersées dans une phase de composition différente à leur nature. Plusieurs exemples de colloïdes peuvent être cités : les colloïdes dits inorganiques (métaux, argiles), les émulsions (laits, crèmes), les fumées, le brouillard. Cette définition des colloïdes au sens large est adoptée dans ce manuscrit.

Deux types de particules sont retrouvés dans l'environnement. Les particules dites *dures* sont composées d'une matière imperméable au solvant, et leurs charges sont portées uniquement à la surface. Les particules dites *molles* sont composées d'un cœur dur enrobé d'une couche polymérique chargée perméable au solvant (voir Figure 1.5).

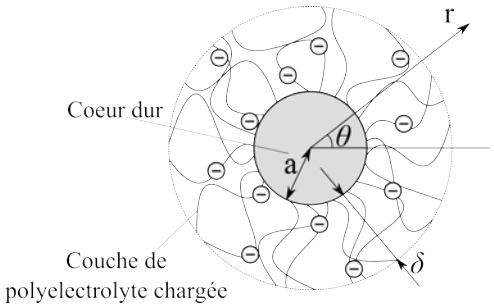


FIGURE 1.5 – Représentation schématique d'une particule molle (adaptée de [59])

où a (m) représente le rayon du cœur dur imperméable au solvant, δ (m) représente l'épaisseur de la couche polymérique qui enrobe ce cœur dur. Ainsi, pour des cas extrêmes, si l'épaisseur de la couche polymérique est égale au rayon de la particule (a $\rightarrow$ 0), alors la particule est composée uniquement de chaînes polymériques, totalement perméables au solvant. À l'opposé ($\delta \rightarrow 0$), la particule est assimilée à une particule imperméable dite *dure*.

Plongées dans un milieu aqueux, les particules acquièrent une charge surfacique ou volumique, dont les origines sont variées (adsorption spécifique d'ions/de molécules chargées, protonation/dépronotation de charges etc.). Les charges portées par ces particules engendrent une distribution des espèces ioniques en solution au voisinage de celles-ci afin d'atteindre la neutralité. De ce fait, les ions de charge opposée sont attirés au plus proche des particules et ceux de même charge sont repoussés vers le milieu. Ces interactions électrostatiques entre les ions en solution et les particules génèrent l'établissement d'une Double Couche Electrique (DCE) de manière à ce que la charge totale entre la particule et la DCE s'annule. L'épaisseur de cette double-couche est assimilée à la longueur de Debye κ^{-1} (m). De par la présence de charges positives et/ou négatives à la surface et/ou dans le corps d'une particule, des interactions électrostatiques entre d'autres éléments chargés comme les ions ou d'autres particules sont possibles. Dans ce manuscrit, seules les interactions ions - particules et ions - cellules biologiques sont envisagées.

En ce qui concerne la dynamique de complexation particules - métaux évoquée, seul le cas des particules molles et de leur complexation avec les métaux est traité. Ce choix est motivé par le fait que la dynamique de complexation entre un métal et une particule est impactée plus fortement avec une particule molle (via un facteur de Boltzmann plus important, voir paragraphe 1.3.4 ci-dessous) qu'avec une particule dure.

1.3.4 Particules molles

Du fait d'être composées d'une couche perméable au solvant, l'étude des particules molles est plus complexe, ce qui explique que les concepts pour décrire la réactivité des NPs molles n'ont été décrits que récemment [60, 61, 62]. La théorie sur les interactions entre un ion métallique et une particule molle implique les différents paramètres physicochimiques ci-dessous [60] :

- la taille et la forme des particules,
- la densité de charge, leur distribution et la concentration d'électrolyte,
- la cinétique de relaxation du champ électrique interfacial,
- la densité de site réactif.

Le mécanisme d'Eigen précédemment décrit est valable pour des ligands moléculaires. Lorsqu'une solution métallique est en présence de particules, le mécanisme d'Eigen en deux étapes n'est plus approprié, pour deux raisons :

La première est qu'il réside entre les suspensions de ligands moléculaires et particulaires une différence dans la répartition des sites réactifs. Les ligands moléculaires sont répartis de façon homogène dans l'ensemble du volume de la solution, contrairement aux ligands particulaires dont les sites réactifs sont confinés sur/dans les particules en suspension. De plus, de par leur taille, la mobilité des particules est plus faible que celle des ligands moléculaires (les coefficients de diffusion des particules sont plus faibles).

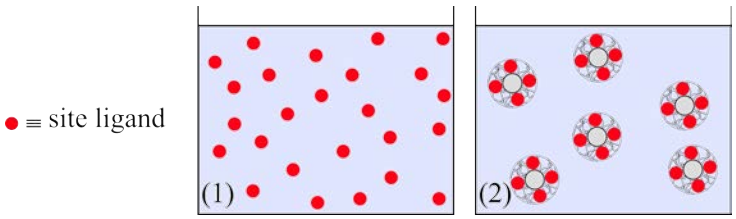


FIGURE 1.6 – Répartition des sites ligands moléculaires (1) et particulaires (2)

De ce fait, la complexation de M avec un site ligand S porté par une particule comporte une étape de transport diffusif de M depuis le milieu vers les sites ligands particulaires. Cette étape de transport est soumise aux interactions électrostatiques en raison de la charge des ions, des charges portées à l'intérieur de la couche molle et de la solution électrolyte. Suite à cette étape de transport, la complexation de M avec un ligand moléculaire a lieu, comme décrit au paragraphe 1.3.2. Ainsi, le mécanisme d'Eigen dit *étendu* à la complexation entre M et une particule est décrit selon les étapes détaillées dans [60] et illustré par la figure ci-dessous.

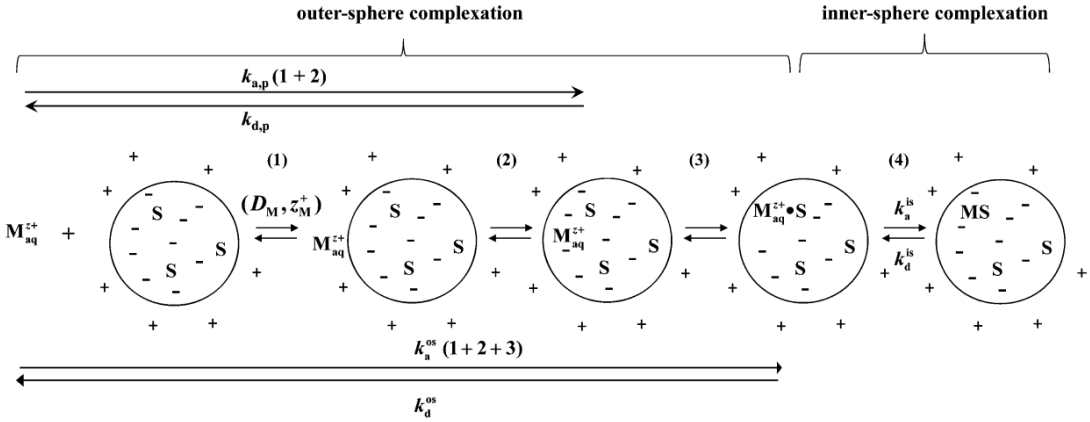


FIGURE 1.7 – Représentation du mécanisme d'Eigen dans le cas d'une complexation de M par un site ligand porté par une particule. Les étapes (1) et (2) représentent la diffusion de M vers un site réactif, tandis que les étapes (3) et (4) correspondent à celles décrites pour le mécanisme d'Eigen avec des ligands moléculaires [60].

Les étapes successives menant à la complexation de M par une nanoparticule molle (NP) s'effectuent dans l'ordre suivant. La première étape correspond à la diffusion conductive de M depuis la solution vers la surface complexante. L'étape 2 illustre le passage de M à travers l'interface solution/particule et son incorporation à l'intérieur sous sa forme hydratée. Les constantes cinétiques associées à ces deux premières étapes sont : la constante cinétique d'association M-NP $k_{\mathrm{a,p}}$ ($\mathrm{mol^{-1}\,m^3\,s^{-1}}$) et la constante cinétique de dissociation M-NP $k_{\mathrm{d,p}}$ ($\mathrm{s^{-1}}$). Les expressions correspondantes s'écrivent [61] :

$$\begin{aligned} k_{\mathrm{a,p}} &= 4\pi r_{\mathrm{p}} D_{\mathrm{M}} \bar{f}_{\mathrm{el,a}} N_{\mathrm{Av}}/N_{\mathrm{s}} \\ k_{\mathrm{d,p}} &= 3(1 + K_{\mathrm{int}} c_{\mathrm{s}}) D_{\mathrm{M}} \bar{f}_{\mathrm{el,d}}/{r_{\mathrm{p}}}^2 \end{aligned} \tag{1.14}$$

avec le rayon de la particule r_{p} (m), le nombre de sites portés par la particule N_{S}, K_{int} ($\mathrm{m^3\,mol^{-1}}$) la constante de stabilité intrinsèque des complexes MS de sphère interne et c_{s} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) la densité de sites réactifs. $\bar{f}_{\mathrm{el,(a\ ou\ d)}}$ est un facteur qui corrige la diffusion de M vers la particule de l'accélération/ralentissement qui dépend du profil de potentiel électrostatique à travers l'interface particule - milieu. $\bar{f}_{\mathrm{el,d}}$ est analogue à $\bar{f}_{\mathrm{el,a}}$ pour la diffusion de M depuis la particule vers le milieu, et est fonction du facteur d'accumulation de Boltzmann f_{B}.

Dans les conditions de Donnan, l'expression de $\bar{f}_{\mathrm{el,a}}$ devient fonction uniquement du ratio a/r_{p} et du facteur d'accumulation de Boltzmann f_{B}. Ce dernier représente l'accumulation d'ions métalliques par effets électrostatiques dans le volume de la particule, et s'écrit :

$$f_{\mathrm{B}} = e^{-\mathrm{z_M} y_{\mathrm{D}}} \tag{1.15}$$

avec y_{D} (sans dimension) le potentiel électrostatique de Donnan à l'équilibre. L'étape 3 représente la formation de complexe de sphère externe par l'association électrostatique de M avec un site ligand S. L'ensemble des étapes 1, 2 et 3 est exprimé par les constantes cinétiques d'association $k_{\mathrm{a}}^{\mathrm{os}}$ ($\mathrm{m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}}$) et de dissociation $k_{\mathrm{d}}^{\mathrm{os}}$ ($\mathrm{s^{-1}}$). Enfin, une dernière étape 4 décrit la formation de complexe de sphère interne par élimination de molécules d'eau avec M (k_{w}) par l'établissement d'une liaison chimique entre M et S. Les constantes cinétiques de cette dernière étape relatives à l'association et à la dissociation sont notées respectivement $k_{\mathrm{a}}^{\mathrm{is}}$ ($\mathrm{m^3\,mol^{-1}\,s^{-1}}$) et $k_{\mathrm{d}}^{\mathrm{is}}$ ($\mathrm{s^{-1}}$).

En théorie, chacun de ces processus peut être cinétiquement limitant dans la dynamique d'association/dissociation globale du complexe. Ces cinétiques dépendent de la charge, de la taille, du coefficient de diffusion et de la constante de déshydratation du métal impliqué, de la température et de la nature des nanoparticules, c'est-à-dire de leurs tailles, de leurs coefficients de diffusion, de la flexibilité des polymères, de leurs densités de sites réactifs complexants (S) et de leurs densités de charge [63].

1.3.5 Impact de la densité de charge sur les cinétiques d'association/dissociation du métal avec une nanoparticule molle

Dans le cas où le rayon de la particule est largement plus grand que l'épaisseur de la double-couche électrique ($\kappa \ll r_{\mathrm{p}}$), la comparaison entre la distance de séparation des charges l_C (m) avec l'épaisseur de la DCE assimilée à la longueur de Debye κ^{-1} forme trois régimes de densité distincts (voir Figure 1.8) :

- le régime de haute densité de charge, lorsque $l_C \ll \kappa^{-1}$, ce qui correspond à un potentiel électrostatique décrit par l'équation de Poisson-Boltzmann **(a)**. Dans ce régime, le potentiel électrostatique dit de Donnan y_{D}(V) correspond à un potentiel constant depuis le centre de la particule jusqu'à la surface de la particule,
- le régime de faible densité de charge, lorsque $l_C \gg \kappa^{-1}$ et lorsque le potentiel à un site chargé est fonction uniquement du champ électrique local **(b)**,
- le régime intermédiaire, où $l_C \approx \kappa^{-1}$ pour lequel les deux effets des régimes précédents comptent.

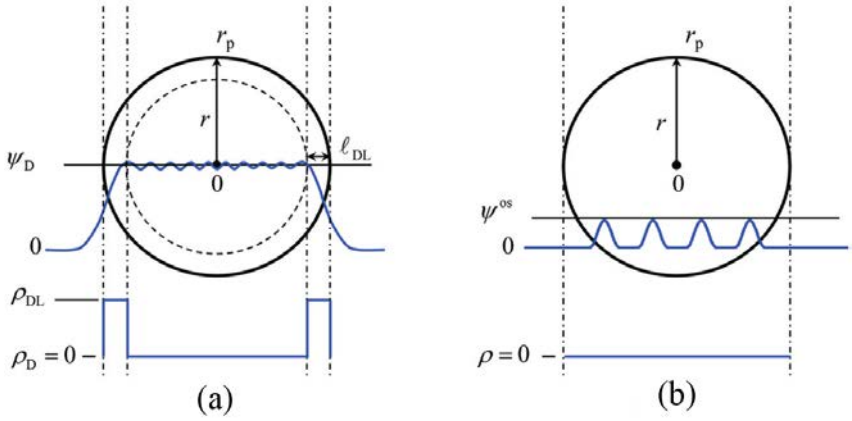


FIGURE 1.8 – Profils du potentiel électrostatique d'une NP molle dans le régime de haute densité de charge (à gauche) et faible densité de charge (droite) [64].

avec l_{DL} (m) l'épaisseur de la double couche électrique intraparticulaire, ρ_D (mol m^{-3}) et ρ_{DL} (mol m^{-3}) la densité volumique de charge dans les conditions de Donnan et de la double couche électrique, respectivement. ψ_D (V) et ψ^{*OS} (V) correspondent au potentiel électrostatique de Donnan et au niveau de la sphère externe des complexes de surface formés, respectivement. La dépendance de l'association de M avec un site réactif S varie en fonction du régime de densité de charge. Dans le régime de faible densité de charge, l'association dépend uniquement du potentiel local de chaque site réactif. En revanche, dans le régime de haute densité de charge, le potentiel électrostatique est constant au sein de la nanoparticule molle. De la même manière que précédemment (voir 1.3.2), il peut donc être raisonnablement considéré que la formation de complexe de sphère externe (étape 3) n'est pas limitante dans le processus global de complexation de M avec une particule [65]. Enfin, la relaxation électrostatique du système est très rapide par rapport aux échelles de temps des processus de complexation entre une nanoparticule et un métal en solution. Il n'y a donc pas de perturbation de l'équilibre électrostatique de la distribution ionique dans la particule et dans le milieu pendant l'association/dissociation de M avec une particule.

1.3.6 Impact de la taille des particules sur les cinétiques d'association des métaux avec les sites réactifs

La dépendance de la cinétique d'association globale de M sur les sites réactifs S avec la taille des particules est présentée en Figure 1.9 pour différentes tailles de particules :

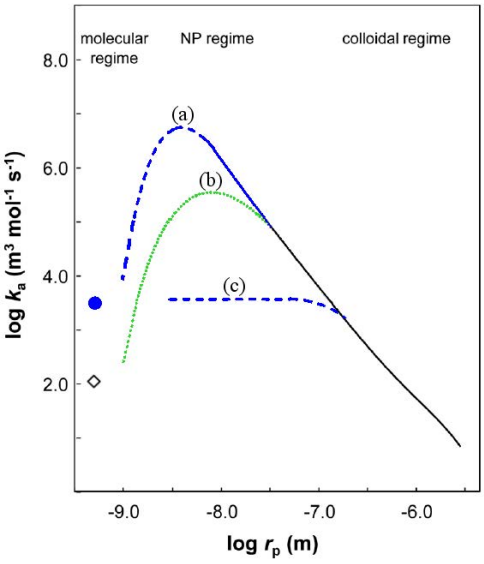


FIGURE 1.9 – Constante d'association k_a de M avec un site ligand porté par une particule en fonction de la taille de particule r_p et de la constante cinétique de deshydratation k_w, adapté de [66]

Sur cette figure sont représentées les variations de la constante d'association k_a entre un métal et un ligand moléculaire (symboles) ou particulaire chargé (courbe a et b) et non chargé (courbe c) avec une densité de charge de -2000mol m^{-3} et une densité de sites réactifs de 45mol m^{-3} dans une solution saline (10mM). Les constantes cinétiques de déshydratation correspondantes sont 10^6s^{-1} (courbes bleues) et 3.10^4s^{-1} (courbe verte).

Trois régimes peuvent être distingués en fonction de la taille considérée : le régime moléculaire (molécules jusqu'à une taille de 1 nanomètre), le régime nanoparticulaire ou NP (tailles de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètre) et le régime colloïdal (au-delà de 100nm).

Pour le premier régime (point et losange), la faible taille des ligands (régime moléculaire) limite l'accumulation de M par manque d'espace au sein de la nanoparticule, et empêche la contribution de l'électrostatique dans l'association de M avec le ligand (via l'accumulation de Boltzmann). M est donc accumulé majoritairement dans l'atmosphère contre-ionique qui englobe la particule. Dans le deuxième régime (régime NP) pour des particules chargées (courbes a et b), la constante d'association de M augmente pour des tailles croissantes jusqu'à un maximum, avant de décroître et rejoindre une courbe maitresse pour des tailles d'environ 50µm de rayon. L'élévation des constantes d'association est due à une augmentation de la concentration locale de M dans la particule via l'accumulation de Boltmzmann (voir équation (1.15) au paragraphe 1.3.4), et est fonction de la nature du métal considéré. Dans le dernier régime (régime colloïdal), la décroissance des courbes (a, b et c) traduit une limitation progressive de la cinétique d'association de M par le transport diffusif conductif de M vers la particule. Enfin, la formation d'un complexe métallique avec une particule non chargée (courbe c) est régie uniquement par une diffusion simple, d'où une absence de variation de la constante d'association pour des tailles croissantes de particule. A partir d'une certaine taille, la constante d'association décroît à mesure que la taille de la particule augmente. La différence importante des constantes d'association d'un métal avec une particule chargée (courbe a) et non-chargée (courbe c) souligne l'effet catalyseur sur les cinétiques d'association (différence de 3 ordres de grandeur) du régime NP pour des particules chargées.

1.3.7 Conséquences de la dynamique de complexation des métaux avec des ligands particulaires sur l'évaluation de la labilité à une interface accumulatrice de métaux

Dans ce manuscrit sont considérées uniquement des suspensions métalliques en présence de ligands moléculaires (A) et particulaires (B). Ces deux situations sont représentées ci-dessous. Par souci de simplification, les suspensions de ligands moléculaires et particulaires sont représentées séparément.

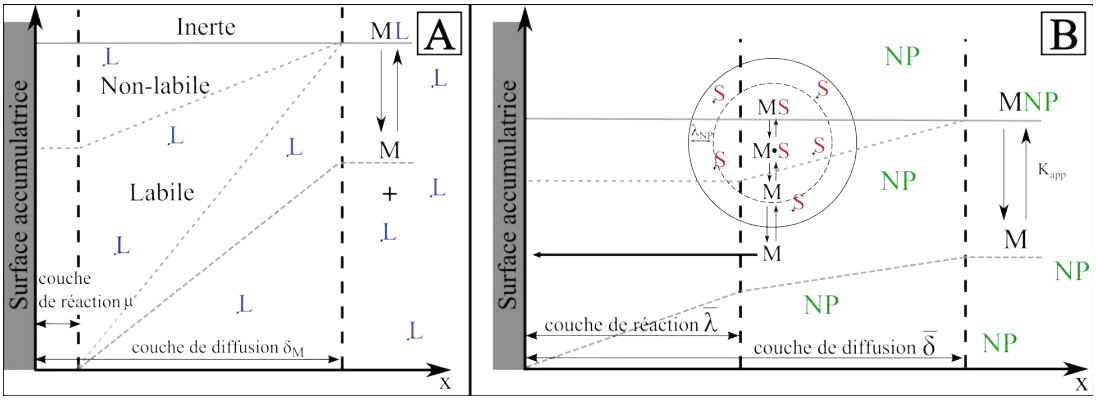


FIGURE 1.10 – Représentation schématique des processus de complexation dynamique des métaux en présence de ligand moléculaire (à gauche) et particulaire (à droite, inspiré de [63]) à une interface consommatrice de métaux

Il existe deux différences majeures entre les deux situations [64] :

- Il existe une différence entre la répartition dans un volume fini de ligands moléculaires et de sites ligands portés par des particules. Or, le concept de couche de réaction liée à la surface accumulatrice à l'échelle d'une électrode développé par [67, 68] repose sur l'hypothèse d'une répartition homogène de sites ligands dans un volume. L'approche de Koutecký et Koryta n'est donc pas applicable en l'état.
- La seconde différence concerne l'impact de la dynamique de complexation de M avec les particules. En effet, comme décrit précédemment (voir paragraphe 1.3.1), il existe à une surface accumulatrice de métaux (cellules biologiques, électrodes) une couche de réaction qui correspond à la distance à partir de laquelle le métal dissocié du complexe (sous forme libre) est adsorbé/accumulé par la surface accumulatrice. Ce concept de couche de réaction n'a de sens qu'en présence d'une surface consommatrice de métaux. A l'échelle moléculaire, la complexation du métal par les sites réactifs contenus dans la particule est analogue à la consommation de M par une surface accumulatrice à l'échelle macroscopique. Ainsi, il peut être considéré que chaque nanoparticule possède sa propre couche de réaction à l'interface nanoparticule/milieu [69].

Dans le cas d'une solution métallique en présence de particules, il existe deux couches de réaction, l'une à l'échelle moléculaire à la surface des particules, l'autre à l'échelle macroscopique à la surface accumulatrice (du type électrode ou microorganisme). Cette dernière couche de réaction est, dans cette situation, fonction du temps moyen de présence des particules dans cette couche et de la concentration de sites ligands particulaires associée $\bar{c}_S^{\lambda}$ (mol m^{-3}). En considérant que le complexe métal - particule n'interagit pas avec la surface accumulatrice, l'expression de la couche de réaction $\bar{\lambda}$ (m) de cette dernière devient [70] :

$$\bar{\lambda} = \left(\frac{k_{\mathrm{a,p}} \bar{c}_{\mathrm{S}}^{\lambda}}{D_{\mathrm{M}}} + \frac{k_{\mathrm{d}}}{D_{\mathrm{p}}} \right)^{-1/2} \tag{1.16}$$

où D_{p} ($\mathrm{m^2\,s^{-1}}$) est le coefficient de diffusion de la particule, et $\bar{c}_{\mathrm{S}}^{\lambda}$ ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) la concentration moyenne de sites ligands dans la zone opérationnelle de la couche réactionnelle à l'échelle macroscopique ($\bar{\lambda}$). Le produit $k_{\mathrm{a,p}} \bar{c}_{\mathrm{S}}^{\lambda}$ ($\mathrm{s^{-1}}$) constitue la réciproque du temps pendant lequel M est sous forme libre dans la couche de réaction macroscopique $\bar{\lambda}$ (m). $\bar{c}_{\mathrm{S}}^{\lambda}$ est égale à $\bar{c}_{\mathrm{S}}(1-\gamma)$, où le terme (1-$\gamma$) correspond à la fraction moyenne de sites réactifs contenue dans les particules qui chevauche la couche de réaction macroscopique.

De récents formalismes théoriques ont étendu les expressions décrites pour des solutions métalliques contenant des ligands moléculaires afin de prendre en compte la chemodynamique des particules avec les ions métalliques en présence d'une surface accumulatrice. Par souci de simplicité, seules les expressions du flux cinétique et du flux de diffusion seront décrites dans ce manuscrit.

A l'échelle macroscopique d'une surface accumulatrice, le critère de labilité décrit précédemment pour les ligands moléculaires (c'est-à-dire le ratio entre les flux cinétiques et diffusifs, voir schéma 1.3 du paragraphe 1.3.1) reste transposable en présence de ligands particulaires [63]. Dans le cas de complexes métalliques particulaires, le flux cinétique J_{kin} correspond au flux de métal provenant de la dissociation de M de la couche molle et qui est adsorbé/accumulé par la surface consommatrice à l'échelle macroscopique. En considérant raisonnablement que la diffusion de M depuis la couche molle vers l'extraparticulaire est beaucoup plus rapide que la diffusion de la particule vers la surface consommatrice macroscopique, le flux cinétique J_{kin} ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) s'écrit :

$$J_{\mathrm{kin}} = k_{\mathrm{d}}^{\mathrm{is}} \bar{c}_{\mathrm{MS}}^{\lambda} \bar{\lambda} \tag{1.17}$$

où $\bar{c}_{\mathrm{MS}}^{\lambda}$ ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) est la concentration moyenne en complexes métal - site réactif dans la couche de réaction macroscopique.

Le flux de diffusion de M J_{diff}^{*} concerne toutes les formes de M présentes en solution qui diffuse depuis le milieu vers la surface accumulatrice macroscopique (ions métalliques sous forme libre M, les complexes de sphères internes MS, etc). Dans ce cadre, J_{diff}^{*} ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) devient :

$$J_{\mathrm{diff}}^{*} = \frac{\bar{D}(\bar{c}_{\mathrm{M}}^{*} + \bar{c}_{\mathrm{MS}} + \bar{c}_{\mathrm{M}} + ...)}{(\frac{1}{\bar{\delta}} + \frac{1}{r_0})^{-1}} \tag{1.18}$$

où $\bar{D}$ ($\mathrm{m^2\,s^{-1}}$) est le coefficient de diffusion moyen des différentes formes de M pondérées par leurs concentrations respectives, c_{M}^{*} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) la concentration en métal libre en solution, $\bar{c}_{\mathrm{MS}}$ ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) et $\bar{c}_{\mathrm{M}}$ ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) la concentration en complexe MS et en métal libre moyennée sur le volume totale de la solution considérée, respectivement. $\bar{\delta}$ (m) décrit l'épaisseur de la couche de diffusion moyenne à l'échelle macroscopique et r_0 (m) le rayon de la surface accumulatrice.

1.3.8 Conséquences sur la biodisponibilité des métaux

Les processus aux interfaces accumulatrices de métaux décrits précédemment (voir paragraphe 1.3.1) sont applicables à une surface biologique. De ce fait, ces formalismes peuvent être employés pour faciliter la compréhension de la dynamique de partition des métaux aux inter-

faces bactériennes. Partant de ce constat, ces travaux de thèse avaient pour but de déterminer les processus d'assimilation des métaux en tenant compte de :

- la membrane biologique consommatrice de métaux qui perturbe la dynamique de spéciation des complexes métalliques et génère une diffusion de M et de ML depuis le milieu vers sa surface. La situation pour laquelle l'étape de diffusion est limitante dans l'assimilation globale de M n'est pas considérée dans le modèle BLM (voir 1.2.3),
- l'adsorption des métaux sur des sites ligands à la surface biologique menant ou non à l'internalisation,
- l'internalisation des métaux sous forme libre par le mécanisme de Michaelis-Menten,
- la chemodynamique des métaux internalisés dans le volume intracellulaire,
- l'excretion des métaux internalisés vers le milieu extracellulaire,
- la déplétion des métaux dans le milieu extracellulaire au cours du temps.

Jusqu'à présent, différents travaux ont été effectués en ce sens, sans toutefois tenir compte de la totalité des processus en jeu. Certains de ces travaux se fondent sur l'équation de Best [71], qui ont porté sur l'assimilation de sucres par des cellules biologiques. Cette équation est fondée sur l'équation de Michaelis-Menten pour le mécanisme d'internalisation du métal et la loi de Fick pour son transport.

L'équation de Michaelis-Menten permet de décrire le flux d'internalisation d'un métal en fonction de la concentration en M aux abords de la surface c_{M}^{a} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) et d'une constante (constante de Michaelis-Menten K_{M} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$)) :

$$J_{\mathrm{u}} = \frac{J_{\mathrm{u}}^{*} c_{\mathrm{M}}^{a}}{K_{\mathrm{M}} + c_{\mathrm{M}}^{a}} \tag{1.19}$$

avec J_{u} ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) et J_{u}^{*} ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) les flux d'internalisation et flux d'internalisation maximum.

La loi de Fick utilisée par Best exprime le flux de M J_{M} depuis le milieu vers la surface biologique en fonction de la concentration en métal dans le milieu c_{M}^{*} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$), de la concentration à la surface biologique c_{M}^{a} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) et d'un facteur de perméabilité k † ($\mathrm{m^{3}\,s^{-1}}$).

$$J_{\mathrm{M}} = k(c_{\mathrm{M}}^{*} - c_{\mathrm{M}}^{a}) \tag{1.20}$$

En régime stationnaire, J_{u} et J_{M} sont considérés égaux et une expression du flux d'assimilation du métal peut être déterminée en fonction des paramètres c_{M}^{*}, c_{M}^{a}, K_{M} et J_{u}^{*}.

Beaucoup plus tard en 1999, un développement théorique [15] fondé sur l'équation de Best décrit les flux (i) de diffusion des métaux depuis le milieu vers la surface biologique et de (ii) le flux de passage transmembranaire, en tenant compte de la spéciation dynamique extracellulaire des métaux. Ce formalisme théorique a été étendu [50] afin d'être appliqué aux cellules biologiques (de l'ordre du micromètre, ce qui modifie l'expression des flux de métaux). Une étude parue l'année suivante a appliqué avec succès le modèle sur des moules et des carpes [51]. En 2004, ce formalisme théorique a été étendu afin de tenir compte de (i) la diminution de la concentration de métal en solution au cours du temps et de (ii) la fraction adsorbée de M sur des sites ligands menant à l'internalisation pour des concentrations faibles en métal (dans le régime de Henry) [72]. Malgré les extensions de ce modèle, certains aspects ne sont pas pris en compte, tels que :

†. k ($\mathrm{m^{3}\,s^{-1}}$) correspond au produit de la surface cellulaire A ($\mathrm{m^{2}}$) avec un coefficient de transfert de M au travers la matrice biologique m_{t} ($\mathrm{m\,s^{-1}}$)

- la contribution de l'électrostatique du système dans la diffusion de M ou des complexes métalliques,
- l'adsorption des métaux sur deux types de sites ligands (site menant à l'internalisation et site de complexation simple),
- la croissance (ou l'inhibition de croissance) des organismes,
- la chemodynamique intracellulaire du métal et/ou du complexe métallique internalisé.

Plus tard, Hajdu et al. [52] proposent à leur tour un autre modèle pour décrire la dynamique de partition de M aux biointerfaces. Dans ce modèle, les auteurs tiennent compte de :

- l'adsorption de M sur des sites passifs qui décrit une isotherme d'adsorption de type Langmuir,
- l'adsorption de M sur des sites actifs suivie d'une internalisation de M selon une constante cinétique k_{int} (s^{-1}),
- d'une excrétion de M depuis le milieu intracellulaire jusqu'au milieu extracellulaire (l'un des moyens de défense des organismes, voir 1.1.1),
- la déplétion de M au cours du temps dans le milieu extracellulaire,
- la variation de la concentration intracellulaire de M par un bilan des flux entrants et sortants.

Là encore, certains processus clefs comme le transport réactif de M et sa spéciation dans le milieu extracellulaire sont manquants.

Enfin, une dernière étude de Zhang et al. [73] propose un modèle fondé sur le mécanisme d'internalisation des métaux via l'expression de Michaelis-Menten, et de spéciation dynamique de M en présence d'une solution métallique de cadmium sous forme libre et complexée par des ligands inorganiques. Malheureusement, l'absence de prise en compte des processus tels que l'adsorption de M sur la biosurface, la contribution de l'électrostatique dans le transport de M, l'excrétion de M depuis l'intracellulaire vers le milieu extérieur et la déplétion de M dans le milieu persiste.

Pour conclure, aucun modèle cité précédemment ne considère le devenir des métaux dans le milieu intracellulaire. Une première approche sur ce dernier point a été réalisée par Redeker et al. [74], qui ont proposé le modèle Bio-Active Metal (BAM) - Bio-Inactive Metal (BIM). Celui-ci considère que chaque organisme possède une capacité d'accumulation des ETM représentée de façon fictive par deux compartiments. L'accumulation des métaux dans le premier compartiment (BIM) n'induit aucun effet toxique à l'organisme considéré. Le remplissage du compartiment BAM au-delà du seuil d'une quantité de métal dans BIM génère des effets toxiques à l'organisme. Par cette représentation, les auteurs proposent un outil qui relie les cinétiques de compartimentalisation du métal au niveau intracellulaire avec le fractionnement de M dans les tissus. En revanche, ils ne tiennent pas compte des aspects extracellulaires évoqués précédemment (transport réactif, adsorption sur des sites actifs et passifs, dépletion et excretion des métaux, etc.).

1.4 Approche théorique fondée sur une équation généralisée de Best

Les études décrites précédemment ont permis une meilleure compréhension des interactions entre les contaminants métalliques et les organismes vivants, sans toutefois prendre en considération la totalité des processus impliqués dans leur assimilation.

Partant de ce constat, Duval [75] propose une théorie fondée sur l'analyse de la dynamique de partition des métaux aux biointerfaces. Ce modèle s'appuie sur l'équation de Best en régime

stationnaire [71] (voir paragraphe 1.3.8), et tient compte des interactions électrostatiques entre les ions métalliques et la biosurface chargée, d'une part en corrigeant les flux de diffusion des métaux à travers le milieu vers la biosurface (via le facteur correctif $\bar{f}_{\mathrm{el}}$) et d'autre part en tenant compte de la distribution spatiale des métaux aux abords de la biosurface (via le facteur de Boltzmann β_{a}). Ces deux paramètres adimensionnels dépendent de la concentration en électrolyte, des dimensions cellulaires et des propriétés électrostatiques de la biomembrane. Enfin, une dernière expression issue d'un bilan de masse entre la quantité de M dépletée au cours du temps dans le milieu extracellulaire et la quantité de M internalisé est utilisée dans ce formalisme.

Cette approche théorique permet l'évaluation des flux de métaux depuis la solution jusqu'au passage transmembranaire, en tenant compte des processus de transport par diffusion conductive, d'adsorption et d'internalisation de M. La suite de cette partie est consacrée à l'explication de ce modèle théorique. Puis, une première extension de ce modèle [76] qui tient compte du phénomène d'excrétion des métaux depuis l'intracellulaire vers l'extracellulaire est détaillée. Une seconde extension [77] (non développée ici) établit le lien entre l'inhibition de croissance des cellules biologiques et la complexation de M avec des sites inhibiteurs portés par la membrane et présents dans l'intracellulaire. Par souci de simplicité, seules les principales expressions seront décrites ici. Le lecteur est invité à consulter [75, 76, 78, 77] pour plus de précisions.

1.4.1 Cadre du modèle

On considère une suspension de microorganismes sphériques de rayon a (m) dans une solution métallique composée d'électrolyte de concentration largement en excès en comparaison avec la concentration de métal M en solution $c^*_{\mathrm{M}}(\mathrm{mol\,m^{-3}})$. Les microorganismes sont recouverts d'une couche molle d'épaisseur d (m) composée de matière organique/inorganique adsorbée sur la biosurface ou d'origine biotique.

Fondée sur l'approche de Best, l'assimilation de M est gouvernée par deux étapes successives : (i) le transport de M depuis le milieu vers la biosurface et (ii) l'internalisation de M via le mécanisme de Michaelis-Menten en régime permanent. Dans [75], l'auteur utilise l'équation de Nernst-Planck pour décrire le transport de M. Celle-ci tient compte du gradient de concentration de M sous l'influence des interactions électrostatiques entre M et les ions contenus dans l'atmosphère proche du microorganisme.

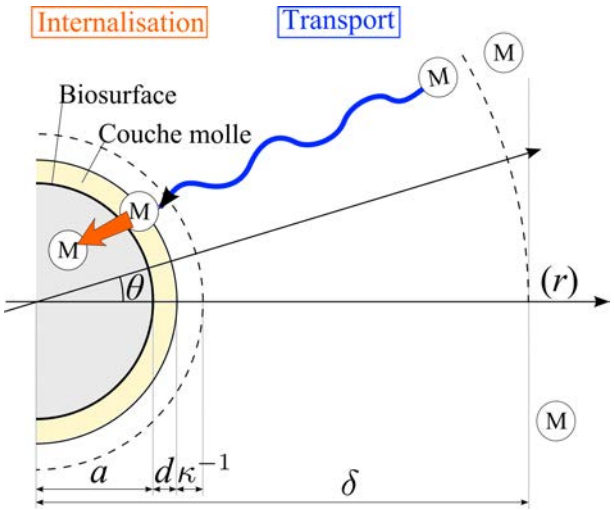


FIGURE 1.11 – Représentation schématique de l'interface cellule/milieu selon le repère polaire (r,θ).

Lorsqu'un microorganisme est en contact avec une solution métallique, la consommation

de M par la biosurface génère un gradient de concentration dans l'environnement proche de la biosurface, puis un transport par diffusion de M vers celle-ci, soumis à des interactions électrostatiques. Dans ce contexte, l'expression du flux de transport de M depuis le milieu vers la biosurface issue de l'équation générale de Nernst-Planck est :

$$J_{\mathrm{M}} = J_{\mathrm{M}}^{*}\left(1 - \frac{c_{\mathrm{M}}^{a}\beta_{\mathrm{a}}^{-1}}{c_{\mathrm{M}}^{*}}\right) \tag{1.21}$$

où β_{a}^{-1} (sans dimension) est la réciproque du facteur d'accumulation de Boltzmann au niveau de la biosurface (voir équation 1.15 au paragraphe 1.3.4) et corrige de l'électrostatique la concentration de M aux abords de la biomembrane c_{M}^{a}.

L'internalisation de M par le mécanisme de Michaelis-Menten est décrite par l'expression (1.19), qui relie le flux maximal J_{u}^{*} au flux d'internalisation J_{u} des métaux en fonction c_{M}^{a} et d'un paramètre d'affinité pour le métal sur un site ligand actif K_{M}.

D'un point de vue biologique, il existe différents mécanismes qui mènent à l'internalisation des métaux. Celle-ci s'effectue uniquement par des transports dits actifs ou facilités via des protéines membranaires qui peuvent être de trois types : des pompes ATPases, des canaux et des transporteurs protéiques. Dans ce formalisme, l'internalisation est représentée d'un point de vue global matérialisée par une constante cinétique d'internalisation physique k_{int} (s^{-1}), et n'est pas associée à l'un de ces mécanismes biologiques en particulier.

A partir de l'expression du flux d'assimilation décrit par le mécanisme de Michaelis-Menten et considérant que pour des faibles concentrations en M le flux d'uptake de M J_{u} est fonction de la concentration sorbée de M à la surface biologique et d'une constante cinétique k_{int} (s^{-1}), l'expression du flux maximal J_{u}^{*} s'écrit :

$$J_{\mathrm{u}}^{*} = K_{\mathrm{H}} k_{\mathrm{int}} K_{\mathrm{M}} \tag{1.22}$$

avec K_{H} (m) le coefficient d'adsorption dans le régime linéaire de Henry.

De la même manière que la relation de Best, l'égalité des flux entre J_{M} (équation 1.21) et J_{u} (équation 1.19) en régime permanent relie la concentration de M à la surface biologique c_{M}^{a} en fonction de la concentration de M dans le milieu c_{M}^{*}. Après réarrangements, un paramètre dit de biodisponibilité Bn apparaît :

$$\mathrm{Bn} = \frac{D_{\mathrm{M,out}} f_{\mathrm{el}} a^{-1}}{K_{\mathrm{H}} k_{\mathrm{int}} \beta_{\mathrm{a}}} \tag{1.23}$$

où $1/K_{\mathrm{H}} k_{\mathrm{int}} \beta_{\mathrm{a}} (\mathrm{m\,s^{-1}})$ et $1/D_{\mathrm{M,out}} f_{\mathrm{el}} a^{-1} (\mathrm{m\,s^{-1}})$ correspond à la résistance au passage transmembranaire R_{S} de M depuis le milieu extérieur vers le milieu intracellulaire et à la résistance R_{T} du transport de M depuis le milieu vers la biosurface, respectivement. Le facteur f_{el} (adimensionnel) corrige la diffusion de M des effets électrostatiques. L'évaluation du nombre de biodisponibilité Bn permet d'identifier le processus qui limite l'assimilation de M (transport de M depuis le milieu vers la biosurface versus passage transmembranaire de M). En effet, lorsque :

- Bn $<<$ 1, l'assimilation de M depuis le milieu est limitée par son transport depuis le milieu extracellulaire jusqu'à la surface biologique.
- Bn $>>$ 1, l'assimilation de M depuis le milieu est limitée par son passage transmembranaire du côté externe de la membrane vers l'intracellulaire.

- Bn ≈ 1, le transport dans le milieu extracellulaire et le passage transmembranaire limite l'assimilation de M.

Une dernière expression issue du bilan de masse entre la quantité de métal dépléte dans le milieu extracellulaire (terme à gauche de l'égalité) et la quantité de métal internalisé au cours du temps (terme à droite de l'égalité) peut être établie. L'expression de conservation de la masse s'écrit :

$$4\pi \int_a^{r_c} r^2(c_\mathrm{M}(r,t) - c_\mathrm{M}(r,0))\mathrm{d}r = -4\pi a^2 \int_0^t J_\mathrm{u}(t)\mathrm{d}t \tag{1.24}$$

avec r_c le rayon de la cellule de Kuwabara (m). L'utilisation du modèle de Kuwabara permet de considérer une dispersion homogène des cellules dans le volume total de la solution.

Ainsi, à partir des quatre expressions précédemment évoquées (à savoir l'équation de transport (1.21), l'expression de Michaelis-Menten (voir expression 1.19) pour l'internalisation de M, l'égalisation des flux $J_\mathrm{M} = J_\mathrm{u}$ en régime permanent qui relie c_M^a en fonction de c_M^* et le bilan de masse (1.24)), une équation différentielle de c_M^* en fonction de K_H, k_int, K_M, β_a, $D_\mathrm{M,out}$, f_el et a^{-1} peut être formulée :

$$c_\mathrm{M}^*(t)U(t)[2K_\mathrm{M}\beta_\mathrm{a}^{-1} + c_\mathrm{M}^*(t)U(t)]^{-1} = \Omega_1 \frac{dc_\mathrm{M}^*}{dt} + \Omega_2 d[c_\mathrm{M}^*(t)U(t)]/dt \tag{1.25}$$

avec $U(t)$ une fonction mathématique qui dépend de Bn, K_M, c_M^* et β_a. Ω_1 et Ω_2 sont des paramètres adimensionnels qui dépendent de la distribution du potentiel électrostatique à travers la biointerface.

La résolution de cette équation différentielle permet d'exprimer $c_\mathrm{M}^*(t)$ en fonction du temps. Il existe une solution générale de cette équation, dont l'utilisation s'applique à tous les systèmes, mais nécessite des outils de calcul numérique. Dans son article, Duval [75] dérive aussi deux solutions analytiques qui correspondent aux cas où l'assimilation de M est limitée soit par son transport dans le milieu extracellulaire soit par son passage transmembranaire du côté extracellulaire vers l'intracellulaire. Deux temps caractéristiques sont issus de ces expressions analytiques. Le premier paramètre τ_L (s) correspond au temps caractéristique du passage transmembranaire de M, dont l'expression dans les conditions de Donnan est donnée par :

$$\tau_\mathrm{L} = \frac{V_\mathrm{soft} + V_\mathrm{p}/(\varphi\beta_D)}{S_\mathrm{a} k_\mathrm{int} K_\mathrm{H}} \tag{1.26}$$

avec V_soft (m^3) le volume de la couche molle qui englobe le microorganisme, V_p (m^3) le volume d'une cellule de rayon a (m), φ (adimensionnel) la fraction volumique en cellule, β_D le facteur d'accumulation de Boltzmann dans les conditions de Donnan et S_a (m^2) la surface du microorganisme.

Le second paramètre τ_E (s) définit le temps caractéristique du transport de M à travers le milieu jusque dans le milieu intracellulaire. L'expression de τ_E s'écrit :

$$\tau_\mathrm{E} = 4\pi G_{\mathrm{a,r}_c} R_\mathrm{S}/S_\mathrm{a} - J_\mathrm{u}^* \Omega_1 R_\mathrm{T} \tag{1.27}$$

.

où Ω_1 est un paramètre adimensionnel qui dépend de la distribution du potentiel électrostatique à travers la biointerface.

Similairement au nombre de biodisponibilité Bn, la comparaison de ces deux temps caractéristiques est aussi un indicateur des processus qui limitent l'uptake de M par la cellule. Ainsi :

- lorsque $\tau_{\mathrm{E}} \gg \tau_{\mathrm{L}}$, l'étape de transport de M depuis le milieu extracellulaire vers la surface biologique est limitante,
- lorsque $\tau_{\mathrm{E}} \approx \tau_{\mathrm{L}}$, l'étape de passage transmembranaire de M est limitante.

Lorsque l'assimilation de M est limitée par son transport dans le milieu extracellulaire, la diminution de la concentration de M dans le milieu à des temps longs $c^*_{\mathrm{M}}(t \to \infty)$ suit l'expression suivante : $c^*_{\mathrm{M}}(t \to \infty) = c^*_{\mathrm{M}}(0)e^{-t/\tau_{\mathrm{E}}}$. A l'inverse, lorsque l'assimilation est limitée par le passage transmembranaire, $c^*_{\mathrm{M}}(t \to \infty) = c^*_{\mathrm{M}}(0)\left[1 - \frac{K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}}{c^*_{\mathrm{M}}(0)}\frac{t}{\tau_{\mathrm{L}}}\right]$

1.4.2 Extension du modèle : excrétion du métal

En 2014, Duval et al [76] ont étendu ce modèle afin de prendre en compte un possible flux d'excrétion de M, l'un des mécanismes de défense largement répandu parmi les organismes vivants. Dans cette approche, le flux d'excrétion est modélisé par le produit d'une constante d'excrétion k_{e} (s^{-1}) avec la concentration de M internalisé $\phi_{\mathrm{u}}(t)$ (exprimé en $\mathrm{mol\,m}^{-2}$) :

$$J_{\mathrm{e}} = k_{\mathrm{e}}\phi_{\mathrm{u}}(t) \tag{1.28}$$

L'ajout de ce flux d'excrétion modifie l'expression des flux en régime permanent. En effet, le flux de transport de M à travers le milieu jusqu'à la biointerface est égal au flux d'uptake de M ôté du flux d'excrétion de M, d'où :

$$J_{\mathrm{M}} = J_{\mathrm{u}} - J_{\mathrm{e}} \tag{1.29}$$

Après réarrangements, l'expression générale de la concentration de M en fonction du temps $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ devient (voir détails dans [76]) :

$$c^*_{\mathrm{M}}(t) = (K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}\mathrm{Bn}^{-1} - k_{\mathrm{e}}\phi_{\mathrm{u}}^0 R_{\mathrm{T}})e^{-k_{\mathrm{e}}t} + K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}\left\{\bar{c}^a_{\mathrm{M}}(t) - \mathrm{Bn}^{-1}\left[\frac{1}{1+\bar{c}^a_{\mathrm{M}}(t)} - k_{\mathrm{e}}e^{-k_{\mathrm{e}}t}\int_0^t \frac{e^{k_{\mathrm{e}}\xi}}{1+\bar{c}^a_{\mathrm{M}}(\xi)}d\xi\right]\right\} \tag{1.30}$$

où ϕ_{u}^0 est la concentration de métal total internalisé à $t = 0$, ξ une variable d'intégration muette et $\bar{c}^a_{\mathrm{M}}(t)$ (adimensionnel) est égal à $c^a_{\mathrm{M}}(t)/K_{\mathrm{M}}$.

Comme précédemment, deux solutions analytiques sont issues de cette solution générale :

<u>Cas de forte affinité</u> : lorsque $K_{\mathrm{M}} \ll c^a_{\mathrm{M}}$, $J_{\mathrm{u}}(t) \to J^*_{\mathrm{u}}$ via l'expression de Michaelis-Menten (voir expression 1.19). Ce cas correspond à une limitation de l'assimilation de M par l'étape de passage transmembranaire. Cette condition constitue l'une des hypothèses de base des modèles thermodynamiques présentés plus haut (voir paragraphe 1.2).

<u>Cas de faible affinité</u> : lorsque $K_{\mathrm{M}} \gg c^a_{\mathrm{M}}$, l'expression de Michaelis-Menten peut être linéarisée sous la forme $J_{\mathrm{u}} = K_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}c^a_{\mathrm{M}}$ et correspond au régime linéaire de Henry.

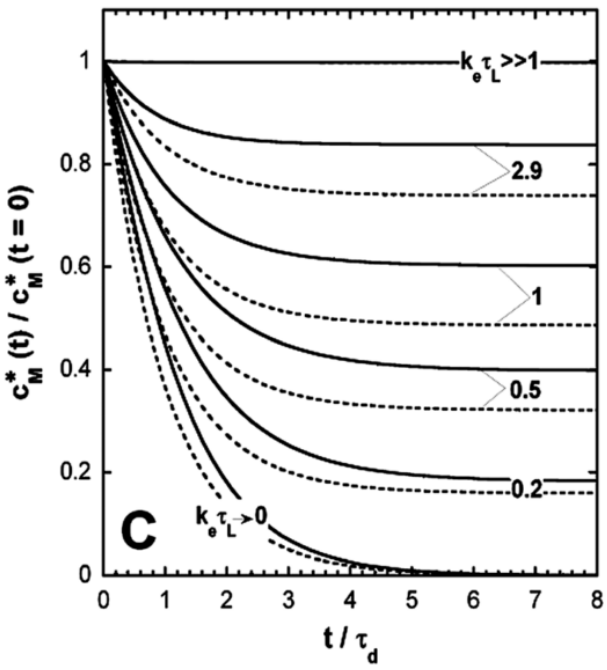


FIGURE 1.12 – Exemple de profils de dépletion de M ($c^*_{\mathrm{M}}(t)/c^*_{\mathrm{M}}(0)$) en fonction du temps (adimensionnalisé sous la forme t/τ_{d}, avec τ_{d} le temps caractéristique de déplétion des métaux du milieu), obtenus par l'expression rigoureuse de $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ (traits pleins) pour différentes valeurs de constante d'excrétion k_{e} adimensionnalisée par le produit $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$. Les traits pointillés correspondent aux profils de dépletion obtenus par l'expression analytique dans le cas de faible affinité. Les paramètres utilisés sont : $a = 400$nm, $d = 50$nm, $\varphi = 10^{-6}$, $k_{\mathrm{int}}K_{\mathrm{H}} = 2 \times 10^{-3}$, $D_{\mathrm{M,out}} = 10^{-9}(\mathrm{m}^2\,\mathrm{s}^{-1})$, $K_{\mathrm{M}} = 10^{-5}$, $\varepsilon = D_{\mathrm{M,in}}/D_{\mathrm{M,out}} = 1$, $\phi^0_{\mathrm{u}} = 0$, $c^*_{\mathrm{M}}(t=0) = 10^{-5}\mathrm{mole/m}^3$, la valence de l'électrolyte $z = 1$, $z_{\mathrm{M}} = 2$. Il n'y a pas d'adsorption de M sur la biomembrane et dans la couche de surstructures. Il est considéré ici que que les charges de surface sont écrantées ($\beta_a = 1$). Graphe issu de [76], Figure 2C.

Ce graphe illustre la déplétion de la concentration en métal dans le milieu (normalisée par la concentration à $t = 0$) en fonction du temps, pour différentes constantes cinétiques d'excrétion, représentées ici par le produit adimensionnel $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$. Lorsque $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} \gg 1$, l'excrétion de M depuis le milieu intracellulaire vers le milieu extérieur est si importante qu'elle compense complètement l'internalisation de M, bien que celle-ci soit opérationnelle. Le résultat net de cette forte excrétion est une dépletion inexistante de M dans le milieu. A l'inverse, lorsque $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} \to 0$, l'excrétion de M est si faible par rapport à son internalisation que pour des temps longs, $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ tend vers une concentration nulle. Enfin, pour des valeurs intermédiaires de $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$, la dépletion de M tend vers des valeurs plateau de $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ non nulles révélant l'atteinte d'un équilibre entre le flux d'assimilation J_{u} et le flux d'excrétion J_{e} de M pour des temps longs.

Confrontation de l'approche théorique avec des résultats expérimentaux

En 2015, Rotureau et al [78] ont proposé une méthodologie pas-à-pas afin d'analyser quantitativement les cinétiques de dépletion du métal et d'en extraire les paramètres qui régissent les processus aux interfaces biologiques tels que : la constante cinétique d'internalisation k_{int} et d'excrétion k_{e} ainsi que la constante d'affinité de M sur les sites d'internalisation K_{M}. La souche bactérienne *Pseudomonas putida* consommatrice d'ions Cd^{2+} a été utilisée pour ces travaux expérimentaux. Celle-ci a été mutée afin de supprimer l'expression des gènes qui codent pour la production de pompes efflux spécifiques au Cd et ce faisant, exacerber la déplétion de M dans le milieu. La suite du texte détaille les étapes de cette méthode.

La première étape consiste à acquérir expérimentalement les cinétiques de déplétion du cadmium dans le milieu (par dosage in-situ) à différentes fractions volumiques en cellule. Le set de données obtenu est graphiquement semblable à la Figure 1.12, à la différence près que les courbes obtenues représentent les cinétiques de déplétion de M dans le milieu extracellulaire à différentes fractions volumiques φ, et non pour différentes capacités d'excrétion de la cellule ($k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$).

Afin de simplifier les expressions mathématiques, ces travaux ont été effectués dans des conditions physicochimiques pour lesquelles les interactions électrostatiques de surface ne jouent pas de rôle majeur dans la dynamique d'assimilation de M. Ainsi, les conditions physicochimiques dans lesquelles ont été conduites ces expérimentations ont permis de (i) écranter les charges de la surface biologique, ce qui se traduit par un facteur de Boltzmann $\beta_a = 1$, et (ii) poser $\bar{f}_{\mathrm{el}} = 1$, ce qui correspond à une situation d'équilibre thermodynamique entre c^*_{M} et c^a_{M} pour $t \to \infty$ (c'est-à-dire l'assimilation de M par la cellule n'est pas limitée par la diffusion de M dans le milieu pour des temps longs). Enfin, l'hypothèse d'une épaisseur négligeable de la couche polymérique par rapport au rayon de la cellule dans les conditions de Donnan a permis d'utiliser une expression simplifiée de τ_{L} (voir expression 1.26). L'expression de $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ devient alors $c^*_{\mathrm{M}} = c^a_{\mathrm{M}}$.

Dans ces conditions, une expression analytique issue de l'équation $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ permet d'exprimer les valeurs des plateaux $c^*_{\mathrm{M}}(t \to \infty)$ en fonction de la fraction volumique φ. Cette expression est fonction de K_{M}, β_a, $c^*_{\mathrm{M}}(0)$, φ et de φ^*, qui est un paramètre adimensionnel fonction du ratio $k_{\mathrm{e}}/K_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}$.

$$\varphi^* = \frac{V_{\mathrm{P}}k_{\mathrm{e}}}{S_{\mathrm{a}}\beta_a K_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}} \tag{1.31}$$

Ainsi, l'ajustement de la courbe théorique $c^{*,\infty}_{\mathrm{M}}(\varphi)$ sur les données expérimentales permet de déterminer les deux paramètres inconnus K_{M} et φ^*. A l'issue de cette deuxième étape et connaissant la valeur de φ^*, la reconstruction des courbes $c^*_{\mathrm{M}}(t)$ à différentes fractions volumiques via l'expression rigoureuse ou l'un des cas analytiques s'effectue par l'ajustement d'un unique paramètre physique, soit k_{e} soit $K_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}$.

1.4.3 Relation entre dynamique de partition des métaux et tests de toxicité par inhibition de croissance

Dans le domaine d'application de BLM (cas où le transport des métaux dans le milieu extracellulaire n'est pas cinétiquement limitant dans leur assimilation par les cellules), l'approche décrite ci-dessus a été étendue en 2015 par Duval et al. [77] afin de relier la théorie sur la dynamique de partition des métaux aux interfaces à la cinétique de croissance cellulaire. Dans ce formalisme, les flux de métaux sont corrigés de (i) la variation de la taille des cellules lors des divisions cellulaires et de (ii) la croissance cellulaire et son inhibition, considérée comme la conséquence de la complexation des métaux sur les sites ligands inhibiteurs de croissance portés par la surface et présents dans le milieu intracellulaire. Cette théorie a été confrontée à des données expérimentales d'exposition chronique de métaux à des microalgues et a permis d'identifier si la toxicité provenait de la complexation des métaux et/ou de l'accumulation des métaux dans le milieu intracellulaire. En 2016, le domaine d'application de cette théorie a été étendu au cas général où l'assimilation des métaux est limitée soit par le transport des métaux à travers le milieu soit par le passage transmembranaire des métaux de l'extracellulaire vers l'intracellulaire [79].

1.5 Utilisation de biosenseurs comme outils de mesure de la dynamique de partition et de la biodisponibilité des métaux

Fondée expérimentalement sur le suivi cinétique de la déplétion des métaux à différentes fractions volumiques, la méthodologie précédemment décrite a l'inconvénient de reposer sur une mesure indirecte de la quantité de métal internalisé. Pour contourner ce problème, d'autres méthodes expérimentales peuvent être envisagées. L'un des outils possibles pour estimer les concentrations en métaux biodisponibles sont les systèmes biosenseurs. Ce sont des systèmes bactériens génétiquement modifiés afin de produire un signal mesurable en fonction de la quantité internalisée de composés cibles (ici les métaux). Les diverses constructions génétiques possibles reposent toutes sur le même principe : des gènes rapporteurs sont fusionnés à un groupe de gènes (opérateur) sur lequel est fixée une protéine appelée répresseur. Cette dernière est issue de l'expression de gènes appelés gènes régulateurs. Le répresseur possède une forte affinité avec l'élément recherché. En l'absence de cet élément, l'expression des gènes rapporteurs est réprimée par le répresseur fixé en amont des gènes, ce qui empêche les ARN polymérases de transcrire le brin d'ADN (biosenseur off). L'inactivation du répresseur survient par une complexation de ce dernier avec l'ion métallique internalisé. Cette complexation du répresseur libère le brin d'ADN, permet à l'ARN polymérase de se fixer et de transcrire les gènes rapporteurs en ARN, eux-mêmes traduits en protéines par les ribosomes (biosenseur on). Un exemple du fonctionnement d'un biosenseur actif (**A**) et inactif (**B**) est schématiquement représenté au Chapitre 2, Figure 2.2. En fonction des types de systèmes rapporteurs utilisés (signaux chimiques, électrochimiques et optiques), les protéines formées sont de natures et de fonctions différentes.

Les biosenseurs fondés sur l'émission de photons ont été largement développés pour la détection [80, 81] voire la quantification des ETM en solution [82], de par leur facilité d'application. Deux systèmes de gènes rapporteurs émettent des photons dans le visible par :

- fluorescence via la Green Fluorescent Protein (GFP). L'excitation du groupe chromophore de la protéine par l'émission de photons à 397nm ou 475nm est suivie d'une désexcitation par l'émission de photons à 504nm. Les avantages de la GFP résident dans le fait qu'aucun cofacteur n'est nécessaire à la protéine pour fonctionner [83], qu'elle est résistante à de nombreuses variations de conditions physicochimiques (chaleur, pH, agents chaotropiques, solvants organiques et protéases) [84] et que son expression dans le milieu n'induit pas d'effets toxiques aux cellules [85]. La GFP a été isolée pour la première fois sur de l'ADN provenant de la méduse *Aequorea victoria*, dont la protéine émet à 504nm (vert). Depuis, d'autres gènes rapporteurs de GFP issus de divers organismes vivants sont utilisés et codent pour des protéines qui émettent dans différentes longueurs d'ondes (bleu, jaune, rouge) [86]
- luminescence via la luciferase. Dans ce manuscrit, seule la luciferase issue de la bactérie *Vibrio fischeri* sera explicitée. Le lecteur est invité à se référer à [87] pour des informations sur les autres luciférases. Le système rapporteur bioluminescent considéré ici est codé par les gènes *luxCDABE*. *luxA* et *luxB* codent respectivement pour deux sous-unités α et β qui forment la luciférase. La forme réduite du cofacteur Flavine MonoNucleotide ($FMNH_2$) et des aldéhydes à longues chaînes carbonnées présents dans la cellule jouent le rôle de substrat de la luciférase qui catalyse l'oxydation par le dioxygène dissous et mène à l'émission de photons à 490nm. Les acides gras et FMN formés sont "recyclés" pour maintenir l'émission de photons dans le temps. FMN est de nouveau réduit en $FMNH_2$ par l'activité de l'enzyme NADPH-Flavine-reductase naturellement présente dans l'intracellulaire. La réduction des acides gras s'opère par trois enzymes couplées : la réductase, la synthetase et la transferase, exprimées par les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE*, respectivement [88, 89].

L'utilisation de systèmes rapporteurs luminescents ou fluorescents (spécifiques à un ou plusieurs composés donnés) par les microorganismes engendre une consommation significative d'énergie [90], moins importante pour un système basé sur la GFP que pour un système utilisant la

luciférase [91].

Une méthodologie en deux étapes est couramment utilisée pour la détermination de la fraction de métal biodisponible dans les eaux naturelles. Dans un premier temps, les biosenseurs sont exposés à une gamme de solution de concentration en métal connue préparée au laboratoire. Le suivi cinétique de l'induction de lumière permet d'établir la relation entre l'induction de lumière et la concentration en métal à laquelle le biosenseur est exposé. A l'issu de cette étape de calibration, le signal émis par les biosenseurs dispersés dans l'échantillon à analyser permet d'estimer la concentration en métal. Très souvent, des souches constitutives (souches qui émettent des photons quelle que soit la concentration en M) servent de contrôle et permettent de vérifier que les conditions physicochimiques des milieux d'exposition n'induisaient pas d'effets toxiques aux cellules bactériennes. Un exemple de mesure des cinétiques d'émission de lumière des biosenseurs à différentes concentrations en M dans le milieu est présenté ci-dessous :

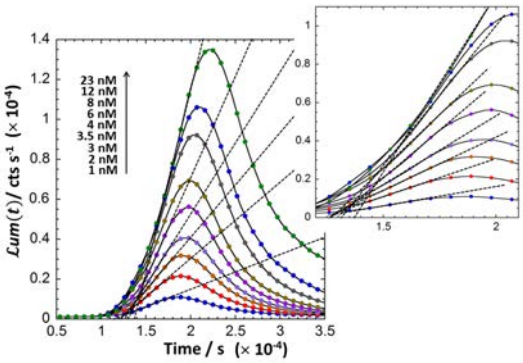


FIGURE 1.13 – Dépendance au temps de l'émission de photons à différentes concentrations en Cd(II) initiales mesurée par luminométrie. Les données (points) ont été obtenues à partir d'une suspension de biosenseurs sensibles au cadmium dispersés dans une solution à 10mM de force ionique, à une Densité Optique à 600nm (DO_{600}) égale à 0.2. Les lignes correspondent à une interpolation par splines cubiques. Pour chaque courbe, la tangente représente la pente maximale observée. L'encart est un zoom des données. L'exemple est issu du Supporting Information de l'article présenté au chapitre 5.

Malgré la simplicité de cette méthode, l'interprétation des résultats se révèle difficile, et sont presque uniquement qualitatifs. Seule une étude a permis de correctement quantifier les concentrations en métaux dans des échantillons d'eaux naturelles par l'utilisation de biosenseurs, confirmées par des analyses chimiques indépendantes [82]. Les raisons avancées de la difficulté d'obtenir des mesures quantitatives de concentration de métaux sont multiples. La quantité de photons émise étant directement liée aux capacités énergétiques des microorganismes, les performances des biosenseurs peuvent être limitées, dues à des conditions physicochimiques biologiquement défavorables, comme le manque de nutriments, la présence de composés inhibiteurs, le mélange de composés chimiques ou encore la viabilité des cellules après plusieurs semaines à température ambiante [92, 81]. L'utilisation des biosenseurs comme outil biologique de quantification des concentrations en métaux nécessite des travaux de recherches supplémentaires.

1.6 Bilan et axes de recherche

Cette synthèse bibliographique a mis en évidence l'existence de deux approches fondamentalement différentes de l'analyse de la biodisponibilité des métaux aux interfaces biologiques. Une première approche est fondée sur le lien entre la complexation des métaux sur les sites ligands biotiques et les effets toxiques observés. Cette approche est modélisée par des modèles thermodynamiques pour lesquels de nombreuses hypothèses sont posées malgré leur inadéquation avec les conditions environnementales. Une seconde approche fondée sur la détermination des flux de métaux aux biointerfaces cherche à reconstituer la dynamique de partition des métaux aux interfaces en tenant compte des processus biophysicochimiques qui régissent le transport, l'adsorption, l'internalisation et l'excrétion des métaux. Récemment, le lien entre cette dynamique de partition et les effets toxiques mesurés par l'inhibition de croissance des cellules a été établi.

Cependant, au travers de cette synthèse bibliographique, il est clairement mis en évidence que l'analyse de la dynamique de partition des métaux aux interfaces biologiques est restée focalisée uniquement sur les interactions et flux de métaux dans le compartiment extracellulaire, comme détaillé au paragraphe 1.3.8 et 1.4. Or, les mécanismes de défense précédemment évoqués (comme la complexation intracellulaire) sont largement répandus chez les organismes vivants afin de limiter la réactivité des métaux dans le milieu extracellulaire [93]. Ces mécanismes de défense déclenchés efficacement lors de stress métalliques prouvent leurs impacts significatifs dans la dynamique de partition globale des métaux. Il est donc nécessaire de tenir compte de la chemodynamique intracellulaire des métaux.

Concernant les biosenseurs, la méthodologie utilisée ne permet pas déterminer les concentrations adsorbées et/ou internalisées de métaux. De plus, la détermination de la biodisponibilité de M est limitée, et ne renseigne pas sur les processus physicochimiques et biologiques aux interfaces qui régissent la dynamique de partition des métaux. La nécessité de déterminer ces processus décrits dans 1.2.5 invite à poursuivre les efforts sur l'analyse des données issues des cinétiques d'émission de photons. La production de photons étant liée à la complexation de M avec un régulateur intracellulaire, il existe un lien entre la quantité de photons émise en fonction du temps et la concentration de métal internalisé sous forme libre et complexée avec divers sites ligands dans le milieu intracellulaire, le flux de métal internalisé J_{u} et le flux de transport de M à travers le milieu vers la surface biologique J_{M}. Partant de ce constat, les objectifs de ces travaux de thèse étaient de :

1. Accroître la compréhension de la dynamique de partition des métaux aux interfaces biologiques en incluant la chemodynamique intracellulaire des métaux. Pour ce faire, le formalisme théorique décrit au paragraphe 1.4 a été étendu et confronté avec des données expérimentales d'exposition de Cd(II) à des bactéries chélatrices de métaux par des protéines fortement complexantes dans le milieu intracellulaire.
2. Développer un formalisme théorique et interpréter des données issues des cinétiques d'émission de photons par les biosenseurs, afin d'évaluer les paramètres physicochimiques qui gouvernent les processus aux interfaces.

Références

[1] Adriano, D. C. *Trace Elements in Terrestrial Environments*. New York, NY : Springer New York, 2001, p. 1–867.

[2] Waldron, K. J. et Robinson, N. J. « How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? » In : *Nature Reviews Microbiology* 7.1 (2009), p. 25–35.

[3] Gadd, G. M. « Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation ». In : *Microbiology* 156.3 (2010), p. 609–643.

[4] Frew, R., Bowie, A., Croot, P. et Pickmere, S. « Macronutrient and trace-metal geochemistry of an in situ iron-induced Southern Ocean bloom ». In : *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 48.11-12 (2001), p. 2467–2481.

[5] Lane, T. W. et Morel, F. M. M. « A biological function for cadmium in marine diatoms ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.9 (2000), p. 4627–4631.

[6] Chandrangsu, P., Rensing, C. et Helmann, J. D. « Metal homeostasis and resistance in bacteria ». In : *Nature Reviews Microbiology* 15.6 (2017), p. 338–350.

[7] Rutherford, J. C. et Bird, A. J. « Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells ». In : *Eukaryotic Cell* 3.1 (2004), p. 1–13.

[8] Nies, D. H. « Microbial heavy-metal resistance ». In : *Applied Microbiology and Biotechnology* 51.6 (1999), p. 730–750.

[9] Megharaj, M., Avudainayagam, S. et Naidu, R. « Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste ». In : *Current Microbiology* 47.1 (2003), p. 51–54.

[10] Strasser, H., Burgstaller, W. et Schinner, F. « High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by Aspergillus niger ». In : *FEMS Microbiology Letters* 119.3 (1994), p. 365–370.

[11] Drever, J. et Stillings, L. « The role of organic acids in mineral weathering ». In : *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 120.1-3 (1997), p. 167–181.

[12] Ruijter, G. J. G., Visser, J. et Vondervoort, P. J. I. van de. « Oxalic acid production by Aspergillus niger: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese ». In : *Microbiology* 145.9 (1999), p. 2569–2576.

[13] Peijnenburg, W. et Jager, T. « Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues ». In : *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56.1 (2003), p. 63–77.

[14] Van Leeuwen, H. P., Town, R. M., Buffle, J., Cleven, R. F. M. J., Davison, W., Puy, J., Riemsdijk, W. H. van et Sigg, L. « Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems ». In : *Environmental Science & Technology* 39.22 (2005), p. 8545–8556.

[15] Van Leeuwen, H. P. « Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes ». In : *Environmental Science & Technology* 33.21 (1999), p. 3743–3748.

[16] Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Schraa, G. et Zehnder, A. J. B. « Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability ». In : *Environ Sci Technol* 31.1 (1997), p. 248–252.

[17] Giller, K. E., Witter, E. et Mcgrath, S. P. « Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review ». In : *Soil Biology and Biochemistry* 30.10-11 (1998), p. 1389–1414.

[18] Ritz, C. « Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 29.1 (2010), p. 220–229.

[19] Tipping, E. « WHAMC—A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances ». In : *Computers & Geosciences* 20.6 (1994), p. 973–1023.

[20] Kinniburgh, D. G., Milne, C. J., Benedetti, M. F., Pinheiro, J. P., Filius, J., Koopal, L. K. et Van Riemsdijk, W. H. « Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan model ». In : *Environmental Science & Technology* 30.5 (1996), p. 1687–1698.

[21] Brown, D. S. et Allison, J. *An equilibrium speciation model. User's Manual.* Athens, GA : US Environmental Protection Agency, 1987.

[22] Morel, F. M. M. et Hering, J. G. *Principles and applications of aquatic chemistry (Revised edition).* New York, NY : Wiley, 1993, p. 588.

[23] Ginneken, L. V., Chowdhury, M. J. et Blust, R. « Bioavailability of cadmium and zinc to the common carp, Cyprinus carpio , in complexing environments: a test for the validity of the free ion activity model ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 18.10 (1999), p. 2295–2304.

[24] Hough, R. L., Tye, A. M., Crout, N. M. J., McGrath, S. P., Zhang, H. et Young, S. D. « Evaluating a 'Free Ion Activity Model' applied to metal uptake by Lolium perenne L. grown in contaminated soils ». In : *Plant and Soil* 270.1 (2005), p. 1–12.

[25] Ytreberg, E., Karlsson, J., Hoppe, S., Eklund, B. et Ndungu, K. « Effect of organic complexation on copper accumulation and toxicity to the estuarine red macroalga ceramium tenuicorne : a test of the free ion activity model ». In : *Environmental Science & Technology* 45.7 (2011), p. 3145–3153.

[26] Mirimanoff, N. et Wilkinson, K. J. « Regulation of Zn accumulation by a freshwater Gram-positive bacterium (Rhodococcus opacus) ». In : *Environmental Science & Technology* 34.4 (2000), p. 616–622.

[27] Pagenkopf, G. K. « Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness ». In : *Environmental Science & Technology* 17.6 (1983), p. 342–347.

[28] Smith, H. W. « The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts ». In : *American Journal of Physiology-Legacy Content* 93.2 (1930), p. 480–505.

[29] Playle, R. C., Gensemer, R. W. et Dixon, D. G. « Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill microenvironment ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 11.3 (1992), p. 381–391.

[30] Santore, R. C., Di Toro, D. M., Paquin, P. R., Allen, H. E. et Meyer, J. S. « Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and Daphnia ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 20.10 (2001), p. 2397–2402.

[31] Di Toro, D. M., Allen, H. E., Bergman, H. L., Meyer, J. S., Paquin, P. R. et Santore, R. C. « Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 20.10 (2001), p. 2383–2396.

[32] Paquin, P. R., Santore, R. C., Wu, K. B., Kavvadas, C. D. et Di Toro, D. M. « The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life ». In : *Environmental Science & Policy* 3.Supplement 1 (2000), p. 175–182.

[33] De Schamphelaere, K. A., Heijerick, D. G. et Janssen, C. R. « Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to Daphnia magna ». In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133.1-2 (2002), p. 243–258.

[34] Brix, K. V., DeForest, D. K., Tear, L., Grosell, M. et Adams, W. J. « Use of multiple linear regression models for setting water quality criteria for copper: a complementary approach to the Biotic Ligand Model ». In : *Environmental Science & Technology* 51.9 (2017), p. 5182–5192.

[35] Paquin, P. R., Di Toro, D. M., Santore, R. C., Trivedi, D. et Wu, K. « A Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. III. Application to fish and Daphnia exposure to silver. Section 3 ». In : *Integrated Approach to Assessing the Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments, a submission to the EPA Science Advisory Board, Office of Water, Office of Research and Development.* Washington, DC : USEPA-822-E-99-001, 1999, p. 3–102.

[36] Paquin, P. R., Zoltay, V., Winfield, R. P., Wu, K. B., Mathew, R., Santore, R. C. et Di Toro, D. M. « Extension of the biotic ligand model of acute toxicity to a physiologically-based model of the survival time of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to silver ». In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133.1-2 (2002), p. 305–343.

[37] Schamphelaere, K. A. C. de et Janssen, C. R. « A Biotic Ligand Model predicting acute copper toxicity for daphnia magna : the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH ». In : *Environmental Science & Technology* 36.1 (2002), p. 48–54.

[38] Hatano, A. et Shoji, R. « A new model for predicting time course toxicity of heavy metals based on Biotic Ligand Model (BLM) ». In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151.1 (2010), p. 25–32.

[39] Thakali, S., Allen, H. E., Di Toro, D. M., Ponizovsky, A. A., Rooney, C. P., Zhao, F.-J. et McGrath, S. P. « A terrestrial biotic ligand model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils ». In : *Environmental Science & Technology* 40.22 (2006), p. 7085–7093.

[40] Worms, I., Simon, D., Hassler, C. et Wilkinson, K. « Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake ». In : *Biochimie* 88.11 (2006), p. 1721–1731.

[41] Van Leeuwen, H. P. et Köster, W. *Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces IUPAC series on analytical and physical chemistry.* Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 2004, p. –471.

[42] Hassler, C. S. et Wilkinson, K. J. « Failure of the Biotic Ligand and Free Ion Activity Models to explain zinc bioaccumulation by Chlorella kesslerii ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 22.3 (2003), p. 620–626.

[43] Hassler, C. S., Slaveykova, V. I. et Wilkinson, K. J. « Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the Free Ion Activity and Biotic Ligand Models ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 23.2 (2004), p. 283.

[44] Slaveykova, V. I. et Wilkinson, K. J. « Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model ». In : *Environmental Chemistry* 2.1 (2005), p. 9–24.

[45] Slaveykova, V. I. et Wilkinson, K. J. « Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by Chlorella vulgaris ». In : *Environmental Science & Technology* 36.5 (2002), p. 969–975.

[46] Wilkinson, K. J. et Campbell, P. G. C. « Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media ». In : *Environmental Toxicology and Chemistry* 12.11 (1993), p. 2083–2095.

[47] Heijerick, D., De Schamphelaere, K. et Janssen, C. « Biotic Ligand Model development predicting Zn toxicity to the alga Pseudokirchneriella subcapitata: possibilities and limitations ». In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133.1-2 (2002), p. 207–218.

[48] Chen, Z., Zhu, L. et Wilkinson, K. J. « Validation of the Biotic Ligand Model in metal mixtures: bioaccumulation of lead and copper ». In : *Environmental science & technology* 44.9 (2010), p. 3580–3586.

[49] Rotureau, E., Waldvogel, Y., Présent, R. M. et Pinheiro, J. P. « Addressing temperature effects on metal chemodynamics studies using stripping electroanalytical techniques. Part 1: lability of small complexes ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 752 (2015), p. 68–74.

[50] Pinheiro, J. P. et Van Leeuwen, H. P. « Metal speciation dynamics and bioavailability. 2. Radial diffusion effects in the microorganism range ». In : *Environmental Science & Technology* 35.5 (2001), p. 894–900.

[51] Jansen, S., Blust, R. et Van Leeuwen, H. P. « Metal speciation dynamics and bioavailability: Zn(II) and Cd(II) uptake by mussel (Mytilus edulis) and carp (Cyprinus carpio) ». In : *Environmental Science and Technology* 36.10 (2002), p. 2164–2170.

[52] Hajdu, R., Pinheiro, J. P., Galceran, J. et Slaveykova, V. I. « Modeling of Cd uptake and efflux kinetics in metal-resistant bacterium Cupriavidus metallidurans ». In : *Environmental science & technology* 44.12 (2010), p. 4597–4602.

[53] Buffle, J. *Complexation reactions in aquatic systems.* Chichester : Ellis Horwood, 1988.

[54] Van Leeuwen, H. P. « Theoretical analysis of the effects of association/dissociation kinetics and the ensuing lability criteria ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 296 (1990), p. 359–370.

[55] Van Leeuwen, H. P. et Buffle, J. « Chemodynamics of aquatic metal complexes: from small ligands to colloids ». In : *Environmental Science & Technology* 43.19 (2009), p. 7175–7183.

[56] Heyrovsky, J. et Kuta, J. *Principles of polarography.* Praha/New York : Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science/Academic Press, 1966, p. 582.

[57] Fuoss, R. M. « Ionic association. III. The equilibrium between ion pairs and free ions ». In : *Journal of the American Chemical Society* 80.19 (1958), p. 5059–5061.

[58] Lyklema, J. H. *Fundamentals of interface and colloid science.* London : Academic Press, 1991.

[59] Duval, J. F. L., Wilkinson, K. J., Van Leeuwen, H. P. et Buffle, J. « Humic substances are soft and permeable: evidence from their electrophoretic mobilities ». In : *Environmental science & technology* 39.17 (2005), p. 6435–6445.

[60] Town, R. M., Buffle, J., Duval, J. F. L. et Van Leeuwen, H. P. « Chemodynamics of soft charged nanoparticles in aquatic media: fundamental concepts ». In : *The Journal of Physical Chemistry A* 117.33 (2013), p. 7643–7654.

[61] Duval, J. F. L. « Chemodynamics of metal ion complexation by charged nanoparticles: a dimensionless rationale for soft, core-shell and hard particle types ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 19.19 (2017), p. 11802–11815.

[62] Town, R. M., Duval, J. F. L., Buffle, J. et Van Leeuwen, H. P. « Chemodynamics of metal complexation by natural soft colloids: Cu(II) binding by humic acid ». In : *The Journal of Physical Chemistry A* 116.25 (2012), p. 6489–6496.

[63] Town, R. M., Pinheiro, J. P. et Van Leeuwen, H. P. « Chemodynamics of soft nanoparticulate metal complexes: from the local particle/medium interface to a macroscopic sensor surface ». In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 33.2 (2017), p. 527–536.

[64] Van Leeuwen, H. P., Duval, J. F. L., Pinheiro, J. P., Blust, R. et Town, R. M. « Chemodynamics and bioavailability of metal ion complexes with nanoparticles in aqueous media ». In : *Environmental Science: Nano* 4.11 (2017), p. 2108–2133.

[65] Van Leeuwen, H. P., Town, R. M. et Buffle, J. « Chemodynamics of soft nanoparticulate metal complexes in aqueous media: basic theory for spherical particles with homogeneous spatial distributions of sites and charges ». In : *Langmuir* 27.8 (2011), p. 4514–4519.

[66] Van Leeuwen, H. P., Buffle, J., Duval, J. F. L. et Town, R. M. « Understanding the extraordinary ionic reactivity of aqueous nanoparticles ». In : *Langmuir* 29.33 (2013), p. 10297–10302.

[67] Koutecký, J. et Koryta, J. « The general theory of polarographic kinetic currents ». In : *Electrochimica Acta* 3.4 (1961), p. 318–339.

[68] Koryta, J., Dvorak, J. et Kavan, L. *Principles of electrochemistry, second edition.* Chichester : Wiley, 1993.

[69] Van Leeuwen, H. P. et Town, R. M. « Lability of nanoparticulate metal complexes in electrochemical speciation analysis ». In : *Journal of Solid State Electrochemistry* 20.12 (2016), p. 3255–3262.

[70] Duval, J. F. L., Town, R. M. et Van Leeuwen, H. P. « Applicability of the reaction layer principle to nanoparticulate metal complexes at a macroscopic reactive (bio)interface: a theoretical study ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 121.35 (2017), p. 19147–19161.

[71] Best, J. B. « The inference of intracellular enzymatic properties from kinetic data obtained on living cells. II. A study of hexokinase and invertase as cellular components of Baker's yeast ». In : *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 46.1 (1955), p. 29–52.

[72] Pinheiro, J. P., Galceran, J. et Van Leeuwen, H. P. « Metal speciation dynamics and bioavailability: bulk depletion effects ». In : *Environmental science & technology* 38.8 (2004), p. 2397–2405.

[73] Zhang, Z., Alemani, D., Buffle, J., Town, R. M. et Wilkinson, K. J. « Metal flux through consuming interfaces in ligand mixtures: boundary conditions do not influence the lability and relative contributions of metal species ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 13.39 (2011), p. 17606–17414.

[74] Redeker, E. S. et Blust, R. « Accumulation and toxicity of cadmium in the aquatic oligochaete tubifex tubifex : a kinetic modeling approach ». In : *Environmental Science & Technology* 38.2 (2004), p. 537–543.

[75] Duval, J. F. L. « Dynamics of metal uptake by charged biointerphases: bioavailability and bulk depletion ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 15.20 (2013), p. 7873–7888.

[76] Duval, J. F. L. et Rotureau, E. « Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases: impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 16.16 (2014), p. 7401–7416.

[77] Duval, J. F. L., Paquet, N., Lavoie, M. et Fortin, C. « Dynamics of metal partitioning at the cell-solution interface: implications for toxicity assessment under growth-inhibiting conditions ». In : *Environmental Science and Technology* 49.11 (2015), p. 6625–6636.

[78] Rotureau, E., Billard, P. et Duval, J. F. L. « Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal depletion kinetics at various cell concentrations: theory and application ». In : *Environmental Science and Technology* 49.2 (2015), p. 990–998.

[79] Duval, J. F. L. « Coupled metal partitioning dynamics and toxicodynamics at biointerfaces: a theory beyond the biotic ligand model framework ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 18.14 (2016), p. 9453–9469.

[80] Baumann, B. et Van Der Meer, J. R. « Analysis of bioavailable arsenic in rice with whole cell living bioreporter bacteria ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55.6 (2007), p. 2115–2120.

[81] Van Der Meer, J. R. et Belkin, S. « Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria ». In : *Nature Reviews Microbiology* 8.7 (2010), p. 511–522.

[82] Trang, P. T. K., Berg, M., Viet, P. H., Van Mui, N. et Van Der Meer, J. R. « Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples ». In : *Environmental Science and Technology* 39.19 (2005), p. 7625–7630.

[83] Naylor, L. H. « Reporter gene technology: the future looks bright ». In : *Biochemical Pharmacology* 58.5 (1999), p. 749–757.

[84] Ehrmann, M., Scheyhing, C. et Vogel, R. « In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions ». In : *Letters in Applied Microbiology* 32.4 (2001), p. 230–234.

[85] Zimmer, M. « Green Fluorescent Protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior ». In : *Chemical Reviews* 102.3 (2002), p. 759–782.

[86] Close, D. M., Ripp, S. et Sayler, G. S. « Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications ». In : *Sensors* 9.11 (2009), p. 9147–9174.

[87] Wilson, T. et Hastings, J. « Bioluminescence ». In : *Annual reviews* 14 (1998), p. 197–230.

[88] Boylan, M., Miyamoto, C., Wall, L., Graham, A. et Meighen, E. « Lux C, D and genes of the Vibrio fisheri luminescence operon code for the reductase, transferase and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis ». In : *Photochemistry and Photobiology* 49.5 (1989), p. 681–688.

[89] Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. et Thompson, F. *The Prokaryotes*. Sous la dir. de Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. et Thompson, F. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2013, p. 609.

[90] Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. et Schleifer, K.-H. *The Prokaryotes*. Sous la dir. de Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. et Schleifer, K.-H. New York, NY : Springer New York, 1992.

[91] Nunes-Halldorson, V. D. S. et Duran, N. L. « Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors ». In : *Brazilian Journal of Microbiology* 34.2 (2003), p. 91–96.

[92] Shin, H. J. « Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution ». In : *Applied Microbiology and Biotechnology* 89.4 (2011), p. 867–877.

[93] Vijver, M. G., Van Gestel, C. A. M., Lanno, R. P., Van Straalen, N. M. et Peijnenburg, W. J. G. M. « Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review ». In : *Environmental Science and Technology* 38.18 (2004), p. 4705–4712.

2 | Matériels et méthodes expérimentales

2.1 Présentation des souches d'*Escherichia coli* utilisées 46
2.1.1 Plasmide pMalc2-MT 47
2.1.2 Plasmide P_{zntA}-pUCD615 48
2.1.3 Bilan des modifications génétiques effectuées sur *Escherichia coli* 48
2.2 Présentation des milieux d'exposition et des protocoles de culture employés 49
2.2.1 Milieux d'exposition des bactéries au Cd(II) 49
2.2.2 Protocoles de culture bactérienne 50
2.3 Fonctionnement du système bactérien reporteur luminescent sensible au Cd(II) 51
2.3.1 Souches biosenseurs constitutives 52
2.4 Suivi cinétique de la bioluminescence par luminomètre 52
2.5 Dénombrement des cellules en suspension 54
2.5.1 Comptage par cytométrie à flux continu 54
2.5.2 Vérification de la viabilité des cellules après exposition au Cd(II) 55
2.6 Purification de la protéine MBP-MT 55
2.7 Quantification des concentrations en Cd(II) en solution par des techniques électroanalytiques 56
2.7.1 Quantification des concentrations libres et labiles en Cd(II) par Stripping Chronopotentiometry (SCP) 56
2.7.2 Quantification de la concentration libre en Cd(II) par Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES) 58
2.7.3 Dispositif expérimental et préparation de l'électrode 59
2.7.4 Suivi cinétique de déplétion de Cd(II) en solution par SCP 60
2.7.5 Détermination des constantes de stabilité du complexe Cd(II)–MTc 60
2.7.6 Détermination des isothermes d'adsorption de Cd(II) sur les surfaces bactériennes 61
2.8 Détermination de la quantité adsorbée de cadmium sur les membranes bactériennes par Spectrométrie d'Absorption Atomique 62
2.9 Évaluation de la taille des cellules par Microscopie à Force Atomique 62
2.10 Évaluation des propriétés de surface des particules par mesure de la mobilité électrophorétique 64
2.10.1 Origine de la charge surfacique ou volumique - Double Couche Electrique 64
2.10.2 Mobilité électrophorétique des particules 65
2.10.3 Principe de la microélectrophorèse sur la mesure de la mobilité des bactéries 67

L'objectif de ces travaux de recherche étaient de mieux comprendre la dynamique de partition des métaux aux interfaces biologiques afin de déterminer l'impact :

- de la chemodynamique intracellulaire par la présence de protéines fortement chélatrices dans le milieu intracellulaire,
- de la présence de lipopolysaccharides de surface de différentes tailles, par l'utilisation de biosenseurs luminescents sensibles au Cd(II).

Ce chapitre présente les différentes techniques et configurations utilisées pour mener à bien ces recherches. Dans ces travaux, le cadmium a été utilisé comme métal modèle pour plusieurs raisons. La première est que l'exposition de Cd(II) à des organismes vivants mène uniquement à des effets toxiques, car ce dernier ne fait pas partie des oligoéléments nécessaires à la physiologie des organismes. Pour des raisons physiologiques, l'exposition d'organismes à une solution métallique est réalisée à pH neutre pour lequel le cadmium est sous forme ionique. De plus, l'état d'oxydation et la constante de déshydratation du cadmium est proche d'autres éléments métalliques toxiques comme le plomb ou le mercure. Enfin, ce métal est facilement détectable et quantifiable par des techniques électroanalytiques utilisées au laboratoire.

2.1 Présentation des souches d'*Escherichia coli* utilisées

Afin d'aider le lecteur à la compréhension des paragraphes 2.1, 2.1.1, 2.1.2 et 2.1.3, une annexe rappelant quelques bases de microbiologie a été rédigée à cette intention (voir le chapitre Annexes).

Dans le cadre de cette thèse, la souche sauvage *Escherichia coli* BW25113 et 3 mutants ont été choisis :

- BW25113 est une souche dite « sauvage », génétiquement proche de la souche sauvage K-12 dont toute la banque de mutants est issue [1] (**Chapitre 4 et 5**).
- JW3434 est une souche pour laquelle les gènes codant pour la synthèse de pompes efflux spécifiques au zinc, au cadmium et au plomb ont été supprimés. Ce gène est dénommé zntA dans la littérature. JW3434 est donc aussi dénommée BW25113Δ*zntA*, "Δ" signifiant la suppression du gène *zntA* du génome (**Chapitre 4**).
- JW3596 (ou BW25113Δ*rfaC*) est une souche pour laquelle la taille des LPS a été réduite par la suppression du gène *rfaC* (voir Figure 2.1 ci-dessous). Ce dernier code pour la synthèse d'une enzyme de transfert d'heptose, un des sucres qui constituent les LPS. Ce sucre n'étant plus transféré par l'enzyme, l'heptose et les sucres subséquemment liés ne sont plus fixés sur la membrane (**Chapitre 5**).
- JW3601 (ou BW25113Δ*rfaJ*) est une souche pour laquelle la taille des LPS a été réduite, mais dans une moindre mesure que pour JW3596. Le gène *rfaJ* code également pour la synthèse d'une enzyme de transfert de l'un des glucoses qui constituent les LPS. De la même manière, les sucres subséquemment liés au glucose disparaissent (voir Figure 2.1 ci -dessous) (**Chapitre 5**).

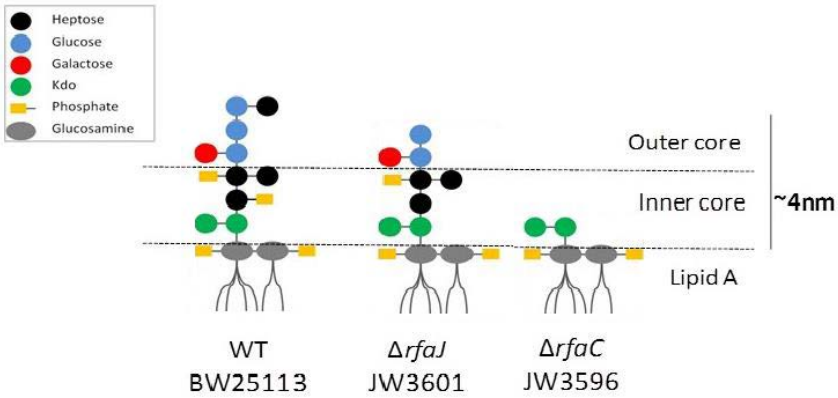


FIGURE 2.1 – Représentation des différences des LPS sur souches mutées (schéma de Pagnout. C)

De plus, E.coli et ses différents mutants ont été transformés par différents plasmides afin de conférer les propriétés intracellulaires ou interfaciales désirées.

2.1.1 Plasmide pMalc2-MT (Chapitre 4)

Ce plasmide artificiel (issu de [2]) regroupe un vecteur plasmidique portant des gènes de résistance à l'ampicilline, suivi de gènes régulateurs répondant au maltose, et de gènes codant pour la synthèse d'une protéine appelée Maltose-Binding-Protein (MBP) [3] sur laquelle est fixée une métallothionéine (abbrégée MBP-MT). Dans la suite du manuscrit, la souche JW3434 transformée avec ce plasmide est nommée JW3434-MTc par simplicité d'écriture.

Complexe MBP-MT

Le complexe protéique est composé d'une MBP et d'une métallothionéine [2]. La MBP est une protéine qui a pour caractéristique une affinité très forte avec le maltose. Elle est fixée à une métallothionéine (MT). Brièvement, les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7kDa) présentes chez certains procaryotes et eucaryotes. De nombreuses familles de métallothionéines ont été identifiées sur la base de séquences similaires et de relations phylogénétiques [4]. La métallothionéine utilisée ici est issue du mouton et contient 61-62 amino-acides (type II). En règle générale, les métallothionéines bactériennes sont plus petites que celles provenant de vertebrées [4]. Les métallothionéines comportent une quantité importante de cystéine, un acide aminé riche en groupement -SH classiquement rencontré au sein des protéines pour son rôle structurel. La forte proportion de cystéine contenue dans les métallothionéines permet à cette dernière de fortement complexer les métaux essentiels et non-essentiels au fonctionnement cellulaire. Ainsi, la métallothionéine possède des propriétés biologiques intéressantes comme la détoxification des espèces métalliques par la complexation forte des métaux toxiques internalisés par une cellule (Hg et Cd par exemple), le maintien de l'homéostasie des concentrations intracellulaires en métaux essentiels (Zn et du Cu par exemple) et la protection de la cellule contre les espèces réactives oxygénées (ROS) [5, 6, 7, 8]. Dans le cadre de cette thèse, le but était de mimer les effets d'une complexation intracellulaire forte sur la dynamique de partition des métaux aux interfaces bactériennes (voir Chapitre 4) en utilisant cette protéine. La forte affinité de la MBP avec le maltose a permis l'isolement de la MBP-MT du contenu cytosolique par son passage sur une résine d'amylose et sa purification (voir paragraphe 2.6).

2.1.2 Plasmide pZntA-pUCD615 (Chapitre 5)

Ce plasmide artificiel (issu de [9]) porte le promoteur P_{zntA} sensible au cadmium, au zinc et au cobalt. Dans ce travail de recherche, nous nous sommes assurés que l'induction du promoteur P_{zntA} par la présence de zinc et de cobalt était négligeable par rapport à son induction en présence de cadmium. Le plasmide pUCD615 comporte un ensemble de gènes (*luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* et *luxE*) [10] provenant de *Vibrio fischeri* qui codent pour la luciférase et d'autres enzymes menant à l'émission de photons à 490nm (bleu-vert). Le plasmide porte également des gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Dans la suite du manuscrit, les souches BW25113, JW3601 et JW3596 transformées avec ce plasmide sont nommées **BW25113**, **JW3601** et **JW3596** par simplicité d'écriture.

Luciferase et complexe enzymatique associé

Le lecteur est invité à se référer au paragraphe 1.5 du chapitre 1 dans lequel est déjà décrit le fonctionnement des protéines issues de l'expression des gènes *luxCDABE*.

2.1.3 Bilan des modifications génétiques effectuées sur *Escherichia coli*

Les souches bactériennes mutées et/ou transformées d'*E.coli* utilisées dans le cadre de cette thèse sont :

Nom	Phénotype (obtenu par mutation génomique)	Phénotype (obtenu par mutation plasmidique)	Chapitre
BW25113Δ*zntA* (ou **JW3434**)	Empêche la production de pompes spécifiques au cadmium		4
BW25113Δ*zntA* pMalc2-MT (ou **JW3434-MTc**)	Empêche la production de pompes spécifiques au cadmium	Produit la métallothionéine	4
BW25113Δ*rfaC* pUCD615 (ou **JW3596**)	Réduit la taille des LPS	Produit de la lumière en présence de cadmium en solution	5
BW25113Δ*rfaJ* pUCD615 (ou **JW3601**)	Réduit modérément la taille des LPS	Produit de la lumière en présence de cadmium en solution	5
BW25113 pUCD615		Produit de la lumière en présence de cadmium en solution	5
BW25113Δ*rfaC* p105	Réduit la taille des LPS	Produit de la lumière quelque soit la concentration de cadmium en solution	5
BW25113Δ*rfaJ* p105	Réduit modérément la taille des LPS	Produit de la lumière quelque soit la concentration de cadmium en solution	5
BW25113 p105		Produit de la lumière quelque soit la concentration de cadmium en solution	5

Table 2.1 – Bilan des souches utilisées dans ces travaux de recherche

2.2 Présentation des milieux d'exposition et des protocoles de culture employés

2.2.1 Milieux d'exposition des bactéries au Cd(II)

Les compositions des milieux d'exposition ont été établies afin de limiter la complexation de Cd(II) en solution. Les compositions des milieux HMM et nGGM utilisés dans ces travaux sont respectivement issues de travaux antérieurs ([11, 9]). Selon le modèle de calcul de spéciation à l'équilibre VisualMinteq, 90% du cadmium était sous forme libre en solution.

Sel	HMM - concentration ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$)
glucose	0.5%
MOPS	40mM
KNO_3	50mM
NH_4Cl	1mM
Fe(III)NH_4Citrate	1µM
$Mg(SO_4)_2$	0.5mM
Na-β-glycerophosphate	0.5mM
$NaNO_3$	35mM
pH	6.8

Table 2.2 – Composition du milieu HMM utilisé pour les expérimentations sur JW3434 et JW3434-MTc (**Chapitre 4**)

Sel	nGGM - concentration ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$)
glucose	0.5%
MOPS	40mM
$MgCl_2$	1mM
NH_4NO_3	12.5mM
KNO_3	10mM
K_2SO_4	5mM
$CaCl_2$,H_2O	0.068mM
β-glycerophosphate	5mM
pH	6.7

Table 2.3 – Composition du milieu nGGM utilisé pour les expérimentations sur BW25113, JW3596 et JW3601 (**Chapitre 5**)

2.2.2 Protocoles de culture bactérienne

Le protocole de culture bactérienne impacte fortement la réponse biologique des bactéries à un stress métallique (en terme de cinétique de déplétion et de quantité d'émission de photons pour les biosenseurs). Les protocoles de culture listés ci-dessous ont été établis afin d'optimiser ces réponses.

Souche	**Préculture**	**Culture**	**Rinçage**	**Solution bactérienne finale**
JW3434 (Chapitre 4)	20mL de LB,[α] Ampicilline 100µg/mL, 160rpm 37°C 15h	Composition du milieu : 10mL préculture dans 100mL LB, Ampicilline 100µg/mL, Condition de culture : 160 rpm 37°C au bain-marie pour atteindre une DO = 2 (environ 3h)	2 rinçages par centrifugation 1700×g pendant 10min dans milieu HMM	Resuspension dans milieu HMM à DO[β]= 2
JW3434-MTc (Chapitre 4)	20mL de LB, Ampicilline 100µg/mL, 160rpm 37°C 8h	Composition du milieu : 10mL préculture dans 100mL LB, 100µg/mL Ampicilline, 0.2mM IPTG, Condition de culture : 160 rpm 22°C au bain-marie pour atteindre une DO = 2 (environ 15h)	2 rinçages par centrifugation 1700×g pendant 10min dans milieu HMM	Resuspension dans milieu HMM à DO = 2
BW25113, JW3601 et JW3596 (Chapitre 5)	-	Composition du milieu : 20mL LB, 50µg/mL Ampicilline et 30µg/mL Kanamycine pour biosenseurs (ou seulement 50 µg/mL Kanamycine pour souches constitutives) Condition de culture : 120rpm 37°C au bain-marie (16h)	1 rinçage par centrifugation 4500×g pendant 10min dans milieu nGGM	Resuspension dans milieu nGGM à DO = 2

[α] Luria Broth, un milieu riche couramment utilisé

[β] La Densité Optique correspond à l'absorbance d'une suspension bactérienne à 600nm mesurée par photométrie. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration de cellules présentes dans l'échantillon.

Table 2.4 – Récapitulatif des protocoles utilisés

La souche JW3434-MTc utilise une fraction non-négligeable de son énergie pour produire la métallothionéine cytoplasmique. De ce fait, pour des conditions de culture identiques, le temps de division cellulaire de la souche JW3434-MTC (en présence d'IPTG) est plus lent que le temps de division cellulaire de la souche JW3434 (sans IPTG). De plus, l'induction des gènes codant pour la production de la métallothionéine cytoplasmique variait d'une culture à l'autre, un résultat souvent observé pour les microorganismes génétiquement modifiés [12, 13, 14]. Ainsi, la température et le temps de culture ont été modifiés afin de réaliser l'ensemble des expérimentations à partir d'une unique suspension bactérienne (cf. Chapitre 4).

2.3 Fonctionnement du système bactérien reporteur luminescent sensible au Cd(II) (Chapitre 5)

Les biosenseurs utilisés ici proviennent de la souche *Escherichia coli* BW25113 transformée par le plasmide pUCD615 [15] détaillé au paragraphe 2.1.1. Afin de déterminer l'impact de la taille des LPS sur la dynamique de partition des métaux, trois mutants qui expriment différentes tailles de LPS ont été utilisés. Le détail sur les mutations génomiques est donné au paragraphe 2.1. Le schéma ci-dessous représente le fonctionnement des biosenseurs utilisés.

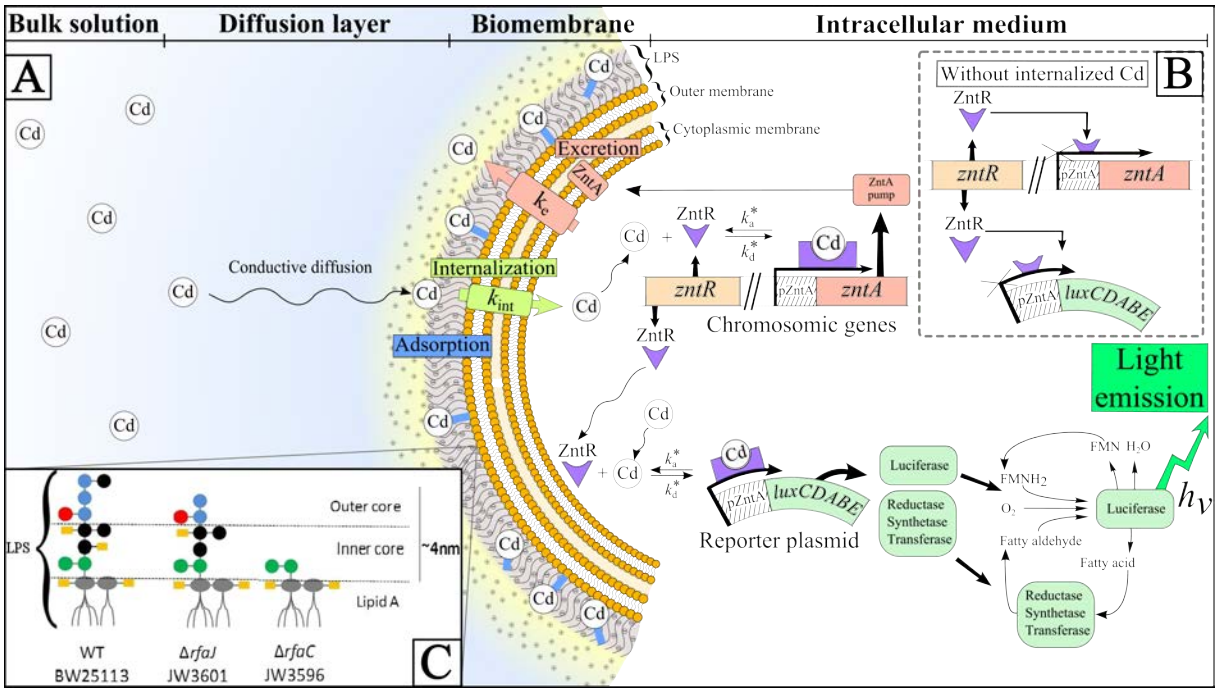


FIGURE 2.2 – Fonctionnement d'un biosenseur luminescent pour la détection de Cd(II) extracellulaire en présence (A) et en absence (B) de Cd(II). La taille des LPS provenant des trois mutants utilisés sont rappelés (C)

.

Les processus biophysicochimiques qui mènent à la production de lumière par les souches biosenseurs sont les suivants : on considère un milieu peu complexant dans lequel sont dispersés des biosenseurs en présence d'ions Cd(II). L'assimilation du Cd par une cellule bactérienne génère un flux de diffusion d'ions métalliques J_{M} ($\mathrm{mol\,m^{-2}\,s^{-1}}$) depuis le milieu vers la surface biologique, avant de s'adsorber sur les sites actifs (menant à l'internalisation) ou passifs (adsorption simple). Une fois internalisé, une partie des ions Cd(II) se complexe avec une protéine métallorégulatrice ZntR appelée répresseur, connue pour son affinité avec le cadmium [16, 17]. ZntR est codée par le gène chromosomique *zntR* de l'opéron *znt* qui régule l'expression du gène *zntA* impliqué dans l'homéostasie du zinc et les processus de détoxification [18]. En l'absence d'ions Cd(II) dans le milieu intracellulaire, la protéine ZntR fixée sur le promoteur pZntA empêche l'expression des gènes en aval. Le changement de conformation de ZntR fixée sur le promoteur pZntA par la formation du complexe ZntR-Cd permet aux ARN polymérases présentes dans le milieu de transcrire l'ADN en ARN, eux-mêmes traduits en protéines par les ribosomes. Les pompes d'efflux spécifiques aux ions Cd(II) synthétisées par l'expression du gène *zntA* se positionnent dans la membrane plasmique. Cette régulation des concentrations en cadmium intracellulaire déclenchée par l'exposition de la cellule bactérienne à Cd(II) constitue un moyen de défense bactérien qui se manifeste par un flux d'excrétion du cadmium J_{e} depuis le cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Une autre fraction de Cd(II) internalisé se lie avec le répresseur ZntR porté par un plasmide artificiel qui permet la production de la luciférase via

l'expression des gènes *luxCDABE* (voir paragraphe 1.5 du chapitre 1).

2.3.1 Souches biosenseurs constitutives

Les bactéries dites constitutives des souches biosenseurs expriment les gènes *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* et *luxE* sans système de régulation, ce qui, dans le cas des biosenseurs correspond à une émission de lumière maximale quelle que soit la concentration en cadmium en solution. Dans ces travaux de recherche, les souches constitutives ont servi de contrôle pour les expérimentations avec les biosenseurs BW25113, JW3596 et JW3601 en permettant de vérifier que les conditions physicochimiques des milieux d'exposition n'induisaient pas d'effets toxiques aux cellules bactériennes. Les souches constitutives des biosenseurs BW25113ΔrfaC, BW25113ΔrfaJ et BW25113 contiennent le plasmide p105, constitué du plasmide pSEVA226 [19] qui porte les gènes luxC, luxD, luxA, luxB, et luxE décrits au paragraphe 1.5 du chapitre 1. En amont de ces gènes, un promoteur pJ105 a été inséré afin d'obtenir une production forte et constitutive de lumière.

2.4 Suivi cinétique de la bioluminescence par luminomètre (Chapitre 5)

L'émission de photons par les biosenseurs précédemment cités est mesurée par luminométrie. Le principe de mesure du luminomètre à plaque utilisé dans ces travaux de recherche (BMG Lab Technologies, Allemagne) comme représenté dans la Figure 2.3 est le suivant : chaque micropuit contient une solution nGGM (voir composition au tableau 2.3) peu complexante de Cd(II) dans laquelle sont dispersés les biosenseurs. Ces derniers émettent des photons à 490nm (bleu-vert) collectés et convertis en signal électrique par un photomultiplicateur relié au PC et piloté par le logiciel Lumistar Software V3.01-2. Le scan puit par puit de la microplaque thermostatée est effectué toutes les 15min pendant 15h afin de reconstituer la cinétique d'émission des photons par les biosenseurs.

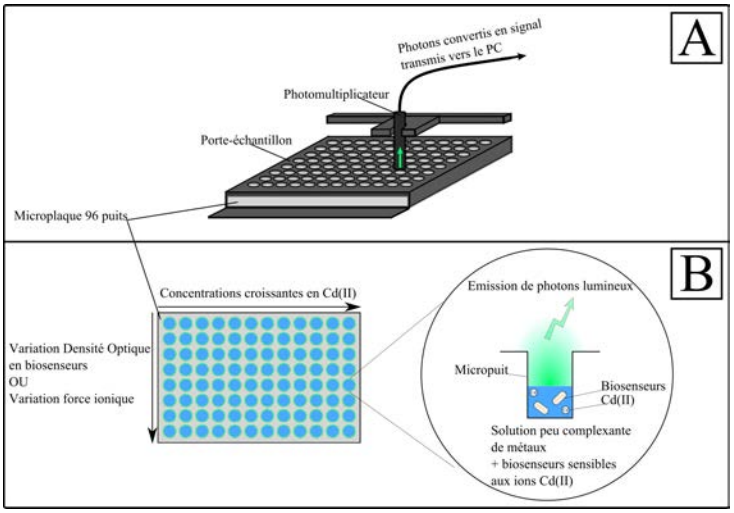


FIGURE 2.3 – **(A)** Schéma d'un luminomètre à microplaques.
(B) Répartition des différentes conditions d'exposition des biosenseurs sur une microplaque

La production de photons par les biosenseurs en présence de cadmium n'est pas instantanée. En effet, la réponse des biosenseurs répondant à un stress métallique est un processus qui nécessite quelques minutes, voire quelques heures pour se mettre en place en fonction des conditions physico-chimiques. Un exemple de la cinétique d'émission de lumière pour chaque puit de mesure

est donné dans la figure ci-dessous.

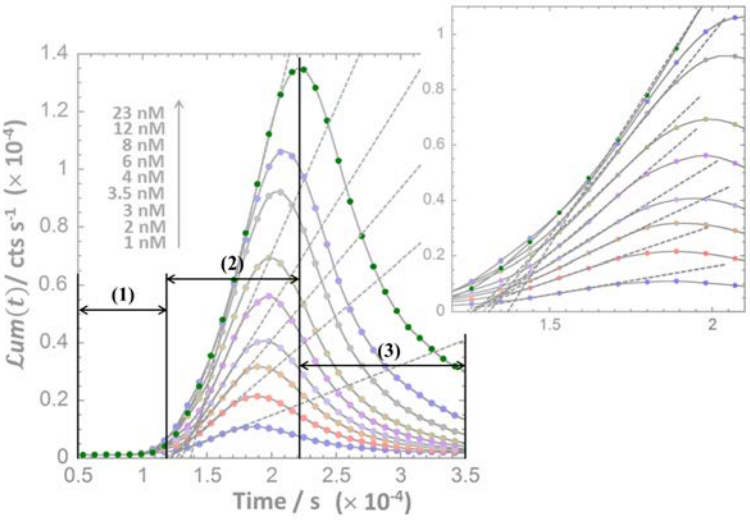


FIGURE 2.4 – Exemple de cinétiques d'émission de photons mesurées par le luminomètre avec la souche JW3596 exposée à différentes concentrations de Cd(II) c^*_{M}. Les points correspondent aux données expérimentales. Les traits représentent l'interpolation par splines cubiques des données expérimentales. Les droites tangentes sont positionnées au point d'inflexion de chaque courbe. L'inset est un zoom des données autour de 1.5×10^4s - 2×10^4s. Conditions de l'essai : DO = 0.2, pH = 6.5 et force ionique = 10mM

Les courbes typiques de cinétique d'émission de photons par les biosenseurs sont illustrées en Figure 2.4. Dans cet exemple, des mesures cinétiques d'émission de photons sont obtenues en fonction de c^*_{M} dans une gamme comprise entre 1nM et 23nM. Chaque courbe peut être découpée en trois phases distinctes. Prenons pour exemple la courbe verte : la cinétique d'émission de photons dans la première phase (1) correspond au temps pendant lequel le biosenseur exprime le complexe enzymatique qui mène à la production de photons. Ce temps est variable en fonction des conditions d'exposition (milieu d'exposition, oxygénation, température, etc). La deuxième phase (2) correspond à la production de lumière issue de l'oxydation de la luciférase obtenue après exposition des biosenseurs aux ions Cd(II). Enfin une dernière phase (3) est observée par la décroissance du signal qui révèle *a priori* l'épuisement énergétique de la cellule. La phase (2) reflète la vitesse d'internalisation des métaux par les cellules, quantifiée par la pente de chaque courbe d$\mathcal{L}$um/dt.

Par l'utilisation des biosenseurs, la détermination de la dynamique de partition des métaux aux interfaces bactériennes pour différentes tailles de LPS a nécessité de tester les souches dans différentes conditions physicochimiques. Les différentes conditions physicochimiques testées sont :

- Variation de la salinité (entre 10mM et 100mM) à pH= 6.5 et DO = 0.2,
- Variation de la concentration cellulaire à pH= 6.5 et salinité = 10mM,
- Variation de la concentration en métal en solution c^*_{M} de 5nM à 100nM

2.5 Dénombrement des cellules en suspension (Chapitre 4)

2.5.1 Comptage par cytométrie à flux continu

Le principe de fonctionnement d'un cytomètre à flux continu est illustré dans la Figure 2.5. Brièvement, la cytométrie de flux est une technique optique capable d'identifier des cellules marquées par fluorescence dans une suspension bactérienne hétérogène. Ainsi, la mesure de la fluorescence d'un échantillon dont l'ADN a été marqué permet la quantification du nombre de cellules ciblées dans un échantillon. La cytométrie à flux continu peut également estimer la forme, la taille des bactéries et déterminer précisément le nombre de cellules par volume de solution. Dans l'exemple ci-dessous, le dispositif est équipé d'un déflecteur utilisé pour trier les cellules par leurs charges. Le fonctionnement du cytomètre est le suivant : les cellules passent dans un canal (de l'ordre du micron) à la file indienne devant un laser. L'excitation par le laser des marqueurs fluorescents à une longueur d'onde donnée est suivie d'une désexcitation accompagnée de l'émission de photons à une autre longueur d'onde. Un mécanisme vibrant à la sortie du canal sépare le flux en gouttelettes, de façon à obtenir une cellule par gouttelette. Une charge électrique positive ou négative est appliquée aux gouttelettes contenant ou non un marqueur fluorescent. Puis, le passage de celles-ci entre les plaques d'un déflecteur électrostatique oriente leurs chutes vers différents récipients en fonction de leurs charges [20].

Dans ces travaux de recherche, la cytométrie à flux continu a été utilisée uniquement pour déterminer précisément le nombre de cellules par millilitre de solution bactérienne en fonction de la densité optique. L'appareil utilisé est un cytomètre C6 Accuri de la marque BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)

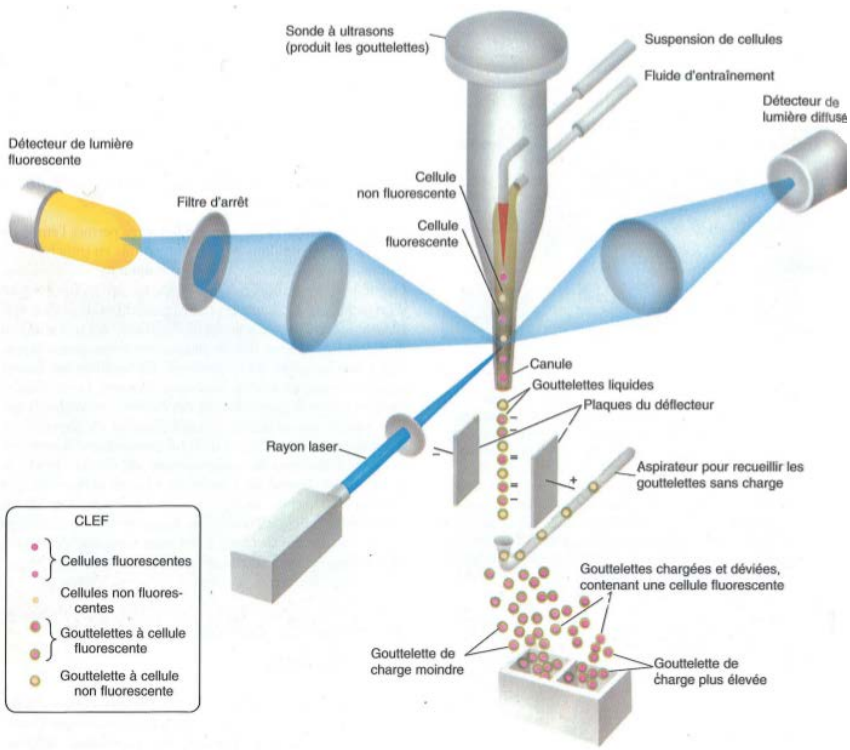


FIGURE 2.5 – Principe de fonctionnement d'un cytomètre à flux continu équipé d'un trieur de cellules marquées par fluorescence [21]

2.5.2 Vérification de la viabilité des cellules après exposition au Cd(II)

A l'issue des mesures de cinétique de déplétion des métaux, la viabilité des cellules a été vérifiée par dénombrement d'Unité Formant de Colonie (UFC) sur boîte de Pétri. Pour ce faire, une dilution en cascade dans le milieu minimum HMM (voir composition dans le paragraphe 2.2) a été réalisée, comme illustrée dans le schéma ci-dessous :

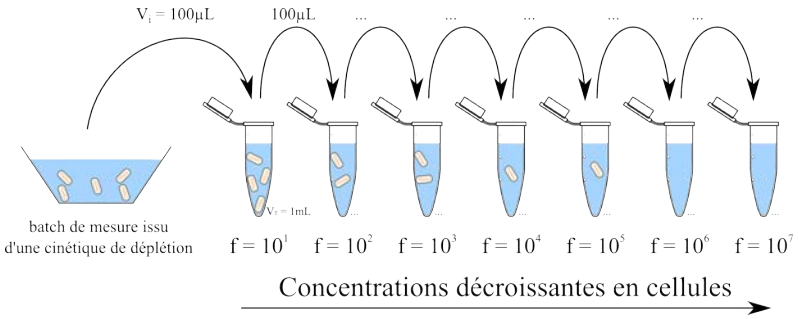


FIGURE 2.6 – Représentation schématique d'une dilution en cascade avec f le facteur de dilution, V_i = 100µL et V_T = 1mL

Puis, 400µL de solution correspondant au facteur de dilution 10^6 et 10^7 sont étalés au râteau sur boîte et mis à l'étuve à 37°C pendant 24h. Enfin, le comptage des UFC a permis de confirmer la fraction volumique et la viabilité des cellules après exposition au Cd.

2.6 Purification de la protéine MBP-MT (Chapitre 4)

La purification de la protéine MBP-MT (voir Supporting Information, Chapitre 4) a été réalisée de la façon suivante [3] : une culture bactérienne de la souche JW3434-MTc a été effectuée dans les conditions de culture identiques à celles employées pour les expérimentations de cinétique de déplétion du métal. La lyse de cette culture bactérienne par une presse cellulaire a permis de récupérer le cytoplasme contenant la protéine chélatrice intracellulaire MBP-MT. Le passage du lysat sur une résine amylose fixe la partie MBP de la protéine totale MBP-MT de par sa forte affinité et sépare la protéine du reste de la solution. Puis, la désorption de la MBP-MT de la résine est effectuée par plusieurs rinçages avec une solution de maltose. La solution finale est ensuite concentrée par dialyse. Le reste de la solution qui contient notamment les autres protéines du cytosol est appelé Flow Through (FT)(voir Figure 2.7).

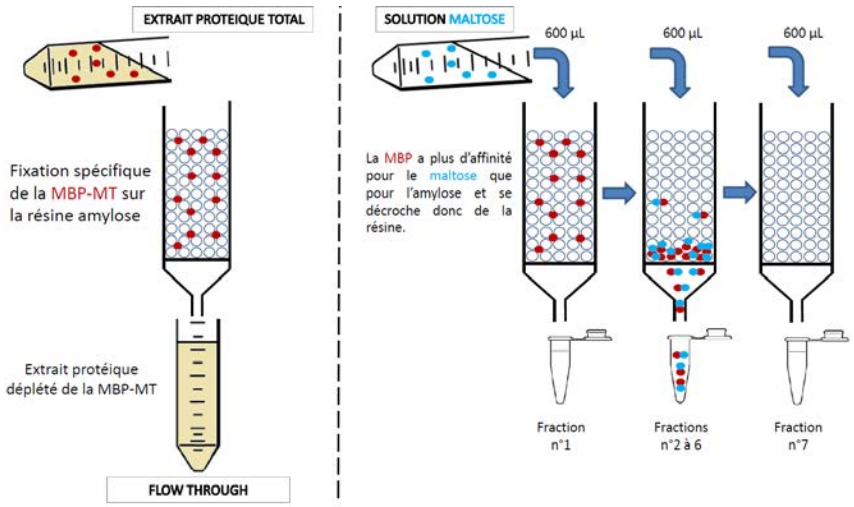


FIGURE 2.7 – Représentation schématique du protocole de purification de la MBP-MT de la solution (schéma de Flayac J.)

A chaque étape, une vérification de la pureté des échantillons a été effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Cette purification a permis de déterminer la quantité de MBP-MT par cellule (voir chapitre 4).

2.7 Quantification des concentrations en Cd(II) en solution par des techniques électroanalytiques

Dans ces travaux de thèse, deux techniques de "stripping voltammetry" appelées Stripping Chronopotentiométrie (SCP) et Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES) détaillées ci-dessous ont été utilisées.

2.7.1 Quantification des concentrations libres et labiles en Cd(II) par Stripping Chronopotentiometry (SCP)

La SCP est une méthode qui quantifie la concentration en complexes métalliques "dynamiques" dans une solution métallique en présence de ligands [22]. Cette méthode en deux étapes consiste en (i) la réduction dans l'amalgame de mercure du métal dissous en solution par l'application d'un courant de déposition I_{d}^{*} (A) pendant un temps t_{d} (s) et (ii) la réoxydation de ce métal par l'application d'un courant constant I_{s} (A) pendant un temps τ^{*} (s). Ainsi, la quantité de métal amalgamé dans le film de mercure dans la première étape est égale à la quantité de métal réoxydé dans le milieu lors de la seconde étape :

$$\begin{aligned} N_{\mathrm{ox}} &= I_{\mathrm{s}}\tau^{*}/nF \\ N_{\mathrm{red}} &= I_{\mathrm{d}}^{*}t_{\mathrm{d}}/nF \end{aligned} \tag{2.1}$$

or, $N_{\mathrm{ox}} = N_{\mathrm{red}}$, d'où

$$I_{\mathrm{d}}^{*} = \frac{\tau^{*} \times I_{\mathrm{s}}}{t_{\mathrm{d}}} \tag{2.2}$$

Par cette relation, il existe une proportionnalité entre le paramètre τ^* mesuré et le paramètre I_d^* déduit. La seconde étape permet de quantifier la quantité de métal accumulé lors de la première étape via la détermination de τ^*, le temps de réoxydation. Ce dernier est mesuré de la manière suivante.

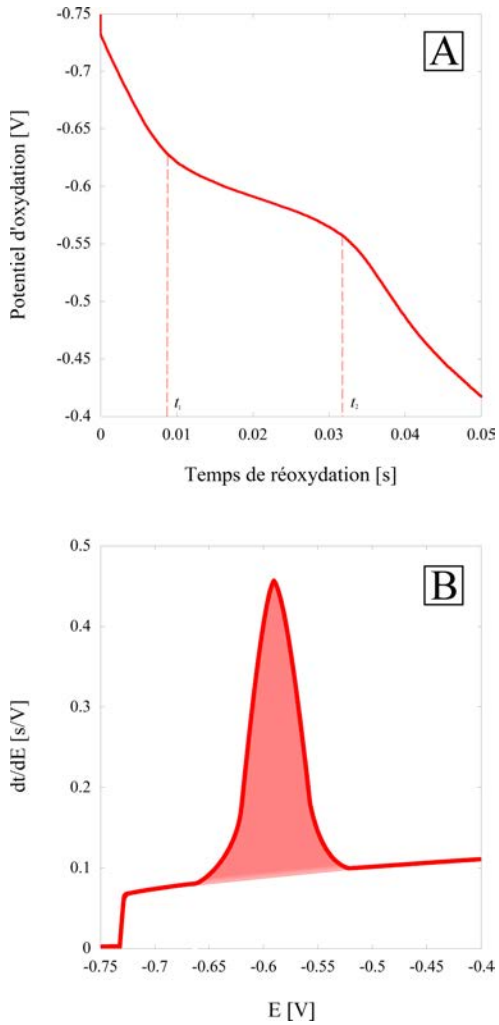


FIGURE 2.8 – **(A)** Exemple de courbe $E = f(t)$ obtenue à l'issue de l'étape de réoxydation **(B)** Dérivée du résultat brut $dt/dE = f(E)$

L'application d'un courant d'oxydation génère une diminution du potentiel. Au potentiel de réoxydation du métal amalgamé, un plateau de transition apparaît. Le temps de réoxydation (ou τ^*) est mesuré à partir de l'aire de la courbe $dt/dE = f(E)$

La relation entre le temps de réoxydation du métal amalgamé et la concentration de Cd(II) nécessite l'établissement d'une droite de calibration pour chaque nouvelle TMFE. Trois ajouts de $Cd(NO_3)_2$ suffisent à tracer une droite de calibration dont un exemple est donné ci-dessous :

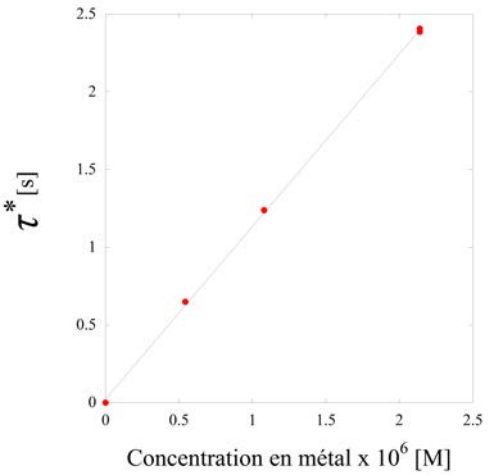


FIGURE 2.9 – Exemple de calibration par SCP reliant le temps de réoxydation τ^* à la concentration de métal libre et labile c^*_{M}

2.7.2 Quantification de la concentration libre en Cd(II) par Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES)

La méthode AGNES permet de mesurer la concentration en métal libre c^*_{M} ($\mathrm{mol\,L^{-1}}$) en solution en établissant un équilibre entre la concentration en Cd(II) à la surface de l'électrode c^0_{M} ($\mathrm{mol\,L^{-1}}$) et la concentration en cadmium amalgamé $c^0_{\mathrm{M^0}}$ ($\mathrm{mol\,L^{-1}}$). Pour cela, un potentiel de réduction est appliqué afin d'atteindre l'équilibre de Nernst, c'est-à-dire une concentration constante de cadmium dans le film de mercure $c^*_{\mathrm{M^0}}$ ($\mathrm{mol\,L^{-1}}$) et en solution c^*_{M} ($\mathrm{mol\,L^{-1}}$). Lorsque l'équilibre est atteint, le ratio des concentrations Y exprimé par l'équation de Nernst s'écrit [23] :

$$Y = \frac{c^*_{\mathrm{M^0}}}{c^*_{\mathrm{M}}} = \exp\left[-\frac{nF}{RT}(E_1 - E^{0'})\right] \tag{2.3}$$

avec E_1 (V) et $E^{0'}$ (V) le potentiel appliqué et le potentiel standard du couple rédox, respectivement, n le nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction, F la constante de Faraday ($\mathrm{C\,mol^{-1}}$), R la constante des gaz parfaits ($\mathrm{J\,mol^{-1}\,K^{-1}}$) et T (K) la température. AGNES s'est révélé complémentaire à la SCP dans la détermination de la concentration en métal libre lors des mesures de cinétiques de déplétion (voir paragraphe 2.7.4 et Chapitre 4). L'établissement d'une droite de calibration (voir protocole au paragraphe 2.7.1) permet de déterminer le temps de réoxydation τ^* en fonction de la concentration en métal mesurée.

2.7.3 Dispositif expérimental et préparation de l'électrode

Montage de l'appareil voltammétrique

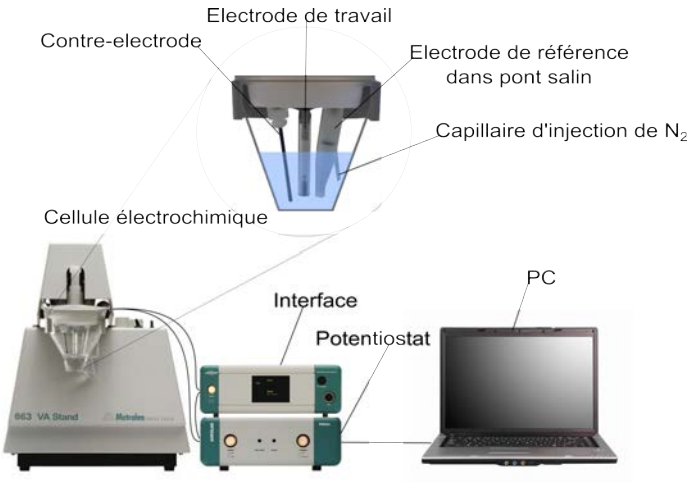


FIGURE 2.10 – Représentation schématique d'un montage voltammétrique

L'appareillage voltammétrique est constitué de plusieurs éléments. Un potentiostat Echochemie Autolab type III est relié à une interface IME663 et à un Stand Metrohm 663 VA qui contrôle la cellule de mesure électrochimique, le tout piloté par le logiciel General Purpose for Electrochemical System (GPES). La cellule électrochimique est composée de trois électrodes : une électrode de référence (Ag/AgCl) WPI (Sarasota, U.S.A.), une contre-électrode en carbone vitreux et une électrode de travail rotative. Cette dernière est constituée d'un film de mercure déposé sur un support en carbone vitreux de 2mm de diamètre (Glassy Carbon Electrode, Metrohm) appelé(e) TMF/RDE (Thin Mercury Film on Rotative Disk Electrode). Dans ce chapitre, tous les potentiels sont donnés en fonction de l'électrode de référence Ag/AgCl.

Préparation de l'électrode de travail

Le protocole suivi est décrit dans [24]. Une nouvelle électrode de travail (TMFE) est préparée pour chaque expérimentation SCP ou AGNES. La préparation de l'électrode de travail repose sur les étapes suivantes. Afin d'obtenir une surface réactive, la première étape consiste à polir la surface de l'électrode en carbone vitreux avec de l'oxyde d'aluminium déposé sur un tissu, suivi d'un rinçage de l'électrode à l'alcool 96% puis à l'eau déionisée. La deuxième étape est un prétraitement électrochimique qui utilise une méthode de voltammétrie cyclique normale pour laquelle le potentiel varie entre -0.8V et 0.8V à 0.1V.s^{-1} (50 cycles) dans une solution tampon composée d'acétate d'ammonium 1M et d'HCl 0.5M. Puis, les électrodes sont plongées dans une solution de Hg(II) à une concentration de $0.24\text{mmol}\,\text{L}^{-1}$ (pH = 1.8). L'application d'un potentiel de -1.3V à la surface de l'électrode de travail en rotation (1000tr.min^{-1}) via une méthode d'analyse voltammétrique par "square wave" réduit le mercure à la surface de l'électrode (Hg^{o}), ce qui forme un film de mercure de 25nm d'épaisseur environ. Une fois les expérimentations terminées, les électrodes sont plongées dans une solution composée de thiocyanate d'ammonium à $0.05\text{mol}\,\text{L}^{-1}$, d'acide chlorhydrique à $2.5\text{mmol}\,\text{L}^{-1}$ et de d'acétate d'ammonium à $5\text{mmol}\,\text{L}^{-1}$ afin de réoxyder le film de mercure. L'application d'une méthode "normal linear sweep voltammetry" avec un potentiel croissant de 0V à 0.4V est répétée plusieurs fois jusqu'à réoxydation complète du film de mercure.

Les techniques SCP et AGNES ont été employées dans le cadre des travaux décrit aux

chapitres 4 et 5 de la façon suivante :

- Suivi cinétique de déplétion de Cd(II) en solution par SCP (chapitre 4),
- Détermination des constantes de stabilité du complexe Cd(II)–MTc (chapitre 4),
- Détermination des isothermes d'adsorption de Cd(II) sur les surfaces bactériennes (chapitre 5).

2.7.4 Suivi cinétique de déplétion de Cd(II) en solution par SCP (Chapitre 4)

Afin d'évaluer la dynamique de partition des métaux aux biointerfaces, deux techniques de voltammétrie (SCP et AGNES) ont été utilisées pour mesurer in-situ la cinétique de déplétion des métaux en solution à des concentrations faibles (10^{-6} à 10^{-9}M).

Les expérimentations réalisées afin de mesurer la cinétique de déplétion des métaux en solution ont été conduites selon le protocole détaillé dans le Supporting Information du chapitre 4. Brièvement, une solution métallique est exposée à une suspension bactérienne accumulatrice de métaux. La dépletion des métaux en solution est suivie par mesure électrochimique in-situ jusqu'à atteindre l'équilibre du système. Le protocole est brièvement détaillé dans le paragraphe ci-dessous.

Préalablement aux mesures, les suspensions bactériennes de JW3434 et JW3434-MTc sont préparées selon le protocole détaillé dans le tableau 2.4. La préparation des électrodes est effectuée selon la description présentée dans le paragraphe 2.7.3. Puis, un batch de 20mL contenant le milieu HMM (voir tableau 2.2) pH = 4, force ionique = 100mM est préparé. Des ajouts successifs de $Cd(NO_3)_2$ jusqu'à une concentration de 2×10^{-6}M en Cd(II) permettent l'établissement de deux droites de calibration, l'une par mesure SCP et l'autre par mesure AGNES. Après ajout de soude pour atteindre un pH = 6.8, une suspension bactérienne à une concentration cellulaire connue est ajoutée à la solution métallique. Dès l'ajout des bactéries, la mesure de la cinétique de déplétion des métaux en solution par SCP (une mesure toutes les 10min) commence. Les mesures SCP sont effectuées avec les paramètres suivants :

- Potentiel de déposition $E_{\mathrm{d}} = -0.75$V (vs Ag/AgCl avec l'électrode de référence utilisée),
- Temps de déposition $t_{\mathrm{d}} = 45$s,
- Courant d'oxydation $I_{\mathrm{d}}^{*} = 3.10^{-6}$A.

La technique AGNES a été employée afin de confirmer l'absence d'un changement de spéciation de Cd(II) pendant l'exposition des bactéries cadmium. Les mesures ont été effectuées de la façon suivante : une étape de réduction du métal est réalisée par l'application d'un premier potentiel à l'électrode E_1 = -0.75V (vs Ag/AgCl avec l'électrode de référence utilisée) en rotation (1000tr.min^{-1}) pendant un temps t_1 = 45s, suivi d'un deuxième potentiel E_2 = -0.6V appliqué pendant t_2 = 120s, afin d'atteindre l'équilibre de Nernst. L'application d'un premier potentiel bien inférieur au potentiel de réduction du Cd(II) permet d'atteindre plus rapidement cet équilibre qu'avec l'application seule du potentiel à -0.6V. Puis, un courant d'oxydation constant $I_{\mathrm{s}} = 3.10^{-6}$A expulse le métal de l'amalgame vers la solution pendant le temps τ mesuré. La relation entre le temps de réoxydation mesuré et la concentration en métal libre est obtenue par l'établissement d'une droite de calibration identique à celle présentée en Figure 2.9. Afin de confirmer l'absence de croissance des bactéries, la DO est mesurée au début et à la fin des cinétiques de déplétion (voir paragraphe 2.5.2).

2.7.5 Détermination des constantes de stabilité du complexe Cd(II)–MTc (Chapitre 4)

A l'issue de l'analyse théorique sur les données expérimentales issues des cinétiques de déplétion conduites sur JW3434-MTc, un set de constantes de stabilité du complexe cadmium

- métallothionéine a été déterminé (voir chapitre 4). Afin de confirmer ces valeurs, des mesures indépendantes par électrochimie ont été effectuées sur un milieu proche du cytosol, dans les conditions des mesures des cinétiques de déplétion effectuées à différentes fraction volumique (voir Supporting Information du chapitre 4). L'expérimentation consiste à mesurer la concentration en Cd(II) libre par AGNES afin de déduire la constante de stabilité apparente du complexe $\bar{K}^* = c_{\mathrm{ML}}/c_{\mathrm{M}}$ avec respectivement c_{ML} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) et c_{M} ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) la concentration en complexe métallique et en métal libre. $\bar{K}^*$ est fonction de la constante de stabilité du complexe K via la relation : $K = \bar{K}^* \times \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$, avec $\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$ ($\mathrm{mol\,m^{-3}}$) la concentration de sites réactifs portés par la protéine. Pour ce faire, un milieu physicochimiquement proche a été reconstitué dans les concentrations de Cd(II), de MBP-MT et de protéines cytosoliques identiques à celles trouvées dans le milieu intracellulaire, diluée 100 fois pour satisfaire les contraintes expérimentales, à pH = 7 et force ionique = 150mM ajusté par ajout de $NaNO_3$. Le contenu protéique du cytosol et la MBP-MT ont été obtenus selon le protocole détaillé au paragraphe 2.6. Le protocole de mesure adopté est le suivant : l'électrode de travail est préparée selon le protocole détaillé au paragraphe 2.7.3, puis, une droite de calibration en utilisant AGNES est établie. Les protéines cytosoliques et la MBP-MT sont ensuite ajoutées dans les proportions identiques à celles trouvées dans le cytosol (ratio MT/Protéines totales = 0.2). Différents ratios de Cd/MT et de Cd/Protéines totales ont été obtenus par la variation de φ lors des mesures de cinétiques de déplétion. De ce fait, la détermination de la constante de stabilité du complexe Cd(II)–MTc formé a été effectuée par un balayage de la concentration de Cd.

2.7.6 Détermination des isothermes d'adsorption de Cd(II) sur les surfaces bactériennes (Chapitre 5)

L'adsorption de Cd(II) sur une surface complexante peut être décrite par l'isotherme d'adsorption de Langmuir. Pour les faibles concentrations de métal, la concentration surfacique de métal sorbé Γ_{M} ($\mathrm{mol\,m^{-2}}$) est liée à la concentration en métal aux abords de la membrane c_{M}^{a} par la relation $\Gamma_{\mathrm{M}} = K_{\mathrm{H}} c_{\mathrm{M}}^{a}$ avec K_{H} (m). Afin de confirmer les valeurs des constantes de Henry K_{H} obtenues à l'issue de l'analyse des données expérimentales (voir chapitre 5), des isothermes d'adsorption de Cd sur les surfaces bactériennes des trois biosenseurs BW25113, JW3596 et JW3601 ont été réalisées. Celles-ci ont été obtenues par la confrontation de l'analyse théorique menées au chapitre 5 (voir paragraphe 2.7.6) avec les résultats expérimentaux obtenus lors de l'exposition des biosenseurs à des concentrations variables en Cd(II) pour différentes fractions volumiques et forces ioniques. L'établissement des isothermes d'adsorption a consisté à d'abord mesurer la concentration en métal total en solution par SCP, puis en déduire la concentration en métal complexé à la surface biologique. Au préalable, l'absence de déplétion des métaux par les bactéries a été vérifiée.

Le protocole adopté est le suivant : préalablement aux mesures, les suspensions bactériennes de BW25113, JW3596 et JW3601 sont préparées selon le protocole détaillé dans le tableau 2.4. La préparation des électrodes est effectuée selon la description présentée dans le paragraphe 2.7.3. Puis, le protocole adopté est le suivant : un batch de 20mL contenant le milieu nGGM (voir composition au tableau 2.3) pH = 7, force ionique 10mM ou 100mM, température = 25°C est préparé. Des ajouts successifs de $Cd(NO_3)_2$ jusqu'à une concentration de 3×10^{-8}M en Cd(II) permettent l'établissement d'une droite de calibration. Enfin, un second batch identique exempt de Cd(II) est préparé, placé dans la cellule électrochimique et dans lequel est ajoutée une suspension bactérienne à une fraction volumique connue. Après ajouts successifs de $Cd(NO_3)_2$, la quantification de la concentration en métal libre en solution par mesure SCP permet de déduire la concentration en métal adsorbé à la surface bactérienne. La détermination de faibles concentrations en Cd(II) nécessite d'abaisser la limite de détection. Pour ce faire, le temps de réduction de Cd(II) dans le film de mercure t_{d} est fixé à 300s. Les autres paramètres de SCP sont identiques à ceux utilisés pour les mesures des cinétiques de dépletion de Cd (voir 2.7.4)

2.8 Détermination de la quantité adsorbée de cadmium sur les membranes bactériennes par Spectrométrie d'Absorption Atomique (Chapitre 4)

La Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) est une technique de dosage d'éléments chimiques qui repose sur le principe d'absorption d'un faisceau par des atomes libres atomisés. Brièvement, les échantillons liquides sont vaporisés puis atomisés par flamme à haute température. Un faisceau de longueur d'onde correspondant à l'élément visé excite les atomes cibles de l'échantillon. Une fraction de ce faisceau est absorbée par les atomes cibles contenus dans l'échantillon. La différence d'intensité entre le faisceau émis et le faisceau transmis est fonction de la quantité de l'élément présente dans l'échantillon. Cette technique a été employée pour vérifier de manière indépendante les quantités de cadmium adsorbées à la surface membranaire par les bactéries JW3434 et JW3434-MTc. Les mesures ont été effectuées au Service d'Analyse des Roches et des Minéraux du Centre de Recherche Pétrographiques et Géochimiques (CRPG, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) sur un Varian 220FS.

Afin de déterminer les quantités de Cd(II) sorbées de JW3434 et JW3434-MTc, les échantillons ont été préparés de la façon suivante : Une série de 5 solutions de 40mL de milieu HMM (voir composition au tableau 2.2) contenant 2.10^{-6}M de Cd(II) a été préparée. Les suspensions bactériennes JW3434 et JW3434-MTc ont été cultivées selon le protocole détaillé dans le tableau 2.4. Puis, les cellules ont été ajoutées dans les batchs à une fraction volumique connue. Après 2, 10, 30, 60 et 120min de temps d'exposition, la moitié des échantillons a été filtrée à 0.2µm, acidifiée et stockée à 4°C. 2mL d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) à 0.01M ont été ajoutés dans la moitié restante de chaque échantillon puis vortexés pendant 1min. Après 10min, les échantillons ont été filtrés, acidifiés et stockés à 4°C. La mesure des concentrations en Cd(II) de la première série correspond à la fraction de métal en solution, tandis que l'analyse de la seconde série permet de quantifier les concentrations en Cd(II) en solution et désorbées par l'EDTA des surfaces biologiques. La confirmation de l'intégrité des cellules après ajout de l'EDTA a été effectuée par dénombrement des UFC sur boîtes gélosées.

2.9 Évaluation de la taille des cellules par Microscopie à Force Atomique (Chapitre 4)

La microscopie à force atomique (AFM) est une microscopie à sonde locale capable d'imager un échantillon à l'échelle du nanomètre, et de déterminer les caractéristiques mécaniques d'un matériau. Cette technique utilise une pointe nanométrique en nitrure de silicium comme sonde locale qui se déplace sur la surface d'un échantillon [25]. La résolution des images obtenues est de l'ordre du nanomètre.

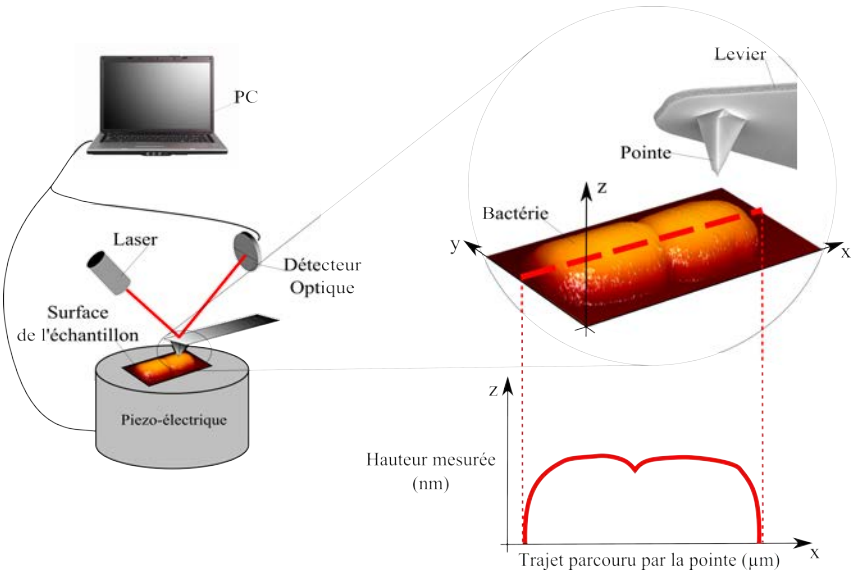


FIGURE 2.11 – Principe de fonctionnement de l'AFM (levier et pointe Bruker adapté du site de Direct Industry) *

L'imagerie des souches bactériennes a été réalisée avec un Dimension FastScan AFM (Bruker, Santa Barbara, USA). Le principe de mesure par AFM est le suivant : un échantillon est fixé sur un support pouvant se déplacer dans le plan (x,y) par l'utilisation d'une céramique piézo-électrique. La surface de l'échantillon peut être sondée dans l'air, dans une atmosphère humide (sous vapeur) ou en solution. Une pointe portée par un levier est approchée de l'échantillon verticalement par un bras mécanique. A l'approche de l'échantillon, la pointe est soumise à des forces d'attraction et de répulsion dues aux interactions locales de type chimique, van der Waals, électrostatique, capillaire ou mécanique [25]. Ces interactions fléchissent le levier. La distance parcourue verticalement par la pointe est qualifiée de distance de défléxion. La loi de Hooke relie cette distance parcourue à la force d'interaction par la relation :

$$F = k_c \times d \tag{2.4}$$

avec F (N) la force d'interaction entre la pointe et la surface, k_c ($\mathrm{N\,m^{-1}}$) la constante de raideur du levier et d (m) la déflexion du levier. Cette dernière est mesurée en utilisant un laser pointé sur sa face supérieure recouverte d'or. Par un jeu de miroir, la réflexion du laser aboutit à un détecteur optique, qui convertit le signal reçu en signal électrique [25].

L'imagerie par AFM consiste à scanner ligne par ligne un échantillon sur une surface donnée, et d'enregistrer la déflexion du levier. L'imagerie de la surface d'un échantillon est possible par différents modes d'acquisition, dont les principaux sont le mode contact et le mode tapping. Ce dernier mode consiste à un scan de la surface de l'échantillon par oscillation du levier, afin de réduire le contact de la pointe qui peut occasionner des dégâts à la surface biologique sondée. Un mode récent dérivé du mode tapping appelé peak force tapping a été utilisé avec l'aide du Dr. Angelina Razafitianamaharavo (LIEC) et du Dr. Audrey Beaussart (LIEC) pour imager les souches *Escherichia coli* JW3434 et JW3434-MTc dans le milieu HMM (voir composition au tableau 2.2) utilisées dans les mesures cinétiques de déplétion du métal (voir chapitre 4).

*. `http://www.directindustry.fr/prod/bruker-nano-surfaces/product-57554-1600778.html`

2.10 Évaluation des propriétés de surface des particules par mesure de la mobilité électrophorétique (Chapitre 4 et 5)

Préalablement à la description du principe de mesure, de l'appareil et des conditions de mesures, quelques explications de processus physiques aux interfaces solide/liquide sont nécessaires.

2.10.1 Origine de la charge surfacique ou volumique - Double Couche Electrique

Comme brièvement explicité dans le chapitre 1 paragraphe 1.3.3, les particules dures ou molles dispersées dans un milieu aqueux acquièrent respectivement une charge surfacique ou volumique. La présence de ces charges induit un potentiel électrostatique à l'interface liquide/particule, qui varie du centre de la particule vers le milieu aqueux. Le profil du potentiel électrostatique généré par ces charges est fonction des conditions physico-chimiques du milieu en lien avec la nature de la particule.

La distribution ionique des charges contenues dans un milieu salin en contact avec des surfaces dures est représentée dans la figure ci-dessous selon le modèle de Gouy-Chapman Stern couramment adopté [26].

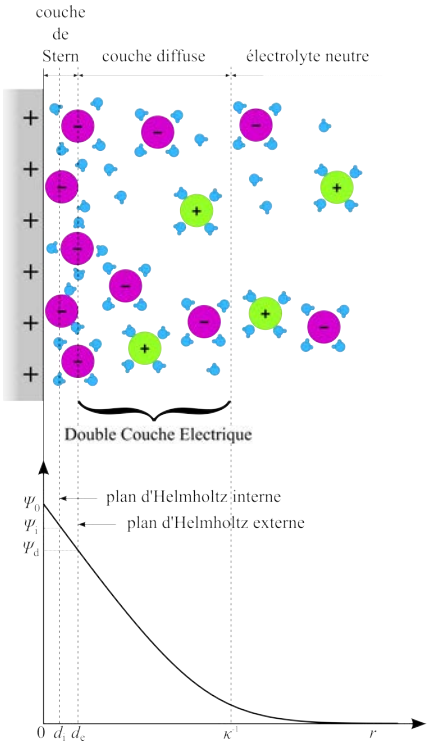


FIGURE 2.12 – Représentation de la distribution ionique et du potentiel électrostatique dans l'environnement proche des surfaces dures. Les ions sont représentés avec leur sphère d'hydratation. Adapté de [27]

Dès lors qu'un milieu salin est en contact avec une surface chargée, des ions de charge opposée contenus dans la solution se positionnent à la surface des parois du capillaire et forment une couche appelée couche de Stern. Celle-ci est subdivisée en deux parties séparées par le plan d'Helmotz interne, dont la taille correspond au rayon des ions adsorbés sur la surface chargée. Le deuxième plan appelé plan d'Helmotz externe est situé à une distance égale au rayon des ions sous leur forme hydratée proche de la surface chargée. Une seconde couche appelée couche diffuse ou couche de Gouy-Chapman recouvre celle de Stern. Dans cette couche, la distribution des charges

suit une distribution de Boltzmann. Cette distribution ionique prend la forme d'une double couche appelée Double Couche Electrique (DCE). L'épaisseur de la DCE peut être assimilée à la longueur de Debye κ (m^{-1}), définie par :

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon \varepsilon_0 RT}{F^2 \sum_i z_i^2 c_i^*} \right)^{1/2} \tag{2.5}$$

où $\varepsilon_\circ$ ($C^2\,J^{-1}\,m^{-1}$) et ε (sans dimension) la permittivité diélectrique du vide et relative du milieu, respectivement, R ($J\,mol^{-1}\,K^{-1}$) est la constante des gaz parfaits, T (K) est la température, F ($C\,mol^{-1}$) est la constante de Faraday et $\sum_i z_i^2 c_i^*$ fait référence à la somme de tous les ions du milieu en tenant compte de leurs charges et de leurs concentrations ($mol\,m^{-3}$).

2.10.2 Mobilité électrophorétique des particules

La mobilité électrophorétique μ ($m^2\,V^{-1}\,s^{-1}$) représente le déplacement des particules chargées dispersées dans un milieu aqueux contenu dans un capillaire fermé sous l'action d'un champ électrique connu. La mesure de cette mobilité consiste à relever la vitesse de migration des particules dispersées dans un milieu, puis de la diviser par le champ électrique uniforme et continu appliqué. L'application d'un champ électrique dans un milieu aqueux est illustré dans la figure 2.13

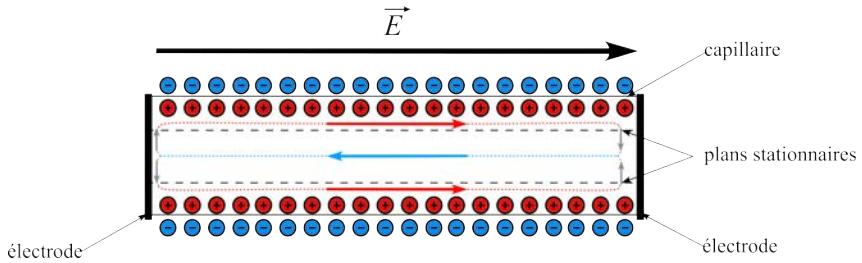


FIGURE 2.13 – Illustration des flux de liquide contenu dans une cellule de mesure fermée sous l'action d'un champ électrique (adapté de [28])

Les mesures de mobilité des particules ne peuvent s'effectuer en tout point du capillaire dues au phénomène d'électroosmose. En effet, l'électroosmose est un phénomène qui apparaît lorsqu'un champ électrique parallèle aux parois du capillaire est appliqué, ce qui force les ions de la couche diffuse à se déplacer le long des parois, et entraîne avec eux le reste du fluide. La direction de ce flux généré par électroosmose dépend du signe des ions de la couche diffuse, eux-mêmes dépendant de la charge des parois. Dans un capillaire fermé, le flux généré aux abords des parois de la cellule est compensé par un flux de sens opposé au centre de la cellule. Ainsi, il existe deux plans dit *stationnaires* où ces deux flux s'annulent et sur lesquels est mesuré la mobilité des particules.

Particules dures

Une suspension de particules de rayon a (m) dispersées dans un milieu aqueux acquiert également une DCE dans leur environnement proche afin d'atteindre la neutralité. Lors des mesures de mobilité des particules dures, la région comprise entre la surface particulaire et le plan d'Helmotz externe est dite stagnante, du fait que la vitesse relative entre la surface de la particule et les couches adjacentes de liquide est nulle. De ce fait, lorsqu'un champ électrique est

appliqué entre les électrodes, cette couche ne suit pas le mouvement du fluide environnant, mais reste fixe par rapport aux particules. Ainsi, le plan entre cette couche stagnante et la couche supérieure mobile de liquide est qualifié de plan de cisaillement. Le potentiel électrostatique à ce point particulier est appelé potentiel ζ.

Plusieurs modèles permettent de reconstruire les données expérimentales de mobilité électrophorétique en fonction de la concentration en sels et du potentiel ζ. Applicable quelles que soient les valeurs de potentiel ζ et du produit κa, le modèle numérique d'O'Brien et White est le plus utilisé. Le lecteur est invité à se référer à [29] pour plus d'informations.

Particules molles

Les particules molles sont différentes des particules dures pour plusieurs raisons :

- La présence d'une couche polymérique d'épaisseur d (m) perméable aux ions génère une distribution spatiale ionique à la fois dans la couche polymérique et dans le milieu extraparticulaire.
- La définition d'un plan de cisaillement entre une couche de liquide stagnante et une couche de liquide mobile est impossible.
- Les particules molles dans un milieu aqueux salin sont généralement dans les conditions de Donnan ($\kappa a \gg 1$ et $\kappa_{\mathrm{m}} d \gg 1$ avec κ_{m}^{-1} (m) l'épaisseur de la longueur de Debye dans la couche molle). Dans ces conditions, le potentiel intraparticulaire est appelé potentiel de Donnan ψ_{D}

De ce fait, la représentation des interactions particules - ions établie par Gouy-Chapman-Stern n'est plus applicable, et est remplacée par celle d'Ohshima [30, 31, 32], représentée dans la Figure 2.14 ci-dessous :

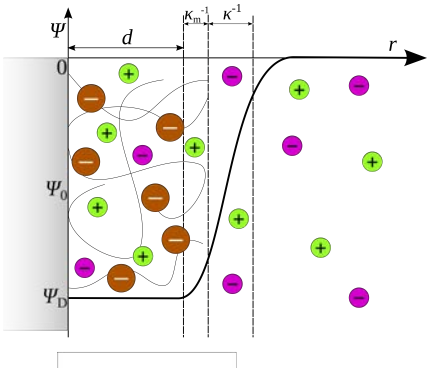


FIGURE 2.14 – Représentation de la distribution ionique et du potentiel électrostatique dans l'environnement proche des surfaces dures. Adaptée de Ohshima [31, 32]

Différents modèles permettent de reconstruire les données expérimentales de mobilité électrophorétique. Parmi ces modèles, celui de Duval et Ohshima [33] évalue la densité volumique de charge ρ (mol m^{-3}) la longueur de pénétration du fluide $1/\lambda$ (m) dans la couche molle et le paramètre d'hétérogénéité de distribution de charge et de matériel membranaire perméable α (sans dimension).

L'interprétation de données expérimentales par l'application de ce modèle tient compte de l'hydrodynamisme, des phénomènes de polarisation † et de relaxation ‡ de la double couche, et

†. Perturbation des distributions de potentiel électrostatique et de concentration en ions autour de la particule par l'application d'un champ électrique

‡. Etat de la DCE qui précède celui d'équilibre suite à une perturbation issue de la différence de transport des ions à l'intérieur et à l'extérieur de cette double couche

de la distribution hétérogène des charges portées par les polymères.

2.10.3 Principe de la microélectrophorèse sur la mesure de la mobilité des bactéries (Chapitre 4 et 5)

De par leur structure, les bactéries peuvent être considérées comme des particules molles [34]. Dans ces travaux de recherche, la mobilité électrophorétique des bactéries a été mesurée à différentes concentrations en sels ($NaNO_3$) à l'aide d'un Zetaphorémètre IV (CAD Instrumentation, France). La mesure consiste à appliquer une différence de potentiel ($30\,\mathrm{V\,m^{-1}}$) à une suspension bactérienne et à suivre le déplacement des bactéries pendant un temps donné. La suspension bactérienne est dispersée dans un milieu salin contenu dans une cellule (constituée d'un capillaire rectangulaire en quartz) fermée, éclairée par un laser et encadrée par deux électrodes de palladium. Une caméra Charge-Coupled Device (CCD) montée sur un microscope orienté vers la cellule suit le déplacement des bactéries et enregistre les données sur un ordinateur équipé du logiciel ZetaCompact 5.01 (CAD Instrumentation). Lors des mesures, le nombre de trajectoires enregistrées par séquence doit être aux alentours de 100 ± 20. Pour chaque mesure, le déplacement des bactéries est enregistré sous l'action du champ électrique appliqué dans un sens, puis dans l'autre, afin d'éviter la polarisation des électrodes. Les mesures sont répétées trois fois de façon à vérifier la répétabilité des mesures. Chaque déplacement de bactéries correspondant à une mesure de mobilité, une distribution des valeurs de mobilité est déterminée pour l'ensemble des bactéries suivies. Cette représentation des données (sous forme d'un histogramme de distribution de vitesse) est un moyen de vérifier que la suspension bactérienne présente un comportement électrophorétique lorsque la distribution est monodisperse.

La mesure de la mobilité électrophorétique des souches JW3434 et JW3434-MTc (chapitre 4) a été effectuée dans des conditions de salinité en $NaNO_3$ comprises entre 1mM et 200mM (voir Supporting Information du chapitre 4). Concernant les souches BW25113, JW3596 et JW3601 impliquée dans le chapitre 5, les expérimentations ont été menées dans le milieu d'exposition des biosenseurs à des salinités comprises entre 10mM et 300mM (voir Supporting Information du chapitre 5).

Références

[1] Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. et Mori, H. « Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection ». In : *Molecular Systems Biology* 2.1 (2006), p. 1–11.

[2] Sauge-Merle, S., Lecomte-Pradines, C., Carrier, P., Cuiné, S. et DuBow, M. « Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within Escherichia coli protects against elevated metal exposure ». In : *Chemosphere* 88.8 (2012), p. 918–924.

[3] New England BioLabs. *Protein Expression & Analysis. pMAL protein fusion & purification system.* 2005.

[4] Romero-Isart, N. et Vašák, M. « Advances in the structure and chemistry of metallothioneins ». In : *Journal of Inorganic Biochemistry* 88.3-4 (2002), p. 388–396.

[5] Nakagawa, I., Suzuki, M., Imura, N. et Naganuma, A. « Involvement of Oxidative Stress in Paraquat-Induced Metallothionein Synthesis Under Glutathione Depletion ». In : *Free Radical Biology and Medicine* 24.9 (1998), p. 1390–1395.

[6] Sato, M. et Bremner, I. « Oxygen free radicals and metallothionein ». In : *Free Radical Biology and Medicine* 14.3 (1993), p. 325–337.

[7] I., B. « Nutritional and Physiological Significance of Metallothionein (Proceedings of the Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins, Zürich) ». In : *Metallothionein II*. Sous la dir. de Kägi, J. H. R. et Kojima, Y. Basel : Birkhäuser Verlag, 1987. Chap. Chapter 5, p. 81–107.

[8] Kägi, J. H. R. et Kojima, Y. « Chemistry and Biochemistry of Metallothionein (Proceedings of the Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins, Zürich) ». In : *Metallothionein II*. Sous la dir. de Kägi, J. H. R. et Kojima, Y. Basel : Birkhäuser Verlag, 1987. Chap. Chapter 3, p. 25–61.

[9] Riether, K., Dollard, M.-A. et Billard, P. « Assessment of heavy metal bioavailability using Escherichia coli zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors ». In : *Applied Microbiology and Biotechnology* 57.5-6 (2001), p. 712–716.

[10] Selifonova, O., Burlage, R. et Barkay, T. « Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg (II) in the environment. » In : *Applied and environmental microbiology* 59.9 (1993), p. 3083–3090.

[11] Rotureau, E., Billard, P. et Duval, J. F. L. « Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal depletion kinetics at various cell concentrations: theory and application ». In : *Environmental Science and Technology* 49.2 (2015), p. 990–998.

[12] Hynninen, A., Tõnismann, K. et Virta, M. « Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals ». In : *Bioengineered Bugs* 1.2 (2010), p. 132–138.

[13] Stone, B. J. et Kwaik, Y. A. « Natural competence for DNA transformation by Legionella pneumophila and its association with expression of type IV pili ». In : *Journal of bacteriology* 181.5 (1999), p. 1395–1402.

[14] Raser, J. M. et O'Shea, E. K. « Noise in Gene Expression: Origins, Consequences, and Control ». In : *Science* 309.5743 (2005), p. 2010–2013.

[15] Rogowsky, P. M., Close, T. J., Chimera, J. A., Shaw, J. J. et Kado, C. I. « Regulation of the vir genes of Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiC58. » In : *Journal of bacteriology* 169.11 (1987), p. 5101–5112.

[16] Caguiat, J. J., Watson, A. L. et Summers, A. O. « Cd (II)-responsive and constitutive mutants implicate a novel domain in MerR ». In : *Journal of bacteriology* 181.11 (1999), p. 3462–3471.

[17] Outten, C. E., Outten, F. W. et O'Halloran, T. V. « DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in Escherichia coli ». In : *Journal of Biological Chemistry* 274.53 (1999), p. 37517–37524.

[18] Rensing, C., Mitra, B. et Rosen, B. P. « The zntA gene of Escherichia coli encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94.26 (1997), p. 14326–14331.

[19] Silva-rocha, R., Martinez-Garcia, E., Calles, B., Chavarria, M., Arce-Rodriguez, A., De las Heras, A., Paez-Espino, D. A., Durante-Rodriguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R. et Lorenzo, D. V. « The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes ». In : *Nucleic Acids Research* 41.November 2012 (2013), p. 666–675.

[20] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. Sous la dir. d'Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. 5th. New York, Abingdon : Garland Science, 2008, p. 1689–1699.

[21] Lodi, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira et Darnell. « Chapitre 5 Organisation cellulaire, structure infracellulaire et division cellulaire ». In : *Biologie Moléculaire de la cellule*. Bruxelles : De Boeck Université, 1997. Chap. 5, p. 162.

[22] Town, R. M. et Van Leeuwen, H. P. « Significance of wave form parameters in stripping chronopotentiometric metal speciation analysis ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 535.1 (2002), p. 11–25.

[23] Galceran, J., Companys, E., Puy, J., Cecilia, J. et Garces, J. « AGNES: a new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry* 566.1 (2004), p. 95–109.

[24] Monterroso, S. C., Carapuça, H. M., Simão, J. E. et Duarte, A. C. « Optimisation of mercury film deposition on glassy carbon electrodes: evaluation of the combined effects of pH, thiocyanate ion and deposition potential ». In : *Analytica Chimica Acta* 503.2 (2004), p. 203–212.

[25] Eaton, P. et West, P. *Atomic Force Microscopy.* Oxford, United Kingdom : Oxford University Press, 2010, p. 256.

[26] Stern, O. « Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht ». In : *Zeitschrift fur Elektrochemie* 30 (1924), p. 508–516.

[27] Hiemenz, P. C. *Principles of Colloid and Surface Chemistry.* Sous la dir. d'Hiemenz, P. C. et Rajagopalan, R. 3rd. New York : Marcel Dekker, Inc., 1997, p. 248–286.

[28] Merlin, J. « Propriétés électrostatiques, mécaniques et chémodynamiques de (bio) interphases molles: analyses en régime d'équilibre transitoire ». Thèse de doct. Lorraine, 2012, p. 284.

[29] O'Brien, R. W. et White, L. R. « Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle ». In : *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* 74 (1978), p. 1607.

[30] Ohshima, H. « Electrophoretic mobility of soft particles ». In : *Journal of Colloid and Interface Science* 163.2 (1994), p. 474–483.

[31] Ohshima, H. « Electrophoresis of soft particles * ». In : *Advances in Colloid and Interface Science* 62.2-3 (1995), p. 189–235.

[32] Ohshima, H. « Electrophoretic mobility of soft particles ». In : *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 103.3 (1995), p. 249–255.

[33] Duval, J. F. L. et Ohshima, H. « Electrophoresis of diffuse soft particles. » In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 22.8 (2006), p. 3533–46.

[34] Duval, J. F. et Gaboriaud, F. « Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases ». In : *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15.3 (2010), p. 184–195.

3 Évaluation de la dynamique de partition des métaux aux interfaces microbiennes : impacts de la complexation intracellulaire

Les interactions entre un ion métallique et une cellule biologique sont régies par des processus biophysicochimiques aux interfaces. Jusqu'à présent, les études sur le partitionnement des métaux aux interfaces biologiques ont porté sur la détermination de la spéciation des métaux dans le milieu extracellulaire et à la surface biologique des organismes considérés. Il existe deux approches qui visent à déterminer la distribution des métaux aux interfaces biologiques. La première repose sur l'hypothèse selon laquelle le milieu extracellulaire est à l'équilibre thermodynamique, i.e. la spéciation et les concentrations des métaux aux abords de la membrane biologique et en solution sont identiques (approche des modèles de spéciation thermodynamiques de type Biotic Ligand Model). Une seconde approche consiste à évaluer les flux de métaux depuis la solution vers la surface biologique, quel que soit l'état du système (équilibre et hors-équilibre). Malgré le développement plus rigoureux de cette seconde approche, aucune des deux ne tient compte de la réponse cellulaire associée à l'exposition des cellules aux métaux. Parmi ces réponses biologiques peuvent être cités certains mécanismes de défense comme le piégeage intracellulaire des métaux internalisés et/ou l'excrétion de ceux-ci vers le milieu extracellulaire. De ce fait, la dynamique de partition des métaux à la surface membranaire et dans le milieu extracellulaire est dépendante de la dynamique chimique des métaux internalisés avec des sites ligands contenus dans le milieu intracellulaire. Dans ce contexte, le chapitre 3 présente un formalisme qui tient compte des processus biophysicochimiques qui régissent la dynamique de partition des métaux en présence d'une dynamique de complexation des métaux internalisés. Ce formalisme inclut le transport des métaux par diffusion conductive depuis le milieu vers la biosurface, formalisé par l'équation de Nernst-Planck et corrigé des interactions électrostatiques entre les métaux et la surface biologique (en utilisant l'expression de Poisson-Boltzmann pour la détermination des potentiels de surface). Ce transport est suivi d'une adsorption de type Langmuir des métaux sur des sites de complexations menant ou non à l'internalisation. La fraction de métal internalisée via le mécanisme de Michaelis-Menten est soit excrétée vers le milieu extracellulaire, soit complexée sur des sites réactifs portés par des chélatants protéiques. Cette complexation intracellulaire est formalisée par le mécanisme d'Eigen étendu qui repose sur une première étape de diffusion du métal vers un site réactif avant de s'associer pour former un complexe métallique. Le formalisme théorique développé à partir de ces expressions permet de rationaliser la dynamique de partition des métaux aux biointerfaces par un jeu d'équations différentielles couplées non linéaires. Dans ce développement théorique sont notamment impliqués :

- la constante de stabilité du complexe intracellulaire $\bar{K}^*$,
- un paramètre mathématique λ qui compare la cinétique de formation du complexe intra-

cellulaire avec la cinétique d'excrétion du métal k_e,

- un coefficient de biopartition fonction de $\bar{K}^*$, k_e et du temps caractéristique du transfert transmembranaire d'un ion métallique du milieu extracellulaire vers l'intracellulaire τ_L.

Par ce développement théorique, la modélisation de la dépendance temporelle des concentrations en métaux dans le milieu extracellulaire, à la surface biologique et dans le milieu intracellulaire est possible par résolution numérique et dans certains cas particuliers par des expressions analytiques. Enfin, l'analyse numérique a montré que la formation de complexes forts dans le compartiment intracellulaire peut générer une "demande" en métal suffisamment importante pour que la cinétique d'assimilation des métaux soit limitée par leurs diffusions depuis le milieu extracellulaire vers la surface biologique (cas non prédit par les modèles classiques du type BLM).

PCCP

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30415

Kinetic and thermodynamic determinants of trace metal partitioning at biointerphases: the role of intracellular speciation dynamics†

Jérôme F. L. Duval,*[ab] Romain M. Présent[ab] and Elise Rotureau[ab]

Received 17th August 2016,
Accepted 6th October 2016

DOI: 10.1039/c6cp05717a

www.rsc.org/pccp

There is a large body of work evidencing the necessity to evaluate chemical speciation dynamics of trace metals in solution for an accurate definition of their bioavailability to microorganisms. In contrast, the integration of intracellular metal speciation dynamics in biouptake formalisms is still in its early stages. Accordingly, we elaborate here a rationale for the interplay between chemodynamics of intracellular metal complexes and dynamics of processes governing metal biouptake under non-complexing outer medium conditions. These processes include the conductive diffusion of metal ions to the charged soft biointerphase, metal internalisation, excretion of intracellular free metal species and metal depletion from bulk solution. The theory is formulated from Nernst–Planck equations corrected for electrostatic and reaction kinetic terms applied at the biosurface and in the intracellular volume. Computational illustrations demonstrate how biointerfacial metal distribution dynamics inherently reflects the chemodynamic properties of intracellular complexes. In the practical limits of high and weak metal affinity to biosurface internalisation sites, the metal concentration profile is explicitly solved under conditions of strong intracellular complexing agents. Exact analytical expression is further developed for metal partitioning at equilibrium. This provides a way to evaluate the metal biopartition coefficient from refined analysis of bulk metal depletion measured at various cell concentrations. Depending on here-defined dimensionless parameters involving rates of metal internalisation–excretion and complex formation, the formalism defines the nature of the different kinetic regimes governing bulk metal depletion and biouptake. In particular, the conditions leading to an internalisation flux limited by diffusion as a result of demanding intracellular metal complexation are identified.

I. Introduction

A comprehensive understanding of the beneficial and/or toxic effects of trace metals on living aquatic microorganisms requires the development of theoretical formalisms to assess the distribution of metal species at biointerphases during biouptake.[1,2] This includes the evaluation of the concentration of metal ions internalised by microorganisms over time as a function of the physico-chemical medium conditions, in particular the presence of metal complexing agents in solution.[1–6] In that respect, a conceptual framework developed by Van Leeuwen[3] and inspired by the pioneering work of Best[7] proved to be decisive for analysing metal flux characteristics at cell surfaces with account of interconversion kinetics between metal complexes and free metal ions in solution. This approach discriminates cases where labile metal complexes in the extracellular volume effectively contribute to metal uptake.[3] This theoretical corpus on the dynamics of metal uptake by microorganisms is based on the integration of the intricate coupling between kinetics of association/dissociation of metal complexes in solution and dynamics of transport of the various metal forms (free and complexed) from the

[a] *CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France. E-mail: jerome.duval@univ-lorraine.fr*

[b] *Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54501, France*

† Electronic supplementary information (ESI) available: Part I: 1. Detailed derivations of eqn (19) and (27). 2. Demonstration of eqn (23) and (24). Part II: 1. Demonstration of eqn (29)–(31) 2. Physical interpretation of the term $(1+\bar{K}^*)/(k_e\tau_L)$. 3. Formal demonstration of the relationship $c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* \gg 1)/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0) \to 0$. 4. Detailed asymptotic behavior of eqn (29) for $\bar{K}^* \ll 1$ and $\bar{K}^* \gg 1$, and details on the behavior of eqn (31) at $k_e\tau_L \ll 1$ and $k_e\tau_L \gg 1$ (Table S1). 5. Evolution of the ratio $c_M^{*,\infty}(\bar{K}^*)/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ with $\bar{K}^*$ at different $k_e\tau_L$ values (Fig. S1). Part III: 1. Derivation of eqn (32) valid for strong ML_S complexes ($\bar{K}^* \gg 1$). 2. Derivation of the expressions for the surface and bulk metal concentrations for $\bar{K}^* \gg 1$ in the regime of strong and weak affinity of M for the internalisation sites (eqn (33) and (34) and eqn (35)–(37), respectively). Simplifications of eqn (37) and (38) for situations where $k_o = k_+ = k_-$ and $k_- = k_e(1+\lambda)$. 3. Limits of eqn (35)–(37) at $\lambda \to 0$. 4. Evolution of $k_+\tau_E$ with $\lambda k_e\tau_E$ at different $k_e\tau_L$ values (Fig. S2). 5. Physical interpretation of the timescale $\tau_E \Big/ \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E + k_e\tau_L\right)$ and comments on Table 1. 6. Simplification of eqn (37) and (38) for $\bar{\phi}_u^{M,0} = 0$. Part IV: 1. Time-dependence of M transport flux at the membrane surface under conditions of Fig. 5 (Fig. S3) and time-dependent ratio $c_M^*/c_M^{*,0}$ under conditions of Fig. 7 (Fig. S4). 2. Expressions of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ and k_+/k_- as a function of φ/φ^* and details on the corresponding asymptotic behavior at $\varphi/\varphi^* \ll 1$ and $\varphi/\varphi^* \gg 1$ (Table S2). Derivation of eqn (39)–(41). 3. Dependence of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ on φ/φ^* and $\bar{K}^*$ at various values of $\Delta\bar{c}_o$ and $1/x_o$ (Fig. S5). See DOI: 10.1039/c6cp05717a

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

solution to the biointerphase. It offers a physically sound alternative to popular equilibrium models, like the biotic ligand model (BLM),[8–10] that are applicable under the restrictive conditions where metal uptake is solely controlled by the activity of free metal species at the biosurface *a priori* set equal to that in bulk solution.[3,10–11] Within this thermodynamic framework, it is thus assumed that metal transport in solution is fast compared to the internalisation process. This excludes *de facto* the possible limitation of the rate of metal uptake by diffusion of metal species from the solution to the biointerphase. There are several studies pointing out the limits and/or failure of the equilibrium BLM framework under both metal complexing and non-complexing outer medium conditions[1–3,10–18] and within the context of metal toxicity studies:[19] Hassler *et al.*[17] evidenced diffusion-limitation of zinc uptake by freshwater algae of the type *Chlorella kesslerii*, and Bosma *et al.*[18] argued that mass transfer is the critical factor in most bioremediation processes taking place in soils or sediments. Several reports further demonstrate diffusion-limited uptake of essential metal elements by various marine microorganisms.[20–22] These examples all legitimate the need to resort to out-of-equilibrium models where biouptake is derived from proper evaluation of metal transport dynamics in the extracellular aqueous phase. The models differ with respect to *e.g.* their account or not of cell surface electrostatics and soft peripheral cell structures, their integration of metal depletion from bulk solution and cell growth kinetics, and their ability to treat metal biosorption beyond the mathematically convenient linear Henry regime.[19,23–28]

In practice, the uptake of metal ions by microorganisms is mediated by various intracellular metal-binding compounds (*e.g.* proteins and peptides) that play a key role in sustaining microbial life *via* their regulation of metal internalisation–excretion or their implications in the transport of metal to specific cellular compartments.[29] Metal homeostasis, which refers to the ability of cells to maintain a healthy level of metal concentration in their body, involves intracellular chemical processes, the dynamics of which affects the rate of metal uptake-excretion in order to meet the physiological requirements of the microbes.[29] For the sake of illustration, let us consider a microorganism that needs to store metal ions at a given rate (supplied by the medium) in the form of intracellular metal complexes with *ad hoc* internal metal chelators. This demand will be satisfied as long as metal uptake flux at the biomembrane can sustain the required intracellular metal complex formation. For situations where the rate of such complex formation is fast, the interfacial uptake flux will become necessarily limited by the diffusion supply of metal species (supported or not by extracellular complexes), and the depletion of the latter in bulk solution may further overlap with the uptake process depending on the metal reservoir available for the microorganisms. This example highlights that explicit account of intracellular metal speciation dynamics is critical for a correct evaluation of metal partitioning at active biointerphases over time. To the best of the authors' knowledge, a rigorous theoretical investigation of the coupling between cell flux features and kinetics of intracellular metal complex formation/dissociation has never been elaborated at the quantitative dynamic physicochemical level. This contrasts with the large body of work related to the effects of extracellular metal speciation on uptake and bioavailability.[1–6,30]

Accordingly, we develop here a comprehensive formalism that rationalizes the intimate, dynamic interplay between metal uptake at biointerphases and chemodynamics (*i.e.* association/dissociation kinetics) of intracellular metal complexes. At this stage, the theory is developed for a poorly metal-complexing external solution to simplify the analysis of the contributions of intracellular metal complex formation to metal distribution dynamics at biointerphases. This formalism integrates the possible excretion of metals from the intracellular volume and the depletion of metal ions from bulk solution following significant biouptake.[19,23–28] The theory is elaborated in terms of the relevant dimensionless kinetic, thermodynamic and transport parameters pertaining to intracellular, extracellular and interfacial compartments of the microorganisms. The highlights of this work include: (i) the derivation of a relationship between surface and bulk metal concentrations as a function of the rate of intracellular metal complex formation. This allows the identification of situations where demanding intracellular complex formation leads to (extracellular) transport-limited uptake of metal ions, (ii) the identification of the nature of the various (cell concentration-dependent) kinetic regimes governing metal uptake/depletion, and (iii) the rigorous derivation of the metal concentration profile at equilibrium as a function of the stability of intracellular metal complexes. It will be shown in a forthcoming publication that the theory detailed here successfully explains metal uptake/depletion features measured on genetically modified bacterial strains expressing intracellular metal-binding agents. Due to the complexity and the diversity of the endogenous chemical processes that potentially determine intracellular metal speciation,[29] refined formulations of metal chemical kinetics and transport within the microorganism body may be required depending on the nature of the biosystem investigated. Despite the obvious difficulty in grasping in a single formalism all details pertaining to individual intracellular chemical machinery,[31] the basic ideas developed here on the effects of intracellular metal complex chemodynamics on interfacial metal biouptake remain applicable. The current formalism should therefore be viewed as a first step toward the analysis of the metal uptake scenario in cases where dynamics of intracellular metal speciation comes into play.

II. Metal partitioning dynamics at biointerphases: governing equations

1. Setting the stage

We consider a swarm of identical and spherical microorganisms dispersed in an aqueous medium of volume V_T containing metal ions M. Their interfacial structure involves a charged soft surface layer (*e.g.* exopolysaccharides[32,33] or other types of soft surface appendages[34]) of thickness d permeable to ions and water.[35] The radius of the microorganisms is denoted as $r_o = a + d$ with a being the radius of the intracellular compartment (Fig. 1).

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

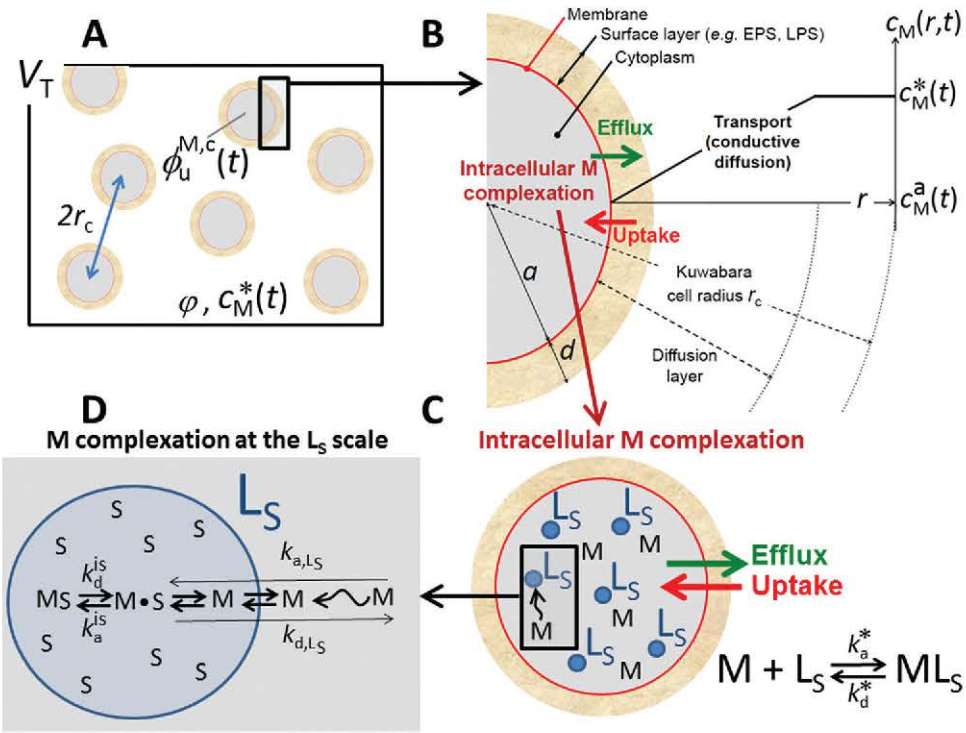


Fig. 1 Schematic multiscale representation of the partitioning of metal ions M in a suspension of metal-assimilating spherical microorganisms (A), at the interphase formed between a single microorganism and the external solution (B), in the microorganism body (C), and at the scale of a single intracellular chelator L_S carrying metal binding sites S (D). The various interfacial processes considered in this work are indicated and the introduced notations are detailed in the text and in the glossary of symbols.

The number density c_p of microorganisms in solution is independent of time t and is related to their volume fraction φ *via* $c_p = \varphi/V_p$ with $V_p = 4\pi r_o^3/3$ being the volume of an individual microorganism. The formalism is therefore applicable for cases where cell growth is insignificant (*e.g.* in minimal media). It is valid over timescales well below the typical timescale of biological growth that may exceed a few hours depending on the microorganism considered and on the quality of the food bioavailable in the medium. At $t = 0$, metal ions (valence z_M) are introduced in solution with bulk concentration $c_M^{*,0}$. In agreement with practical situations,[26,27] the solution further contains an electrolyte (mM concentration range or larger) in large excess compared to M such that M is insignificant for the medium ionic strength. The screening of the electric double layer (EDL) developed at the charged microorganism/solution interphase is then predominantly achieved by background electrolyte ions.[23] In addition, the relaxation of the EDL to equilibrium configuration takes place typically at the μs timescale, *i.e.* much faster than the timescale r_o^2/D_M (~ms) necessary to reach steady-state diffusion of M from the solution to the microorganism surface (with D_M being the diffusion coefficient of M in the medium).[23] These elements legitimate the use of the equilibrium Poisson–Boltzmann theory for the computation of the EDL field that holds at the biointerphase during M uptake. This EDL evaluation is detailed in a previous work,[23] and it requires knowledge of the density of electrostatic charges carried by the membrane and of those distributed in the soft peripheral surface layer. These cell electrostatic properties may be estimated from proper analysis of electrokinetic data following the methodology reported elsewhere.[34,35]

It is convenient to formulate the spatial distribution of microorganisms in solution according to a Kuwabara cell representation.[36] Within the framework of the latter, each individual organism is enveloped by a virtual cell of radius $r_c = r_o\varphi^{-1/3}$ so that the microorganism volume fraction in a Kuwabara unit cell coincides with that in solution.[19,23,24] Due to the accumulation over time of M in the microorganism body (internalisation), the bulk concentration of M at t, denoted as $c_M{}^*(t)$, may differ from $c_M^{*,0}$ as a result of M depletion from bulk solution.[26–28] Steady-state M diffusion is readily achieved for organisms with micrometric dimensions as the corresponding ~ms timescale is much faster than the typical timescales associated with internalisation and depletion of M from bulk solution (~min to h).[19,23–28] It can be further shown that steady-state M transport actually applies under conditions where the volume fraction φ of microorganisms is much lower than unity or, equivalently, $r_o/r_c \ll 1$.[23,28] This condition is systematically verified in *e.g.* studies on metal uptake by planktonic organisms. The adopted radial coordinate r is specified in Fig. 1: the origin is taken at the microorganism centre and the position $r = a$ marks the location of the membrane where the actual internalisation process takes place. The M concentration profile at t in the extracellular phase ($a \le r \le r_c$) is denoted as $c_M(r, t)$. To simplify notations, metal surface concentration $c_M(r = a, t)$ is further

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

written as $c_M^a(t)$ and a glossary of all symbols used in this work is provided at the end of the document to facilitate the reading.

In line with the objectives of this study, metal chelators, hereafter called ligands L_S, are distributed over a volume $V_i \leq 4\pi a^3/3$ within each microorganism body at a number density $c_{L_S} = N_{L_S}/V_i$, where N_{L_S} is the number of L_S in V_i. These intracellular ligands L_S represent biological entities carrying metal binding sites S distributed in the 3D body of L_S (Fig. 1). For the sake of demonstration, the ligands L_S display a spherical geometry, and their radius r_{L_S} may span from molecular to nanoparticulate dimensions. Examples include nucleic acids ($r_{L_S} \sim 1$ nm), metal-storage proteins such as ferritins and metallothioneins ($r_{L_S} \sim 4$–6 nm), metallochaperones or other metal sensor proteins with typical diameters of the order of 10–15 nm or below.[37–39] Obviously, real biological systems contain metal complexing agents in the intracellular liquid phase outside the here-considered (nano)particulate ligands L_S. Accounting for the presence of these additional ligands requires an explicit treatment of the heterogeneity in metal binding entities within the whole cell body (heterogeneity in terms of *e.g.* size or electrostatic properties of L_S, *etc.*). This issue, while definitely important, goes beyond the framework of the current work where, starting from the simple representation displayed in Fig. 1, we demonstrate the basic effects of intracellular metal complexation on metal partitioning dynamics at biointerphases. Once internalised by the microorganisms, metal ions M can interact with metal-binding sites S carried by each ligand L_S to form intracellular metal complexes ML_S according to the volume reaction (Fig. 1)

$$M + L_S \underset{k_d^*}{\overset{k_a^*}{\rightleftharpoons}} ML_S, \tag{1}$$

where k_a^* ($mol^{-1}\ m^3\ s^{-1}$) and k_d^* (s^{-1}) are the effective kinetic constants pertaining to the conversion of free M inside the volume V_i into ML_S complex species, and to the dissociation of ML_S complexes, respectively. As detailed in the next section, k_a^* and k_d^* define the chemodynamic features of intracellular ML_S complexes with account of the confinement of the binding sites S within the volume V_{L_S} of the (soft proteinaceous) ligands L_S. In line with previous work on dynamics of metal speciation in suspensions of soft (nano)particulate ligands,[40–47] the heterogeneous distribution of sites S throughout the intracellular volume V_i leads to k_a^* and k_d^* that may substantially differ from their counterparts relevant in situations where binding sites S are homogeneously distributed all over the volume V_i. The differences originate from the coupling between conductive-diffusion transport of free M within and around L_S and the kinetics of complex formation/dissociation with binding sites S distributed within the (generally charged) ligand volume V_{L_S} (Fig. 1).[40–48] Eqn (1) effectively reflects the intracellular sequestration of metal ions M by the microorganism for a possible subsequent use of the so-transformed M in *e.g.* biocatalysis reactions. The purpose of the following developments is to derive the distribution over time of metal species across the biointerphase from adequate evaluations of M internalisation, excretion and conductive–diffusion fluxes at the microorganism interphase (Fig. 1A and B), all coupled to chemodynamics of intracellular metal complexes ($k_{a,d}^*$). We start with the formulation of the effective $k_{a,d}^*$ kinetic constants as a function of the concentration of binding sites S per ligand L_S accounting for the relevant kinetic and transport processes underlying intracellular association between M and L_S.

2. Chemodynamics of intracellular metal complexes

Fig. 1C and D schematize the stepwise complexation of M with the particulate soft complexant L_S where metal-binding sites S are distributed amidst charged ionogenic groups (not represented in Fig. 1) throughout the 3D body of L_S. The number of binding sites S per particulate complexant L_S is denoted N_S. Following the concepts derived in ref. 45–47 on chemodynamics of (nano)particle–metal complexes in aqueous environments, M complexation can be viewed as a result of the following processes: (i) after internalisation by the microorganism, M is transported to the complexants L_S *via* conductive–diffusion, then incorporated within L_S as a free hydrated ion and rapidly associates with S in the form of an outer-sphere metal complex M·S. (ii) Upon release of a water molecule from the inner hydration shell of M, an inner sphere metal complex, MS, is formed. The rate constants k_{a,L_S} and k_{d,L_S} associated with step (i), and k_a^{is} and k_d^{is} with step (ii) are indicated in Fig. 1D (subscripts 'a' and 'd' denote association and dissociation, respectively). From the coarse-grained approach detailed elsewhere,[40,41] it is shown that the searched k_a^* is defined by

$$k_a^* = k_a^{is}/(1 + k_a^{is}/k_{a,L_S}), \tag{2}$$

where k_{a,L_S} and k_a^{is} (both having $mol^{-1}\ m^3\ s^{-1}$ dimensions) are expressed per mole of sites S carried by an individual particulate ligand L_S according to[47]

$$k_{a,L_S} = 4\pi(r_L + r_M)\left(D_M^{int} + D_{L_S}\right)\bar{f}_{el,L_S}^{int} N_{Av}/N_S \tag{3}$$

and

$$k_a^{is} = k_w V_{os} \bar{f}_{B,L_S}^{int} N_{Av}, \tag{4}$$

where V_{os} is the outer-sphere volume of a single binding site S. Eqn (3) and (4) hold for excess of S over M (with hydrated radius r_M) in the so-called high charge density regime defined by $\kappa_{m,L_S} l_c \ll 1$ with l_c being the typical separation distance between adjacent charges in L_S and $1/\kappa_{m,L_S}$ being the Debye screening length inside the L_S body.[44,48] The counterpart of eqn (3) and (4) for situations where $\kappa_{m,L_S} l_c \gg 1$ (low density regime) and $\kappa_{m,L_S} l_c \sim 1$ (intermediate charge density regime) can be derived along the lines detailed elsewhere.[49] In eqn (3), D_M^{int} is the diffusion coefficient of free M in the volume V_i, D_{L_S} is that of the particulate complexants L_S and N_{Av} is the Avogadro constant. The electric field of L_S acts to accelerate or retard the convergent diffusion of free M to L_S depending on the sign of the density ρ_{o,L_S} of charges carried by L_S.[50] The dimensionless quantity $\bar{f}_{el,L_S}^{int}$ involved in eqn (3) corrects intracellular M diffusion for this conductive effect *via*[50]

$$\bar{f}_{el,L_S}^{int} = 1 \Bigg/ \left(r_{L_S} \int_{r_{L_S}}^{\infty} \xi_{L_S}^{-2} e^{z_M F \psi^{int}(\xi_{L_S})/RT} d\xi_{L_S} \right), \tag{5}$$

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

where ξ_{L_S} is a dummy radial integration variable and constants F, R and T have their usual meaning. $F\psi^{int}/RT$ is the dimensionless potential applied at a given radial position ξ_{L_S} from the centre of ligand L_S (corresponding to $\xi_{L_S} = 0$) and computed on the basis of the non-linear Poisson–Boltzmann equation provided that ρ_{o,L_S} is known (*e.g.* from the reported 3D structure of proteinaceous L_S) together with the screening Debye layer relevant at the L_S scale.[50] Related to this, it is worth mentioning that in the case of bacteria most of the intracellular volume (~70%) is occupied by water. Depending on the tolerance of the microorganism to variations of osmotic pressure in the external environment, the basal osmolarity (~180 mM) in the intracellular volume may vary as a result of *e.g.* swelling processes, recalling that regulation of cytoplasmic composition and hydration (*via* water in- or out fluxes) is a key component of cellular homeostasis.[51] In turn, the distribution of the electrostatic potential $F\psi^{int}/RT$ and the extent of its intracellular screening are functions of the ratio between $|\rho_{o,L_S}|/F$ and the concentration of charged carriers around and within L_S.[23] Even for intracellular salt concentrations above the 100 mM level, $|F\psi^{int}/RT|$ may well exceed several tens of mV due to the confinement of the charges carried by L_S in nano-volume V_{L_S}. Analogy can be drawn with humic acid particles (few nm in radius).[52] In eqn (4), k_w (s^{-1}) corresponds to the rate constant for inner sphere dehydration and depends on the type of M ion considered with tabulated values available in the literature.[53] The smeared-out Boltzmann factor $\bar{f}^{int}_{B,L_S}$ in eqn (4) for accumulation of M in the ligand volume V_{L_S} is provided by[45–47]

$$\bar{f}^{int}_{B,L_S} = r_{L_S}^{-3}\int_{r_{L_S}}^{\infty} \xi_{L_S}^2 e^{-z_M F\psi^{int}(\xi_{L_S})/RT} d\xi_{L_S}/3. \quad (6)$$

In the limit $k_{a,L_S} \gg k_a^{is}$, the effective rate constant $k_a{}^*$ reduces to k_a^{is} (eqn (2)), *i.e.* the overall intracellular complex formation is limited by the inner sphere complex formation step. In the other extreme $k_{a,L_S} \ll k_a^{is}$, we have $k_a{}^* \to k_{a,L_S}$, meaning that intracellular M transport to ligand body L_S is the overall rate-limiting step for association between M and S. In line with the unique ionic reactivity features of soft (nano)particles identified in our previous work,[47] eqn (2)–(6) provide a description of the complex reaction rate $k_a{}^*$ generated by soft intracellular L_S with integration of the relevant Boltzmann accumulation of M and Debye acceleration/retardation of M transport. In particular, $k_a{}^*$ evaluated for L_S with size in the nanodomain and with $\rho_{o,L_S} < 0$ may be several orders of magnitude larger than the ML_S formation kinetic constant evaluated from classical Eigen expression[54] that strictly holds for molecular metal-binding entities.[47] This spectacular result, well confirmed by experimental data,[47] stems from the electrostatically driven increase of M reactant concentration within the L_S body (provided that the accumulation is fast compared to the actual complex formation step). The reader is referred to ref. 47 for further details. At this stage of the analysis, it is stressed that both intracellular chemical kinetics and M transport contributions are involved in the effective kinetic constants $k_{a,d}{}^*$. Despite the obvious difficulty in addressing experimentally the local conditions applicable within the body of L_S and in the intracellular liquid (ion mobility, local electrostatic potential, ionic strength, *etc.*), these conditions greatly affect $k_{a,d}{}^*$ as detailed in *e.g.* ref. 47. The developments below detail the equations that govern M partition dynamics on account of intracellular ML_S chemodynamics formulated above.

3. Expressions of fluxes for M internalisation, excretion and transport – equations for metal conservation and steady-state metal transport conditions

In agreement with experiments,[1,2,10–12,26,27] the uptake of free metal ions M by the microorganisms is assumed to follow a Michaelis–Menten mechanism corresponding to a fast Langmuirian adsorption of M at transporter (or internalisation) single type sites S_u located at the membrane surface, followed by a first-order rate-limiting internalisation step with rate constant k_{int}. Accordingly, the uptake flux $J_u(t)$ is defined by[23–28]

$$J_u(t)/J_u{}^* = c_M^a(t)/(K_M + c_M^a(t)), \quad (7)$$

where the maximum M uptake flux $J_u{}^*$ is given by $J_u{}^* = k_{int}K_HK_M$ with K_M (mol m^{-3}) and K_H (m) representing the reciprocal metal affinity and binding capacity to S_u, respectively. Under the conditions specified in Section II.1, microorganisms are able to expel intracellular free metal ions *via e.g.* dedicated M membrane-efflux pumps.[26–27] The corresponding excretion flux J_e at time t can be written in the expeditious form $J_e(t) = k_e\phi_u^M(t)$, where k_e (s^{-1}) is the excretion kinetic constant and $\phi_u^M(t)$ (mol m^{-2}) is the concentration of free M in the intracellular liquid (outside the complexing entities L_S) at t and is expressed per microorganism unit surface area. It is emphasized that the actual excretion of intracellular free metal ions M is a multistep process. In particular, the excretion is determined by the interplay between the dissociation of intracellular MS complexes (Fig. 1) and the (divergent) diffusion of resulting free M ions from L_S into the inner part of the membrane where the actual excretion step can subsequently take place. In our formulation, the effective kinetics of these processes as a whole is captured by the single constant k_e and, in line with experimental results, the excretion flux is defined by the product between k_e and the free M concentration in the intracellular volume. Deciphering the nature of the process that kinetically limits excretion would consist of comparing *a posteriori* k_e with the kinetic constant pertaining to the transfer of free M from the body of the ligand L to the inner part of the membrane where the M expulsion step is operational. It is further mentioned that excretion may also take place *via* passive diffusion of intracellular free M through the membrane. The reader is referred to ref. 26 for a mathematical formulation of such an excretion process. The quantity $1/k_e$ corresponds here to the transfer timescale of M across the membrane from the intra- to extra-cellular compartment.

The M diffusion flux J_M at the membrane surface can be formulated from the solution of the applicable steady-state Nernst–Planck equations accounting for interfacial cell electrostatics and the differentiated diffusion coefficients of M inside and outside the peripheral surface layer. The latter may indeed act as a barrier that impedes (retards) M transport to S_u.[24]

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

Under such conditions, J_M at a given accumulation time t is given by[23,24]

$$J_M(t) = \bar{f}_{el} D_{M,out}\left(c_M^*(t) - \beta_a^{-1} c_M^a(t)\right)/a, \quad (8)$$

where $D_{M,out}$ is the diffusion coefficient of M outside the soft surface layer and $\beta_a = \exp(-z_M F\psi_a/RT)$ is the Boltzmann factor for the accumulation of M at the membrane surface where the dimensionless potential $F\psi_a/RT$ applies. The dimensionless $\bar{f}_{el}$ in eqn (8) involves the surface layer-mediated retardation of M transport to the membrane and the Debye acceleration of the diffusion of positively charged M as a result of the equilibrium EDL field at the interphase between solution and negatively charged microorganisms ($\rho_o < 0$ with ρ_o being the density of charges carried by the peripheral soft surface layer of the microorganism).[50] After arrangements, $\bar{f}_{el}$ is provided by[23]

$$\bar{f}_{el} = \varepsilon\left(aF_{a,r_o}F_{r_o,r_c}\right)^{-1} \Big/ \left(\varepsilon F_{a,r_o}^{-1} + F_{r_o,r_c}^{-1}\right), \quad (9)$$

where F_{r_1,r_2} is an integral function of the dummy spatial coordinates r_1 and r_2 according to $F_{r_1,r_2} = \int_{r_1}^{r_2} \xi^{-2}\beta_\xi^{-1}\mathrm{d}\xi$ with ξ being a dummy radial integration variable and $\beta_r = \exp(-z_M F\psi(r)/RT)$ being the Boltzmann factor applied at the position r with corresponding potential $F\psi(r)/RT$ computed as detailed in ref. 23. The quantity $\varepsilon \equiv D_{M,in}/D_{M,out} \leq 1$ in eqn (9) is defined as the ratio between M diffusion coefficients inside and outside the peripheral soft microbial layer of thickness d.

For steady-state metal transport conditions to apply (Section II.1), the conductive diffusion flux J_M of metal ions from bulk solution to the membrane surface must equate, at any time t during biouptake, the difference between internalisation and excretion fluxes

$$J_M(t) = J_u(t) - k_e\phi_u^M(t). \quad (10)$$

where $J_u(t)$ is defined by eqn (7). The time derivative of the internalised free M concentration ϕ_u^M simply corresponds to the uptake flux $J_u(t)$ corrected for the rate of conversion of intracellular free M due to excretion and intracellular complexation

$$\mathrm{d}\phi_u^M(t)/\mathrm{d}t = J_u(t) - k_e\phi_u^M(t) - k_a^*\rho_S^{V_i}\phi_u^M(t) + k_d^*\phi_u^c(t), \quad (11)$$

where $k_{a,d}^*$ was defined in the preceding section, $\phi_u^c(t)$ (mol m^{-2}) is the concentration of intracellular metal complexes per unit of microorganism surface area, and $\rho_S^{V_i} = c_{L_S}N_S/N_{Av}$ is the molar concentration of binding sites S smeared-out over the volume V_i. The counterpart of eqn (11) for the association/dissociation of metal complexes in the intracellular volume V_i is

$$\mathrm{d}\phi_u^c(t)/\mathrm{d}t = k_a^*\rho_S^{V_i}\phi_u^M(t) - k_d^*\phi_u^c(t). \quad (12)$$

At any t, the depletion level of metal ions in bulk solution is determined by the amount of M adsorbed on the total biosurface developed in solution (with area $4\pi a^2 V_T\varphi/V_p$) and by the total amounts of accumulated and excreted metal species. In the following, it is assumed that M biosorption is much faster than internalisation, which is justified in practice for *e.g.* bacteria.[26,28] Accordingly, after correcting the initial M concentration $c_M^{*,0}$ for the amount of adsorbed M (which includes the sorption on the membrane and in the extracellular layer supported by the membrane),[26] metal mass balance condition may be written within the framework of the Kuwabara representation in the form

$$\int_a^{r_c} \xi^2[c_M(\xi,t) - c_M(\xi,0)]\mathrm{d}\xi = -a^2\int_0^t \left[J_u(\nu) - k_e\phi_u^M(\nu)\right]\mathrm{d}\nu, \quad (13)$$

where ν is a dummy temporal integration variable. The concentration profile $c_M(r,t)$ involved in eqn (13) is defined at any r and t from the solution of the Nernst–Planck equations used for deriving eqn (8), namely[23]

$$c_M(a \leq r \leq r_o,t) = \beta_r c_M^*(t)F_{a,r}\bar{f}_{el}a/\varepsilon + \beta_r c_M^a(t)(1 - F_{a,r}\bar{f}_{el}a/\varepsilon)/\beta_a \quad (14)$$

$$c_M(r_o \leq r \leq r_c,t) = \beta_r c_M^*(t)\left[1 - \left(1 - F_{a,r_o}\bar{f}_{el}a/\varepsilon\right)\frac{F_{r,r_c}}{F_{r_o,r_c}}\right] + \frac{\beta_r}{\beta_a}c_M^a(t)\left(1 - F_{a,r_o}\bar{f}_{el}a/\varepsilon\right)\frac{F_{r,r_c}}{F_{r_o,r_c}}, \quad (15)$$

where the functions F_{r_1,r_2} are defined below eqn (9).

The set of eqn (7)–(15) defines the time-dependent distribution of metal ions in solution, at the microorganism/solution interphase and in the intracellular volume, written in terms of the bulk, surface and intracellular free and complexed M concentrations at t ($c_M^*(t)$, $c_M^a(t)$, ϕ_u^M and ϕ_u^c, respectively). It is stressed that the formulation provides a way to account for the inherent multiscale nature of the problem: intracellular M complexation takes place at the scale of a binding (molecular) site S (Fig. 1D) carried by a charged (nano)particulate complexant L_S distributed within a micro-organism (Fig. 1C) forming an interphase with an external solution (Fig. 1B) containing metal ions M and microorganisms present at volume fraction φ (Fig. 1A). The upscaling from molecular complexation of M with S to the (nano)colloidal size relevant for L_S is performed by means of a coarse-grained approach leading to eqn (2)–(4) (see ref. 40 and 41 for further details). The transition from the interfacial scale pertaining to uptake processes relevant at the single microorganism level to the mesoscopic dimension associated with the ensemble of microorganisms is performed on the basis of the Kuwabara representation. In the next section, the differential equations governing M biopartition dynamics are elaborated from eqn (7)–(15) with identification of the dimensionless physical parameters that control M biouptake/depletion kinetics.

4. Coupled differential equations for the time-dependent distribution of M at the biointerphase

Using the metal concentration profiles defined by eqn (14) and (15), we obtain

$$\int_a^{r_c} \xi^2 c_M(\xi,t)\mathrm{d}\xi = -a^2 J_u^*\left(\Omega_1 c_M^*(t) + 2\beta_a^{-1}\Omega_2 c_M^a(t)\right), \quad (16)$$

where coefficients $\Omega_1(<0)$ and $\Omega_2(<0)$ depend on a, d, φ, ε, J_u^* and the potential distribution $\psi(r)$ according to the expressions

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

detailed in ref. 23 (eqn (31) and (32) therein). Eqn (11) further leads to the following expression for $\phi_u^M(t)$

$$\phi_u^M(t) = e^{-k_e(1+\lambda)t}\left\{\phi_u^{M,0} + \int_0^t \left[J_u(\nu) + k_d{}^*\phi_u^T(\nu)\right]e^{k_e(1+\lambda)\nu}d\nu\right\}, \tag{17}$$

with $\phi_u^{M,0} = \phi_u^M(0)$ being the initial concentration of intracellular free M, and $\phi_u^T(t) = \phi_u^M(t) + \phi_u^c(t)$ the total concentration of intracellular metal species (free and complexed) at t. In eqn (17), the dimensionless parameter λ basically compares the kinetic constant for ML_S formation to that relevant for M excretion

$$\lambda = k_a{}^*\rho_S^{V_i}\left(1 + \bar{K}^{*-1}\right)\Big/k_e, \tag{18}$$

where the dimensionless stability $\bar{K}^*$ of the intracellular metal complex is $\bar{K}^* = k_a{}^*\rho_S^{V_i}\Big/k_d{}^*$. In the following, we denote as $\bar{\phi}_u^{T,M,c} = k_e\phi_u^{T,M,c}/J_u{}^*$ the dimensionless concentrations of intracellular M and ML_S (superscript 'T'), free M (superscript 'M') and ML_S (superscript 'c'), respectively. After the lengthy algebraic developments detailed in the ESI† (part I.1 therein), the combination of eqn (10), (11), (13), (16) and (17) leads to a non-linear 2nd order differential equation in terms of the time-dependent function $\Sigma(t) = \int_0^t (J_u(\nu)/J_u{}^*)d\nu$ (in s). The latter corresponds to the zero-order moment of the dimensionless uptake flux $J_u(t)/J_u{}^*$ and physically stands for the cumulative amount of internalised free M at t. The final result readswhere $\Phi^T(t) = \int_0^t \bar{\phi}_u^T(\nu)d\nu$ (in s) refers to the amount of free and complexed metal species accumulated in the microorganism body between $t = 0$ and t, Σ_{tt} is the second derivative of $\Sigma(t)$ with respect to t while Σ_t and Φ_t^T are first-order time derivatives of $\Sigma(t)$ and $\Phi^T(t)$, respectively. The time constant $-\tau_o$ (>0) in eqn (19) depends on initial conditions according to the dimensionless form

$$\Sigma_{tt} = \frac{(1-\Sigma_t)^2\left[k_e(\tau_o + \lambda\Sigma(t)) - k_d{}^*\left[\Phi^T(t) - \Phi_t^T\Delta\tau\right]\right] + \Sigma_t(1-\Sigma_t)\left[(1-\Sigma_t)(1-\lambda k_e\Delta\tau) + k_e\tau_L(1+\lambda)\right]}{\Delta\tau(1-\Sigma_t)^2 - \tau_L}, \tag{19}$$

$$k_e\tau_o = k_e(1+\lambda)\left(\Omega_1 c_M^{*,0} + 2\beta_a{}^{-1}\Omega_2 c_M^{a,0}\right) - \bar{\phi}_u^{M,0}, \tag{20}$$

with $\bar{\phi}_u^{M,0} = k_e\phi_u^{M,0}/J_u{}^*$ and $c_M^{a,0} = c_M^a(0)$. Using eqn (16), eqn (20) can be rewritten in the form $S_aJ_u{}^*\left((-\tau_o) - \bar{\phi}_u^{M,0}\Big/k_e\right)\Big/(1+\lambda) = 4\pi\int_a^{r_c}\xi^2 c_M(\xi,0)d\xi$, where $S_a = 4\pi a^2$ is the active surface area of an individual microorganism. The latter formulation indicates that $-\tau_o/(1+\lambda)$ is the time needed by a microorganism to internalise all M present at $t = 0$ in the external medium under the hypothetical condition $J_u = J_u{}^*$ and $\phi_u^{M,0} = 0$. The quantity $\Delta\tau$ in eqn (19) is defined by the difference between the characteristic timescale τ_L for M transfer through the membrane (M transfer from the membrane surface facing the external medium to the intracellular volume), and the timescale τ_E for transfer of M from bulk solution to the intracellular compartment in the form of free M.[23,24] As demonstrated earlier,[23,24] τ_L and τ_E are relevant at the scale of the suspension of charged microorganisms and thus depend on the volume fraction φ or, equivalently, on the Kuwabara radius r_c, according to

$$\tau_L = 4\pi R_S\int_a^{r_c}\xi^2\beta_\xi d\xi\Big/S_a, \tag{21}$$

and

$$\tau_E = \tau_L - J_u{}^*\Omega_1 R_T, \tag{22}$$

where $R_S = 1/(k_{int}K_H\beta_a)$ (in m^{-1} s) denotes the membrane transfer resistance reflecting the ability of M to cross the membrane barrier of a microorganism, and $R_T = 1/(D_{M,out}\bar{f}_{el}a^{-1})$ (in m^{-1} s) corresponds to the propensity of the extracellular compartment (including the soft surface layer) to impede or accelerate diffusion of M from the solution to the membrane surface.[23,24] Explicit expressions for τ_E ($\geq\tau_L$ as $\Omega_1 < 0$) and τ_L as a function of a, d, $\varphi(\ll 1)$, ε and K_Hk_{int} are given elsewhere[23] for situations where the Donnan electrostatic condition applies in the soft surface layer. This condition holds provided that the inequality $\kappa_m d \gg 1$ is verified with $\kappa_m{}^{-1} = \kappa^{-1}[\cosh(F\psi_D/RT)]^{-1/2}$ being the Debye layer thickness in the soft surface layer, κ^{-1} the Debye layer thickness at the solution side of the biointerphase, and $\psi_D = (RT/zF)\sinh^{-1}(\rho_o/2zFc^\infty)$ the expression of the Donnan potential valid for a z:z symmetrical background electrolyte with bulk concentration c^∞.[55] The steady-state diffusion layer thickness $\delta \sim r_o$ for organisms with micrometric dimensions is always much larger than the Debye layer thickness κ^{-1} (tens of nanometers at most). Accordingly, at the scale of the diffusion process it is actually sufficient to approximate the interfacial potential distribution $\psi(r)$ in the form $\psi(a \leq r \leq r_o) \equiv \langle\psi\rangle$ and $\psi(r_o \leq r \leq r_c) = 0$ with $\langle\psi\rangle$ being the mean potential across the soft surface layer that identifies with ψ_D for $\kappa_m d \gg 1$. Given this element, τ_L (eqn (21)) can be rewritten in the tractable (dimensionless) form (ESI,† part I.2)

$$k_e\tau_L = \varphi^*(\varphi^{-1} + \bar{V}), \tag{23}$$

where $\bar{V}$ is the dimensionless volume β_aV_{soft}/V_p, with V_{soft} being the volume of the soft peripheral surface layer, and φ^* is the ratio between the resistance R_S and the resistance $R_e = S_a/(k_eV_p)$ (m^{-1} s) of an individual microorganism to excrete internalised free M. $k_e\tau_L$ corresponds to the equilibrium partitioning coefficient of free metal forms between the bulk solution and the intracellular compartment in the absence of intracellular ML formation.[24] Using eqn (23), it is shown that τ_E follows from τ_L according to (ESI,† part I.2)

$$\tau_E/\tau_L = 1 + \zeta Bn^{-1}/(1 + \bar{V}\varphi), \tag{24}$$

where $Bn^{-1} = R_T/R_S$ is the inverse of the Bosma (or bioavailability) number[23,24] and we introduced $\zeta = \bar{f}_{el}[(\varepsilon\beta_a)^{-1}(1 - a/r_o) + a(1 - 3\varphi^{1/3}/2)/r_o]$ with $\bar{f}_{el}$ defined by eqn (9) which reduces here to the expression detailed in the ESI† (part I.2). Under the conditions of dilute suspensions examined here (see Section II.1),

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

it can be shown that ζ is always close to unity and hardly depends on $\varphi(\ll 1)$. The limit $\mathrm{Bn}^{-1} \to 0$ (or, equivalently $\tau_E/\tau_L \to 1$) applies to uptake scenarios in line with the applicability of the thermodynamic BLM framework, *i.e.* metal transport is much faster than M internalisation ($R_T \ll R_S$).

After adding eqn (11) and (12), we obtain the second-order differential equation verified by $\Phi^T(t)$

$$\Phi^T_{tt} = k_e[\Sigma_t - \Phi^T_t + \bar{\phi}^c_u(t)], \tag{25}$$

where Φ^T_{tt} is the second derivative of $\Phi^T(t)$ with respect to t. Rearrangements of eqn (12) in terms of $\bar{\phi}^c_u(t)$ and $\Phi^T(t)$ further provide

$$\frac{d\bar{\phi}^c_u(t)}{dt} = k_e\lambda\left[\frac{\Phi^T_t}{1+\bar{K}^{*-1}} - \bar{\phi}^c_u(t)\right]. \tag{26}$$

After time-derivation of the steady-state M transport condition given by eqn (10), substitution therein of the derivative $d\phi^M_u(t)/dt$ defined by eqn (11), we obtain after rearrangements the first-order differential equation satisfied by the dimensionless bulk metal concentration $\bar{c}_M{}^*(t) = c_M{}^*(t)/c^{*,0}_M$ (ESI,† part I.1)

$$\frac{d\bar{c}_M{}^*(t)}{dt} = -k_e(1+\lambda)\bar{c}_M{}^*(t) + \left\{\Sigma_{tt}\left(\mathrm{Bn}^{-1} + \frac{1}{(1-\Sigma_t)^2}\right) + k_e\Sigma_t\left(\lambda\mathrm{Bn}^{-1} + \frac{1+\lambda}{1-\Sigma_t}\right) - \mathrm{Bn}^{-1}k_d{}^*\Phi^T_t\right\}\Big/x_o, \tag{27}$$

with $x_o = [K_M/(\beta_a c^{*,0}_M)]^{-1}$ reflecting the dimensionless M affinity to surface internalisation sites.[23]

The non-linear set of highly coupled differential eqn (19), (25)–(27) consistently determines the time-dependent concentrations $\bar{c}_M{}^*(t)$ and $\bar{\phi}^c_u(t)$, the cumulative uptake flux $\Sigma(t)$ and the cumulative total concentration $\Phi^T(t)$ of intracellular metal species. Partitioning dynamics of M at the biointerphase was thus evaluated by numerically solving eqn (19), (25)–(27) on the basis of a collocation algorithm for solution approximation at Gaussian points with an adaptive mesh in the time dimension.[56] The initial boundary conditions required for that purpose are $\bar{c}_M{}^*(0) = 1$, $\Sigma(0) = \Phi^T(0) = 0$, $\bar{\phi}^c_u(0) = \bar{\phi}^{c,0}_u$, $\Phi^T_t(0) = \bar{\phi}^T_u(0) = \bar{\phi}^{T,0}_u$ and $\Sigma_t(0) = c^{a,0}_M/(K_M + c^{a,0}_M)$ with $c^{a,0}_M$ defined by[24]

$$c^{a,0}_M\Big/\left(\beta_a c^{*,0}_M\right) = \left\{1 - \frac{1+\mathrm{Bn}^{-1}\left(1-\bar{\phi}^{M,0}_u\right)}{x_o} + \left\{\left[\frac{1+\mathrm{Bn}^{-1}\left(1-\bar{\phi}^{M,0}_u\right)}{x_o} - 1\right]^2 + \frac{4}{x_o}\left(1+\frac{\mathrm{Bn}^{-1}\bar{\phi}^{M,0}_u}{x_o}\right)\right\}^{1/2}\right\}\Big/2, \tag{28}$$

which corresponds to the surface concentration $c^{a,0}_M$ satisfying eqn (7), (8) and (10) at $t = 0$. Eqn (28) identifies with the original expression by Best[7] later corrected by Duval *et al.*[24] for cell surface electrostatics, for excretion and for differentiated M diffusion inside and outside the peripheral surface layer, and rewritten here in terms of x_o and Bn^{-1}. Once the solution of eqn (19), (25)–(27) is obtained, the internalisation–excretion fluxes and the M concentration at the membrane surface can be simply evaluated from $J_u(t)/J_u{}^* = \Sigma_t$, $J_e(t)/J_u{}^* = \Phi^T_t - \bar{\phi}^c_u(t)$, $c^a_M(t)/K_M = \Sigma_t/(1-\Sigma_t)$ and the transport flux $J_M(t)$ from eqn (8). We systematically ascertained the robustness of the adopted algorithm upon successful comparison of the numerical results obtained in the limit $\lambda \to 0$ with those detailed elsewhere[24] for cases where ML_S formation is infinitely slow compared to excretion. Whereas the general forms of eqn (19), (25)–(27) cannot be solved analytically, closed-form solutions can be derived (i) in the equilibrium regime reached at a sufficiently long time, and (ii) in the limit of strong intracellular ML_S complexes ($\bar{K}^* \gg 1$) and strong or weak affinity of M for the internalisation sites S_u. These solutions were used to further check the correct convergence of the numerics, and their physical implications are discussed in the next two sections.

5. Metal partitioning at the biointerphase in the equilibrium regime

In the equilibrium regime reached at $t \to \infty$, the time-derivatives of the internalisation flux, and of the metal concentrations in bulk solution and in the microorganism body are zero, *i.e.* $\Sigma_{tt} = 0$, $d\bar{c}_M{}^*(t)/dt = 0$, $d\bar{\phi}^c_u(t)/dt = 0$ and $\Phi^T_{tt} = 0$. The combination of eqn (25)–(27) then leads to the Boltzmann relationship $c^{a,\infty}_M = \beta_a c^{*,\infty}_M$ between surface and bulk concentrations of M with $c^{a,\infty}_M = c^a_M(\infty)$ and $c^{*,\infty}_M = c_M{}^*(\infty)$ (ESI,† part II.1). This legitimates the applicability of the (thermodynamic) BLM formalism at $t \to \infty$. With the help of eqn (10)–(12) and (19), it can be further demonstrated that $c^{*,\infty}_M$ is rigorously determined by the expression (ESI,† part II.1)

$$c^{*,\infty}_M\Big/c^{*,0}_M = \frac{1}{2x_o}\left\{-\left(1+\frac{\mu_o}{\tau_L}+\frac{1+\bar{K}^*}{k_e\tau_L}\right)+\frac{1+\bar{K}^*}{k_e\tau_L}\left\{1+\frac{2k_e\tau_L}{1+\bar{K}^*}\left(1+\frac{\mu_o}{\tau_L}\right) + \left[\frac{k_e\tau_L}{1+\bar{K}^*}\left(1-\frac{\mu_o}{\tau_L}\right)\right]^2\right\}^{1/2}\right\}, \tag{29}$$

where $k_e\tau_L$ depends on φ, microorganism geometry, interfacial cell electrostatics and on resistances R_e and R_S *via* eqn (23), and the time constant $-\mu_o = -(1+\lambda)^{-1}\tau_o + [\lambda(1+\lambda)^{-1}\bar{\phi}^{M,0}_u + \bar{\phi}^{c,0}_u]/k_e\ (>0)$ can be written in terms of the initial boundary conditions $c^{a,0}_M$, $c^{*,0}_M$ and $\bar{\phi}^{T,0}_u$ according to (ESI,† part II.1)

$$k_e\mu_o = k_e\tau_L[(1-\tau_E/\tau_L)\Delta\bar{c}_o x_o B_n - c^{a,0}_M/K_M] - \bar{\phi}^{T,0}_u, \tag{30}$$

where we defined $\Delta\bar{c}_0 = 1 - c^{a,0}_M\Big/\left(\beta_a c^{*,0}_M\right)$ with $c^{a,0}_M$ given by eqn (28). It is underlined that μ_o depends on the geometric and electrostatic properties of the microorganisms and on the cell volume fraction, which is transparent upon modifying eqn (30) with the use of eqn (24) in the form $k_e\mu_o = -k_e\tau_L[\Delta\bar{c}_o x_o\zeta/(1+\bar{V}\varphi) + c^{a,0}_M/K_M] - \bar{\phi}^{T,0}_u$, where ζ was defined below eqn (24). The physical meaning of the time constant $-\mu_o$ is the same as that of $-\tau_o/(1+\lambda)$ upon replacing $\bar{\phi}^{M,0}_u$ by $\bar{\phi}^{T,0}_u$. Eqn (11) and (12) considered at $t \to \infty$ further provide

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

$\bar{\phi}_u^c(\infty)/\bar{\phi}_u^M(\infty) = \bar{K}^*$ and $\overline{\phi}_u^T(\infty) = (1+\overline{K}^*)\beta_a c_M^{*,\infty}/(K_M + \beta_a c_M^{*,\infty})$, where $c_M^{*,\infty}$ is defined by eqn (29) above. Eqn (29) does not involve the timescale τ_E (eqn (24)) because the mass transfer resistance R_T goes to 0 under equilibrium conditions where the limits Bn^{-1} ($=R_T/R_S$) $\to 0$ and $\tau_E \to \tau_L$ become systematically applicable. In the extreme where there is no ML_S complex formation ($\bar{K}^* = 0$), it is verified that eqn (29) correctly merges with the expression derived in ref. 24. As demonstrated in the ESI† (part II.2), the ratio $(1+\bar{K}^*)/(k_e\tau_L)$ in eqn (29) physically corresponds to the dimensionless thermodynamic constant associated with the equilibrium reaction between metal ions present in solution at concentration $c_M^{*,\infty}$ and metal species (free and complexed) accumulated at $t \to \infty$ in the overall volume occupied by the microorganisms. Eqn (29) shows that the M depletion level from bulk solution is fully parameterized at equilibrium by the dimensionless $\bar{K}^*$, $k_e\tau_L$, $k_e\mu_o$ and x_o. It is further independent of the parameter λ (eqn (18)) that dictates the dynamics of M partitioning at the biointerphase prior to establishment of the equilibrium regime, as detailed later. In order to capture the impact of intracellular complexation on $c_M^{*,\infty}$, we display in Fig. 2A the formal dependence of the ratio $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ on $\bar{K}^*$, with $c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ being the bulk concentration of M achieved at $t \to \infty$ in the absence of ML_S formation (see the ESI,† part II.1 for the derivation of the expression of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$). For the sake of normalisation, the abscissa axis in Fig. 2A is reported in the form $\bar{K}^*/\bar{K}_{1/2}^*$, where $\bar{K}_{1/2}^*$ is the value taken by $\bar{K}^*$ such that $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0) = 1/2$, *i.e.* (ESI,† part II.1)

Fig. 2A shows that under equilibrium conditions, M depletion in bulk solution is more pronounced upon increasing the intracellular complex stability. In the limit $\bar{K}^* \gg 1$, metal depletion is necessarily maximum, *i.e.* $c_M^{*,\infty}(\overline{K}^* \gg 1)/c_M^{*,\infty}(\overline{K}^* = 0) \to 0$ (see further demonstration of this result in the ESI,† part II.3 therein). The asymptotic dependencies of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ on $\bar{K}^*$ in the regimes of weak and strong ML_S complexes ($\bar{K}^* \ll 1$ and $\bar{K}^* \gg 1$, respectively) are indicated by curves (a) and (b) in Fig. 2A, respectively. For the sake of completeness, the Taylor expressions of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ corresponding to these extremes in the ML_S stability spectrum are provided in the ESI† (part II.4, Table S1). At sufficiently low $k_e\tau_L$ compared to unity, *i.e.* for microorganisms whose excretion is much slower than M membrane transfer, weak ML_S complexes suffice to achieve a two-fold reduction in $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ (Fig. 2B). Under such conditions, the internalisation process is so efficient compared to excretion that the transfer of free M from extra- to intracellular compartments and therewith bulk M depletion are basically unaffected by the strength of the interaction between M and intracellular ligand L_S. The corresponding $\bar{K}_{1/2}^*$ then becomes independent of $k_e\tau_L$, and in the limit $k_e\tau_L \to 0$ we obtain $\bar{K}_{1/2}^* = 1 + k_e\mu_o$ for $-1 < k_e\mu_o < 0$ and $\bar{K}_{1/2}^* = -(1+k_e\mu_o)/2$ if the inequality $k_e\mu_o < -1$ is satisfied (Fig. 2B). In the context of bioremediation of metal ions from aqueous environments, the limit $k_e\tau_L \ll 1$ applies to microorganisms with efflux-pumps that do not significantly impede the desired removal of M. With increasing $k_e\tau_L$, efflux becomes more operational and thus

$$\bar{K}_{1/2}^* = \begin{cases} 3\sqrt{k_e\tau_L(1+k_e\tau_L)}/2 & \text{if } \mu_o = -(\tau_L + 1/k_e) \\ \dfrac{3k_e^2\tau_L\mu_o}{[1+k_e\tau_L(1+\mu_o/\tau_L)]\left\{1+\sigma\sqrt{1-\dfrac{4k_e^2\tau_L\mu_o}{[1+k_e\tau_L(1+\mu_o/\tau_L)]^2}}\right\}} - \dfrac{1+k_e\tau_L(1+\mu_o/\tau_L)}{2} & \text{otherwise,} \end{cases} \quad (31a,b)$$

where $\sigma = \mp 1$ for $1 + k_e\tau_L(1+\mu_o/\tau_L) \gtrless 0$.

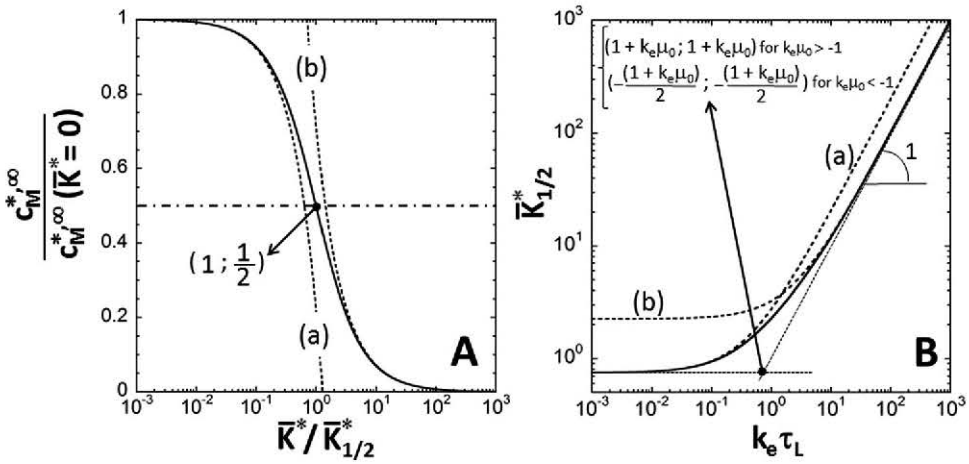


Fig. 2 (A) Formal dependence of the ratio $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ on $\bar{K}^*/\bar{K}_{1/2}^*$. Simulations are given for $k_e\mu_o = -5/2$ and $k_e\tau_L = 2$ (solid line). (B) Formal dependence of $\bar{K}_{1/2}^*$ on $k_e\tau_L$. Simulations are provided for $k_e\mu_o = -5/2$ (solid line). In panel (A), dotted curves (a) and (b) correspond to the asymptotic behaviour of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ at $\bar{K}^* \ll 1$ and $\bar{K}^* \gg 1$, respectively. In panel (B), dotted curves (a) and (b) are the asymptotic limits of $\bar{K}_{1/2}^*$ at $k_e\tau_L \ll 1$ and $k_e\tau_L \gg 1$, respectively. The general theoretical expressions of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0)$ and $\bar{K}^*/\bar{K}_{1/2}^*$ in these extremes are detailed in the ESI† (part II.4, Table S1). The arrows in (A) and (B) indicate the coordinates of the point marking approximately the transition between extremes (A) $\bar{K}^* \ll 1$ and $\bar{K}^* \gg 1$, and (B) $k_e\tau_L \ll 1$ and $k_e\tau_L \gg 1$.

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

reduces the propensity of the microorganism to deplete efficiently M from bulk solution. The stability of the intracellular complexes should accordingly increase in order to achieve significant depletion, which is reflected by the monotonous increase of $\bar{K}_{1/2}{}^{\star}$ with $k_e\tau_L$ (Fig. 2B). The variations of $\bar{K}_{1/2}{}^{\star}$ with $k_e\tau_L$ in scenarios where efflux is efficiently bypassed or not by internalisation ($k_e\tau_L \ll 1$ and $k_e\tau_L \gg 1$, respectively) are given by curves (a) and (b) in Fig. 2B and the corresponding defining expressions are detailed in Table S1 (ESI,† part II.4). In line with the above elements, the symmetry of the sigmoid-like dependence of $c_M^{\star,\infty}/c_M^{\star,\infty}(\bar{K}^{\star} = 0)$ on $\bar{K}^{\star}/\bar{K}_{1/2}{}^{\star}$ with respect to the point of coordinates (1; 1/2) in Fig. 2A depends on $k_e\tau_L$ and $k_e\mu_o$, which is further illustrated in Fig. S1 (ESI,† part II.5).

6. Dynamics of M partitioning at the biointerphase for strong intracellular ML_S complexes ($\bar{K}^{\star} \gg 1$) in the limit of strong (i) or weak (ii) affinity of M for the internalisation sites S_u

Irrespective of the affinity of M for the internalisation sites S_u, a general relationship between M concentrations at the microorganism surface and in bulk solution can be derived from eqn (27) for strong ML_S complexes ($\bar{K}^{\star} \gg 1$). The final result reads as (the details are given in the ESI,† part III.1)

$$c_M{}^{*}(t)\Big/c_M^{*,0} = x_o{}^{-1}\mathrm{Bn}^{-1}\left(1-\bar{\phi}_u^{M,0}\right)e^{-k_e(1+\lambda)t} + x_o{}^{-1}\left\{\frac{c_M^a(t)}{K_M} - \mathrm{Bn}^{-1}\left[\frac{1}{1+\frac{c_M^a(t)}{K_M}} - k_e(1+\lambda)e^{-k_e(1+\lambda)t}\int_0^t \frac{e^{k_e(1+\lambda)\nu}}{1+\frac{c_M^a(\nu)}{K_M}}\left(1+\frac{\lambda}{1+\lambda}\frac{c_M^a(\nu)}{K_M}\right)d\nu\right]\right\}, \tag{32}$$

which extends the expression by Duval *et al.*[24] derived in the specific case $\lambda = 0$. Further setting $k_e = 0$ (absence of excretion), $\beta_a = 1$ (complete screening of cell electrostatics) and $\varepsilon = 1$ (no retardation of M transport through the soft microbial surface layer), eqn (32) then satisfactorily reduces to the famous equation obtained by Best,[7] as detailed elsewhere.[24]

(i) In the limit of strong affinity of M for the S_u sites, the uptake flux $J_u(t)$ saturates at the maximum value $J_u{}^{\star}$, which is achieved for $K_M \ll c_M^a(t)$ (eqn (7)). In addition, for the here-considered case of strong ML_S complexes ($\bar{K}^{\star} \gg 1$) the ML_S dissociation term in eqn (11) and (12) is insignificant compared to the kinetic term pertaining to ML_S formation. After simplifying eqn (7)–(15) and (32) in these limits, it is shown that $c_M^a(t)$ and $c_M{}^{*}(t)$ are explicitly defined by (the details are given in the ESI,† part III.2)

$$c_M^a(t)/K_M = \left[\frac{c_M^{a,0}}{K_M} + \frac{1+k_e(1+\lambda)(\tau_o-\lambda\Delta\tau)}{k_e\tau_L(1+\lambda)^2}\right]e^{-k_e(1+\lambda)t} - \frac{1+k_e(1+\lambda)[\tau_o+\lambda(t-\Delta\tau)]}{k_e\tau_L(1+\lambda)^2} \tag{33}$$

and

$$\beta_a c_M{}^{*}(t)/K_M = c_M^a(t)/K_M + \frac{\lambda}{1+\lambda}\mathrm{Bn}^{-1}\left(1-e^{-k_e(1+\lambda)t}\right), \tag{34}$$

with $c_M^{a,0} = \beta_a c_M^{\star,0}$. For microorganisms that do not develop strategies for excreting metal ions (*i.e.* $k_e \to 0$), it can be verified that $c_M^a(t) \to c_M^{a,0} - (1+\lambda)^{-1}K_M t/\tau_L$ and $c_M{}^{*}(t) = \beta_a{}^{-1}c_M^a(t)$. In the extreme where excretion is much faster than intracellular complexation ($\lambda \to 0$), eqn (33) and (34) satisfactorily reduce to the results detailed in ref. 24 in the limit $K_M \ll c_M^a(t)$. In particular, the Boltzmann relationship $c_M{}^{*}(t) = \beta_a{}^{-1}c_M^a(t)$ (or, equivalently, $J_M(t) = 0$) applies at any t for $\lambda \to 0$ (eqn (34)), which demonstrates the systematic validity of the thermodynamic BLM framework in situations where $\bar{K}^{\star} \gg 1$, $K_M \ll c_M^a(t)$ and intracellular complexation kinetics is sluggish compared to excretion. For cases where $\lambda \neq 0$, the second term in the right hand side of eqn (34) now depends on $\mathrm{Bn}^{-1} = R_T/R_S$, meaning that deviations from the thermodynamic BLM scenario can be envisaged if $\lambda\mathrm{Bn}^{-1}/(1+\lambda)$ is significantly large compared to $c_M^a(t)/K_M$, or more restrictively to $x_o = \beta_a c_M^{\star,0}/K_M$ recalling that $c_M^a(t)/K_M \leq x_o$. Quantitatively, the transport flux expression $J_M(t)/J_u{}^{\star} = \lambda(1+\lambda)^{-1}(1-e^{-k_e(1+\lambda)t})$ is easily obtained from eqn (8) and (34) and reduces to $J_M(t)/J_u{}^{\star} \approx (1-e^{-k_e(1+\lambda)t})$ for $\lambda \gg 1$. The behavior of eqn (34) at $t \to \infty$ for $\lambda \neq 0$ does not match the rigorous limit $c_M^{a,\infty} = \beta_a c_M^{\star,\infty}$ identified in Section II.5. The reason for this apparent inconsistency originates from the fact that the inequality $K_M \ll c_M^a(t)$ defining the range of M surface concentrations where eqn (34) is valid becomes necessarily violated at $t \to \infty$ and $\lambda \neq 0$ having in mind that the equality $c_M^{a,\infty} = c_M^{\star,\infty} = 0$ systematically holds for $\bar{K}^{\star} \gg 1$ (see Section II.5, Fig. 2A and ESI,† part II.3). Eqn (34) is therefore physically meaningful at sufficiently short t when $K_M \ll c_M^a(t)$ is still satisfied. As a last remark, eqn (33) and (34) show that for $K_M \ll c_M^a(t)$ M bulk depletion kinetics is defined by a single characteristic timescale $k_e{}^{-1}/(1+\lambda) = 1\Big/\left(k_e + k_a{}^{*}\rho_S^{V_i}\right)$, where λ defined by eqn (18) reduces to $\lambda = k_a{}^{*}\rho_S^{V_i}\Big/k_e$ for $\bar{K}^{\star} \gg 1$. This timescale simply reflects how depletion kinetics is impacted by the competition between kinetics of metal excretion and of intracellular complex formation.

(ii) The limit $K_M \gg c_M^a(t)$ goes in pair with a weak affinity of M for S_u sites and it corresponds to the Henry regime for M adsorption on internalisation sites. In this regime where $J_u(t)/J_u{}^{\star} \ll 1$, the uptake flux (eqn (7)) can be linearized according to $J_u(t)/J_u{}^{\star} = c_M^a(t)/K_M$. Solving eqn (19) in this limit and further considering the inequality $\bar{K}^{\star} \gg 1$, we establish after lengthy algebra (see the details in the ESI,† part III.2) that M surface concentration follows the deceptively simple time-dependent expression

$$c_M^a(t)/K_M = \sum_{j=+,-} A_j e^{-k_j t}, \tag{35}$$

where we introduced $A_{\pm} = \pm k_{\pm}\left[\frac{c_M^{a,0}\Big/K_M + k_{\mp}\tau_o/\lambda}{k_+ - k_-}\right]$, and eqn (28) defining $c_M^{a,0}$ reduces here to $c_M^{a,0}/K_M = (1+\mathrm{Bn}^{-1})^{-1}(x_o + \bar{\phi}_u^{M,0}\mathrm{Bn}^{-1})$.

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

The kinetic constants $k_{\pm}(\geq 0)$ involved in eqn (35) define the rate of the decrease of $c_M^a(t)$ with time. They also reflect how fast microorganisms in solution internalise metal ions because the equality $J_u(t)/J_u^* = c_M^a(t)/K_M$ holds in the linear Henry adsorption domain considered here (case (ii)). $k_{\pm}$ depends on λ, $k_e\tau_L$ (eqn (23)) and $k_e\tau_E$ (eqn (24)) according to the dimensionless expressions (the details are given in the ESI,† part III.2)

$$k_{\pm}\tau_E = -\left[1 + k_e(\tau_L + \lambda\tau_E)\right] \times \left\{-1 \pm \sqrt{1 - \frac{4\lambda k_e\tau_E}{[1 + k_e(\tau_L + \lambda\tau_E)]^2}}\right\} \Big/ 2. \quad (36)$$

It is easily verified that $k_+^{-1} \geq k_-^{-1} \geq 0$, *i.e.* k_+ and k_- mirror long- and short-term components, respectively, of the depletion process and of the overall M uptake dynamics. As detailed in the following and in the ESI† (part III.2), there is a singular situation where the respective kinetics for M excretion, metal transfer from the solution to the intracellular volume and intracellular complex formation leads to $k_+ = k_- = k_o = (\tau_E)^{-1}$. In such a specific case, the pendant of eqn (35) is $c_M^a(t)/K_M = (A_o + B_o t)e^{-k_o t}$ with $A_o = c_M^{a,0}/K_M$ and $B_o = -k_o(c_M^{a,0}/K_M + k_o\tau_o/\lambda)$. The substitution of eqn (35) into eqn (32) finally yields the time-dependent expression for $c_M^*(t)$ (the details are given in the ESI,† part III.2)

$$\frac{\beta_a c_M^*(t)}{K_M} = \frac{\mathrm{Bn}^{-1}}{1+\lambda}\left\{\sum_{j=+,-}\left(\frac{A_j}{1 - \frac{k_j}{k_e(1+\lambda)}}\right) - (1+\lambda)\bar{\phi}_u^{M,0}\right\} \times e^{-k_e(1+\lambda)t} + \sum_{j=+,-}\left[1 + \frac{\frac{\lambda \mathrm{Bn}^{-1}}{1+\lambda}\left(1 - \frac{k_j}{k_e\lambda}\right)}{1 - \frac{k_j}{k_e(1+\lambda)}}\right] A_j e^{-k_j t}, \quad (37)$$

and its equivalent for $k_+ = k_- = k_o$ is derived in the ESI,† part III.2. The transport flux $J_M(t)$ finally follows from eqn (35) and (37) with the use of eqn (8)

$$J_M(t)/J_u^* = \frac{1}{(1+\lambda)}\left\{\left[\sum_{j=+,-}\left(\frac{A_j}{1 - \frac{k_j}{k_e(1+\lambda)}}\right) - (1+\lambda)\bar{\phi}_u^{M,0}\right] \times e^{-k(1+\lambda)t} + \lambda\sum_{j=+,-}\frac{1 - \frac{k_j}{k_e\lambda}}{1 - \frac{k_j}{k_e(1+\lambda)}} A_j e^{-k_j t}\right\}, \quad (38)$$

and its counterpart for $k_+ = k_- = k_o$ is also detailed in the ESI† (part III.2). As further demonstrated in the ESI† (part III.2), there are conditions on $k_e\tau_L$ and $k_e\tau_E$ for which k_- may equate $k_e(1 + \lambda)$ whereas the situation $k_+ = k_e(1 + \lambda)$ is not possible irrespective of the values of $k_e\tau_{L,E}$. In such cases, eqn (37) and (38) simplify into the expressions given in the ESI† (part III.2). Finally, it is easily verified that eqn (37) and (38) remain defined for microorganisms without efflux pumps (*i.e.* $k_e \to 0$) after the rearrangement of denominators in the right hand sides of eqn (37) and (38). In the extreme $\lambda \to 0$, eqn (35) and (37) further correctly agree with our previous results[24] valid in the absence of intracellular metal complexation (the details are given in the ESI,† part III.3). Eqn (37) formally shows that kinetics of M depletion from bulk solution is generally determined by the interplay between 3 characteristic timescales: k_+^{-1}, k_-^{-1} and $k_e^{-1}/(1 + \lambda)$. The meaning of $k_e^{-1}/(1 + \lambda)$ was discussed above when examining the scenario of strong M affinity to internalisation sites (eqn (33) and (34)). We focus below on the physical interpretation of $k_{\pm}^{-1}$.

Physical interpretation of k_+. Eqn (36) clearly demonstrates that $k_+\tau_E$ and $k_-\tau_E$ are fully defined upon the only specification of $k_e\tau_L$ and $\lambda k_e\tau_E = k_a^*\rho_S^{V_i}\tau_E$ (see the limit of eqn (18) for the case $\bar{K}^* \gg 1$ considered in Section 6). The former parameter compares the respective dynamics of M internalisation (τ_L) and M excretion ($1/k_e$), and the latter weighs the timescale τ_E for transfer of free M from the solution to the intracellular volume against the timescale $1\Big/\left(k_a^*\rho_S^{V_i}\right)$ for association between intracellular free M and ligands L_S (it is important to have in mind that $\lambda k_e\tau_E$ is independent of k_e, see eqn (18)). Accordingly, Fig. 3 displays the typical dependence of $k_{\pm}\tau_E$ on $\lambda k_e\tau_E$ and further details the asymptotic behaviour of $k_{\pm}\tau_E$ as a function of $k_e\tau_L$ in the limits $\lambda k_e\tau_E \ll 1$ and $\lambda k_e\tau_E \gg 1$. Fig. 3A shows that k_+ increases from 0 to $1/\tau_E$ with increasing $\lambda k_e\tau_E$ from the extreme $\lambda k_e\tau_E \ll 1$ to $\lambda k_e\tau_E \gg 1$. In the former regime where $\tau_E \ll 1\Big/\left(k_a^*\rho_S^{V_i}\right)$ holds, ML_S formation is not operational at the timescale pertaining to M transfer from the bulk solution to the intracellular compartment. In contrast, the regime $\lambda k_e\tau_E \gg 1$ applies to situations where the supply of M from the external medium to the microorganism internal body cannot sustain the rapid ML_S formation. In turn, M accumulation (and M bulk depletion) is limited by the overall transfer of free M from the bulk solution to the intracellular volume (time constant τ_E that reduces to τ_L in the specific thermodynamic BLM scenario where $\mathrm{Bn}^{-1} = 0$ applies, see eqn (24)). The transition between the two regimes occurs at $k_a^*\rho_S^{V_i} \sim (1/2 + k_e\tau_L)/\tau_E$, which corresponds to the point of coordinates $(1/2 + k_e\tau_L;1/2)$ in the representation of Fig. 3A. The larger the $k_e\tau_L$ value is, the faster is metal excretion compared to M membrane transfer (and thus to the overall transfer of free M from the solution to the intracellular volume), and the larger are the values of $\lambda k_e\tau_E$ where M bioaccumulation/depletion becomes significantly limited by overall free M transfer. Stated differently, a fast excretion of M compared to internalisation effectively disables free intracellular M to complex with L_S except at large $\lambda k_e\tau_E$. This is further accompanied by a marked asymmetry of the sigmoid-like dependence of $k_+\tau_E$ on $\lambda k_e\tau_E$ (Fig. S2 in the ESI,† part III.4). In agreement with these elements, the long-term dynamic component k_+ in eqn (35)–(38) reflects the ease with which dynamics of free M transfer from the solution to the microorganism can maintain/limit intracellular ML_S formation (kinetic) flux.

Physical interpretation of k_-. The dependence of $k_-\tau_E$ on $\lambda k_e\tau_E$ is reported in Fig. 3B together with the asymptotic behaviour of $k_-\tau_E$ at $\lambda k_e\tau_E \ll 1$ and $\lambda k_e\tau_E \gg 1$. From Fig. 3B,

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

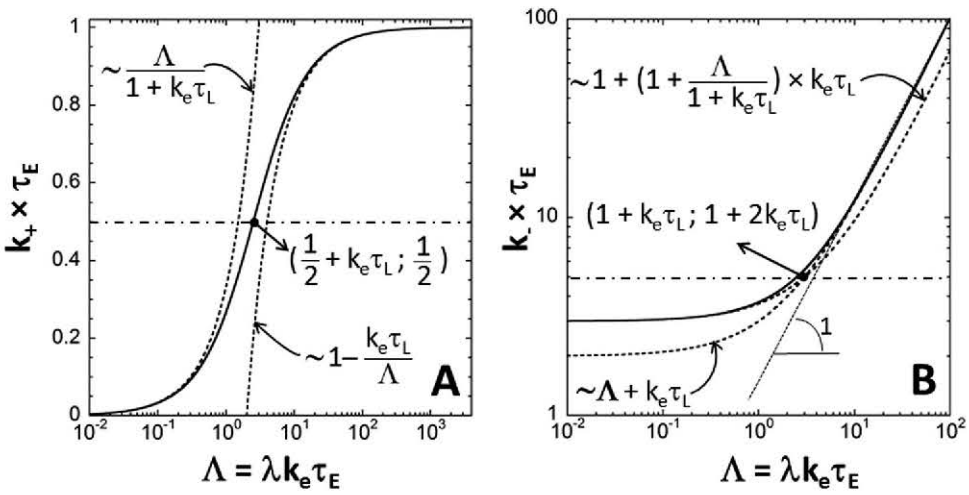


Fig. 3 Formal dependence of the (dimensionless) kinetic constants $k_+\tau_E$ (A) and $k_-\tau_E$ (B) on $\Lambda = \lambda k_e\tau_E = k_a{}^*\rho_S^{V_i}\tau_E$. Simulations are shown for $k_e\tau_L = 2$ (solid lines). The dotted lines are the asymptotic limits of $k_\pm\tau_E$ at $\Lambda \ll 1$ and $\Lambda \gg 1$ with the corresponding $k_e\tau_L$-dependent defining expressions indicated in the figure. The arrows indicate the coordinates of the couple where transition between the extremes $\Lambda \ll 1$ and $\Lambda \gg 1$ approximately takes place. The figure holds for $\bar{K}^* \gg 1$ and weak metal affinity for the internalisation sites S_u.

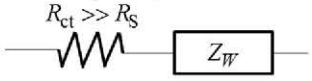
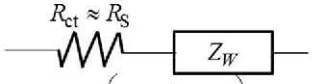
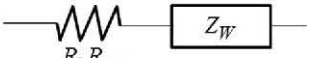
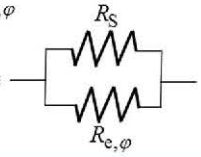
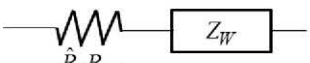
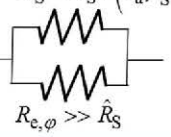
it is concluded that k_- increases monotonously with $\lambda k_e\tau_E$ and it behaves as $k_- \sim k_a{}^*\rho_S^{V_i} + k_e\tau_L/\tau_E$ for $\lambda k_e\tau_E \gg 1$. In the limit $\lambda k_e\tau_E \ll 1$, $1/k_-$ identifies with $\tau_E/(1 + k_e\tau_L)$ (hereafter denoted as τ_d) that corresponds to the characteristic timescale derived in ref. 24 for systems where intracellular complexation is far slower than M transfer ($\lambda \to 0$). The reader is referred to ref. 24 for a detailed interpretation of τ_d in terms of equivalent electrochemical circuits. Briefly, τ_d can be viewed as the time required to discharge a Warburg-like element across an interface with charge transfer resistance defined by M excretion and membrane transfer resistances set in parallel with values $R_e V_p/\left(4\pi\int_a^{r_c}\xi^2\beta_\xi d\xi\right) = R_e\varphi/(1+\bar{V}\varphi) = R_{e,\varphi}$ and R_S, respectively.[24] The difference between R_e and $R_{e,\varphi}$ is that R_e corresponds to the excretion resistance for a single microorganism while $R_{e,\varphi}$ is that applied at the scale of the microorganism suspension. With increasing $\lambda k_e\tau_E$, $1/k_-$ gradually tends to $\tau_E\Big/\left(k_a{}^*\rho_S^{V_i}\tau_E + k_e\tau_L\right) \equiv \tilde{\tau}_d$. The latter expression basically corrects the timescale τ_d defined above for intracellular ML_S formation kinetics that effectively leads to a decrease in the membrane transfer resistance R_S by a factor $k_a{}^*\rho_S^{V_i}\tau_E$ (>1). A rapid intracellular complex formation thus facilitates the kinetics of overall M uptake and M intracellular sequestration (see the demonstration in the ESI,† part III.5). The transition from $1/k_- \to \tau_d$ to $1/k_- \to \tilde{\tau}_d$ occurs at $k_a{}^*\rho_S^{V_i} \sim 1/\tau_d$, which corresponds to the point of coordinates $(1 + k_e\tau_L; 1 + 2k_e\tau_L)$ in Fig. 3B. Table 1 summarizes the limiting behaviour of k_- in the two extreme regimes of fast and slow ML_S formation kinetics, and it depicts the corresponding equivalent electrochemical circuits. The transition between the two regimes is further specified on the basis of the point coordinates indicated in Fig. 3B. Similarly, it is possible to evaluate expressions of charge transfer resistances associated with $1/k_+$. The reader is referred to the ESI† (part III.5) for demonstration and further discussion of the results collected in Table 1. In particular, it is found that the timescale τ_E reached by $1/k_+$ for fast intracellular ML_S formation corresponds to the time for discharging a Warburg-like element into a charge transfer resistance that identifies with R_S. The absence of any excretion contribution in this charge transfer resistance agrees with the limit $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,\infty}(\bar{K}^* = 0) \to 0$ discussed in Section 5 for $\bar{K}^* \gg 1$ (Table 1 applies for such strong ML_S complexes), recalling that excretion is required to obtain a finite non-zero M bulk concentration at equilibrium.[24] $1/k_+$ thus depicts the way M partitioning at a sufficiently long time converges to the equilibrium regime.

Comparison between $k_\pm$. Now that meanings of $k_\pm$ have been clarified, we can proceed to the formal comparison between k_+ and k_- in order to evaluate the conditions where one or both of these kinetic constants are operational. For that purpose, the ratio $k_+/k_-(\leq 1)$ is displayed in Fig. 4 as a function of $\lambda k_e\tau_E$ at various $k_e\tau_L$ values. Similar to Fig. 3, the asymptotic limits of k_+/k_- at $\lambda k_e\tau_E \ll 1$ and $\lambda k_e\tau_E \gg 1$ are further specified. At fixed $k_e\tau_L$, k_+/k_- increases linearly with $\lambda k_e\tau_E$ (in the double-logarithmic scale), reaches the maximum $(k_+/k_-)_{max} = \left(\sqrt{1+k_e\tau_L} - \sqrt{k_e\tau_L}\right)^2$ at $(\lambda k_e\tau_E)_{max} = 1 + k_e\tau_L$, and decreases upon further increase in $\lambda k_e\tau_E$. While increasing $k_e\tau_L$, the position of the maximum in k_+/k_- is therefore shifted to larger values of $\lambda k_e\tau_E$ and the magnitude of that maximum decreases. The parabolic-like dependence of k_+/k_- on $\lambda k_e\tau_E$ is in line with the respective behaviour of $k_\pm$ discussed in Fig. 3. Namely, upon decreasing $\lambda k_e\tau_E$ well below $(\lambda k_e\tau_E)_{max}$, the limit $k_+ \to 0$ is gradually reached whereas for $\lambda k_e\tau_E \gg (\lambda k_e\tau_E)_{max}$ the limit $k_- \to \infty$ becomes applicable, both situations leading to $k_+/k_- \to 0$. As a result, dynamics of M depletion and overall uptake is effectively governed by the only timescale $1/k_-(1/k_+)$ in situations where $\lambda k_e\tau_E \ll (\lambda k_e\tau_E)_{max}$ ($\lambda k_e\tau_E \gg (\lambda k_e\tau_E)_{max}$, respectively) whereas both timescales k_+ and k_- are operational in cases where $\lambda k_e\tau_E \sim (\lambda k_e\tau_E)_{max}$. These results can be further

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

Table 1 Electrochemical RC circuits whose time constants correspond to the timescales $(k_{\pm})^{-1}$ for bulk metal depletion/overall uptake in the limits of sluggish and fast intracellular ML_S formation kinetics (limits marked by * and **, respectively). The Warburg-like element[24] can be written here in the form $Z_W = (\tau_E/\tau_L)(1 + \bar{V}\varphi)V_p/(S_a\varphi)$, and the excretion and M membrane transfer resistances are defined by $R_{e,\varphi} = R_e\varphi/(1 + \bar{V}\varphi)$ with $R_e = S_a/(k_eV_p)$, and $R_S = 1/(k_{int}K_H\beta_a)$, respectively (see the details in the ESI, part III.5). R_{ct} stands for the charge transfer resistance. This table holds for $\bar{K}^* \gg 1$ and weak metal affinity for the internalisation sites S_u. The element Z_W depends on the ratio τ_E/τ_L or equivalently on the reciprocal Bosma number Bn^{-1} which reflects the extent by which the medium limits the transfer of M from the solution to the active membrane. This dependence motivates our qualification 'Warburg-like element' for Z_W which, in electrochemistry, denotes a kind of resistance of the external medium to mass transfer

	$k_a^*\rho_S^{V_i} << \left(\frac{1}{2}+k_e\tau_L\right)/\tau_E$ *	$k_a^*\rho_S^{V_i} >> \left(\frac{1}{2}+k_e\tau_L\right)/\tau_E$ **
$(k_+)^{-1}$	$(k_+)^{-1} \to \left(k_a^*\rho_S^{V_i}\right)^{-1}(1+k_e\tau_L) >> \tau_E$ $R_{ct} >> R_S$  $R_{ct} = R_S\frac{1+k_e\tau_L}{k_a^*\rho_S^{V_i}\tau_E} >> R_S$	$(k_+)^{-1} \to \tau_E$ $R_{ct} \approx R_S$  $R_{ct} = R_S\left(1+\frac{k_e\tau_L}{k_a^*\rho_S^{V_i}\tau_E}\right) \approx R_S$
$(k_-)^{-1}$	$k_a^*\rho_S^{V_i} << (1+k_e\tau_L)/\tau_E$ * $(k_-)^{-1} \to \tau_E/(1+k_e\tau_L) \le \tau_E$  $R_{ct} = \frac{R_S R_{e,\varphi}}{R_S + R_{e,\varphi}}$ $R_{ct} \equiv$ 	$k_a^*\rho_S^{V_i} >> (1+k_e\tau_L)/\tau_E$ ** $(k_-)^{-1} \to \tau_E/\left(k_a^*\rho_S^{V_i}\tau_E + k_e\tau_L\right) < \tau_E$  $R_{ct} = \frac{\hat{R}_S R_{e,\varphi}}{\hat{R}_S + R_{e,\varphi}}$ $\hat{R}_S = R_S/\left(k_a^*\rho_S^{V_i}\tau_E\right) << R_S$ $R_{ct} \equiv$ 

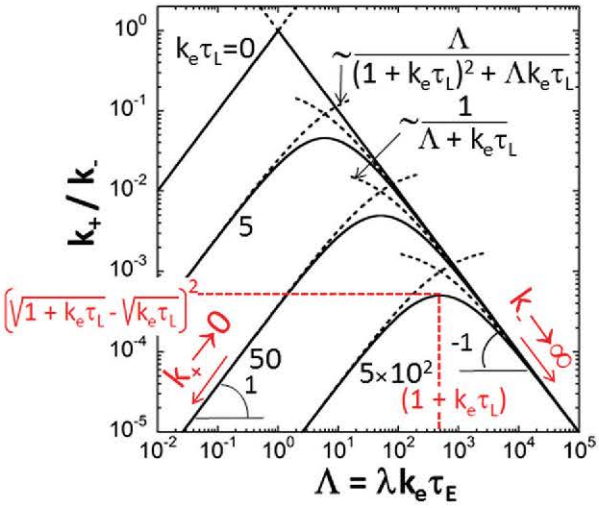


Fig. 4 Formal dependence of the ratio k_+/k_- on $\lambda k_e\tau_E = \Lambda$ simulated at various values of $k_e\tau_L$ (indicated, solid lines). The dotted lines are the asymptotic limits of k_+/k_- at $\Lambda \ll 1$ and $\Lambda \gg 1$ with the corresponding $k_e\tau_L$-dependent defining expressions indicated in the figure. The nature of the parabola-like branches is specified together with the theoretical $k_e\tau_L$-dependent expressions defining the position and the magnitude of the maximum in k_+/k_-. The figure holds for $\bar{K}^* \gg 1$ and weak metal affinity for the internalisation sites S_u.

obtained upon reasoning on the basis of the analogous electrochemical circuits schemed in Table 1 (see the ESI,† part III.5).

For microorganisms that expel intracellular free M much slower than they internalize M ($k_e\tau_L \to 0$), it comes $(k_+/k_-)_{max} \sim 1$ at $\lambda k_e\tau_E = (\lambda k_e\tau_E)_{max} \sim 1$ (or, equivalently, $k_a^*\rho_S^{V_i} \sim 1/\tau_E$). Dynamics of depletion and uptake processes then become determined by a single timescale denoted as $1/k_o = 1/k_{\pm}$, the value of which is obtained from eqn (36) with the result $1/k_o = \tau_E = 1\Big/\left(k_a^*\rho_S^{V_i}\right)$. This specific situation corresponds to a dynamic degeneracy where short- and long-term contributions to M partitioning at biointerphases are identical, with eqn (37) and (38) that then simplify into the expressions detailed in the ESI† (part III.2).

For the sake of completeness, we now briefly compare k_- with the constant $k_e(1 + \lambda)$ involved in eqn (37) and (38) or, equivalently, we compare $k_-\tau_E$ with $k_e\tau_E(1 + \lambda) = k_e\tau_E + \Lambda$ with $\Lambda = \lambda k_e\tau_E$ (Fig. 3B). Under equilibrium conditions where the relationship $c_M^*(t) = \beta_a c_M^a(t)$ correctly applies, we have $Bn^{-1} = 0$ or, equivalently, $\tau_E = \tau_L$ so that $k_- \to k_e(1 + \lambda)$ at $\lambda \to \infty$ and $k_-/[k_e(1 + \lambda)] \sim (1 + k_e\tau_L)/(k_e\tau_L)$ at $\lambda \to 0$ (see Fig. 3B). In these extremes of fast and sluggish intracellular complexation compared to excretion, the kinetic constant $k_e(1 + \lambda)$ is however not effective for systems satisfying the practical limit $\bar{\phi}_u^{M,0} = 0$ as either the prefactor or the argument of the first exponential term in the right side of eqn (37) then tends to zero (see the details in the ESI,† part III.6). For $Bn^{-1} \neq 0$ (*i.e.* $\tau_E > \tau_L$), we obtain $k_-/[k_e(1 + \lambda)] < 1$ over the complete range of λ values

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

provided that the inequality $k_e\tau_E > 1 + k_e\tau_L$ is strictly verified. Under the conditions $(k_e\tau_L <)k_e\tau_E < 1 + k_e\tau_L$, there exists a critical value of $\lambda = \lambda_c$ defined by $\lambda_c = [k_e(\tau_E - \tau_L)]^{-1} - 1$ that leads to $k_- = k_e(1 + \lambda_c)$ (see the details in the ESI,† part III.2) and both kinetic constants then have a comparable magnitude irrespective of λ. Altogether, it is concluded that for sufficiently strong ML_S complexes, M bulk depletion and overall M uptake dynamics are basically determined by k_+ and/or k_- depending on the magnitude of $\lambda k_e\tau_E$ compared to $1 + k_e\tau_L$.

III. Impacts of chemodynamics of intracellular metal complexes on M partitioning at biointerphases: computational examples

As shown in the preceding developments, the dimensionless parameters λ and $\bar{K}^*$ suffice to rationalize the effects of intracellular metal speciation on the kinetics and/or thermodynamics of M partitioning at biointerphases. It is stressed that these physical quantities are deceptively simple as they include details on the dynamics of molecular processes leading to intracellular ML_S formation (eqn (2)–(6)).

1. Impacts of λ on M partitioning dynamics at biointerphases

On the basis of eqn (19), (25)–(27) solved along the lines detailed in Section II.4, the dependence of $\bar{c}_M^*(t) = c_M^*(t)/c_M^{*,0}$ on time t (normalized by the M transfer timescale τ_E) is reported in Fig. 5A at different λ values and fixed $\bar{K}^* = 10$ for situations that do not match the conditions validating the use of the analytical expressions derived in Section II.6. For the sake of comparison, we also indicate results obtained in the limit $\lambda \to 0$ relevant for biosystems where the ML_S formation rate is not significant compared to that for M excretion. The reader is referred to ref. 24 for a detailed analysis of this limiting situation: briefly, bulk M concentration decreases with time and reaches a non-zero plateau value at $t \to \infty$, which is in line with the condition $k_e\tau_L \neq 0$ adopted in Fig. 5A and with eqn (29) taken in the extreme $\bar{K}^* = 0$.[24] As anticipated from Section II, $\bar{c}_M^*(t)$ decreases with increasing λ at fixed t/τ_E. Complexation then gradually bypasses excretion, and microorganisms exhibit accordingly a reduced ability to expel internalized free M over time, which in turn accelerates the rate of M depletion from bulk solution. At sufficiently low λ with $\lambda \neq 0$, two distinct depletion kinetic regimes can be clearly distinguished whereas upon further increasing λ, depletion becomes solely dictated by the timescale governing the rate of the decrease of $\bar{c}_M^*(t)$ toward the equilibrium plateau value. This behaviour is qualitatively in line with the dependence of the ratio k_+/k_- on λ in Fig. 4. Namely, with increasing λ at fixed $k_e\tau_E$, one switches from a depletion kinetics limited by the only short-term component k_- at $\lambda \to 0$ to a regime where the long-term component k_+ is operational at $\lambda \to \infty$ with $k_+ \to 1/\tau_E$ that becomes independent of λ (Fig. 3). At intermediate λ, both k_- and k_+ come into play and the ratio k_+/k_- approaches a maximum. In Fig. 5A, the plateau value $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ (reached at $t \to \infty$) is lower than that achieved in the absence of intracellular ML_S formation and it is further independent of λ, which further confirms predictions from the rigorous eqn (29). Even though eqn (36) and (37) are strictly valid under the conditions $\bar{K}^* \gg 1$ and $K_M \ll c_M^a(t)$ that are not satisfied in Fig. 5A, they remain helpful to qualitatively understand the way bulk depletion is affected by the λ-dependent short- and long-term dynamic contributions.

Fig. 5B displays the ratio $c_M^a(t)/(\beta_a c_M^*(t))$ *versus* time under the conditions of Fig. 5A. Deviations of that ratio from unity informs on the correctness in applying thermodynamic (BLM) modeling for evaluation of M partitioning at biointerphases. Let us first examine the case $\lambda \to 0$. At sufficiently short time t, we have $c_M^a(t)/(\beta_a c_M^*(t)) < 1$ in agreement with eqn (28) and with the inequality $Bn^{-1} \neq 0$ adopted in Fig. 5. With increasing

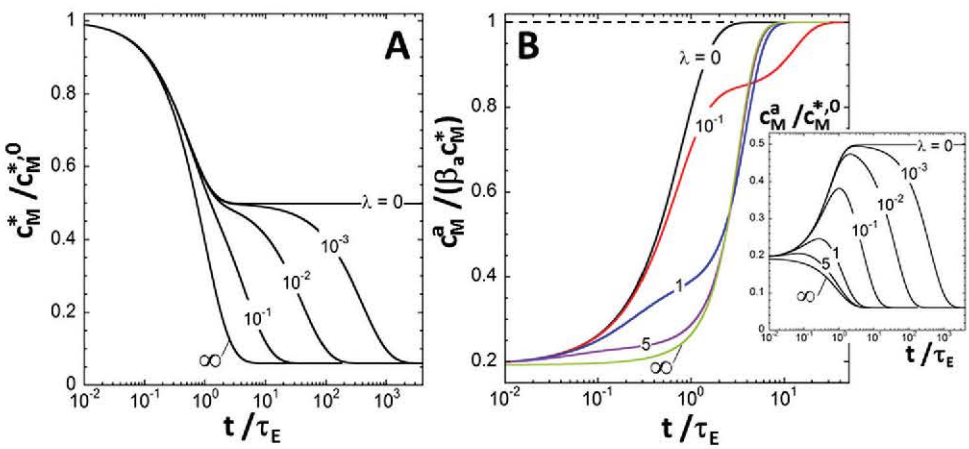


Fig. 5 (A) Evolution of the ratio $c_M^*/c_M^{*,0}$ with time t normalized by the M transfer timescale τ_E, at various λ (indicated) values. (B) Ratio $c_M^a/(\beta_a c_M^*)$ *versus* t/τ_E and dependence of the M surface concentration c_M^a on t/τ_E (inset) under the conditions of (A). The dotted line in (B) corresponds to the thermodynamic limit $c_M^a/(\beta_a c_M^*) = 1$. Model parameters: $a = 1\ \mu m$, $d \to 0$, $\beta_a = 1$, $\varphi = 10^{-6}$ ($r_c/r_o = 10^2$), $c_M^{*,0} = 0.1\ \mu M$, $k_e = 10^{-2}\ s^{-1}$, $K_H k_{int} = 5 \times 10^{-3}\ m\ s^{-1}$, $\bar{K}^* = 10$ (except $\bar{K}^* \to 0$ under the condition $\lambda \to 0$), $x_o = 1$, and $D_{M,out} = 10^{-9}\ m^2\ s^{-1}$.

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

time, the ratio increases and gradually reaches the thermodynamic limit $c_M^a(t)/(\beta_a c_M{}^*(t)) \to 1$ at $t \to \infty$. For $\lambda > 0$, $c_M^a(t)/(\beta_a c_M{}^*(t))$ decreases at fixed t with increasing λ, thereby indicating that intracellular complexation enhances the extent by which overall M uptake is limited by extracellular conductive-diffusion transport of M from the solution to microorganism surface. The larger the λ value is, the faster the equilibrium is achieved, which conforms to the results discussed in Fig. 5A. The inapplicability of the BLM theory with increasing λ is reflected at sufficiently short time t by a decrease in the surface M concentration $c_M^a(t)$ below the level at $t = 0$, as illustrated in the inset of Fig. 5B. The more pronounced is the limitation of the uptake rate by M transport, the earlier this decrease sets in over time prior to establishment of equilibrium. It can be formally shown that for strong ML_S complexes ($\bar{K}^* \gg 1$), weak M affinity for internalisation sites ($K_M \gg c_M^a(t)$) in the absence of excretion ($k_e \to 0$), eqn (35) reduces to $c_M^a(t)/K_M \sim \left(c_M^{a,0}/K_M\right)\left[e^{-t/\tau_E} - k_a{}^*\rho_S^{V_i}\tau_E\left(1 - e^{-t/\tau_E}\right)\right] + O\left(k_a{}^*\rho_S^{V_i}\tau_E\right)^2$, where O means that the expression holds up to the first order $k_a{}^*\rho_S^{V_i}\tau_E$ term. This analytical expression further confirms the decrease of $c_M^a(t)$ while speeding up ML_S formation kinetics. The evolution of M transport flux at the membrane surface with time under the λ conditions of Fig. 5 provides another representation of the increased limitation of the overall uptake by extracellular M transport under demanding ML_S formation kinetic conditions (Fig. S3 in ESI,† part IV.1).

2. Effects of $\bar{K}^*$ on M partitioning dynamics at biointerphases

Fig. 6A illustrates the typical time dependence of $c_M{}^*/c_M^{*,0}$ at different $\bar{K}^*$ values and fixed $\lambda = 10$.

These conditions correspond to those where depletion is governed by the kinetic constant pertaining to the long term-dynamic partitioning component referred to as k_+ in the specific situation treated in Section II.6. It is observed that the depletion timescale hardly depends on $\bar{K}^*$ and becomes independent of $\bar{K}^*$ for $\bar{K}^* \gg 1$, which agrees with eqn (18). In addition, $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ decreases with $\bar{K}^*$ and M depletion from bulk solution is complete for $\bar{K}^* \gg 1$ at $t \to \infty$, which is again in line with the formulation given in eqn (29) and with results in Fig. 2. The time-dependent ratio $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*)$ is reported in Fig. 6B under the conditions of Fig. 6A. In the situation where ML_S formation is insignificant ($\bar{K}^* \to 0$), this ratio increases monotonously with time before reaching unity when equilibrium is established. An increase in $\bar{K}^*$ basically leads to a shift to longer timescales of the profile obtained at $\bar{K}^* \to 0$, and at sufficiently large $\bar{K}^*$ a minimum in $c_M^a(t)/(\beta_a c_M{}^*(t))$ clearly appears. These remarkable features indicate that an increase in ML_S complex stability is accompanied by a marked limitation of the rate of uptake by extracellular M transport. The larger the $\bar{K}^*$ value is, the broader is the time window where this limitation sets in compared to the reference situation $\bar{K}^* \to 0$. It is stressed that the depth of the minimum identified in Fig. 6B at sufficiently large $\bar{K}^*$ is inherently dependent on various factors such as cell surface electrostatics or constant K_M for the reciprocal affinity of M to internalisation sites, all mediating the transfer rate of free M from the solution to the intracellular volume (eqn (23) and (24)).[23,24] This statement is illustrated in Fig. 7 where $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*)$ is reported as a function of time at $\bar{K}^* = 10^2$ and for various values of the dimensionless reciprocal M affinity constant $K_M/(\beta_a c_M^{*,0})(=1/x_o)$ at fixed $K_H k_{int}$. For the sake of completeness, the corresponding $c_M{}^*(t)/c_M^{*,0}$ is given in Fig. S4 (ESI,† part IV.1). In line with eqn (28), $c_M^a(0)/(\beta_a c_M{}^*(0))$ approaches unity with lowering $1/x_o$ (which corresponds to decreasing K_M or equivalently increasing M affinity[23]), which reflects an uptake/depletion kinetics that is increasingly limited by the internalisation step, at least in the initial stage of cell exposure to metal ions. With increasing time, the limitation of the uptake rate by extracellular M transport becomes significant due to the demanding intracellular ML_S formation, which leads to a pronounced minimum in $c_M^a(t)/(\beta_a c_M{}^*(t))$ that further

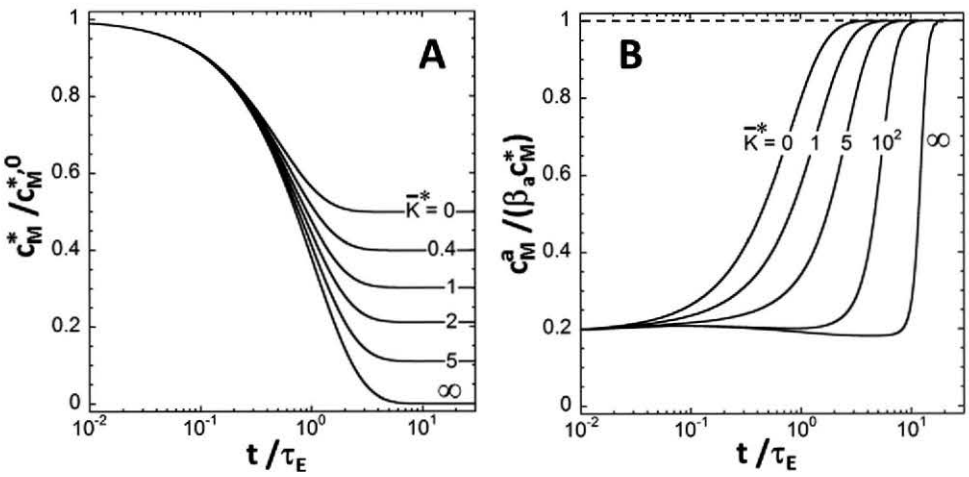


Fig. 6 (A) Evolution of the ratio $c_M{}^*/c_M^{*,0}$ with time t normalized by the M transfer timescale τ_E, at various $\bar{K}^*$ (indicated) values. (B) Ratio $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*)$ *versus* t/τ_E under the conditions of panel A. The dotted line in (B) corresponds to the thermodynamic limit $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*) = 1$. Model parameters: as in Fig. 5 except $\lambda = 10$.

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

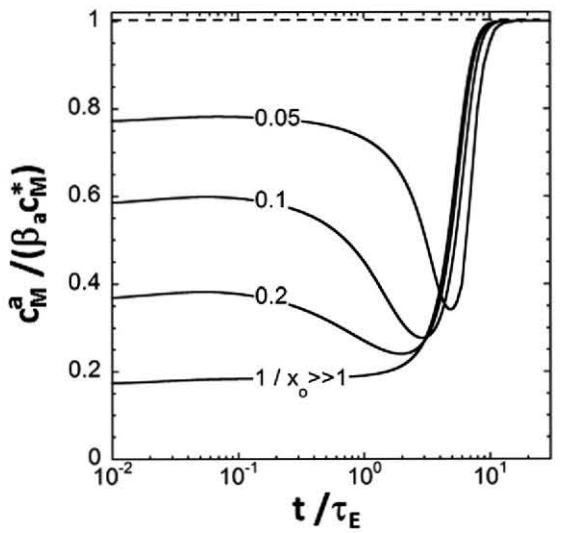


Fig. 7 Evolution of the ratio $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*)$ *versus* t/τ_E for various values of the dimensionless reciprocal M affinity $1/x_o = K_M/(\beta_a c_M^{*,0})$ (indicated). The dotted line corresponds to the thermodynamic limit $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*) = 1$. Model parameters: as in Fig. 5 except $\lambda = 10$ and $\bar{K}^* = 10^2$.

goes to unity at a sufficiently long time when equilibrium is reached. The larger the $1/x_o$ value is, the larger is the contribution of M transport to uptake flux already at $t = 0$,[23] and the least is the uptake limited over time by M transport as a result of rapid ML_S complex formation. In turn, the depth of the minimum in $c_M^a/(\beta_a c_M{}^*)$ decreases with increasing $1/x_o$ and the minimum even disappears at $1/x_o \gg 1$.

3. Impacts of the cell volume fraction on M partitioning dynamics at biointerphases

In our previous work,[26] we demonstrated that a careful analysis of bulk metal depletion measured as a function of time and cell volume fraction φ was extremely valuable for deriving – in a constrained theoretical manner – relevant information on uptake/excretion kinetics and M transport dynamics for situations where ML_S formation was insignificant. We therefore examine here how M uptake and depletion from bulk solution are affected by changes in φ in the presence of intracellular complexation.

Fig. 8 displays the time evolution of $c_M{}^*/c_M^{*,0}$ at various φ values (indicated) for $Bn^{-1} = 10$ and 0.1 (Fig. 8A and B, respectively), $\lambda = 10^{-2}$ and $\bar{K}^* = 10$. For the sake of comparison, the results obtained in the absence of intracellular ML_S formation ($\bar{K}^* \to 0$ and $\lambda \to 0$) are further reported. The range of φ values required to achieve significant M depletion from bulk solution increases with decreasing $Bn^{-1}(=R_T/R_S)$ as the number density of cells must be increased to compensate for the corresponding increase in the resistance R_S pertaining to M membrane transfer. The remarkable features in Fig. 8 are (i) the strong dependence of the equilibrium plateau value $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ on cell volume fraction φ, and (ii) the interrelation between the magnitude of φ and the nature of the obtained depletion/uptake kinetic regime. In relation to the last point, there exists a single characteristic timescale for M depletion/uptake at sufficiently low and high φ values whereas two kinetic constants are clearly operational at intermediate φ values. Features (i) and (ii) directly follow from the dominating dependence of $k_e\tau_{E,L}$ on $\sim 1/\varphi$ (eqn (23) and (24)). In more detail, the analysis of Fig. 2 and 4 in terms of $k_e\tau_L$ and $\lambda k_e\tau_E$ can be performed using the cell volume fraction φ as a relevant variable. After properly combining eqn (23) and (24) with eqn (29) and (30) and with eqn (36), we derive (ESI,† part IV.2) and display the dependence of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ and k_+/k_- on φ/φ^* in Fig. 9A and B, respectively, where we recall that φ^* is defined by $\varphi^* = R_S/R_e$. The corresponding results are discussed below and it is argued that they adequately capture the peculiar depletion/uptake kinetic features reported in Fig. 8 at various cell volume fractions φ.

In line with observation (i) above, $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ decreases in a sigmoid-like manner with increasing φ/φ^* and the analytical

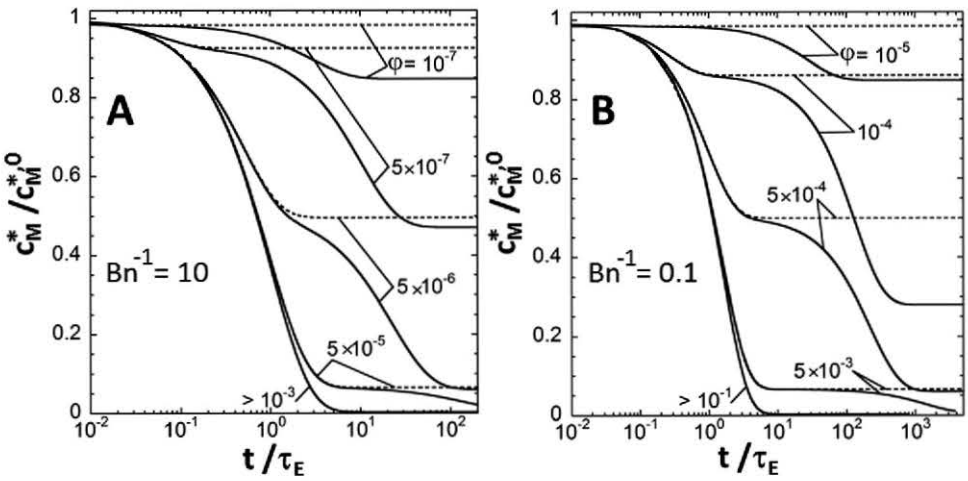


Fig. 8 Evolution of the ratio $c_M{}^*/c_M^{*,0}$ with time t normalized by the M transfer timescale τ_E, at various cell volume fractions φ (indicated) for $Bn^{-1} = 10$ (A) and $Bn^{-1} = 0.1$ (B). The dotted lines in (A) and (B) correspond to predictions in the absence of intracellular ML_S formation ($\bar{K}^* \to 0$ and $\lambda \to 0$). Model parameters: as in Fig. 5 except $\lambda = 10^{-2}$, $\bar{K}^* = 10$, $c_M^{*,0} = 1$ μM, and $k_e = 10^{-1}$ s^{-1} with $K_H k_{int} = 10^{-2}$ m s^{-1} (A) and $K_H k_{int} = 10^{-4}$ m s^{-1} (B).

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

expressions defining the asymptotic behavior of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ at $\varphi/\varphi^* \ll 1$ and $\varphi/\varphi^* \gg 1$ (curves (a) and (b) in Fig. 9A, respectively) are explicitly derived in the ESI† (part IV.2, Table S2). It can be shown that the cell volume fraction $\varphi = \varphi_{1/2}$ needed to achieve a two-fold reduction of the bulk M concentration at $t \to \infty$ (*i.e.* $c_M^{*,\infty}(\varphi_{1/2})/c_M^{*,0} = 1/2$) is defined – under the initial equilibrium condition $\Delta\bar{c}_o = 0$ – by (ESI,† part IV.2)

$$\varphi_{1/2}\Big/\varphi^* = \frac{1 + x_o/2}{1 + \bar{K}^* - \bar{\phi}_u^{T,0}(1 + 2/x_o) - \bar{V}\varphi^*(1 + x_o/2)}, \quad (39)$$

which simplifies into $\varphi_{1/2}/\varphi^* = (1 + x_o/2)/(1 + \bar{K}^*)$ for microorganisms devoid of any soft surface layer ($\bar{V} = 0$) in the absence of intracellular M species at $t = 0$ ($\bar{\phi}_u^{T,0} = 0$) (Fig. 9A).

For the sake of completeness, Fig. S5 in the ESI† (part IV.3) illustrates how the sigmoidal-like decrease of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ with increasing φ/φ^* (and $\bar{K}^*$) is affected by changes in the dimensionless M affinity to internalisation sites and by changes in $\Delta\bar{c}_o$. Briefly, a decrease in $1/x_o$ (which mimics decreasing K_M or decreasing values of the maximum uptake flux $J_u^* = K_H k_{int} K_M$) leads at fixed φ and $\bar{K}^*$ to an increase in $c_M^*(t)/c_M^{*,0}$ (not shown) so that higher cell concentrations are required to achieve at $t \to \infty$ a significant depletion of M initially present in solution. Conversely, with increasing $\bar{K}^*$ at fixed $1/x_o$ and φ, a smaller amount of cells is needed to reach the condition $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0} = 1/2$ because ML_S formation then efficiently decreases M membrane transfer resistance and facilitates therewith M depletion kinetics (see analogy with Fig. 2). It is also found that the symmetry of the plot $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ *versus* φ/φ^* with respect to the point of coordinates $(\varphi_{1/2}/\varphi^*;1/2)$ in Fig. 9A strongly depends on $\Delta\bar{c}_o$ and $1/x_o$ (see Fig. S5 in the ESI† for further details).

Fig. 9B displays information about k_+/k_- analogous to that pictured in Fig. 4 albeit as a function of the experimentally adjustable volume fraction φ normalized by φ^*. The analytical expressions of k_+/k_- as a function of φ at $\varphi/\varphi^* \ll 1$ and $\varphi/\varphi^* \gg 1$ are detailed in the ESI† (Table S2, part IV.2). The noticeable difference between Fig. 9B and 4 is that the ascending and descending branches of the parabolic-like dependence of k_+/k_- identified in Fig. 4 now correspond to the limits $k_- \to \infty$ and $k_+ \to 0$ reached at sufficiently low and high cell volume fractions, respectively. Similar to Fig. 4, k_+/k_- reaches a maximum at a specific value of φ/φ^* defined by (ESI,† part IV.2)

$$(\varphi/\varphi^*)_{max} = \frac{(1 + \zeta Bn^{-1})[1 + \lambda(1 + \zeta Bn^{-1})]}{1 + \zeta Bn^{-1}[1 + \bar{V}\varphi^*(1 - \lambda)] - \bar{V}\varphi^*(1 + \lambda)}, \quad (40)$$

where we recall that the quantity ζ is involved in the definition of τ_E (eqn (24)). The value of the maximum in k_+/k_- can be further written in the explicit form (ESI,† part IV.2)

$$(k_+/k_-)_{max} = \frac{1 - \left\{1 - \dfrac{\lambda(1+\zeta Bn^{-1})^2}{[1+\zeta Bn^{-1}(1+\bar{V}\varphi^*)][1+\lambda(1+\zeta Bn^{-1})]}\right\}^{1/2}}{1 + \left\{1 - \dfrac{\lambda(1+\zeta Bn^{-1})^2}{[1+\zeta Bn^{-1}(1+\bar{V}\varphi^*)][1+\lambda(1+\zeta Bn^{-1})]}\right\}^{1/2}}. \quad (41)$$

Eqn (40) and (41) are valid in the limits of weak M affinity and strong ML_S complexes ($\bar{K}^* \gg 1$) and they simplify into the expressions detailed in Fig. 9B for microorganisms without soft surface layers (*i.e.* $\bar{V} = 0$). Despite the restrictive conditions defining the validity domain of eqn (40) and (41) and therewith of the results in Fig. 9B, the latter still correctly predicts that the long-term k_+ component dominates M depletion/uptake kinetics at sufficiently low φ in Fig. 8 (*i.e.* large $\lambda k_e \tau_E$ in Fig. 4) whereas at large φ (or low $\lambda k_e \tau_E$ in Fig. 4), this is the short-term k_- contribution that determines the evolution of the overall M

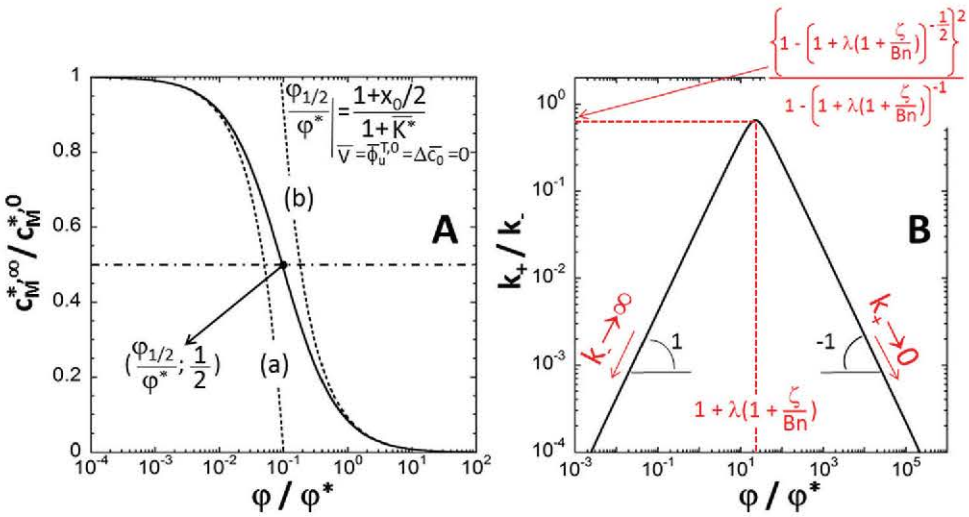


Fig. 9 Formal dependence of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ (A) and k_+/k_- (B) on φ/φ^*. The illustrative simulations (solid lines) are provided for (A): $\bar{V} = \bar{\phi}_u^{T,0} = \Delta\bar{c}_o = 0$, $\varphi^* = 10^{-3}$, $\bar{K}^* = 10$, $x_o = 0.1$, and $\zeta = 1$, and for (B): $\bar{V} = 0$, $\varphi^* = 10^{-5}$, $\lambda = 2$, $Bn^{-1} = 10$ and $\zeta = 1$. The dotted lines (a) and (b) in panel (A) are the asymptotic limits of $c_M^{*,\infty}/c_M^{*,0}$ at $\varphi/\varphi^* \ll 1$ and $\varphi/\varphi^* \gg 1$, respectively, with the corresponding φ-dependent defining expressions derived in the ESI† (part IV.2, Table S2). The arrow in (A) indicates the coordinates of the point marking the transition between the regimes $\varphi/\varphi^* \ll 1$ and $\varphi/\varphi^* \gg 1$. In (B), the nature of the parabolic-like branches is specified together with the general expressions defining the position and the magnitude of the maximum in k_+/k_- under the condition $\bar{V} = 0$. The results in (B) hold for $\bar{K}^* \gg 1$ and weak metal affinity for the internalisation sites S_u.

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

uptake/depletion with time. Fig. 8 further shows that for the regime of 'concentrated' microorganism suspensions $\varphi/\varphi^* \gg 1$, the timescale for M depletion becomes independent of φ. This important result agrees with the limit $\sim\tau_E/(1 + k_e\tau_L)$ reached by $1/k_-$ at $\lambda k_e\tau_E \ll 1$ (Fig. 3), recalling that τ_E and τ_L become independent of φ at $\varphi/\varphi^* \gg 1$ (see eqn (23) and (24)). The timescale τ_E further depends on Bn^{-1} (irrespective of the value taken by φ, see eqn (24)), which is well supported by data at $\varphi \geq 10^{-3}$and $\varphi \geq 10^{-1}$ in Fig. 8A and B, respectively. Finally, Fig. 9B shows that both contributions k_+ and k_- come into play at intermediate cell volume fractions, which again adequately agrees with the results of Fig. 8.

IV. Conclusions

A comprehensive theory is formulated for the partitioning dynamics of metal ions at charged, soft biointerphases taking into account chemodynamics of intracellular metal complexation. The formalism further integrates the interplay between excretion of free metal ions over time by the microorganisms, internalisation kinetics, conductive-diffusion of metal ions to the membrane surface, and metal depletion from bulk medium. The exact set of non-linear and coupled differential equations governing the distribution of metal species in the microorganism body, at the microorganism/solution interphase and in bulk solution, is derived by careful implementation of the multiple spatial and temporal scales active in the treated problem, *i.e.* from the molecular metal binding sites supported by the intracellular proteinaceous chelators up to the mesoscopic scale associated with the ensemble of microorganisms in solution. The formalism is completed by closed-form analytical expressions obtained for the time-dependent metal concentrations at the microorganism surface and in bulk solution under conditions of strong intracellular metal complexes and low or high affinity of the target metal ions for membrane transfer sites. In addition, the Best–Duval equations[7,24] interrelating surface and bulk concentrations of metal ions are extended to include intracellular complex formation kinetics in the limit where the complex dissociation step can be discarded. Finally, we provide rigorous analytical expressions for the metal concentration distribution achieved in the equilibrium regime reached at a sufficiently long time. In all these developments, the relevant dimensionless physical parameters governing the kinetics and/or thermodynamics of metal partitioning at biointerphases in the microorganisms suspension are clearly defined as a function of cell geometry, cell surface electrostatics, cell volume fraction and kinetics of metal internalisation, excretion and intracellular metal complexation. In particular, our procedure allows for a sound biophysical formulation of the partitioning coefficient of metal species at equilibrium between extra- and intracellular volumes as a function of intracellular complex stability, excretion kinetic constant and timescale for metal membrane transfer. The theory evaluates the characteristic timescales of the overall metal uptake and bulk metal depletion processes *e.g.* upon changing the cell volume fraction, kinetics of intracellular complex formation, or resistance to metal transfer from the solution to the biointerphase. It further specifies the conditions where one or two kinetic constants for metal uptake/depletion from bulk solution are operational. Finally, the formalism corrects popular and approximate equilibrium partitioning models (like the biotic ligand model) that are necessarily inapplicable for situations where extracellular metal transport significantly limits the overall rate of metal uptake or where excretion is substantial. Our analysis demonstrates however that the former situations are easily met for microbial systems in which intracellular complexation demands lead to metal uptake fluxes that are severely limited by the conductive-diffusion supply of metal ions from the external medium. Future extensions of the theory include (i) a full treatment of the inherent heterogeneity of the metal binding entities involved in the dynamic intracellular sequestration of metal ions by real biosystems, (ii) the inclusion of a constant minimum flux term in the Michaelis–Menten expression for the microorganism's mere maintenance,[18] (iii) the account of cell growth and/or metal toxicity (leading to *e.g.* growth inhibition), as done in ref. 19 and 25 *albeit* without accounting for intracellular metal speciation, and (iv) the inclusion of metal speciation dynamics in the extracellular solution, which we shall address in a forthcoming publication.

Clearly, the current theory needs to be confronted to data collected on real systems. While such confrontation has already been reported for bacteria and algae in the absence of intracellular complexation,[25,26] a forthcoming study shall detail metal depletion/uptake experiments conducted with bacteria with or without intracellular complexing agents. It will be shown that the data can be quantitatively and successfully interpreted on the basis of the theory presented here. It is anticipated that the current theory should be of further interest for the optimization of metal bioremediation strategies and prediction of their efficiency over time. In particular, the theory provides a tool for apprehending the propensity of a given microorganism to satisfactorily remove metal ions from a given medium as a function of cell geometry-electrostatics-volume fraction and physico-chemical conditions in the external medium (*e.g.* pH and salinity which impact the electrostatic potential distribution at the microorganism/solution interphase). Finally, the theory has potential applications for designing tailored biological systems for metal release or sequestration, or for analysing quantitatively the response of engineered-bacterial sensors used to monitor metal concentrations in aqueous environments. Indeed, the response of these systems takes the form of light or fluorescence emitted on the prerequisite that internalised metal ions associate with specific intracellular proteins. In that respect, the current formalism offers promising perspectives for further integration of the inherent and intricate coupling between physico-chemical dynamics of extracellular/interfacial processes, and biochemical dynamics of intracellular homeostasis, all contributing to the spatiotemporal distribution of metal species in suspensions of active microorganisms.

Glossary of main symbols

a	Radius of the intracellular microorganism compartment (m)
$A_\pm$	Constants involved in eqn (35)

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

A_o	Constant defined by $c_M^{a,0}/K_M + k_o\tau_o/\lambda$ (dimensionless)
Bn^{-1}	Inverse of the Bosma number defined by R_T/R_S (dimensionless)
c_{L_S}	Number density of L_S in the volume V_i (m^{-3})
$c_M(r,t)$	M concentration at position r and time t (mol m^{-3})
$c_M^a(t)$	M concentration at the membrane surface (mol m^{-3})
$c_M^{a,0}$	Defined by $c_M^a(0)$ (mol m^{-3})
$c_M^{a,\infty}$	Defined by $c_M^a(\infty)$ (mol m^{-3})
$c_M{}^*(t)$	Bulk M concentration at t (mol m^{-3})
$c_M^{*,0}$	Bulk M concentration at $t = 0$ (mol m^{-3})
$c_M^{*,\infty}$	Defined by $c_M{}^*(\infty)$ (mol m^{-3})
$\bar{c}_M{}^*(t)$	Dimensionless M concentration $c_M{}^*(t)/c_M^{*,0}$
c_p	Number density of microorganisms in V_T (m^{-3})
d	Thickness of the peripheral soft surface layer (m)
$\bar{f}_{el,LS}^{int}$	Electrostatic Debye correction factor for M diffusion to L_S (dimensionless)
$\bar{f}_{el}$	Electrostatic Debye correction factor for M diffusion to the microorganism membrane surface (dimensionless)
$\bar{f}_{B,LS}^{int}$	Electrostatic Boltzmann accumulation factor for M within the L_S body (dimensionless)
$J_u{}^*$	Maximum uptake flux of M (mol m^{-2} s^{-1})
$J_u(t)$	Uptake flux of M at time t (mol m^{-2} s^{-1})
$J_e(t)$	Excretion flux of M at time t (mol m^{-2} s^{-1})
$k_{a,d}{}^*$	Effective kinetic constants for the conversion of free M in the volume V_i into ML_S complex species (mol^{-1} m^3 s^{-1}), and for ML_S dissociation (s^{-1}) (subscript 'a' and 'd', respectively)
$k_{a,d}^{is}$	Kinetic constants for formation (mol^{-1} m^3 s^{-1}), and dissociation (s^{-1}) of inner sphere metal complexes (subscripts 'a' and 'd', respectively)
k_{a,L_S}	Kinetic constant pertaining to the transport of M from intracellular bulk solution to ligand L_S (mol^{-1} m^3 s^{-1})
k_e	Kinetic constant for M excretion (s^{-1})
k_w	Kinetic constant for inner sphere dehydration (s^{-1})
$k_\pm$	Kinetic constants for the overall M uptake/depletion process (involved in eqn (36)) (s^{-1})
k_o	Value taken by $k_\pm$ in the degeneracy situation $k_o = k_+ = k_- = 1/\tau_E$ (s^{-1})
K_H	Henry coefficient for the adsorption of M at the internalisation sites S_u (m)
K_M	Reciprocal affinity constant of M for the internalisation sites (mol m^{-3})
$\bar{K}^* = k_a{}^*\rho_S^{V_i}/k_d{}^*$	Stability constant of the intracellular ML_S complex (dimensionless)
$\bar{K}_{1/2}{}^*$	Value of $\bar{K}^*$ required to achieve at $t \to \infty$ half depletion of M from bulk solution
L_S	Stands for the intracellular particulate ligand (radius r_{L_S}, diffusion coefficient D_{L_S})
l_c	Typical separation distance between adjacent charges in L_S (m)
M	Stands for free metal ions (valence z_M, hydrated radius r_M, intracellular diffusion coefficient D_M^{int})
ML_S	Stands for intracellular metal complexes
N_{L_S}	Number of L_S in V_i
r	Radial coordinate with $r = 0$ at the microorganism center and $r = a$ at the membrane surface (m)
r_{L_S}	Radius of the (nano)particulate multi-site binding entity L_S (m)
S	Stands for M binding sites carried by an intracellular particulate ligand L_S
N_S	Number of binding sites S per particulate complexant L_S
$r_c = r_o\varphi^{-1/3}$	Radius of the Kuwabara unit cell (m)
r_o	Defined by $a + d$ (m)
R_{ct}	Stands for the charge transfer resistance (m^{-1} s)
$R_e = S_a/(k_eV_p)$	Resistance of a microorganism to excrete internalised free M (m^{-1} s)
$R_{e,\varphi} = R_e\varphi/(1 + \bar{V}\varphi)$	Excretion resistance relevant at the scale of the microorganism suspension (m^{-1} s)
$R_S = 1/(k_{int}K_H\beta_a)$	M membrane transfer resistance (m^{-1} s)
$R_T = 1/(D_{M,out}\bar{f}_{el}a^{-1})$	Extracellular M transport resistance (m^{-1} s)
$S_a = 4\pi a^2$	Surface area of a microorganism (without including the peripheral soft surface layer) (m^2)
S_u	Stands for the internalisation sites
t	Time (s)
V_i	Volume where intracellular M complexing agents L_S are distributed (m^3)
V_{L_S}	Volume of ligand L_S (m^3)
V_{OS}	Volume of outer-sphere metal complex (m^3)
V_p	Volume of a microorganism (including the soft surface layer) (m^3)
V_{soft}	Volume of the soft peripheral surface layer (m^3)
V_T	Volume of the solution sample (m^3)
$\bar{V}$	Dimensionless volume defined by β_aV_{soft}/V_p
x_o	Dimensionless ratio $(\beta_ac_M^{*,0})/K_M$
Z_W	Stands for the Warburg-like element (m)

Greek symbols

β_a	Boltzmann factor applied at the membrane surface (dimensionless)
β_r	Boltzmann factor applies at the position r in the microorganism/solution interphase (dimensionless)
δ	Steady state diffusion layer thickness (m)
$\Delta\bar{c}_o$	Defined by $1 - c_M^{a,0}/(\beta_ac_M^{*,0})$(dimensionless)
$\Delta\tau$	Defined by the difference $\tau_L - \tau_E$ (s)
ε	Defined by the ratio $D_{M,in}/D_{M,out}$ between M diffusion coefficients inside and outside the soft peripheral surface layer of the microorganism (dimensionless)
ζ	Dimensionless quantity defined by $\bar{f}_{el}[(\varepsilon\beta_a)^{-1}(1 - a/r_o) + a(1 - 3\varphi^{1/3}/2)]/r_o$
$1/\kappa$	Debye layer thickness at the solution side of the microorganism/solution interphase (m)

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

$1/\kappa_m$	Debye layer thickness in the soft peripheral surface layer of the microorganism (m)
$1/\kappa_{m,L_S}$	Debye screening length inside the L_S body (m)
$\Lambda = \lambda k_e \tau_E$	Dimensionless variable defined by $k_a{}^* \rho_S^{V_i} \tau_E \left(1 + \bar{K}^{*-1}\right)$
λ	Dimensionless variable defined by $k_a{}^* \rho_S^{V_i} \left(1 + \bar{K}^{*-1}\right) \Big/ k_e$
$-\mu_o$	Time constant defined by eqn (30) (s)
ν	Dummy temporal integration variable (s)
ξ_{L_S} and ξ	Dummy spatial integration variables (m)
$\rho_S^{V_i}$	Molar concentration of binding sites S smeared-out over the volume V_i (mol m^{-3})
ρ_o	Density of charges carried by the soft peripheral surface layer of the microorganism (C m^{-3})
ρ_{o,L_S}	Density of charges in the particulate ligand L_S (C m^{-3})
$\Sigma(t) = \int_0^t (J_u(\nu)/J_u{}^*)\mathrm{d}\nu$	Cumulative amount of internalised free M at t (s)
Σ_t	Time derivative of $\Sigma(t)$
Σ_{tt}	Second-order time derivative of $\Sigma(t)$
$-\tau_o$	Time constant defined by eqn (20) (s)
τ_d	Depletion time constant defined by $\tau_E/(1 + k_e\tau_L)$ (s)
$\tilde{\tau}_d$	Depletion time constant defined by $\tau_E \Big/ \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E + k_e \tau_L\right)$(s)
τ_E	Characteristic timescale for transfer of free M from bulk solution to the intracellular compartment (s)
τ_L	Characteristic timescale for M transfer through the membrane (s)
φ	Cell volume fraction (dimensionless)
$\varphi^\star$	Critical cell volume fraction defined by R_S/R_e (dimensionless)
$\varphi_{1/2}$	Value taken by φ such that $c_M^{\star,\infty}(\varphi_{1/2})/c_M^{\star,0} = 1/2$ (dimensionless)
$\bar{\phi}_u^{T,M,c}$	Defined by $k_e\phi_u^{T,M,c}/J_u{}^\star$ (dimensionless)
$\bar{\phi}_u^{c,0}$	Defined by $\bar{\phi}_u^c(0) = k_e\phi_u^c(0)/J_u{}^\star$ (dimensionless)
$\bar{\phi}_u^{T,0}$	Defined by $\bar{\phi}_u^T(0) = k_e\phi_u^T(0)/J_u{}^\star$ (dimensionless)
$\bar{\phi}_u^{M,0}$	Defined by $k_e\phi_u^{M,0}(0)/J_u{}^\star$ (dimensionless) with $\phi_u^{M,0} = \phi_u^M(0)$ (mol m^{-2})
$\Phi^T(t) = \int_0^t \bar{\phi}_u^T(\nu)\mathrm{d}\nu$	Amount of free and complexed metal species accumulated in the microorganism body between $t = 0$ and t (s)
$\phi_u^c(t)$	Concentration of intracellular ML_S complexes at time t (mol m^{-2})
$\phi_u^M(t)$	Concentration of intracellular free M at time t (mol m^{-2})
$\phi_u^T(t) = \phi_u^M(t) + \phi_u^c(t)$	Concentration of intracellular metal species (free and complexed) at time t (mol m^{-2})
$\psi^{int}(\xi_{L_S})$	Electrostatic potential distribution at the ligand L_S/intracellular solution interphase (V)
$\psi(r)$	Electrostatic potential distribution at the microorganism/solution interphase (V)
ψ_a	Electrostatic potential at the membrane surface (V)
ψ_D	Donnan potential (V)

References

1 K. J. Wilkinson and J. Buffle, in *Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces*, ed. H. P. van Leeuwen and W. Koster, John Wiley & Sons, Chichester, 2004, chapter 10, p. 445.
2 K. J. Wilkinson and J. Buffle, in *Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces*, ed. H. P. van Leeuwen and W. Koster, John Wiley & Sons, Chichester, 2004, chapter 4, p. 143.
3 H. P. Van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 3743–3748.
4 A. Tessier, J. Buffle and P. G. C. Campbell, in *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems; ed. J. Buffle and R. de Vitre*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994, pp. 199–232.
5 G. A. Jackson and J. Morgan, *J. Limnol. Oceanogr.*, 1978, **23**, 268.
6 M. Whitfield and D. R. Turner, in Chemical Modeling in Aqueous Systems, ed. E. A. Jenne, *ACS Symposium Series 93*, American Chemical Society, Washington, DC, 1979, pp. 657–680.
7 J. B. Best, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1955, **46**, 1–27.
8 S. Niyogi and C. M. Wood, *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 6177–6192.
9 S. L. Flynn, J. E. S. Szymanowski and J. B. Fein, *Chem. Geol.*, 2014, **374–375**, 110–116.
10 V. I. Slaveykova and K. J. Wilkinson, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 9–24.
11 J. P. Pinheiro and H. P. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35**, 894–900.
12 I. Worms, D. F. Simon, C. S. Hassler and K. J. Wilkinson, *Biochimie*, 2006, **88**, 1721–1731.
13 H. P. van Leeuwen, R. M. Town, J. Buffle, R. F. M. J. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk and L. Sigg, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 8545–8556.
14 P. Sánchez-Marín, C. Fortin and P. G. C. Campbell, *Environ. Chem.*, 2013, **10**, 80–90.
15 C. Fortin and P. G. C. Campbell, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2000, **19**, 2769–2778.
16 A. Crémazy, P. G. C. Campbell and C. Fortin, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 2408–2415.
17 C. S. Hassler and K. J. Wilkinson, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, **22**, 620–626.
18 T. N. P. Bosma, P. J. M. Middeldorp, G. Schraa and A. J. B. Zehnder, *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31**, 248–252.
19 J. F. L. Duval, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 9453–9469.
20 R. J. M. Hudson and F. M. M. Morel, *Deep-Sea Res.*, 1993, **40**, 129–150.
21 W. G. Sunda and S. A. Huntsman, *Limnol. Oceanogr.*, 1995, **40**, 1404–1417.
22 W. G. Sunda, in *Bioavailability and bioaccumulation of iron in the sea, The Biogeochemistry of Iron in Seawater*, ed. D. R. Turner and K. A. Hunter, New York, Wiley, 2001, pp. 41–84.
23 J. F. L. Duval, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7873–7888.
24 J. F. L. Duval and E. Rotureau, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 7401–7416.

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 06 October 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 16/11/2016 11:00:50.

25 J. F. L. Duval, N. Paquet, M. Lavoie and C. Fortin, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 6625–6636.
26 E. Rotureau, P. Billard and J. F. L. Duval, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 990–998.
27 R. Hajdu, J. P. Pinheiro, J. Galceran and V. I. Slaveykova, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 4597–4602.
28 J. P. Pinheiro, J. Galceran and H. P. Van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 2397–2405.
29 F. W. Outten and B. S. Twining*Metal Homeostasis: an Overview in Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 2007, John Wiley & Sons, New York, pp. 1–10.
30 E. Rotureau, J. F. L. Duval and H. P. Van Leeuwen, in *Dynamic metal sorption by environmental biocolloids, In Essential Reviews in Experimental Biology, Surface Chemistry, Bioavailability and Metal Homeostasis in Aquatic Organisms: An Integrated Approach. SEB Seminar Series*ed. N. R. Bury and R. D. Handy, SEB Press, London, 2010, vol. 2, Chapter 3, pp. 67–105.
31 J. A. Lemire, J. J. Harrison and R. J. Turner, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, **11**, 371–384.
32 M.-E. Krapf, B. Lartiges, C. Merlin, G. Francius, J. Ghanbaja and J. F. L. Duval, *Colloids Surf., B*, 2016, **139**, 285–293.
33 M.-E. Krapf, B. Lartiges, C. Merlin, G. Francius, J. Ghanbaja and J. F. L. Duval, *Water Res.*, 2012, **46**, 1838–1846.
34 G. Francius, P. Polyakov, J. Merlin, Y. Abe, J.-M. Ghigo, C. Merlin, C. Beloin and J. F. L. Duval, *PLoS One*, 2011, **6**(5), e20066.
35 J. F. L. Duval and F. Gaboriaud, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, **15**, 184–195.
36 S. Kuwabara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 1959, **14**, 527–532.
37 Z. Ma, F. E. Jacobsen and D. P. Giedroc, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4644–4681.
38 S. B. Falconer, W. Wang, S. S. Gehrke, J. D. Cuneo, J. F. Britten, G. D. Wright and E. D. Brown, *Chem. Biol.*, 2014, **21**, 136–145.
39 J. J. Benítez, A. M. Keller, D. L. Huffman, L. A. Y. Yatsunyk, A. C. Rosenzweig and P. Chen, *Faraday Discuss.*, 2011, **148**, 71–82.
40 J. P. Pinheiro, M. Minor and H. P. Van Leeuwen, *Langmuir*, 2005, **21**, 8635–8642.
41 J. F. L. Duval, J. P. Pinheiro and H. P. Van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 7137–7151.
42 J. F. L. Duval, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 2275–2293.
43 J. F. L. Duval and S. Qian, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 12791–12804.
44 H. P. Van Leeuwen and J. Buffle, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 7175–7183.
45 R. M. Town, J. F. L. Duval, J. Buffle and H. P. Van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 6489–6496.
46 R. M. Town, J. Buffle, J. F. L. Duval and H. P. Van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2013, **117**, 7643–7654.
47 H. P. Van Leeuwen, J. Buffle, J. F. L. Duval and R. M. Town, *Langmuir*, 2013, **29**, 10297–10302.
48 H. P. Van Leeuwen, R. M. Town and J. Buffle, *Langmuir*, 2011, **27**, 4514–4519.
49 P. Polyakov and J. F. L. Duval, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 1999–2010.
50 J. F. L. Duval and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 6443–6451.
51 J. M. Wood, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2011, **65**, 215–238.
52 J. F. L. Duval, K. J. Wilkinson, H. P. Van Leeuwen and J. Buffle, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 6435–6445.
53 F. M. M. Morel and J. Hering, *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*, John Wiley, New York, 2nd edn, 1993.
54 M. Eigen, *Pure Appl. Chem.*, 1963, **6**, 97–115.
55 J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2005, **21**, 3247–3258.
56 U. Ascher, J. Christiansen and R. D. Russel, *ACM T. Math. Software*, 1981, **7**, 209–222.

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics.
This journal is © the Owner Societies 2016

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY INFORMATION

Kinetic and thermodynamic determinants of trace metal partitioning at biointerphases: the role of intracellular speciation dynamics

Jérôme F.L. Duval,* Romain M. Présent, Elise Rotureau

CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC),
UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.
Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54501, France.

*Corresponding author: Jérôme F.L. Duval. E-mail address: jerome.duval@univ-lorraine.fr (J.F.L. Duval)
Tel: + 33 3 83 59 62 63. Fax: + 33 3 83 59 62 55.

N.B. If not explicitly indicated in this document, meanings of symbols are those defined in the glossary reported at the end of the main text. Here-listed references are given at the end of the document.

I. 1. Detailed derivations of eqns (19), (27).

Derivation of eqn (19). After differentiation of eqn (10) with respect to time and combination with eqns (10)-(11), we obtain

$$\frac{\mathrm{d}J_{\mathrm{u}}(t)}{\mathrm{d}t}-\frac{\mathrm{d}J_{\mathrm{M}}(t)}{\mathrm{d}t}=k_{\mathrm{e}}\left[(1+\lambda)J_{\mathrm{M}}(t)-\lambda J_{\mathrm{u}}(t)+k_{\mathrm{d}}^{*}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(t)\right], \tag{S1}$$

, where we used the definition $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(t)=\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t)+\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)$ for the total concentration of intracellular metal species (free and complexed) at *t*. Substituting the expression of $J_{\mathrm{M}}(t)$ given by eqn (8) and further introducing the mass transfer resistant $R_{\mathrm{T}}=1/\left(D_{\mathrm{M,out}}\overline{f}_{\mathrm{el}}a^{-1}\right)$, eqn (S1) leads to

$$\frac{\mathrm{d}J_{\mathrm{u}}(t)}{\mathrm{d}t}+k_{\mathrm{e}}\left(\lambda J_{\mathrm{u}}(t)-k_{\mathrm{d}}^{*}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(t)\right)-R_{\mathrm{T}}^{-1}\left[\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{M}}^{*}(t)}{\mathrm{d}t}+k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)c_{\mathrm{M}}^{*}(t)-\beta_{a}^{-1}\left(\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{M}}^{a}(t)}{\mathrm{d}t}+k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)c_{\mathrm{M}}^{a}(t)\right)\right]=0\,. \tag{S2}$$

In addition, after combining eqn (13) with eqn (11), it comes

$$\int_{a}^{r_{\mathrm{c}}}\xi^{2}\left[c_{\mathrm{M}}(\xi,t)-c_{\mathrm{M}}(\xi,0)\right]\mathrm{d}\xi=-a^{2}\left[\frac{\lambda}{1+\lambda}\int_{0}^{t}J_{\mathrm{u}}(\nu)\mathrm{d}\nu+\frac{1}{1+\lambda}\left(\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M,0}}\right)-\frac{k_{\mathrm{d}}^{*}}{1+\lambda}\int_{0}^{t}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(\nu)\mathrm{d}\nu\right]. \tag{S3}$$

After substitution of eqn (17) into eqn (S3) and subsequent derivation with respect to time, we further obtain

$$\int_a^{r_c} \xi^2 \left\{ \frac{\mathrm{d}c_\mathrm{M}(\xi,t)}{\mathrm{d}t} + k_\mathrm{e}(1+\lambda)\left[c_\mathrm{M}(\xi,t) - c_\mathrm{M}(\xi,0)\right] \right\} \mathrm{d}\xi = a^2 \left\{ k_\mathrm{e}\phi_\mathrm{u}^{\mathrm{M},0} - J_\mathrm{u}(t) - k_\mathrm{e}\int_0^t \left[\lambda J_\mathrm{u}(\nu) - k_\mathrm{d}^*\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}(\nu)\right]\mathrm{d}\nu \right\} \tag{S4}$$

Using eqn (16), eqn (S4) provides

$$\frac{J_\mathrm{u}(t)}{J_\mathrm{u}^*} - \Omega_1\left(\frac{\mathrm{d}c_\mathrm{M}^*(t)}{\mathrm{d}t} + k_\mathrm{e}(1+\lambda)c_\mathrm{M}^*(t)\right) - 2\beta_a^{-1}\Omega_2\left(\frac{\mathrm{d}c_\mathrm{M}^a(t)}{\mathrm{d}t} + k_\mathrm{e}(1+\lambda)c_\mathrm{M}^a(t)\right) +$$

$$\frac{k_\mathrm{e}}{J_\mathrm{u}^*}\int_0^t \left[\lambda J_\mathrm{u}(\nu) - k_\mathrm{d}^*\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}(\nu)\right]\mathrm{d}\nu + k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{o} = 0 \tag{S5}$$

, where τ_o depends on the initial conditions as specified by eqn (20).

Eliminating the term $\frac{\mathrm{d}c_\mathrm{M}^*(t)}{\mathrm{d}t} + k_\mathrm{e}(1+\lambda)c_\mathrm{M}^*(t)$ between eqn (S2) and eqn (S5), we finally obtain

$$\frac{\Delta\tau}{J_\mathrm{u}^*}\frac{\mathrm{d}J_\mathrm{u}(t)}{\mathrm{d}t} + \frac{J_\mathrm{u}(t)}{J_\mathrm{u}^*}(k_\mathrm{e}\lambda\Delta\tau - 1) - \frac{k_\mathrm{e}k_\mathrm{d}^*}{J_\mathrm{u}^*}\Delta\tau\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}(t) - \frac{\tau_\mathrm{L}}{K_\mathrm{M}}\left(\frac{\mathrm{d}c_\mathrm{M}^a(t)}{\mathrm{d}t} + k_\mathrm{e}(1+\lambda)c_\mathrm{M}^a(t)\right) -$$

$$\frac{k_\mathrm{e}}{J_\mathrm{u}^*}\int_0^t \left[\lambda J_\mathrm{u}(\nu) - k_\mathrm{d}^*\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}(\nu)\right]\mathrm{d}\nu - k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{o} = 0 \tag{S6}$$

, where we used the relationship $\tau_\mathrm{L} = -K_\mathrm{M}\beta_a^{-1}(\Omega_1 + 2\Omega_2)$ [1] and $\Delta\tau = \tau_\mathrm{L} - \tau_\mathrm{E} = J_\mathrm{u}^*\Omega_1 R_\mathrm{T}$ derived from eqn (22) in the main text. Introducing the dimensionless variable $\Sigma(t) = \int_0^t \left(J_\mathrm{u}(\nu)/J_\mathrm{u}^*\right)\mathrm{d}\nu$ and $\Phi^\mathrm{T}(t) = \int_0^t \overline{\phi}_\mathrm{u}^\mathrm{T}(\nu)\mathrm{d}\nu$ defined in the main text, eqn (S6) can be rewritten in the form

$$\Delta\tau\Sigma_{tt} + \Sigma_t(k_\mathrm{e}\lambda\Delta\tau - 1) - k_\mathrm{d}^*\Delta\tau\Phi_t^\mathrm{T} - \tau_\mathrm{L}\frac{\Sigma_{tt}}{(1-\Sigma_t)^2} - k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}(1+\lambda)\frac{\Sigma_t}{1-\Sigma_t} - k_\mathrm{e}\lambda\Sigma(t) + k_\mathrm{d}^*\Phi^\mathrm{T}(t) - k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{o} = 0 \tag{S7}$$

, where we used the relationships $J_\mathrm{u}(t)/J_\mathrm{u}^* = \Sigma_t$, $c_\mathrm{M}^\mathrm{a}(t) = K_\mathrm{M}\Sigma_t/(1-\Sigma_t)$ and $\frac{\mathrm{d}c_\mathrm{M}^a(t)}{\mathrm{d}t} = \frac{K_\mathrm{M}\Sigma_{tt}}{(1-\Sigma_t)^2}$.

After rearrangements, eqn (S7) finally becomes

$$\Sigma_{tt} = \frac{(1-\Sigma_t)^2\left[k_\mathrm{e}(\tau_\mathrm{o} + \lambda\Sigma(t)) - k_\mathrm{d}^*\left[\Phi^\mathrm{T}(t) - \Phi_t^\mathrm{T}\Delta\tau\right]\right] + \Sigma_t(1-\Sigma_t)\left[(1-\Sigma_t)(1-\lambda k_\mathrm{e}\Delta\tau) + k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}(1+\lambda)\right]}{\Delta\tau(1-\Sigma_t)^2 - \tau_\mathrm{L}} \tag{S8}$$

, which is eqn (19) in the main text.

Derivation of eqn (27). Rewriting eqn (S2) in terms of $\Sigma(t)=\int_0^t\left(J_{\mathrm{u}}(\nu)/J_{\mathrm{u}}^*\right)\mathrm{d}\nu$ and $\Phi^{\mathrm{T}}(t)$ $=\int_0^t\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(\nu)\mathrm{d}\nu$, we obtain after arrangements

$$\frac{\mathrm{d}\overline{c}_{\mathrm{M}}^*(t)}{\mathrm{d}t}=-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)\overline{c}_{\mathrm{M}}^*(t)+\left\{\Sigma_{tt}\left(Bn^{-1}+\frac{1}{(1-\Sigma_t)^2}\right)+k_{\mathrm{e}}\Sigma_t\left(\lambda Bn^{-1}+\frac{1+\lambda}{1-\Sigma_t}\right)-Bn^{-1}k_{\mathrm{d}}^*\Phi_t^{\mathrm{T}}\right\}/x_{\mathrm{o}} \tag{S9}$$

, where we used the relationship $R_{\mathrm{T}}J_{\mathrm{u}}^*=\beta_a^{-1}Bn^{-1}K_{\mathrm{M}}$ recalling that $Bn^{-1}=R_{\mathrm{T}}/R_{\mathrm{S}}$, $J_{\mathrm{u}}^*=K_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}K_{\mathrm{M}}$ and $R_{\mathrm{S}}=1/\left(k_{\mathrm{int}}K_{\mathrm{H}}\beta_a\right)$. Equation (S9) identifies with eqn (27) in the main text.

I. 2. Demonstration of eqns (23), (24).

Demonstration of eqn (23). Under the electrostatic conditions detailed in the main text ($\psi(a\le r\le r_{\mathrm{o}})\equiv<\psi>$ and $\psi(r_{\mathrm{o}}\le r\le r_{\mathrm{c}})=0$), the time constant τ_{L} defined by eqn (21) reduces to[1,2]

$$\tau_{\mathrm{L}}=\frac{1}{S_aK_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}}\left(V_{\mathrm{soft}}+\frac{V_{\mathrm{p}}}{\beta_a\varphi}\right). \tag{S10}$$

Further introducing the critical volume fraction $\varphi^*=k_{\mathrm{e}}V_{\mathrm{p}}/\left(S_aK_{\mathrm{H}}k_{\mathrm{int}}\beta_a\right)$ in eqn (S10), we obtain the dimensionless form of τ_{L} provided by

$$k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=\varphi^*\left(\overline{V}+\varphi^{-1}\right) \tag{S11}$$

, which is eqn (23) in the main text with $\overline{V}=\beta_aV_{\mathrm{soft}}/V_{\mathrm{p}}$.

Demonstration of eqn (24). The time constant τ_{E} is provided by the expression[1]

$$\tau_{\mathrm{E}}=\left\{V_{\mathrm{soft}}+V_{\mathrm{p}}/(\varphi\beta_a)+k_{\mathrm{int}}K_{\mathrm{H}}aV_{\mathrm{p}}/\left(\varepsilon\varphi D_{\mathrm{M,out}}\right)\left[\varepsilon\alpha(1-\gamma_{\mathrm{o}})+(1-\alpha)/\beta_a-\gamma_{\mathrm{a}}\varepsilon/2\right]\right\}/\left(S_{\mathrm{a}}k_{\mathrm{int}}K_{\mathrm{H}}\right) \tag{S12}$$

with $\alpha=a/r_{\mathrm{o}}$, $\gamma_{\mathrm{o}}=r_{\mathrm{o}}/r_{\mathrm{c}}$ and $\gamma_{\mathrm{a}}=a/r_{\mathrm{c}}$. Equations (S11) and (S12) hold at sufficiently low volume fractions φ and for constant electrostatic potential inside the soft surface layer of the microorganism and zero potential at the electrolyte side of the interphase. Using eqn (S10), eqn (S12) can be rewritten

$$\tau_{\mathrm{E}}=\tau_{\mathrm{L}}\left[1+Bn^{-1}\frac{\overline{f}_{\mathrm{el}}}{\left(1+\overline{V}\varphi\right)}\left(\alpha(1-\gamma_{\mathrm{o}})+(\varepsilon\beta_a)^{-1}(1-\alpha)-\gamma_{\mathrm{a}}/2\right)\right]. \tag{S13}$$

Realizing that $r_{\mathrm{c}}=r_{\mathrm{o}}\varphi^{-1/3}$ and $\gamma_{\mathrm{a}}=\alpha\varphi^{1/3}$, it comes

$$\tau_{\mathrm{E}}=\tau_{\mathrm{L}}\left\{1+Bn^{-1}\frac{\overline{f}_{\mathrm{el}}}{\left(1+\overline{V}\varphi\right)}\left[(\varepsilon\beta_a)^{-1}\left(1-\frac{a}{r_{\mathrm{o}}}\right)+\frac{a}{r_{\mathrm{o}}}\left(1-\frac{3}{2}\varphi^{1/3}\right)\right]\right\}. \tag{S14}$$

In addition, with help of eqn (9) it can be shown that under the electrostatic conditions of interest in this work $\overline{f}_{\mathrm{el}}$ reduces to $\overline{f}_{\mathrm{el}} = \left[(\varepsilon\beta_a)^{-1}\left(1-\frac{a}{r_{\mathrm{o}}}\right) + \frac{a}{r_{\mathrm{o}}}\left(1-\varphi^{1/3}\right)\right]^{-1}$. Substituting into eqn (S14) and expanding the result for $\varphi << 1$ that holds for dilute suspensions of microorganisms (case treated in the main text), we obtain eqn (24) with $\zeta \approx 1 - \frac{\varphi^{1/3}/2}{1+(\varepsilon\beta_a)^{-1}(r_{\mathrm{o}}/a-1)}$. The value of ζ is close to unity as the term $1+(\varepsilon\beta_a)^{-1}(r_{\mathrm{o}}/a-1)$ satisfies $1+(\varepsilon\beta_a)^{-1}(r_{\mathrm{o}}/a-1) \geq 1$. Accordingly, for the sake of mathematical simplification the φ-dependent term $\frac{\varphi^{1/3}/2}{1+(\varepsilon\beta_a)^{-1}(r_{\mathrm{o}}/a-1)}$ involved in ζ was discarded for the derivation of eqns (40) and (41) in the main text.

II. 1. Demonstration of eqns (29)-(31) and detailed expressions of the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\overline{K}^*\right)/c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\overline{K}^*=0\right)$.

Demonstration of eqns (29), (30). In the equilibrium regime reached at $t \to \infty$, eqn (25) provides $\Sigma_t(\infty) - \Phi_t^{\mathrm{T}}(\infty) + \overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty) = 0$ while eqn (26) yields $\Phi_t^{\mathrm{T}}(\infty) = \left(1+\overline{K}^{*^{-1}}\right)\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty)$. Combination of these two equations further leads to

$$\Phi_t^{\mathrm{T}}(\infty) = \left(1+\overline{K}\right)\Sigma_t(\infty). \tag{S15}$$

Substituting eqn (S15) into eqn (27) in the limit $t \to \infty$ where $\Sigma_{tt}(\infty) = 0$ and $\mathrm{d}\overline{c}_{\mathrm{M}}^*(\infty)/\mathrm{d}t = 0$, it comes after rearrangements

$$c_{\mathrm{M}}^{a,\infty} = \beta_a c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} \tag{S16}$$

, where we used the relationships $\lambda k_{\mathrm{e}} = k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}\left(1+\overline{K}^{*^{-1}}\right) = k_{\mathrm{d}}^*\left(1+\overline{K}^*\right)$ derived from eqn (18) and from $\overline{K}^* = k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} / k_{\mathrm{d}}^*$, and the equality $c_{\mathrm{M}}^{a,\infty} = K_{\mathrm{M}}\Sigma_t(\infty)/\left(1-\Sigma_t(\infty)\right)$. As argued in the text, eqn (S16) legitimates the systematic applicability of the (thermodynamic) BLM formalism at $t \to \infty$. Further substitution of eqn (S15) into eqn (19) taken at $t \to \infty$ yields after simplification

$$\left[1-\Sigma_t(\infty)\right]\left[k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}} + k_{\mathrm{e}}\lambda\Sigma(\infty) - k_{\mathrm{d}}^*\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)\right] + \Sigma_t(\infty)\left[1-\Sigma_t(\infty) + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}(1+\lambda)\right] = 0. \tag{S17}$$

In the following, we express $\Sigma(\infty)$ and $\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)$ as a function of $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}$, recalling that surface and bulk M concentrations are interrelated *via* eqn (S16) in the here-examined equilibrium regime. The integration of eqn (11) between $t=0$ and $t\to\infty$ leads to

$$\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}=J_{\mathrm{u}}^{*}\Sigma(\infty)-\left(k_{\mathrm{e}}+k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}\right)x_{\mathrm{M}}^{\infty}+k_{\mathrm{d}}^{*}x_{\mathrm{c}}^{\infty} \tag{S18}$$

, where we introduced $x_{\mathrm{M}}^{\infty}=\int_0^{\infty}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t)\mathrm{d}t$ and $x_{\mathrm{c}}^{\infty}=\int_0^{\infty}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)\mathrm{d}t$. Similarly, the integration of eqn (12) between $t=0$ and $t\to\infty$ provides

$$\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c},0}=k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}x_{\mathrm{M}}^{\infty}-k_{\mathrm{d}}^{*}x_{\mathrm{c}}^{\infty}\,. \tag{S19}$$

Solving eqn (S18)-(S19) in $x_{\mathrm{M,c}}^{\infty}$, we obtain

$$\begin{cases} x_{\mathrm{c}}^{\infty}=-\dfrac{\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}-J_{\mathrm{u}}^{*}\Sigma(\infty)+\left(1+\dfrac{1+\bar{K}^{*-1}}{\lambda}\right)\left(\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c},0}\right)}{k_{\mathrm{e}}\bar{K}^{*-1}} \\ x_{\mathrm{M}}^{\infty}=-\dfrac{\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}+\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c},0}-J_{\mathrm{u}}^{*}\Sigma(\infty)}{k_{\mathrm{e}}} \end{cases}. \tag{S20a,b}$$

Using eqn (S20), it is straightforward to show that $\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)=k_{\mathrm{e}}\left(x_{\mathrm{M}}^{\infty}+x_{\mathrm{c}}^{\infty}\right)/J_{\mathrm{u}}^{*}$ is defined after reduction by

$$\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)=-\left(1+\bar{K}^{*}\right)\left[-\Sigma(\infty)+\frac{\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}+\left(\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty)-\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c},0}\right)(1+1/\lambda)}{J_{\mathrm{u}}^{*}}\right]. \tag{S21}$$

Equation (12) at equilibrium further yields $\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(\infty)/\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(\infty)=\bar{K}^{*}$ while eqn (10) in the equilibrium limit leads to $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(\infty)=J_{\mathrm{u}}(\infty)/k_{\mathrm{e}}=J_{\mathrm{u}}^{*}\Sigma_{t}(\infty)/k_{\mathrm{e}}$. Substitution of these expressions into eqn (S21) gives

$$\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)=\left(1+\bar{K}^{*}\right)\alpha_{\mathrm{o}}+\left(1+\bar{K}^{*}\right)\left\{\Sigma(\infty)-k_{\mathrm{e}}^{-1}\Sigma_{t}(\infty)\left[1+\bar{K}^{*}(1+1/\lambda)\right]\right\} \tag{S22}$$

, where we introduced the constant $\alpha_{\mathrm{o}}=\left[\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}+\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c},0}(1+1/\lambda)\right]/J_{\mathrm{u}}^{*}$. From eqn (S22), we infer

$$\left(1+\bar{K}^{*}\right)\Sigma(\infty)-\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)=-\left(1+\bar{K}^{*}\right)\alpha_{0}+\left(1+\bar{K}^{*}\right)k_{\mathrm{e}}^{-1}\Sigma_{t}(\infty)\left[1+\bar{K}^{*}(1+1/\lambda)\right]. \tag{S23}$$

Realizing that the term $k_{\mathrm{e}}\lambda\Sigma(\infty)-k_{\mathrm{d}}^{*}\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)$ in eqn (S17) can be rewritten in the form $k_{\mathrm{d}}^{*}\left[\left(1+\bar{K}^{*}\right)\Sigma(\infty)-\Phi^{\mathrm{T}}(\infty)\right]$, it comes after combining eqn (S23) and eqn (S17)

$$A\Sigma_{t,\infty}^{2}+B\Sigma_{t,\infty}+C=0 \tag{S24}$$

, where we wrote $\Sigma_{t,\infty} = \Sigma_t(\infty)$ for shortening notations, and the coefficients A, B and C are here defined by $A = -\left[1+\lambda+\bar{K}^*(1+\lambda)\right]$, $B = 1+\lambda+\bar{K}^*(1+\lambda)+k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}(1+\lambda)-k_\mathrm{e}(\tau_\mathrm{o}-\lambda\alpha_\mathrm{o})$ and $C = k_\mathrm{e}(\tau_\mathrm{o}-\lambda\alpha_\mathrm{o})$. The second-order polynomial equation (S24) in $\Sigma_{t,\infty}$ can be transformed into a second-order polynomial expression in terms of the variable $c_\mathrm{M}^{a,\infty}/K_\mathrm{M}$ with proper use of the equivalence $c_\mathrm{M}^{a,\infty}/K_\mathrm{M} = \Sigma_{t,\infty}/(1-\Sigma_{t,\infty})$. After algebraic arrangements, the final result reads as

$$\left(c_\mathrm{M}^{a,\infty}/K_\mathrm{M}\right)^2 + \left[1+\frac{1+\bar{K}^*}{k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}+\frac{\tau_\mathrm{o}-\lambda\alpha_\mathrm{o}}{\tau_\mathrm{L}(1+\lambda)}\right]\left(c_\mathrm{M}^{a,\infty}/K_\mathrm{M}\right)+\frac{\tau_\mathrm{o}-\lambda\alpha_\mathrm{o}}{\tau_\mathrm{L}(1+\lambda)} = 0\,. \tag{S25}$$

As $\tau_\mathrm{o}-\lambda\alpha_\mathrm{o}$ is always strictly negative, the discriminant of the quadratic eqn (S25) is positive. After calculation, it is demonstrated that the physically-relevant solution $c_\mathrm{M}^{a,\infty}$ of eqn (S25) is then expressed by

$$c_\mathrm{M}^{a,\infty}/K_\mathrm{M} = \frac{1}{2}\left\{-\left(1+\frac{\mu_\mathrm{o}}{\tau_\mathrm{L}}+\frac{1+\bar{K}^*}{k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}\right)+\frac{1+\bar{K}^*}{k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}\left\{1+\frac{2k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}{1+\bar{K}^*}\left(1+\frac{\mu_\mathrm{o}}{\tau_\mathrm{L}}\right)+\left[\frac{k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}{1+\bar{K}^*}\left(1-\frac{\mu_\mathrm{o}}{\tau_\mathrm{L}}\right)\right]^2\right\}^{1/2}\right\} \tag{S26}$$

, with $\mu_\mathrm{o} = (\tau_\mathrm{o}-\lambda\alpha_\mathrm{o})/(1+\lambda)$ (<0) and τ_o defined by eqn (20). Equation (29) in the main text directly follows from eqn (S26) using the equilibrium expression (S16). The time constant $-\mu_\mathrm{o}$ in eqn (S26) simplifies after some developments into

$$k_\mathrm{e}\mu_\mathrm{o} = k_\mathrm{e}\left(\Omega_1 c_\mathrm{M}^{*,0}+2\beta_a^{-1}\Omega_2 c_\mathrm{M}^{a,0}\right)-\bar{\phi}_\mathrm{u}^{\mathrm{T},0}\,. \tag{S27}$$

Using the relationship $\tau_\mathrm{L} = -K_\mathrm{M}\beta_a^{-1}(\Omega_1+2\Omega_2)$,[1] it comes

$$k_\mathrm{e}\mu_\mathrm{o} = \frac{k_\mathrm{e}\Delta\tau}{J_\mathrm{u}^* R_\mathrm{T}}c_\mathrm{M}^{*,0}\Delta\bar{c}_\mathrm{o}-\frac{k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}{K_\mathrm{M}}c_\mathrm{M}^{a,0}-\bar{\phi}_\mathrm{u}^{\mathrm{T},0} \tag{S28}$$

Further using the equality $R_\mathrm{T}J_\mathrm{u}^* = \beta_a^{-1}Bn^{-1}K_\mathrm{M}$ and the definition $x_\mathrm{o} = \left[K_\mathrm{M}/\left(\beta_\mathrm{a}c_\mathrm{M}^{*,0}\right)\right]^{-1}$, we finally obtain

$$k_\mathrm{e}\mu_\mathrm{o} = k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}\left[(1-\tau_\mathrm{E}/\tau_\mathrm{L})\Delta\bar{c}_\mathrm{o}x_\mathrm{o}Bn-c_\mathrm{M}^{a,0}/K_\mathrm{M}\right]-\bar{\phi}_\mathrm{u}^{\mathrm{T},0} \tag{S29}$$

, which is eqn (30) in the main text.

Demonstration of eqn (31). Starting from eqn (29), the ratio $c_\mathrm{M}^{*,\infty}(\bar{K}^*)/c_\mathrm{M}^{*,\infty}(\bar{K}^*=0)$ can be formulated according to

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}=\frac{-\left(1+\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}+\frac{1+\bar{K}^{*}}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\right)+\frac{1+\bar{K}^{*}}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\left\{1+\frac{2k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}{1+\bar{K}^{*}}\left(1+\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)+\left[\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}{1+\bar{K}^{*}}\left(1-\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)\right]^{2}\right\}^{1/2}}{-\left(1+\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}+\frac{1}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\right)+\frac{1}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\left\{1+2k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)+\left[k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1-\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)\right]^{2}\right\}^{1/2}} \tag{S30}$$

Under the peculiar condition $1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=0$, eqn (S30) simplifies into

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}=\frac{-\bar{K}^{*}+\left(1+\bar{K}^{*}\right)\left[1-\frac{2}{1+\bar{K}^{*}}+\left(\frac{1+2k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}}{1+\bar{K}^{*}}\right)^{2}\right]^{1/2}}{2\left[k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}\left(1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}\right)\right]^{1/2}} \tag{S31}$$

, while for $1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\neq 0$, eqn (S30) can be rewritten in the form

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}=\frac{-\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]-\bar{K}^{*}+\left(1+\bar{K}^{*}\right)\left[1+\frac{2k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)}{1+\bar{K}^{*}}+\left(\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1-\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)}{1+\bar{K}^{*}}\right)^{2}\right]^{1/2}}{-\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]\left\{1+\sigma\left[1-\frac{4k_{\mathrm{e}}^{2}\mu_{\mathrm{o}}\tau_{\mathrm{L}}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]^{2}}\right]^{1/2}\right\}} \tag{S32}$$

, where we introduced $\sigma=\mp 1$ for $1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\gtrless 0$. The complex stability constant $\bar{K}_{1/2}^{*}$ introduced in §II.5 corresponds to the value taken by $\bar{K}^{*}$ such that the equation $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=\bar{K}_{1/2}^{*}\right)=c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)/2$ is verified. For situations where $1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=0$, this equation can be solved with use of eqn (S31) and, after developments, we obtain the following solution

$$\bar{K}_{1/2}^{*}=3\sqrt{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)}/2 \tag{S33}$$

, which is eqn (31a). For situations where $1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\neq 0$, using eqn (S32) the equality $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=\bar{K}_{1/2}^{*}\right)=c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)/2$ leads after lengthy algebra and simplifications to the result

$$\bar{K}_{1/2}^{*}=\frac{3k_{\mathrm{e}}^{2}\tau_{\mathrm{L}}\mu_{\mathrm{o}}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]\left\{1+\sigma\sqrt{1-\frac{4k_{\mathrm{e}}^{2}\tau_{\mathrm{L}}\mu_{\mathrm{o}}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]^{2}}}\right\}}-\frac{1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)}{2} \tag{S34}$$

, which identifies with eqn (31b).

II. 2. Physical interpretation of the term $\left(1+\bar{K}^*\right)/\left(k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}\right)$.

As indicated in the main text (§II.5), eqns (11)-(12) considered at $t\to\infty$ provide $\bar{\phi}_\mathrm{u}^\mathrm{c}\left(\infty\right)/\bar{\phi}_\mathrm{u}^\mathrm{M}\left(\infty\right)=\bar{K}^*$ and $\bar{\phi}_\mathrm{u}^\mathrm{T}\left(\infty\right)=\left(1+\bar{K}^*\right)\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}/\left(K_\mathrm{M}+\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}\right)$. The latter expression can be rearranged in the form $\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}\left(\infty\right)=k_\mathrm{e}^{-1}J_\mathrm{u}^*\left(1+\bar{K}^*\right)\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}K_\mathrm{M}^{-1}/\left(1+\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}/K_\mathrm{M}\right)$. In addition, eqn (23) is equivalent to $k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}=k_\mathrm{e}\left[V_\mathrm{soft}+\left(\beta_a\varphi\right)^{-1}V_\mathrm{p}\right]/\left(K_\mathrm{H}k_\mathrm{int}S_\mathrm{a}\right)$ so that $K_\mathrm{H}k_\mathrm{int}$ can be expressed as a function of τ_L according to $K_\mathrm{H}k_\mathrm{int}=\left[V_\mathrm{soft}+\left(\beta_a\varphi\right)^{-1}V_\mathrm{p}\right]/\left(S_\mathrm{a}\tau_\mathrm{L}\right)$. In turn, substituting the latter expression in the above equation defining $\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}\left(\infty\right)$, we obtain

$$\frac{1+\bar{K}^*}{k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}}=\frac{S_\mathrm{a}c_\mathrm{p}\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}\left(\infty\right)}{c_\mathrm{M}^{*,\infty}}\times\frac{1+\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}/K_\mathrm{M}}{1+\bar{V}\varphi} \tag{S35}$$

, where we further used the relationships $c_\mathrm{p}=\varphi/V_\mathrm{p}$ and $J_\mathrm{u}^*=k_\mathrm{int}K_\mathrm{H}K_\mathrm{M}$. The quantity $S_\mathrm{a}c_\mathrm{p}\phi_\mathrm{u}^\mathrm{T}\left(\infty\right)$ in eqn (S35) corresponds to the amount of (free and complexed) metal forms accumulated at $t\to\infty$ in the overall (intracellular) volume occupied by the microorganisms present at a cell number density c_p. The term $\left(1+\bar{V}\varphi\right)^{-1}\approx 1-\bar{V}\varphi$ corrects c_p determined on the basis of the volume V_p of a microorganism for the presence of a soft peripheral corona where metals are not accumulated after internalisation. The term $1+\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}/K_\mathrm{M}$ accounts for the finite number of internalisation sites at the membrane surface with the limits $\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}/K_\mathrm{M}<<1$ and $\beta_a c_\mathrm{M}^{*,\infty}/K_\mathrm{M}>>1$ corresponding to the Henry and saturation adsorption regimes, respectively. In turn, the quantity $\left(1+\bar{K}^*\right)/\left(k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}\right)$ is analogous to a dimensionless thermodynamic constant of an equilibrium reaction ($t\to\infty$) pertaining to the conversion of bulk free metal ions into internalized free and complexed metal forms in the overall microorganism suspension. In the (unrealistic) situation where $\bar{V}\to\infty$, which applies for microorganisms with very thick surface layer compared to the typical dimension of their cytoplasm, we have $\left(1+\bar{K}^*\right)/\left(k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}\right)\to 0$ meaning that the accumulation of metals is thermodynamically unfavorable, which is physically consistent. In addition, increasing $\bar{K}^*$ at fixed $k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}$ displaces the reaction toward the formation of $\mathrm{ML_S}$ complexes. Conversely, increasing $k_\mathrm{e}\tau_\mathrm{L}$ at fixed $\bar{K}^*$ favors the excretion of internalized free metal forms and thus leads to a

decrease in $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(\infty)$. In the saturation regime $\beta_a c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / K_{\mathrm{M}} >> 1$, we have $\frac{1+\bar{K}^*}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}} = \frac{\beta_a S_{\mathrm{a}} c_{\mathrm{p}} \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(\infty)}{K_{\mathrm{M}}\left(1+\bar{V}\varphi\right)}$ whereas the result $\frac{1+\bar{K}^*}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}} = \frac{S_{\mathrm{a}} c_{\mathrm{p}} \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}(\infty)}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(1+\bar{V}\varphi\right)}$ applies in the Henry regime $\beta_a c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / K_{\mathrm{M}} << 1$.

II. 3. Formal demonstration of the relationship $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* >> 1\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right) \to 0$.

After simplification of eqn (S2) taken in the limit $t \to \infty$ under conditions allowing for a neglect of the intracellular ML_S complex dissociation step (condition satisfied for $\bar{K}^* >> 1$**)**, we obtain

$$\frac{\lambda}{1+\lambda} R_{\mathrm{T}} J_{\mathrm{u}}^* \frac{c_{\mathrm{M}}^{a,\infty}}{K_{\mathrm{M}} + c_{\mathrm{M}}^{a,\infty}} - \left(c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} - \beta_a^{-1} c_{\mathrm{M}}^{a,\infty}\right) = 0 \tag{S36}$$

, where we used eqn (7). After some algebra, eqn (S36) can be transformed in the polynomial equation

$$\left(x^{a,\infty}\right)^2 + x^{a,\infty}\left(1 - x^{*,\infty} + \frac{\lambda}{1+\lambda} Bn^{-1}\right) - x^{*,\infty} = 0 \tag{S37}$$

, where we defined the dimensionless $x^{a,\infty} = c_{\mathrm{M}}^{a,\infty} / K_{\mathrm{M}}$ and $x^{*,\infty} = \beta_a c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / K_{\mathrm{M}}$. The equilibrium eqn (S37) (valid for $\bar{K}^* >> 1$**)** must be satisfied irrespective of the value taken by Bn^{-1} and λ and it must further be consistent with the thermodynamic Boltzmann relationship $x^{a,\infty} = x^{*,\infty}$ (or $c_{\mathrm{M}}^{a,\infty} = \beta_a c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}$) that necessarily applies at equilibrium (see main text, §5). The only solution satisfying these conditions is $x^{a,\infty} = x^{*,\infty} = 0$, which demonstrates that bulk metal concentration at $t \to \infty$ and at $\bar{K}^* >> 1$ is 0, *i.e.* $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* >> 1\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right) \to 0$.

II. 4. Detailed asymptotic behavior of eqn (29) for $\bar{K}^* << 1$ and $\bar{K}^* >> 1$, and details on the behavior of eqn (31) at $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} << 1$ and $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} >> 1$ (Table S1).

The Taylor series expansions of eqns (S31)-(S32) with respect to $\bar{K}^*$ and $1/\bar{K}^*$ are useful for apprehending the behavior of $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^*\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right)$ at $\bar{K}^* << 1$ and $\bar{K}^* >> 1$, respectively. After calculations with help of Mathcad software (version 15, PTC), we obtain the results collected in **Table S1** and written in reduced forms. The expressions of $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^*\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ (defined by eqn (29)) in the limits $\bar{K}^* << 1$ and $\bar{K}^* >> 1$ are simply obtained from the results given in **Table S1** using the relation $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^*\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,0} = c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^*\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right) \times c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ where $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right) / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ is provided by

$$c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)/c_{\mathrm{M}}^{*,0}=\frac{1}{2x_{\mathrm{o}}}\left\{-\left(1+\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}+\frac{1}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\right)+\frac{1}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\left\{1+2k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)+\left[k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1-\frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)\right]^{2}\right\}^{1/2}\right\} \quad \text{(S38)}$$

, which is derived from eqn (29) taken at $\bar{K}^{*}=0$.

Similarly, the limiting behavior of $\bar{K}_{1/2}^{*}$ at $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}<<1$ and $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}>>1$ is described by the Taylor series expansions provided in **Table S1** where we discriminate between cases $k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}>-1$, $k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}=-1$ and $k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}<-1$. The limiting expressions given in **Table S1** corresponds to the curves denoted as (a) and (b) in **Figures 2A-2B**.

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}$$

$$\bar{K}^{*}<<1:\quad \begin{cases}\text{for } 1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=0: & \dfrac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}\approx 1-\dfrac{\bar{K}^{*}}{2\sqrt{k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}\left(1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}\right)}}\\[2ex] \text{for } 1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\neq 0: & \dfrac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}\approx 1+\dfrac{\sigma\bar{K}^{*}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]\left\{1-\dfrac{4k_{\mathrm{e}}^{2}\mu_{\mathrm{o}}\tau_{\mathrm{L}}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]^{2}}\right\}^{1/2}}\end{cases}$$

$$\bar{K}^{*}>>1:\quad \begin{cases}\text{for } 1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=0: & \dfrac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}\approx\dfrac{\sqrt{k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}\left(1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}\right)}}{\bar{K}^{*}}\\[2ex] \text{for } 1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\neq 0: & \dfrac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)}\approx\dfrac{2k_{\mathrm{e}}^{2}\mu_{\mathrm{o}}\tau_{\mathrm{L}}}{\bar{K}^{*}\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]\left\{1+\sigma\left[1-\dfrac{4k_{\mathrm{e}}^{2}\mu_{\mathrm{o}}\tau_{\mathrm{L}}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left(1+\mu_{\mathrm{o}}/\tau_{\mathrm{L}}\right)\right]^{2}}\right]^{1/2}\right\}}\end{cases}$$

$$\bar{K}_{1/2}^{*}$$

$$k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}<<1:\quad \begin{cases}\text{for } k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}>-1: & \bar{K}_{1/2}^{*}=1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}+\dfrac{1-k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}/2}{1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}}k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\\[2ex] \text{for } k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}=-1: & \bar{K}_{1/2}^{*}=\dfrac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}{4}+\dfrac{3\sqrt{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}}{2}\\[2ex] \text{for } k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}<-1: & \bar{K}_{1/2}^{*}=-\dfrac{1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}}{2}-\dfrac{1/2-k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}}{1+k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}}k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\end{cases}\qquad k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}>>1:\ \bar{K}_{1/2}^{*}=1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}-\frac{k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}}}{2}$$

Table S1. Taylor series expansions for the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}\right)/c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)$ at $\bar{K}^{*}<<1$ and $\bar{K}^{*}>>1$ (indicated) and for $\bar{K}_{1/2}^{*}$ in the limits $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}<<1$ and $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}>>1$ (indicated). Results are valid up to first order terms in $\bar{K}^{*}$ or $1/\bar{K}^{*}$, $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ or $1/\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$.

II. 5. Evolution of the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}\right)/c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^{*}=0\right)$ with $\bar{K}^{*}$ at different $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ (Figure S1).

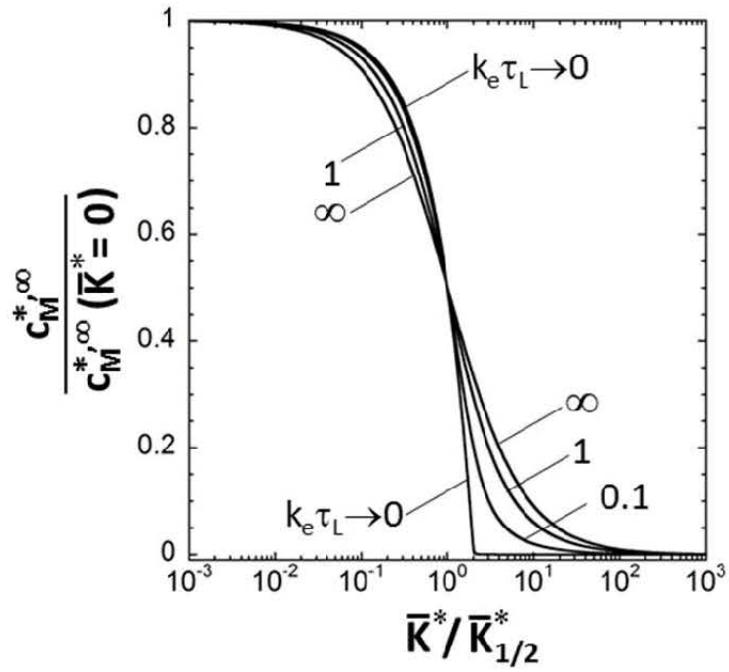


Figure S1. Dependence of the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\bar{K}^* = 0\right)$ on $\bar{K}^* / \bar{K}_{1/2}^*$ at various values of $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ (indicated). Simulations are given for $k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}} = -5/2$.

III. 1. Derivation of eqn (32) valid for strong ML_S complexes ($\bar{K}^* >> 1$).

For strong intracellular ML_S complexes, eqn (27) becomes after rearrangements

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{M}}^*(t)}{\mathrm{d}t} = -k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)c_{\mathrm{M}}^*(t) + \beta_a^{-1}\left\{\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{M}}^a(t)}{\mathrm{d}t}\left[1+\frac{Bn^{-1}}{\left(1+c_{\mathrm{M}}^a(t)/K_{\mathrm{M}}\right)^2}\right] + k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)c_{\mathrm{M}}^a(t)\left(1+\frac{\frac{\lambda}{1+\lambda}Bn^{-1}}{1+c_{\mathrm{M}}^a(t)/K_{\mathrm{M}}}\right)\right\} \tag{S39}$$

, where we used $\Sigma_t = c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(t)/\left(K_{\mathrm{M}} + c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(t)\right)$. The general solution of eqn (S39) can be written in the form

$$c_{\mathrm{M}}^*(t) = C_1 \mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t} + C_2(t)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t} \tag{S40}$$

, with C_1 a scalar independent of time and $C_2(t)$ is a function of time defined by

$$\frac{\mathrm{d}C_2(t)}{\mathrm{d}t} = K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}\mathrm{e}^{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}\left\{\frac{\mathrm{d}y(t)}{\mathrm{d}t}\left[1+\frac{Bn^{-1}}{\left(1+y(t)\right)^2}\right] + k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)y(t)\left(1+\frac{\frac{\lambda}{1+\lambda}Bn^{-1}}{1+y(t)}\right)\right\} \tag{S41}$$

, where we introduced the normalized surface metal concentration $y(t) = c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}$. Integration of eqn (S41) provides after calculation

$$C_2(t) = K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}\mathrm{e}^{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}\left\{y(t) - Bn^{-1}\left[\frac{1}{1+y(t)} - k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}\int_0^t \frac{\mathrm{e}^{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)\nu}}{1+y(\nu)}\left(1+\frac{\lambda}{1+\lambda}y(\nu)\right)\mathrm{d}\nu\right]\right\} \quad \text{(S42)}$$

The constant C_1 is obtained from the initial boundary condition $C_1 = c_{\mathrm{M}}^{*,0} - C_2(0)$ with $C_2(0)$ defined from eqn (S42) according to $C_2(0) = K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}\left\{y(0) - Bn^{-1}\left[\frac{1}{1+y(0)}\right]\right\}$. The steady state transport condition given by eqn (10) and considered at $t = 0$ further provides

$$c_{\mathrm{M}}^{*,0} - K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}y(0) = J_{\mathrm{u}}^{*}R_{\mathrm{T}}\frac{y(0)}{1+y(0)} - k_{\mathrm{e}}R_{\mathrm{T}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0} \quad \text{(S43)}$$

, where we used eqns (7)-(8) at $t = 0$. In turn, it comes $C_1 = K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}Bn^{-1} - k_{\mathrm{e}}R_{\mathrm{T}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}$ after realizing that the product $J_{\mathrm{u}}^{*}R_{\mathrm{T}}$ can be rewritten $K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}Bn^{-1}$. After rearrangements, C_1 reduces to $C_1/c_{\mathrm{M}}^{*,0} = x_{\mathrm{o}}^{-1}Bn^{-1}\left(1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right)$ where we recall that $x_{\mathrm{o}} = \left[K_{\mathrm{M}}/\left(\beta_a c_{\mathrm{M}}^{*,0}\right)\right]^{-1}$. Finally, we obtain

$$c_{\mathrm{M}}^{*}(t)/c_{\mathrm{M}}^{*,0} = x_{\mathrm{o}}^{-1}Bn^{-1}\left(1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t} +$$

$$x_{\mathrm{o}}^{-1}\left\{\frac{c_{\mathrm{M}}^{a}(t)}{K_{\mathrm{M}}} - Bn^{-1}\left[\frac{1}{1+\frac{c_{\mathrm{M}}^{a}(t)}{K_{\mathrm{M}}}} - k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}\int_0^t \frac{\mathrm{e}^{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)\nu}}{1+\frac{c_{\mathrm{M}}^{a}(\nu)}{K_{\mathrm{M}}}}\left(1+\frac{\lambda}{1+\lambda}\frac{c_{\mathrm{M}}^{a}(\nu)}{K_{\mathrm{M}}}\right)\mathrm{d}\nu\right]\right\} \quad \text{(S44)}$$

, which is eqn (32) in the main text.

III. 2. Derivation of the expressions for the surface and bulk metal concentrations for $\overline{K}^{*} >> 1$ in the regime of strong and weak affinity of M for the internalisation sites (eqns (33)-(34) and eqns (35)-(37), respectively). Simplifications of eqns (37)-(38) for situations where $k_{\mathrm{o}} = k_{+} = k_{-}$ and $k_{-} = k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$.

Regime of strong M affinity for the internalisation sites in the limit $\overline{K}^{*} >> 1$ (eqns (33)-(34)).

In this regime, we have $K_{\mathrm{M}} << c_{\mathrm{M}}^{a}(t)$ at any time *t* so that $J_{\mathrm{u}}(t) = J_{\mathrm{u}}^{*}$. Simplifying eqn (S6) accordingly and discarding the $\mathrm{ML_S}$ dissociation terms not relevant in the $\overline{K}^{*} >> 1$ limit, it comes

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{M}}^{a}(t)}{\mathrm{d}t} + k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)c_{\mathrm{M}}^{a}(t) = -\frac{K_{\mathrm{M}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\left[1 + k_{\mathrm{e}}\lambda t + k_{\mathrm{e}}(\tau_{\mathrm{o}} - \lambda\Delta\tau)\right] \quad \text{(S45)}$$

After simple algebra, the integration of eqn (S45) leads to

$$c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}=\left\{\frac{c_{\mathrm{M}}^{a,0}}{K_{\mathrm{M}}}+\frac{\left[1+k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)(\tau_{\mathrm{o}}-\lambda\Delta\tau)\right]}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}(1+\lambda)^{2}}\right\}\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}-\frac{1+k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)\left[\tau_{\mathrm{o}}+\lambda(t-\Delta\tau)\right]}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}(1+\lambda)^{2}} \quad \text{(S46)}$$

, which is eqn (33) in the main text. To derive $c_{\mathrm{M}}^{*}(t)$, we now use eqn (S44) (or eqn (32)) in the limit $J_{\mathrm{u}}(t)=J_{\mathrm{u}}^{*}$ or equivalently $y(t)/(1+y(t))\approx 1$ with $y(t)=c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}$. It comes after simplification

$$c_{\mathrm{M}}^{*}(t)=\left(K_{\mathrm{M}}\beta_{a}^{-1}Bn^{-1}-k_{\mathrm{e}}R_{\mathrm{T}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}+\left[\beta_{a}^{-1}c_{\mathrm{M}}^{a}(t)+\frac{\lambda}{1+\lambda}K_{\mathrm{M}}\beta_{a}^{-1}Bn^{-1}\left(1-\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}\right)\right] \quad \text{(S47)}$$

In addition, from eqns (8) and (28) we easily derive that the initial M transport flux $J_{\mathrm{M}}(0)$ is given by

$$J_{\mathrm{M}}(0)/J_{\mathrm{u}}^{*}=x_{\mathrm{o}}Bn\left[1+\frac{1+Bn^{-1}\left(1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right)}{x_{\mathrm{o}}}\right]\left\{1-\left[1-\frac{4x_{\mathrm{o}}^{-1}Bn^{-1}\left[1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\left(1+x_{\mathrm{o}}^{-1}\right)\right]}{\left\{1+x_{\mathrm{o}}^{-1}\left[1+Bn^{-1}\left(1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right)\right]\right\}^{2}}\right]^{1/2}\right\}/2\,. \quad \text{(S48)}$$

This expression identifies with that derived in Ref [1] in the limit $\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}=0$ where the dimensionless metal surface affinity parameter and bioconversion capacity of the microorganism noted *A* and *B* in Ref [1], respectively, are defined here by $A=x_{\mathrm{o}}^{-1}$ and $B=x_{\mathrm{o}}^{-1}Bn^{-1}$. At $t=0$, the condition $J_{\mathrm{u}}(0)=J_{\mathrm{u}}^{*}$ applies and eqn (10) then simplifies into $J_{\mathrm{M}}(0)/J_{\mathrm{u}}^{*}=1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}$. The latter expression is consistent with eqn (S48) provided that $x_{\mathrm{o}}^{-1}<<1$ *and* $x_{\mathrm{o}}^{-1}Bn^{-1}\left(1-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right)<<1$. Simplifying eqn (28) in these limits, we obtain $c_{\mathrm{M}}^{a,0}/\left(\beta_{a}c_{\mathrm{M}}^{*,0}\right)=1$ or, equivalently, $K_{\mathrm{M}}\beta_{a}^{-1}Bn^{-1}-k_{\mathrm{e}}R_{\mathrm{T}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}=R_{\mathrm{T}}J_{\mathrm{M}}(0)=0$. In turn, eqn (S47) becomes

$$\beta_{a}c_{\mathrm{M}}^{*}(t)/K_{\mathrm{M}}=\left[c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}+\frac{\lambda}{1+\lambda}Bn^{-1}\left(1-\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}\right)\right] \quad \text{(S49)}$$

, which is eqn (34) in the main text.

Regime of weak M affinity for the internalisation sites in the limit $\overline{K}^{*}>>1$ (eqns (35)-(37)).

In this regime where the condition $K_{\mathrm{M}}>>c_{\mathrm{M}}^{a}(t)$ applies, the uptake flux (eqn (7)) can be linearized according to $J_{\mathrm{u}}(t)/J_{\mathrm{u}}^{*}=c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}=y(t)$. Equation (S6) taken in the extreme $\overline{K}^{*}>>1$ then reduces to

$$\frac{\mathrm{d}y(t)}{\mathrm{d}t}+\frac{1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{e}}\lambda\Delta\tau}{\tau_{\mathrm{E}}}y(t)+\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{E}}}+\frac{k_{\mathrm{e}}\lambda}{\tau_{\mathrm{E}}}\int_{0}^{t}y(\nu)\mathrm{d}\nu=0\,. \quad \text{(S50)}$$

Equation (S50) leads to the second-order differential equation in $\Sigma(t)=\int_0^t\left(J_{\mathrm{u}}(\nu)/J_{\mathrm{u}}^*\right)\mathrm{d}\nu=\int_0^t y(\nu)\mathrm{d}\nu$

$$\Sigma_{tt}+\frac{1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}+\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}}{\tau_{\mathrm{E}}}\Sigma_t+\frac{k_{\mathrm{e}}\lambda}{\tau_{\mathrm{E}}}\Sigma(t)=-\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{E}}}. \tag{S51}$$

The characteristic polynomial equation associated with eqn (S51) admits the discriminant Δ that reads after rearrangements

$$\Delta\tau_{\mathrm{E}}^2=\left(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)^2+2k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}-1\right)\lambda+\lambda^2\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\right)^2 \tag{S52}$$

The quantity $\Delta\tau_{\mathrm{E}}^2$ is always ≥ 0 irrespective of the value of λ, which can be shown after evaluation of the discriminant of the second order polynomial eqn (S52) in λ. Let us first examined cases where $\Delta\tau_{\mathrm{E}}^2>0$. Then, the general solution of eqn (S51) can be written in the form

$$\Sigma(t)=\alpha_+\mathrm{e}^{-k_+t}+\alpha_-\mathrm{e}^{-k_-t}-\tau_{\mathrm{o}}/\lambda \tag{S53}$$

, where $\alpha_\pm$ are independent of time and $k_\pm(\geq 0)$ (with $k_-\neq k_+$) are the two kinetic constants defined by

$$k_\pm\tau_{\mathrm{E}}=-\left[1+k_{\mathrm{e}}\left(\tau_{\mathrm{L}}+\lambda\tau_{\mathrm{E}}\right)\right]\left\{-1\pm\sqrt{1-\frac{4\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}}{\left[1+k_{\mathrm{e}}\left(\tau_{\mathrm{L}}+\lambda\tau_{\mathrm{E}}\right)\right]^2}}\right\}/2\,. \tag{S54}$$

$\alpha_\pm$ are determined from the boundaries $\Sigma(0)=0$ and $\Sigma_t(0)=y(0)$, which provides after evaluation $\alpha_\pm=\mp\left[\frac{c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}+k_\mp\tau_{\mathrm{o}}/\lambda}{k_+-k_-}\right]$. Using the relationship $y(t)=\Sigma_t$, we finally obtain

$$c_{\mathrm{M}}^a(t)/K_{\mathrm{M}}=\sum_{j=+,-}A_j\mathrm{e}^{-k_jt} \tag{S55}$$

, with $A_\pm=-\alpha_\pm k_\pm=\pm k_\pm\left[\frac{c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}+k_\mp\tau_{\mathrm{o}}/\lambda}{k_+-k_-}\right]$, which corresponds to eqn (35) in the main text. The expression for $c_{\mathrm{M}}^*(t)$ in the weak M affinity regime is obtained from eqn (32) after substitution therein of the linearized expressions $\left(1+y(t)\right)^{-1}\approx 1-y(t)$ and $y(t)\left(1+\frac{\lambda}{1+\lambda}y(t)\right)^{-1}\approx 1-y(t)/(1+\lambda)$ with $y(t)\left(=c_{\mathrm{M}}^a(t)/K_{\mathrm{M}}\right)<<1$ defined by eqn (S55). After lengthy calculation and algebraic arrangements, we obtain the reduced expression

$$\frac{\beta_a c_{\mathrm{M}}^{*}(t)}{K_{\mathrm{M}}}=\frac{Bn^{-1}}{1+\lambda}\left\{\sum_{j=+,-}\left(\frac{A_j}{1-\frac{k_j}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}\right)-(1+\lambda)\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right\}\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}+\sum_{j=+,-}\left[1+\frac{\frac{\lambda Bn^{-1}}{1+\lambda}\left(1-\frac{k_j}{k_{\mathrm{e}}\lambda}\right)}{1-\frac{k_j}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}\right]A_j\mathrm{e}^{-k_j t} \tag{S56}$$

, where we used the relationship $J_{\mathrm{u}}^{*}R_{\mathrm{T}}=K_{\mathrm{M}}\beta_a^{-1}Bn^{-1}$. Equation (S56) is identical to eqn (37) given in the main text. Finally, the value of $c_{\mathrm{M}}^{a,0}$ is obtained from application of eqn (10) at $t=0$ with $J_{\mathrm{u}}(0)/J_{\mathrm{u}}^{*}=c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}$, *i.e.* $R_{\mathrm{T}}^{-1}\left(c_{\mathrm{M}}^{*,0}-\beta_a^{-1}c_{\mathrm{M}}^{a,0}\right)=J_{\mathrm{u}}^{*}c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}-k_{\mathrm{e}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}$ which leads to $c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}=\left(1+Bn^{-1}\right)^{-1}\left(x_{\mathrm{o}}+\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}Bn^{-1}\right)$ as indicated in the main text.

Analysis of the case $k_{+}=k_{-}=k_{\mathrm{o}}$.

Let us now address the degeneracy case where $\Delta\tau_{\mathrm{E}}^{2}=0$. This situation is achieved for $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=0$ and $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}=1$ with the result $k_{+}=k_{-}=k_{\mathrm{o}}=\tau_{\mathrm{E}}^{-1}$, which is inferred from eqn (36) in agreement with **Figure 4**. Then, the pendant of eqn (35) (or eqn (S55)) is $c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}=\left(A_{\mathrm{o}}+B_{\mathrm{o}}t\right)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{o}}t}$ with $A_{\mathrm{o}}=c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}$ and $B_{\mathrm{o}}=-k_{\mathrm{o}}\left(c_{\mathrm{M}}^{a,0}/K_{\mathrm{M}}+k_{\mathrm{o}}\tau_{\mathrm{o}}/\lambda\right)$. In addition, it is can be shown after some algebra that the equivalent of eqn (37) in the limit $k_{+}=k_{-}=k_{\mathrm{o}}=\tau_{\mathrm{E}}^{-1}$ is provided by

$$\frac{\beta_a c_{\mathrm{M}}^{*}(t)}{K_{\mathrm{M}}}=\frac{Bn^{-1}}{1+\lambda}\left[\frac{A_{\mathrm{o}}-\frac{B_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{o}}}}{1-\frac{k_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}-(1+\lambda)\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right]\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}+$$

$$\left\{\left[1+\frac{\frac{\lambda Bn^{-1}}{1+\lambda}\left(1-\frac{k_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}\lambda}\right)}{1-\frac{k_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}\right]A_{\mathrm{o}}+B_{\mathrm{o}}\left[\left(1+Bn^{-1}\right)t+\frac{k_{\mathrm{e}}Bn^{-1}}{\left(k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{o}}\right)^{2}}\left(1-\left[k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{o}}\right]t\right)\right]\right\}\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{o}}t} \tag{S57}$$

In turn the expression of the transport flux $J_{\mathrm{M}}(t)$ for $k_{+}=k_{-}=k_{\mathrm{o}}=\tau_{\mathrm{E}}^{-1}$ is obtained from eqns (8) and (S57) together with $c_{\mathrm{M}}^{a}(t)/K_{\mathrm{M}}=\left(A_{\mathrm{o}}+B_{\mathrm{o}}t\right)\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{o}}t}$, which yields

$$J_{\mathrm{M}}(t)/J_{\mathrm{u}}^{*}=\frac{1}{1+\lambda}\left[\frac{A_{\mathrm{o}}-\dfrac{B_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{o}}}}{1-\dfrac{k_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}-(1+\lambda)\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right]\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}+$$

$$\left\{\frac{\dfrac{\lambda A_{\mathrm{o}}}{1+\lambda}\left(1-\dfrac{k_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}\lambda}\right)}{1-\dfrac{k_{\mathrm{o}}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}+B_{\mathrm{o}}\left[t+\frac{k_{\mathrm{e}}\left(1-\left[k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{o}}\right]t\right)}{\left(k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{\mathrm{o}}\right)^{2}}\right]\right\}\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{o}}t} \qquad \text{(S58)}$$

Analysis of the case $k_{-}=k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$.

We now examine cases where $k_{-}=k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$, and the conditions leading to such a situation are detailed below (in particular it is shown that k_{+} can not take the value $k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$). Then, realizing that $A_{-}\left(\mathrm{e}^{\left[k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{-}\right]t}-1\right)/\left[k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)-k_{-}\right]\approx A_{-}t$, substitution of eqn (35) into eqn (32) now provides

$$\frac{\beta_a c_{\mathrm{M}}^{*}(t)}{K_{\mathrm{M}}}=\frac{Bn^{-1}}{1+\lambda}\left\{\frac{A_{+}}{1-\dfrac{k_{+}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}-(1+\lambda)\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}+\left(\frac{1+Bn^{-1}}{Bn^{-1}}-k_{\mathrm{e}}t\right)(1+\lambda)A_{-}\right\}\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}+\left[1+\frac{\dfrac{\lambda Bn^{-1}}{1+\lambda}\left(1-\dfrac{k_{+}}{k_{\mathrm{e}}\lambda}\right)}{1-\dfrac{k_{+}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}\right]A_{+}\mathrm{e}^{-k_{+}t}$$

(S59)

, and the metal transport flux expression now reads as

$$J_{\mathrm{M}}(t)/J_{\mathrm{u}}^{*}=\frac{1}{1+\lambda}\left\{\left[\frac{A_{+}}{1-\dfrac{k_{+}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}+(1+\lambda)\left[A_{-}(1-k_{\mathrm{e}}t)-\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right]\right]\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)t}+\frac{1-\dfrac{k_{+}}{k_{\mathrm{e}}\lambda}}{1-\dfrac{k_{+}}{k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)}}\lambda A_{+}\mathrm{e}^{-k_{+}t}\right\}$$

(S60)

Evaluation of the conditions leading to $k_{-}=k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$**.**

Let us first show that the condition $k_{+}=k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$ is never met. Finding the critical value Λ_{c} taken by $\Lambda=\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}$ such that $k_{+}=k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$ comes to solve the equation $k_{+}\tau_{\mathrm{E}}=k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}+\Lambda$ in Λ where $k_{+}\tau_{\mathrm{E}}$ is defined by eqn (36). After calculation, we obtain $\Lambda_{\mathrm{c}}=k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}-k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}})^{-1}(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}-k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}})$. We exclude here the case $\tau_{\mathrm{E}}=\tau_{\mathrm{L}}$ (*i.e.* $Bn^{-1}=0$) for which the kinetic constant $k_{\mathrm{e}}(1+\lambda)$ is not operational in the practical limit $\overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}=0$ (**ESI**, part III.6). As $k_{+}\tau_{\mathrm{E}}\leq 1$ over the whole range of Λ (see **Figure 3A**), Λ_{c} must satisfy the condition $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}+\Lambda_{\mathrm{c}}\leq 1$. In addition, the condition $\Lambda_{\mathrm{c}}>0$ further imposes that

$\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} <\right) k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} < 1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$. Substituting the above expression defining Λ_{c} into the inequality $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} + \Lambda_{\mathrm{c}} \le 1$, we get $1 \le 1 - \left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\right)^{-1}$. This inequality is never verified because $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} \ge 0$, so that there are no conditions leading to $k_{+} = k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda\right)$. We can now attempt finding the value of Λ_{c} such that $k_{-} = k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda\right)$. Adopting the same procedure as above, we again obtain the expression $\Lambda_{\mathrm{c}} = k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} - k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}})^{-1}\left(1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} - k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\right)$. However, Λ_{c} must now satisfy the condition $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} + \Lambda_{\mathrm{c}} \ge 1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ as $k_{-}\tau_{\mathrm{E}} \ge 1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ over the whole range of $\Lambda = \lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}$ (see **Figure 3B)**. Substituting this latter inequality into the expression of Λ_{c}, we obtain $\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} <\right) k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} < 1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$, which is also consistent with the necessity to have positive values of Λ_{c}. In turn, the relationship $k_{-} = k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda\right)$ is verified at the value $\lambda = \lambda_{\mathrm{c}}$ (specified below) provided that the $\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}, k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\right)$ couple is in line with the condition $\left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} <\right) k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}} < 1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$: $k_{-}\tau_{\mathrm{E}}$ then reduces to $k_{-}\tau_{\mathrm{E}} = \left(1 - \tau_{\mathrm{L}} / \tau_{\mathrm{E}}\right)^{-1}$ and the critical value of $\lambda_{\mathrm{c}} = \Lambda_{\mathrm{c}} / \left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\right)$ where $k_{-} = k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda_{\mathrm{c}}\right)$ is given by $\lambda_{\mathrm{c}} = \left[k_{\mathrm{e}}\left(\tau_{\mathrm{E}} - \tau_{\mathrm{L}}\right)\right]^{-1} - 1$.

III. 3. Limits of eqns (35), (37) at $\lambda \to 0$.

It can be shown that A_{+} involved in eqn (35) and (37) satisfies the limit $A_{+}\big|_{\lambda\to 0} \approx -k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}} / \left(1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$ while $A_{-}\big|_{\lambda\to 0} \approx c_{\mathrm{M}}^{a,0} / K_{\mathrm{M}} + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}} / \left(1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$, where we used the limits $k_{+}\big|_{\lambda\to 0} \approx 0$, $k_{-}\big|_{\lambda\to 0} \approx \left(1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right) / \tau_{\mathrm{E}}$. Replacing these limits into eqn (35) we obtain

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{a}(t)}{K_{\mathrm{M}}} = \left(\frac{c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(0)}{K_{\mathrm{M}}} + \frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}}}{1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\right)\mathrm{e}^{-t/\tau_{\mathrm{d}}} - \frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}}}{1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}} \tag{S61}$$

, where $\tau_{\mathrm{d}} = \tau_{\mathrm{E}} / \left(1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$. Equation (S61) correctly corresponds to the result derived in Ref [2] for microorganisms in the absence of intracellular $\mathrm{ML_S}$ formation and in the weak affinity limit. The following limits can be further shown

$$\frac{\lambda}{1+\lambda}\frac{1 - \dfrac{k_{-}}{k_{\mathrm{e}}\lambda}}{1 - \dfrac{k_{-}}{k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda\right)}}\Bigg|_{\lambda\to 0} \approx \frac{1 + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}{1 + k_{\mathrm{e}}\left(\tau_{\mathrm{L}} - \tau_{\mathrm{E}}\right)}, \quad \frac{1}{k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda\right)}\sum_{j=+,-}\left(\frac{A_j}{1 - \dfrac{k_j}{k_{\mathrm{e}}\left(1+\lambda\right)}}\right)\Bigg|_{\lambda\to 0} \approx -\frac{\tau_{\mathrm{o}} + \tau_{\mathrm{E}}c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(0) / K_{\mathrm{M}}}{1 + k_{\mathrm{e}}\left(\tau_{\mathrm{L}} - \tau_{\mathrm{E}}\right)}$$

, so that substitution into eqn (37) leads after some arrangements to

$$c_{\mathrm{M}}^{*}(t) = -k_{\mathrm{e}}\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{e}}t}\left\{\frac{K_{\mathrm{M}}}{\beta_a}Bn^{-1}\left(\frac{\tau_{\mathrm{o}} + \tau_{\mathrm{E}}c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(0) / K_{\mathrm{M}}}{1 + k_{\mathrm{e}}\left(\tau_{\mathrm{L}} - \tau_{\mathrm{E}}\right)}\right) + R_{\mathrm{T}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M},0}\right\} +$$

$$\frac{K_{\mathrm{M}}}{\beta_a}\mathrm{e}^{-t/\tau_{\mathrm{d}}}\left(c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(0)/K_{\mathrm{M}}+\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}}}{1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\right)\left[1+\frac{Bn^{-1}(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}})}{1+k_{\mathrm{e}}(\tau_{\mathrm{L}}-\tau_{\mathrm{E}})}\right]-\frac{K_{\mathrm{M}}}{\beta_a}\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{o}}}{1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}. \tag{S62}$$

This expression correctly compares with the result obtained in Ref [2] for cases where intracellular $\mathrm{ML_S}$ formation is not operational.

III. 4. Evolution of $k_+\tau_{\mathrm{E}}$ with $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}$ at different $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ (Figure S2).

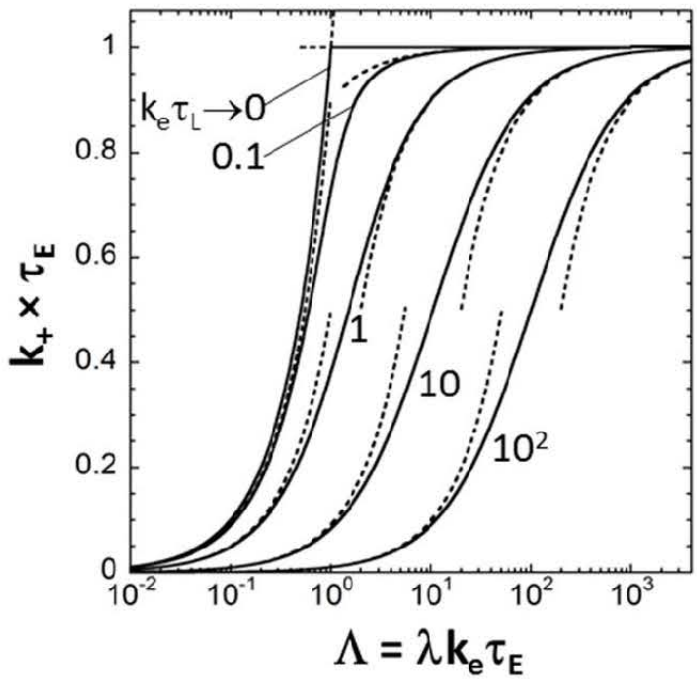


Figure S2. Dependence of the (dimensionless) kinetic constants $k_+\tau_{\mathrm{E}}$ on $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}=\Lambda$ at various values of $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ (indicated). Dotted lines represent the evolution of $k_+\tau_{\mathrm{E}}$ at low and large $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}=\Lambda$ and the corresponding analytical Taylor-series expressions are indicated in Figure 3A.

III. 5. Physical interpretation of the timescale $\tau_{\mathrm{E}}/\left(k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}\tau_{\mathrm{E}}+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$, and comments on Table 1.

Using eqns (21)-(22), τ_{E} can be rewritten in the form

$$\tau_{\mathrm{E}}=R_{\mathrm{S}}\left(4\pi\int_a^{r_{\mathrm{c}}}\xi^2\beta_\xi\mathrm{d}\xi/S_a-J_{\mathrm{u}}^{*}\Omega_1 Bn^{-1}\right). \tag{S63}$$

In the following we define the Warburg-like element Z_W with value[1]

$$Z_W=4\pi\int_a^{r_{\mathrm{c}}}\xi^2\beta_\xi\mathrm{d}\xi/S_a-J_{\mathrm{u}}^{*}\Omega_1 Bn^{-1}. \tag{S64}$$

After algebraic rearrangements, Z_W can be expressed according to

$$Z_W = \left(\tau_{\mathrm{E}} / \tau_{\mathrm{L}}\right)\left(1+\bar{V}\varphi\right)V_{\mathrm{p}} / \left(S_a\varphi\right) \tag{S65}$$

, where we used eqns (21)-(22). Equation (S65) corresponds to that provided in the main text (see caption **Table 1**). In addition, the dimensionless product $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} = 4\pi k_{\mathrm{e}} R_{\mathrm{S}} \int_a^{r_{\mathrm{c}}} \xi^2 \beta_\xi \mathrm{d}\xi / S_a$ (eqn (21)) can be viewed as the ratio between the M membrane transfer resistance R_{S} and the excretion resistance $R_{\mathrm{e},\varphi} = S_a \left(4\pi k_{\mathrm{e}} \int_a^{r_{\mathrm{c}}} \xi^2 \beta_\xi \mathrm{d}\xi\right)^{-1}$. Under the electrostatic conditions specified in the main text (*i.e.* $1/\kappa << \delta$), $R_{\mathrm{e},\varphi}$ can be rewritten as $R_{\mathrm{e},\varphi} = R_{\mathrm{e}}\varphi / \left(1+\bar{V}\varphi\right)$ with $R_{\mathrm{e}} = S_{\mathrm{a}} / \left(k_{\mathrm{e}} V_{\mathrm{p}}\right)$ and $\bar{V} = \beta_a V_{\mathrm{soft}} / V_{\mathrm{p}}$. The timescale $\tilde{\tau}_{\mathrm{d}} = \tau_{\mathrm{E}} / \left(k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}} + k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$ corresponds to $\left(k_-\right)^{-1}$ in the limit $k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} >> \left(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)/\tau_{\mathrm{E}}$ (see main text). It can be written in the following form

$$\tilde{\tau}_{\mathrm{d}} = R_{\mathrm{S}} Z_W / \left(k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}} + \frac{R_{\mathrm{S}}}{R_{\mathrm{e},\varphi}}\right) \tag{S66}$$

, or, equivalently,

$$\tilde{\tau}_{\mathrm{d}} = \frac{\dfrac{R_{\mathrm{S}}}{k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}}} R_{\mathrm{e},\varphi}}{\left(R_{\mathrm{e},\varphi} + \dfrac{R_{\mathrm{S}}}{k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}}}\right)} Z_W . \tag{S67}$$

Equation (S67) is analogous to that defining the characteristic time for discharging a (Warburg-like) element with value Z_W across an interface with charge transfer resistance $R_{\mathrm{ct}} = \hat{R}_{\mathrm{S}} R_{\mathrm{e},\varphi} / \left(R_{\mathrm{e},\varphi} + \hat{R}_{\mathrm{S}}\right)$ with $\hat{R}_{\mathrm{S}} = R_{\mathrm{S}} / k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}}$. R_{ct} is nothing else than the equivalent resistance for the resistances $\hat{R}_{\mathrm{S}}$ and $R_{\mathrm{e},\varphi}$ set in parallel, in agreement with the electrochemical circuit schemed in **Table 1 (**case $\left(k_-\right)^{-1}$ for the limit $k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} >> \left(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)/\tau_{\mathrm{E}}$). Considering the inequality $k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}} >> \left(1+k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)\left(>1\right)$ defining the range of applicability of the limit $\left(k_-\right)^{-1} \approx \tilde{\tau}_{\mathrm{d}}$, it is easy to verify that $\hat{R}_{\mathrm{S}} / R_{\mathrm{S}} << 1$ and $R_{\mathrm{e},\varphi} >> \hat{R}_{\mathrm{S}}$ (see **Table 1**), the latter inequality stemming from $k_{\mathrm{a}}^* \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \tau_{\mathrm{E}} >> \left(1+R_{\mathrm{S}} / R_{\mathrm{e},\varphi}\right) > R_{\mathrm{S}} / R_{\mathrm{e},\varphi}$. Stated differently, fast $\mathrm{ML_S}$ formation kinetics leads to a decrease of the membrane transfer resistance R_{S} and microorganisms display a stronger propensity to accumulate M than excrete internalized metal ions. In

turn, fast ML_S formation facilitates the intracellular sequestration of metal ions in the form of ML_S complexes.

Following the above methodology, it is possible to evaluate expressions of charge transfer resistances associated to $1/k_+$. In the limit $k_a^* \rho_S^{V_i} << (1/2 + k_e \tau_L)/\tau_E$ (see **Table 1**), **Figure 3A** shows that $(k_+)^{-1} \approx \tau_E (1 + k_e \tau_L)/\Lambda$ with $\Lambda = \lambda k_e \tau_E$, or, equivalently, $(k_+)^{-1} \approx \left(k_a^* \rho_S^{V_i}\right)^{-1} (1 + k_e \tau_L)$. As the inequality $k_a^* \rho_S^{V_i} << (1/2 + k_e \tau_L)/\tau_E \left(< (1 + k_e \tau_L)/\tau_E\right)$ applies, we infer $\left(k_a^* \rho_S^{V_i}\right)^{-1} >> \tau_E (1 + k_e \tau_L)^{-1}$, *i.e.* $(k_+)^{-1} >> \tau_E$ (see **Table 1**). In addition, $(k_+)^{-1}$ can be written in the form $(k_+)^{-1} \approx \tau_E \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E\right)^{-1} (1 + k_e \tau_L)$, or

$$(k_+)^{-1} = R_S Z_W \frac{1 + k_e \tau_L}{k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E} \tag{S68}$$

, which corresponds to the time for discharging the Warburg-like element Z_W across a charge transfer resistance defined here by $R_{ct} = R_S (1 + k_e \tau_L) / \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E\right) >> R_S$ (see **Table 1**). This means that a sluggish ML_S formation ($k_a^* \rho_S^{V_i} << (1/2 + k_e \tau_L)/\tau_E$) effectively leads to increasing the M membrane transfer resistance (blocking effect). In the extreme of fast intracellular ML_S formation ($k_a^* \rho_S^{V_i} >> (1/2 + k_e \tau_L)/\tau_E \left(> (1 + k_e \tau_L)/\tau_E\right)$), we have $1/k_+ \approx \tau_E (1 - k_e \tau_L / \Lambda)^{-1}$ (see **Figure 3A**) or $1/k_+ \approx R_S Z_W \left[1 - \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E\right)^{-1} R_S / R_{e,\varphi}\right]^{-1}$. Using $k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E >> 1 + k_e \tau_L > k_e \tau_L \left(= R_S / R_{e,\varphi}\right)$ that holds in the limit examined, it comes $1/k_+ \approx R_S Z_W \left[1 + \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E\right)^{-1} k_e \tau_L\right]$, which corresponds to the time for discharging the Warburg-like element into a charge transfer resistance that identifies with $R_S \left[1 + \left(k_a^* \rho_S^{V_i} \tau_E\right)^{-1} k_e \tau_L\right] \approx R_S$, in line with the result reported in **Table 1**. The absence of any excretion contribution in this charge transfer resistance agrees with the limit $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,\infty} \left(\bar{K}^* = 0\right) \to 0$ discussed in §II.5 for $\bar{K}^* >> 1$ (**Table 1** applies for such strong ML_S complexes), recalling that excretion is required to obtain a finite non-zero M bulk concentration at equilibrium.[2]

As stated in the main text, it is possible to evaluate from **Table 1** which of the timescale $(k_+)^{-1}$ or $(k_-)^{-1}$ is operational in the regime of slow and fast intracellular ML_S formation (left and right column of **Table 1**, respectively). In the regime of slow ML_S formation, the timescale $(k_+)^{-1}$ is much larger than the free M transfer time τ_E between bulk and intracellular volume (see **Table 1** and **Figure 4**). Accordingly, it is the only $(k_-)^{-1}$ contribution that will be operational in defining kinetics of M bulk depletion and overall uptake. On the opposite, the membrane transfer resistance associated with $(k_-)^{-1}$ in the limit of fast ML_S formation significantly facilitates M uptake-depletion compared to that relevant for the $(k_+)^{-1}$ case. In line with this, the processes subsumed in the $(k_+)^{-1}$ component thus now play a key role in governing/limiting M accumulation and bulk depletion kinetics.

III. 6. Simplification of eqns (37)-(38) for $\overline{\phi}_u^{M,0} = 0$.

Obviously, in the limit of fast intracellular ML_S formation reached at $\lambda \to \infty$ we have $e^{-k_e(1+\lambda)t} \to 0$ in eqn (37) and the time constant $(1+\lambda)^{-1}/k_e$ is then not operational in determining M uptake/depletion kinetics. For $\lambda \to 0$, we showed in §III.3 that eqn (37) reduces to

$$c_M^*(t) = -k_e e^{-k_e t}\left\{\frac{K_M}{\beta_a} Bn^{-1}\left(\frac{\tau_o + \tau_E c_M^a(0)/K_M}{1+k_e(\tau_L - \tau_E)}\right) + R_T \phi_u^{M,0}\right\} +$$

$$\frac{K_M}{\beta_a} e^{-t/\tau_d}\left(c_M^a(0)/K_M + \frac{k_e \tau_o}{1+k_e \tau_L}\right)\left[1 + \frac{Bn^{-1}(1+k_e\tau_L)}{1+k_e(\tau_L - \tau_E)}\right] - \frac{K_M}{\beta_a}\frac{k_e \tau_o}{1+k_e\tau_L}. \qquad \text{(S69)}$$

In addition, under the condition $K_M >> c_M^a(t)$ marking the validity of eqn (S69), the time constant τ_o defined by eqn (20) may be written for $\lambda \to 0$ in the form $\tau_o = -c_M^{a,0}\tau_E / K_M - \phi_u^{M,0}\left(1/J_u^* + k_e \Omega_1 R_T\right)$. This equation is derived after combining the expression $\tau_E = -K_M \beta_a^{-1}\left[\Omega_1\left(1+Bn^{-1}\right) + 2\Omega_2\right]$ given in the Supporting Information of our previous work[1] with the relation $c_M^{a,0}/K_M = \left(1+Bn^{-1}\right)^{-1}\left(x_o + \overline{\phi}_u^{M,0} Bn^{-1}\right)$ valid for $K_M >> c_M^a(t)$ (see **ESI**, part III.2). In turn, for $\phi_u^{M,0} = 0$, we obtain $\tau_o = -c_M^{a,0}\tau_E / K_M$ and $\frac{K_M}{\beta_a} Bn^{-1}\left(\frac{\tau_o + \tau_E c_M^a(0)/K_M}{1+k_e(\tau_L - \tau_E)}\right) + R_T \phi_u^{M,0} = 0$. The prefactor of the $e^{-k_e t}$ term in eqn (S69) becomes zero so that the time constant $1/k_e$ is not operational, as stated in the main text.

IV. 1. Time-dependence of M transport flux at the membrane surface under conditions of Figure 5 (Figure S3) and time-dependent ratio $c_{\mathrm{M}}^{*}/c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ under conditions of Figure 7 (Figure S4).

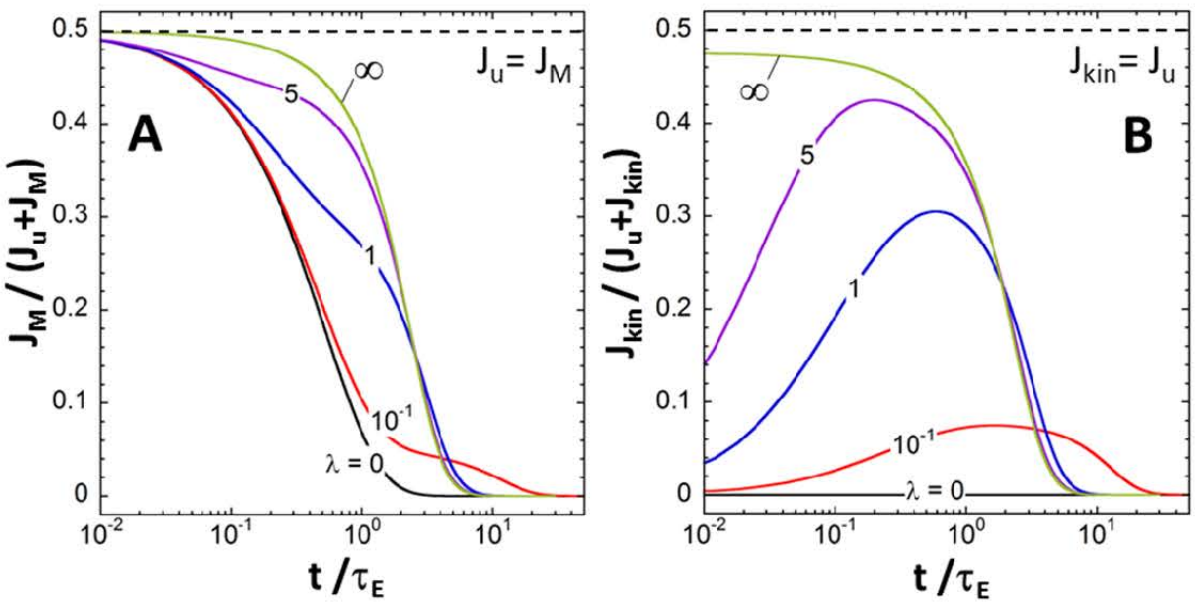


Figure S3. Evolution of the dimensionless ratio $J_{\mathrm{M}}(t)/\left(J_{\mathrm{u}}(t)+J_{\mathrm{M}}(t)\right)$ **(A)** and $J_{\mathrm{kin}}(t)/\left(J_{\mathrm{kin}}(t)+J_{\mathrm{u}}(t)\right)$ **(B)** with time t normalized by the M transfer timescale τ_{E}, at various values of λ (indicated). J_{M} and J_{u} are defined in the main text and $J_{\mathrm{kin}}(t)=\mathrm{d}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)/\mathrm{d}t=k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t)-k_{\mathrm{d}}^{*}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)$ corresponds to the net kinetic flux pertaining to intracellular $\mathrm{ML_S}$ complex formation. Model parameters: as in **Figure 5** of the main text. The dotted lines in (A) and (B) represent the limits $J_{\mathrm{u}}=J_{\mathrm{M}}$ and $J_{\mathrm{kin}}=J_{\mathrm{u}}$, respectively.

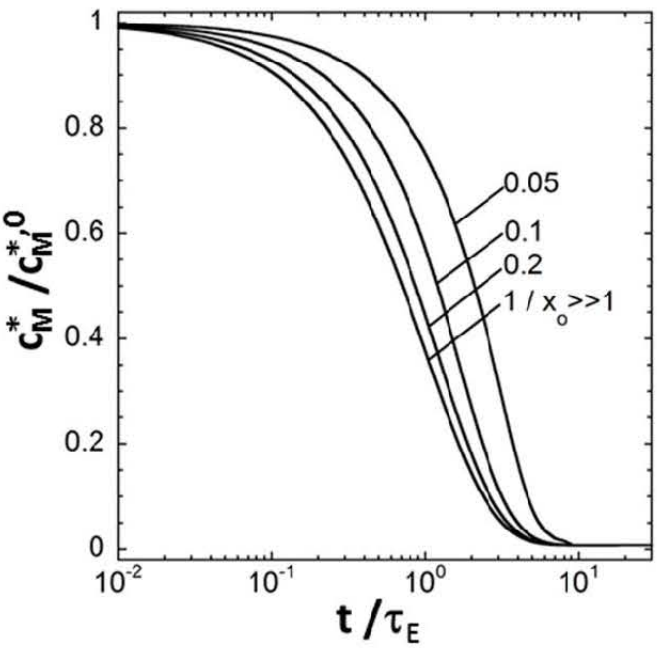


Figure S4. Evolution of the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ versus t / τ_{E} for various values of the dimensionless M reciprocal affinity $1 / x_{\mathrm{o}} = K_{\mathrm{M}} / \left(\beta_{\mathrm{a}} c_{\mathrm{M}}^{*,0}\right)$ (indicated). Model parameters: as in **Figure 7** of the main text.

IV. 2. Expressions of $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ and k_{+} / k_{-} as a function of φ / φ^{*} and details on the corresponding asymptotic behavior at $\varphi / \varphi^{*} << 1$ and $\varphi / \varphi^{*} >> 1$ (Table S2). Derivation of eqns (39)-(41).

Equation (29) defines the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ according to

$$c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0} = \frac{1}{2x_{\mathrm{o}}} \left\{ -\left(1 + \frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}} + \frac{1+\bar{K}^{*}}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}\right) + \frac{1+\bar{K}^{*}}{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}} \left\{ 1 + \frac{2k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}{1+\bar{K}^{*}}\left(1 + \frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right) + \left[\frac{k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}}{1+\bar{K}^{*}}\left(1 - \frac{\mu_{\mathrm{o}}}{\tau_{\mathrm{L}}}\right)\right]^{2} \right\}^{1/2} \right\} \quad \text{(S70)}$$

, with $k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}} = k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\left[\left(1 - \tau_{\mathrm{E}} / \tau_{\mathrm{L}}\right)\Delta\bar{c}_{\mathrm{o}} x_{\mathrm{o}} Bn - c_{\mathrm{M}}^{a,0} / K_{\mathrm{M}}\right] - \bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}$ (eqn (30)) which we rewrite in the form $k_{\mathrm{e}}\mu_{\mathrm{o}} = -k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} x_{\mathrm{o}} \left\{1 - \Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}\left[1 - \zeta / \left(1 + \bar{V}\varphi\right)\right]\right\} - \bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}$ where we used eqn (24) valid for $\varphi << 1$. In turn we obtain $\mu_{\mathrm{o}} / \tau_{\mathrm{L}} = -x_{\mathrm{o}} \left\{1 - \Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}\left[1 - \zeta / \left(1 + \bar{V}\varphi\right)\right]\right\} - \bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0} / \left(k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}\right)$. Further using eqn (23) that defines $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ as a function of φ, we finally derive $\mu_{\mathrm{o}} / \tau_{\mathrm{L}} = -x_{\mathrm{o}} \left\{1 - \Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}\left[1 - \zeta / \left(1 + \bar{V}\varphi\right)\right]\right\} - \bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0} / \left[\varphi^{*}\left(\varphi^{-1} + \bar{V}\right)\right]$. Substitution of that latter expression and of $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}} = \varphi^{*}\left(\varphi^{-1} + \bar{V}\right)$ (eqn (23)) into eqn (S70) provides the general relationship that determines the evolution of $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ as a function of the microorganism volume

fraction φ in the suspension. Then, after solving the equation $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}\left(\varphi_{1/2}\right)/c_{\mathrm{M}}^{*,0}=1/2$, we obtain eqn (39) that defines the cell volume fraction $\varphi_{1/2}$ needed to achieve a two-fold reduction of the bulk M concentration at $t\to\infty$ under the condition $\Delta\overline{c}_{\mathrm{o}}=0$. Using Mathcad software (version 15, PTC) and after simplifications, we further obtain the Taylor series expansions reported in **Table S2** for $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}/c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ at $\varphi/\varphi^{*}<<1$ and $\varphi/\varphi^{*}>>1$. For the sake of simplicity, we derived these expressions in the limit where the term $\overline{V}\varphi$ is so small compared to unity (which is generally the case in practice) that it can be discarded in the mathematical developments.

As detailed in the main text, the kinetic constants $k_{\pm}\left(\geq 0\right)$ given by eqn (36) are fully defined upon upon the only specification of $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ and $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}\left(=k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}\tau_{\mathrm{E}}\right)$ and the same holds for the ratio k_{+}/k_{-}. The expressions of $k_{\pm}$ and k_{+}/k_{-} as a function of cell volume fraction φ are simply obtained after substituting into eqn (36) the relationships defining the dependence of $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}$ and $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}$ on φ, *i.e.* $k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{L}}=\varphi^{*}\left(\varphi^{-1}+\overline{V}\right)$ (which is eqn (23)) and $\lambda k_{\mathrm{e}}\tau_{\mathrm{E}}=\lambda\varphi^{*}\left(\varphi^{-1}+\overline{V}\right)\left[1+\zeta Bn^{-1}/\left(1+\overline{V}\varphi\right)\right]$. Using Mathcad software (version 15, PTC), the first derivative of the ratio k_{+}/k_{-} with respect to φ can be easily computed. Then, the position and the value of the maximum in k_{+}/k_{-} can be determined from the value in φ where this derivative is zero. After lengthy simplifications and neglect of the φ-dependent component of ζ (see justification in **ESI**, Part I.2), the expression defining $\left(\varphi/\varphi^{*}\right)_{\max}$ where k_{+}/k_{-} is maximum can be written in the form given by eqn (40) and the value $\left(k_{+}/k_{-}\right)_{\max}$ can be arranged according to eqn (41). Finally, we derived the Taylor-series expansion of the ratio k_{+}/k_{-} at $\varphi/\varphi^{*}<<1$ and $\varphi/\varphi^{*}>>1$ and after arrangements we obtain the results in reduced form collected in **Table S2**.

$$c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$$

$\varphi / \varphi^* << 1$:

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,0}} \approx 1-\Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}(1-\zeta)+\frac{\varphi}{\varphi^*}\frac{1+\bar{K}^*}{x_{\mathrm{o}}}\left\{\frac{\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}}{1+\bar{K}^*}-\frac{x_{\mathrm{o}}\left[1-\Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}(1-\zeta)\right]}{1+x_{\mathrm{o}}\left[1-\Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}(1-\zeta)\right]}\right\}$$

$\varphi / \varphi^* >> 1$:

$$\frac{c_{\mathrm{M}}^{*,\infty}}{c_{\mathrm{M}}^{*,0}} \approx \frac{1}{x_{\mathrm{o}}\left(1+\bar{K}^*\right)\left[1-\left(1+\bar{K}^*\right)^{-1}\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}\right]}\left\{\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}+\frac{\varphi^*}{\varphi}\left[\frac{x_{\mathrm{o}}\left[1-\left(1+\bar{K}^*\right)^{-1}\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}\right]\left[1-\Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}(1-\zeta)\right]-\left(1+\bar{K}^*\right)^{-1}\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}}{\left[1-\left(1+\bar{K}^*\right)^{-1}\bar{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0}\right]^2}\right]\right\}$$

$$k_+ / k_-$$

$\varphi / \varphi^* << 1$: $$\frac{k_+}{k_-} \approx \frac{\lambda\left(1+\zeta Bn^{-1}\right)}{\left[1+\lambda\left(1+\zeta Bn^{-1}\right)\right]^2}\frac{\varphi}{\varphi^*}$$

$\varphi / \varphi^* >> 1$: $$\frac{k_+}{k_-} \approx \frac{1-(1-\chi)^{1/2}}{1+(1-\chi)^{1/2}}\left\{1+\frac{4\lambda\left[1+\zeta Bn^{-1}-\frac{2\bar{V}\varphi^*\left[1+\lambda\left(1+\zeta Bn^{-1}\right)\right]}{1+\bar{V}\varphi^*(1+\lambda)}\right]}{\chi\left[1+\bar{V}\varphi^*(1+\lambda)\right]^2(1-\chi)^{1/2}}\frac{\varphi^*}{\varphi}\right\} \quad \text{with} \quad \chi=\frac{4\lambda\bar{V}\varphi^*}{\left[1+\bar{V}\varphi^*(1+\lambda)\right]^2}$$

Table S2. Taylor series expansions for the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ at $\varphi / \varphi^* << 1$ and $\varphi / \varphi^* >> 1$ (indicated, valid with discarding term in $\bar{V}\varphi$) and for k_+ / k_- in the limits $\varphi / \varphi^* << 1$ and $\varphi / \varphi^* >> 1$ (indicated). Results are valid up to first order terms in φ / φ^* or φ^* / φ.

IV. 3. Dependence of $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ on φ / φ^* and $\bar{K}^*$ at various values of $\Delta\bar{c}_{\mathrm{o}}$ and $1/x_{\mathrm{o}}$ (Figure S5).

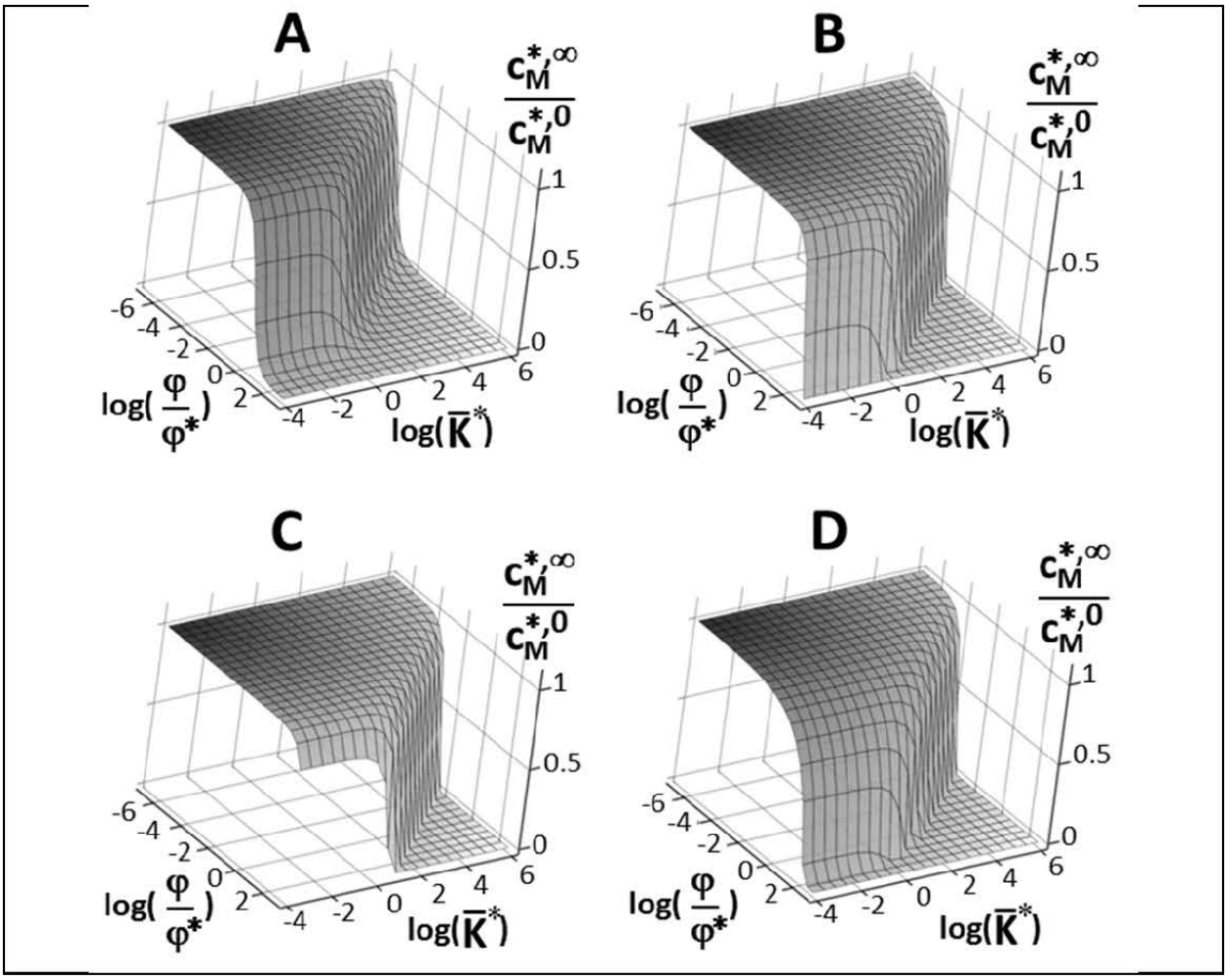


Figure S5. Evolution of the ratio $c_{\mathrm{M}}^{*,\infty} / c_{\mathrm{M}}^{*,0}$ with microorganism volume fraction (normalized by $\varphi^* = R_{\mathrm{S}} / R_{\mathrm{e}}$ with $R_{\mathrm{e}} = S_{\mathrm{a}} / \left(k_{\mathrm{e}} V_{\mathrm{p}}\right)$ and $R_{\mathrm{S}} = 1 / \left(k_{\mathrm{int}} K_{\mathrm{H}} \beta_a\right)$) and with intracellular dimensionless $\mathrm{ML_S}$ complex stability constant ($\overline{K}^*$). Model parameters: $\varphi^* = 10^{-3}$, $\overline{V} = \overline{\phi}_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T},0} = 0$, $a / r_{\mathrm{o}} = \varepsilon = \beta_a = 1$ with (A): $\Delta\overline{c}_{\mathrm{o}} = 0$, $x_{\mathrm{o}} = 1$, (B): $\Delta\overline{c}_{\mathrm{o}} = 0$, $x_{\mathrm{o}} = 5 \times 10^2$, (C): $\Delta\overline{c}_{\mathrm{o}} = 0$, $x_{\mathrm{o}} = 5 \times 10^3$, (D): $\Delta\overline{c}_{\mathrm{o}} = 1$, $x_{\mathrm{o}} = 5 \times 10^2$.

References.

1. J. F. L. Duval, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7873-7888.
2. J. F. L. Duval and E. Rotureau, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 7401-7416.

4 Impact de la métallothionéine intracellulaire sur l'internalisation biologique et la dynamique de partition de métaux aux interfaces bactériennes

L'augmentation de la contamination en métaux des eaux et des sols par les activités industrielles pose un problème de santé publique majeur, d'autant que certains de ces métaux sont non seulement toxiques à de faibles concentrations, mais sont aussi cancérigènes et mutagènes. Il existe plusieurs techniques physicochimiques de dépollution des eaux et sols (précipitation/oxydation/réduction chimique, filtration, utilisation de résines échangeuses d'ions, etc.). Cependant, la plupart de ces techniques sont inefficaces dans la dépollution de sols contaminés à de faibles concentrations et leurs coûts très élevés limitent leurs usages sur de grandes surfaces. C'est pourquoi l'utilisation de méthodes de bioremédiation par l'utilisation de plantes et de microorganismes constituent une solution adéquate dans la réhabilitation de sols pollués. L'usage de microorganismes génétiquement modifiés afin d'augmenter leur performance de dépollution est de plus en plus envisagé. Jusqu'à présent, l'établissement de protocole de bioremédiation repose sur des tests empiriques effectués en laboratoire ou sur des sites pilotes. Une analyse fine des processus biophysicochimiques aux interfaces biologiques qui régissent l'assimilation des métaux par les organismes permettrait d'optimiser les capacités de dépollution des organismes épurateurs utilisés.

Dans ce cadre, ce chapitre met en évidence les performances de bactéries accumulatrices de métaux en employant le formalisme théorique d'analyse de la dynamique de partition des métaux aux biointerfaces (détaillé au chapitre précédent). Plus précisément, deux souches d'*Escherichia coli* mutées pour limiter les capacités d'excrétion des métaux ont été exposées à des solutions de cadmium à différentes fractions volumiques. L'introduction d'un plasmide qui permet la production d'une métallothionéine intracellulaire (MTc) dans l'une de ces deux souches a permis d'estimer l'impact d'une complexation intracellulaire forte sur la dynamique de partition des métaux. Les cinétiques de déplétion des concentrations en métaux en solution ont été obtenues par l'emploi de techniques électroanalytiques. Ces expérimentations ont aussi conduit à déterminer les quantités de métaux adsorbés aux surfaces bactériennes, confirmées par des mesures indépendantes en utilisant une technique d'échange de ligands. A l'aide du formalisme théorique précédemment décrit (voir chapitre 3), l'interprétation des données de déplétion des métaux permet la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques propres aux processus biophysicochimiques du compartiment intracellulaire, au niveau de l'interface biologique et dans le milieu d'exposition. Les résultats indiquent que la cinétique de formation du complexe

métallique intracellulaire est si rapide qu'elle court-circuite l'excrétion des métaux internalisés à tel point qu'une déplétion complète des métaux en solution est observée pour les fractions volumiques les plus élevées. Enfin, l'analyse des données expérimentales par ce formalisme a permis d'estimer la constante de stabilité du complexe intracellulaire, confirmée par des mesures indépendantes de spéciation thermodynamique utilisant des techniques électroanalytiques menées dans un milieu physicochimiquement proche de la composition du cytosol bactérien.

PCCP

PAPER

View Article Online
View Journal

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

Cite this: DOI: 10.1039/c7cp05456d

Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial interfaces†

Romain M. Présent,[ab] Elise Rotureau,*[ab] Patrick Billard,[ab] Christophe Pagnout,[cd] Bénédicte Sohm,[cd] Justine Flayac,[cd] Renaud Gley,[ab] José P. Pinheiro[ab] and Jérôme F. L. Duval*[ab]

Received 10th August 2017,
Accepted 15th October 2017

DOI: 10.1039/c7cp05456d

rsc.li/pccp

Genetically engineered microorganisms are alternatives to physicochemical methods for remediation of metal-contaminated aquifers due to their remarkable bioaccumulation capacities. The design of such biosystems would benefit from the elaboration of a sound quantitative connection between performance in terms of metal removal from aqueous solution and dynamics of the multiscale processes leading to metal biouptake. In this work, this elaboration is reported for *Escherichia coli* cells modified to overexpress intracellular metallothionein (MTc), a strong proteinaceous metal chelator. Depletion kinetics of Cd(II) from bulk solution following biouptake and intracellular accumulation is addressed as a function of cell volume fraction using electroanalytical probes and ligand exchange-based analyses. It is shown that metal biouptake in the absence and presence of MTc is successfully interpreted on the basis of a formalism recently developed for metal partitioning dynamics at biointerfaces with integration of intracellular metal speciation. The analysis demonstrates how fast sequestration of metals by intracellular MTc bypasses metal excretion (efflux) and enhances the rate of metal depletion to an extent such that complete removal is achieved at sufficiently large cell volume fractions. The magnitude of the stability constant of nanoparticulate metal–MTc complexes, as derived from refined analysis of macroscopic bulk metal depletion data, is further confirmed by independent electrochemical measurement of metal binding by purified MTc extracts.

1. Introduction

Microorganisms play a key role in the biogeochemical cycling of trace elements and heavy metals in aquatic ecosystems and in determining their speciation, availability and toxicity.[1] In the past decades, much work has been devoted to decipher the biochemical strategies developed by bacteria to modulate their uptake, accumulation or excretion of metals according to their metabolic[2] demands and/or metals toxicity.[3–5] The processes underlying metal homeostasis involve a large range of (bio)-chemical reactions, which includes electron transfer processes,[6] production of metal-binding peptides and proteins,[7–9] inorganic precipitation,[10,11] active transport,[12,13] efflux,[14] intracellular sequestration,[15] or adsorption at the cell wall.[16] The ability of microbes to withstand toxic metal concentrations using intracellular detoxifying systems is further extensively exploited in metal bioremediation strategies. With the advent of genetic and bioengineering techniques, a large amount of bacterial mutant strains with specific metal accumulation features have been indeed developed for pollutant removal purposes.[17–19] For the sake of illustration, the bioproduction of extracellular polymeric

[a] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F54501, France.
E-mail: elise.rotureau@univ-lorraine.fr, jerome.duval@univ-lorraine.fr
[b] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France
[c] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France
[d] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Section A: Determination of cell volume fraction φ. A1. Bacteria imaging using Atomic Force Microscopy (AFM). A2. Evaluation of the relationship between OD_{600} and cell concentration. Section B: Electrokinetic measurements. Section C: Electroanalytical measurements. C1. Preparation of the thin mercury film electrode (TMFE). C2. AGNES and SCP measurement principles. C3. Experimental protocol for electrochemical measurements. Section D: Addressing metal biosurface sorption as a function of cell volume fraction φ. D1. Quantification of adsorbed cadmium concentration at the biosurface using Ligand Exchange Technique. D2. Metal adsorption measurements *versus* φ and conclusions. Section E: Details on purification of MBP-MT. Section F: Determination of Cd(II)–MTc complex stability constant from electrochemical measurements. Section G: Construction of a master curve from Cd(II) depletion kinetic data collected for JW3434 cells (Fig. 1A). See DOI: 10.1039/c7cp05456d

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

substances with high metal sorption capacity[20] or the overproduction of periplasmic or cytoplasmic[21,22] metal-binding peptides confers upon the engineered microorganisms an enhanced metal accumulation capacity together with a better tolerance against harmful effects.[23,24]

Despite the extensive experimental work demonstrating a successful bio-assisted immobilization of metals according to the above strategies, there have been scant efforts to rationalize how mutations of metal-accumulating microorganisms affect the overall dynamics of metal partitioning between intracellular, biointerfacial and extracellular compartments. In particular, this step is required for a proper evaluation and prediction of metal bioremoval performance as a function of the physicochemical conditions prevailing in aquatic environmental systems where out-of-equilibrium metal speciation and transport processes may be operative.[25] Such processes together with intracellular metal sequestration dynamics are ignored within classical thermodynamic representations as adopted in *e.g.* the Biotic Ligand Model (BLM).[26–30]

A pioneering formulation of the impacts of intracellular metal detoxification and bio-compartmentalization on cell viability was proposed by Redeker and Blust[31] and inspired by the work of Wallace *et al.*[15] The authors proposed an operational classification of intracellular metal species in terms of a spatial pool containing biologically inactive (or detoxified) metals (BIM) and another pool of biologically active metals (BAM).[32] According to this conceptual scheme, for metal concentrations exceeding a given threshold value in the BIM pool, metal discharge into the BAM pool takes place, which subsequently leads to harmful biological effects. This so-called BIM-BAM model offers a useful tool that relates intracellular metal compartmentalization kinetics and metal toxicodynamics from the measurement of subcellular metal fractionation and internal storage over time. Despite this visionary identification of the paramount importance of intracellular metal speciation in metal risk-assessment, a limit of the BIM-BAM representation is the neglect of the interplay between the dynamics of metal supply to the cells, the rate of metal internalization at the microorganism/medium interphase[33,34] and the dynamics of intracellular metal sequestration.[35]

As a first step toward the elaboration of such an intricate coupling, we recently derived a formalism for metal partitioning at biointerfaces with explicit integration of the various timescales pertaining to the relevant processes governing metal diffusion from bulk solution to/from the internalisation sites (or metal-transporter sites), metal internalisation/excretion, metal adsorption at the cell wall and intracellular sequestration by nanoparticulate metal-binding entities (*e.g.* proteins).[35] This formalism further elaborates the characteristic timescale for metal depletion/removal from bulk solution relevant at the macroscopic scale of the cell dispersion as a function of the above nanoscopic and microscopic partitioning processes operative in the intracellular volume and at the interfacial compartment. In this work, the formalism is confronted for the first time to experiments performed in aqueous solution containing Cd(II) ions and *Escherichia coli* strains genetically modified to overexpress intracellular metallothionein (MTc), a strong proteinaceous metal chelator with nanometric Stokes radius.[36,37] It is shown that Cd(II) biouptake and depletion from bulk solution can be quantitatively reconstructed by means of theory over *ca.* 3 hours cell exposure delay and over a wide range of cell volume fractions (0 to 10^{-3}). The experimental and theoretical results obtained with modified *E. coli* strains are thoroughly compared to those collected on their equivalents lacking MTc. The procedure allows for a clear and quantitative rationale of the catalytic role played by intracellular nano-sized MTc in the macroscopic bioremoval of metal ions from solution.

2. Theory

In the following, we consider the situation where metal-accumulating and supposedly spherical bacterial cells are dispersed in an aqueous medium containing metal ions M^{z_M+} (M for short) with bulk concentration $c_M{}^*(t)$ at time t, with the reference $t = 0$ corresponding to the introduction of bacterial cells in the medium at cell volume fraction φ. Under the non-complexing outer medium conditions applicable in this work (see Section 4), partitioning of M over time at the cell/solution interface is generally governed by the interplay between the conductive diffusion of M from bulk solution to the metal-transporter sites, the adsorption of M at non-transporter sites supported by the membrane, by internalization, excretion and intracellular metal sequestration *via* M complexation with soft proteinaceous intracellular chelators (metallothionein, denoted as MTc, in this work). Recent theory[35] offers a conceptual physicochemical framework that elaborates how chemodynamics of intracellular metal complexes and dynamics of the above interfacial and extracellular processes jointly affect the kinetics of metal depletion from bulk solution as a result of biouptake and biosorption. The basics of this formalism are briefly recalled below.

2.1. Flux expressions for metal biouptake/excretion, extracellular diffusive metal transport and intracellular metal complex association/dissociation kinetics

In line with previous reports,[33–35] the uptake flux of free metal ions M at time t, $J_u(t)$ (mol m^{-2} s^{-1}), is assumed to follow a Michaelis–Menten mechanism corresponding to a fast Langmuirian adsorption of M at the membrane metal-transporter sites S_u, followed by a first-order rate-limiting internalisation step with rate constant k_{int}:

$$J_u(t)/J_u{}^* = c_M^a(t)/(K_M + c_M^a(t)), \quad (1)$$

where the maximum uptake flux $J_u{}^*$ (mol m^{-2} s^{-1}) is defined by $J_u{}^* = k_{int}K_HK_M$, with K_M (mol m^{-3}) and K_H (m) the reciprocal metal affinity for S_u and the Henry adsorption coefficient of M to S_u, respectively. In detail, K_H is connected to K_M *via* $K_H = \Gamma_{S_u}/K_M$ where Γ_{S_u} refers to the smeared-out surface concentration (mol m^{-2}) of metal-transporter sites S_u. $c_M^a(t)$ (mol m^{-3}) pertains to the concentration of M at the active cell surface and it identifies with $c_M{}^*(t)$ on the premise that cell electrostatics is completely screened and metal diffusion from bulk solution to

 This journal is © the Owner Societies 2017

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

S_u is fast compared to the very internalisation process, a condition that is tacitly hypothesized within equilibrium BLM.[38] The excretion flux J_e (mol m^{-2} s^{-1}) at time t can be written in the form $J_e(t) = k_e\phi_u^M(t)$[39] where k_e (s^{-1}) is the excretion kinetic constant and $\phi_u^M(t)$ (mol m^{-2}) is the concentration of free M in the intracellular volume at t expressed per microorganism unit surface area. The diffusion flux of M at the membrane surface, J_M (mol m^{-2} s^{-1}), is formulated from solution of the applicable steady-state Nernst–Planck equations with account of interfacial cell electrostatics according to[33,34]

$$J_M(t) = \bar{f}_{el}D_{M,out}(c_M{}^*(t) - \beta_a{}^{-1}c_M^a(t))/a, \quad (2)$$

where $D_{M,out}$ (m^2 s^{-1}) is the diffusion coefficient of M in the extracellular medium, β_a is the (dimensionless) Boltzmann factor for accumulation of M at the membrane surface as determined by the electrostatic properties of the bacterial interphase, and a is the radius of the cells assimilated here to spheres. The dimensionless $\bar{f}_{el}$ involved in eqn (2) accounts for possible biosurface appendage-mediated retardation of M transport from solution to the membrane[33,34] and for the Debye acceleration of the diffusion of positively charged M as a result of the equilibrium electric double layer field at the interphase formed between solution and negatively charged microorganism.[40] The reader is referred to ref. 33 and 40 for detailed expression of $\bar{f}_{el}$ as a function of (bio)particle electrostatics and peripheral cell surface structure dimension. The time derivative of the concentration ϕ_u^M of internalized free M simply corresponds to the uptake flux $J_u(t)$ corrected for excretion and for interconversion of intracellular free M due to intracellular complexation, *i.e.*[35]

$$d\phi_u^M(t)/dt = J_u(t) - k_e\phi_u^M(t) - k_a{}^*\rho_S^{V_i}\phi_u^M(t) + k_d{}^*\phi_u^c(t), \quad (3)$$

where $k_a{}^*$ (mol^{-1} m^3 s^{-1}) and $k_d{}^*$ (s^{-1}) define the rate of intracellular formation/dissociation of metal–metallothionein complexes, $\phi_u^c(t)$ (mol m^{-2}) is the concentration at t of intracellular metal complexes per unit microorganism surface area. The quantity $\rho_S^{V_i}$ (mol m^{-3}) stands for the molar concentration of binding sites S carried by the ensemble of intracellular MTc and smeared-out over the volume of an individual cell. The counterpart of eqn (3) for intracellular complexed metal forms simply reads as[35]

$$d\phi_u^c(t)/dt = k_a{}^*\rho_S^{V_i}\phi_u^M(t) - k_d{}^*\phi_u^c(t). \quad (4)$$

Expressions for $k_{a,d}{}^*$ were derived on the basis of a recent formalism[41,42] for chemodynamics of nanoparticulate metal complexes in aqueous solution that extends the classical Eigen complexation theory[43] strictly valid for molecular metal binding ligands.[35] $k_{a,d}{}^*$ thus includes both intracellular transport and chemical kinetic components associated with the intracellular diffusion of M to/from nano-sized MTc and with complex formation/dissociation, respectively. The developments above tacitly assume that the complexation of M in the intracellular compartment is predominantly mediated by MTc. This assumption was verified by electrochemical speciation measurements carried out in cytosol-like media that reproduced the conditions prevailing in the intracellular compartment relevant in this work (see details in ESI,† part F). Obviously, advanced spatially-resolved techniques would be required to follow the dynamics of metal transport and the kinetics of metal complexation in cellular volume, and therewith evaluate the magnitude of $k_{a,d}{}^*$ to subsequently test the fundaments of the theory detailed in ref. 41 and 42 applicable to metal speciation in aqueous dispersion of nanoparticulate ligands. To that end, precise knowledge of the local intracellular conditions is required, which includes *e.g.* pH and ionic strength. The account of competing biocomplexants in the formulation of eqn (3) and (4) is further mandatory for cases where there is a broad spectrum of intracellular complexing entities that define the overall partitioning between free and complexed metal ions within the cell volume. Despite these challenging tasks, metal speciation dynamics in intracellular environments is inherently determined by mixed chemical kinetic and transport contributions, which justifies application of the existing principles involved in the theory detailed in ref. 41 and 42 for metal speciation in aqueous dispersions of nanoparticulate ligands. In the following we introduce the dimensionless M–MTc stability constant $\bar{K}^*$ defined by $\bar{K}^* = k_a{}^*\rho_S^{V_i}/k_d{}^*$. It is stressed that $\bar{K}^*$ is defined here for intracellular conditions because the metal-complexing agents (metallothionein, MTc) are in this work exclusively distributed within the intracellular volume. The stability constant with mol^{-1} m^3 dimension simply corresponds to the ratio $k_a{}^*/k_d{}^*$.

2.2. Metal partitioning dynamics: governing equations

Considering that metal adsorption to non-transporter sites is fast compared to depletion and biouptake processes (see Section 4),[35,44] the searched $c_M{}^*(t)$, $c_M^a(t)$, $\phi_u^c(t)$ and $\phi_u^M(t)$ are obtained from numerical solution of a set $\{\Omega\}$ of non-linear, coupled and time-dependent differential equations[35] derived from: (i) the mass balance condition that relates metal depletion level in bulk solution at t to the amounts of bioaccumulated and excreted metal species, assuming that the surface concentration Γ (mol m^{-2}) of metals adsorbed at the cell wall is constant with time, (ii) the steady-state M transport condition defined by $J_M(t) + J_e(t) = J_u(t)$ (where $J_{M,e,u}(t)$ are defined in Section 2.1), which in turn leads to a generalized form of the non-equilibrium Best equation that interrelates surface and bulk metal concentrations at any time t, and (iii) the kinetic eqn (3) and (4) (immaterial in the absence of MTc). The reader is referred to ref. 35 for further details. In particular, the steady-state metal transport condition (ii) reads after developments

$$\frac{d\bar{c}_M{}^*(t)}{dt} = -k_e(1+\lambda)\bar{c}_M{}^*(t) + \left\{\Sigma_{tt}\left(Bn^{-1} + \frac{1}{(1-\Sigma_t)^2}\right) + k_e\Sigma_t\left(\lambda Bn^{-1} + \frac{1+\lambda}{1-\Sigma_t}\right) - Bn^{-1}k_d{}^*\Phi_t^T\right\}\Big/ x_o, \quad (5)$$

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

with $\bar{c}_M{}^*(t) = c_M{}^*(t)/c_M{}^*(0)$, Σ_{tt} (s^{-1}) the first derivative with respect to time t of the normalized uptake flux defined by $\Sigma_t = J_u(t)/J_u{}^*$, $x_o = [K_M/(\beta_a c_M{}^*(0))]^{-1}$ the dimensionless M affinity to surface internalisation sites S_u, and Φ_t^T the dimensionless total concentration of intracellular metal species at t defined by $k_e[\phi_u^c(t) + \phi_u^M(t)]/J_u{}^*$. Eqn (5) further involves Bn^{-1}, the reciprocal of the dimensionless Bosma number (also known as the bioavailability number) defined by $Bn^{-1} = R_T/R_S$ with $R_S = 1/(k_{int}K_H\beta_a)$ (m^{-1} s) the membrane transfer resistance that reflects the ability of M to cross the cell membrane barrier and $R_T = 1/(D_{M,out}\bar{f}_{el}a^{-1})$ (m^{-1} s) the resistance to metal diffusion transport from solution to the active membrane surface.[33,34] Cases where equilibrium between surface and bulk metal concentrations holds at any t correspond to the BLM limit $Bn^{-1} \ll 1$.[33,34] Eqn (5) further highlights that the rate $d\bar{c}_M{}^*/dt$ of bulk metal depletion is intimately connected to the dimensionless quantity λ defined by[35]

$$\lambda = k_a{}^*\rho_S^{V_i}\left(1 + \bar{K}^{*-1}\right)/k_e, \tag{6}$$

which basically compares the rate constant for intracellular M–MTc complex formation to the rate of M excretion from the intracellular volume to the outer solution. For cells devoid of any peripheral soft surface appendage and under salinity conditions in line with screened cell surface electrostatics (*i.e.* $\bar{f}_{el} \to 1$ and $\beta_a \to 1$),[35] metal partitioning dynamics at the microorganism/solution interphase is fully defined provided that the biophysicochemical variables λ, k_e, $k_{int}K_H$, K_M and $\bar{K}^*$ are known. Section 4 details how these quantities can be retrieved from step-by-step constrained interpretation of metal depletion measurements $c_M{}^*(t)$ at various cell volume fractions φ.

Whereas the solution of the set $\{\Omega\}$ of differential equations invoked above requires resorting to numerics,[35] analytical tractable solution can be derived in the equilibrium regime reached at $t \to \infty$.[35] Considering cells devoid of any protruding surface structures, assuming that equilibrium between surface and bulk metal concentration holds at $t = 0$ (*i.e.* $c_M^a(0) = \beta_a c_M{}^*(0)$) and further following the strategy detailed in ref. 45 valid in the absence of intracellular M speciation, the expression for $c_M{}^*(t \to \infty)$ given in ref. 35 with account of intracellular M speciation may be arranged according to the reduced form

$$c_M{}^*(t \to \infty) = K_M\beta_a{}^{-1}\left\{-\left[1 + \frac{\varphi}{\varphi^*(1+\bar{K}^*)}\right] + x_0 + \left\{\left[1 + \frac{\varphi}{\varphi^*(1+\bar{K}^*)} + x_0\right]^2 - \frac{4\varphi}{\varphi^*(1+\bar{K}^*)}x_0\right\}^{1/2}\right\}\Big/2, \tag{7}$$

with $\varphi^* = ak_e/(3\beta_a K_H k_{int})$ (dimensionless).

3. Materials and methods

In this work, Cd(II) biouptake and partitioning dynamics at cell/solution interphase were investigated for two *Escherichia coli* mutants as model biosystems, both constructed from the BW25113 reference strain. First, *E. coli* JW3434 mutant from the Keio mutant collection,[46] a derivative of BW25113 lacking the ZntA metal efflux pump, was obtained from the *E. coli* Genetic Stock Center of Yale University. Kanamycin resistance cassette was removed, and the introduction of the plasmid pMalc2-MT (kindly provided by Dr Sandrine Sauge-Merle from CEA Cadarache, France)[47] into JW3434 yielded the second strain JW3434-MTc where the expression of intracellular metallothionein chelators (maltose binding protein–metallothionein fusion protein MBP-MT) is inducible by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The size of the sphere-assimilated bacterial cells was determined from atomic force microscopy (AFM) imaging in liquid (ESI-A,† Fig. S1). The so-obtained bacterial size value was subsequently adopted in data modeling on the basis of the theoretical formalism outlined in Section 2. AFM analysis further supports the absence of any protruding surface structure which could act as barrier to metal diffusion from solution to JW3434 and JW3434-MTc membranes. Last, electrophoretic mobility measurements on JW3434 and JW3434-MTc strains provided in ESI-B† (Fig. S2) evidence that cell surface electrostatics was systematically screened under the medium salinity conditions adopted in this work. As a result, the equalities $\beta_a = \bar{f}_{el} = 1$ systematically held where β_a and $\bar{f}_{el}$ were defined in Section 2.

3.1. Growth conditions for JW3434 and JW3434-MTc cell mutants

For each strain, agar plates were inoculated with frozen glycerol cell stocks stored at −80 °C. Single colonies of JW3434 were then collected from agar plates of Luria–Bertani (LB) media, and aerobically cultured in liquid LB using a circular bath shaker (160 rpm, 37 °C) during 15 hours. Then, 10 ml of this culture was incubated in 100 ml LB over 3 hours in order to reach a final optical density OD_{600} of 2 (measured at 600 nm wavelength). Concerning JW3434-MTc, LB media was supplemented with 100 μg ml^{-1} of ampicillin for selection purpose. A JW3434-MTc preculture of 8 hours was realized in the circular bath shaker at 37 °C under 160 rpm agitation conditions. Then, 10 ml of this culture was incubated in 100 ml LB over *ca.* 15 hours at 22 °C (160 rpm agitation) in the presence of 0.2 mM IPTG to induce the production of intracellular metallothionein. Culture growth was subsequently stopped at a final optical density OD_{600} of 2. For both strains, cells were systematically washed twice by gentle centrifugation and dispersed in a poor metal-complexing medium (HMM).[45,48] The ionic strength of the medium was finally fixed at 110 mM after proper addition of 1 M $NaNO_3$ solution (Fluka, purity ≥99.999%). Bulk metal depletion measurements (see Section 3.3) were performed with the so-obtained cell dispersion at various values of cell volume fraction φ achieved after dilution. Values of φ were determined from bacterial dimension measured by AFM and from cell concentration determined in the culture medium by flow cytometry measurements (ESI-A†).

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

3.2. Experimental electrochemical setup

An Ecochemie Autolab type III potentiostat controlled by GPES 4.9 software (Ecochemie, The Netherlands) was connected to a voltammetry stand (Metrohm model 663VA). The set up comprises three electrodes: a rotating glassy carbon disk coated with a thin mercury film as working electrode (TMFE), a Dri-ref-5 reference electrode from World Precision Instruments (Sarasota, USA) and a counter glassy carbon electrode. The preparation of TMFE was repeated daily for each set of experiments according to the procedure given in ESI-C.†

3.3. Electrochemical measurements of kinetics of metal depletion from bulk solution

2 ml of freshly prepared bacterial cells (Section 3.1) with known volume fraction φ was added in a HMM solution containing 1.91×10^{-6} M concentration of Cd(II) (ultra-pure certified $Cd(NO_3)_2$, Fluka). From this very moment, scanning chronopotentiometry measurements[49] (details in ESI-C†) were continuously conducted for a period of 5 hours. OD_{600} was measured at the start and at the end of each experiment to ensure that φ remains constant during electrochemical acquisition. Plate counting was further performed after completion of the electrochemical experiments and it evidenced the absence of metal toxicity effects on both tested strains under the exposure conditions adopted in this work. As far as JW3434-MTc strain was concerned, pMalc2-MT genes induction strongly varied from one culture to another and this variability is commonly accepted for genetically modified microorganisms.[50–52] Therefore, in order to obtain a consistent set of results in terms of intracellular metallothionein concentration per cell over the full range of tested φ conditions, all experiments were conducted from a single fresh culture within the same day. For each strain, the amount of Cd(II) adsorbed on the total biosurface developed in the cell dispersion was determined from electrochemical measurement (ESI-D,† Fig. S3) immediately after addition of cells into the solution according to the procedure detailed in a preceding report.[45] The so-derived adsorption features were independently confirmed by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) analysis of samples prepared following the ligand exchange protocols detailed in ESI-D† (Section 4).

3.4. Determination of the stability constant of Cd(II)-purified MTc complexes in cytosol like-medium

The stability constant of the complex formed between Cd(II) and MTc was further evaluated using purified MTc originating from JW3434-MTc strain. The details of the protein purification procedure are given in ESI-E.† Measurements were performed in a 150 mM $NaNO_3$ solution (pH buffered at 7.2 with *N*-morpholino-propanesulfonic acid sodium salt, Sigma Aldrich) containing the purified MBP-MT and the other intracellular proteins mixed at a concentration ratio that best mimic the cytosolic composition of *E. coli* strain,[53,54] as further detailed in ESI-F.† The stability constant of nanoparticulate Cd(II)–MTc complex was then derived from AGNES (Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping) electroanalytical measurements[55] along the lines detailed in ESI-C.†

4. Results and discussion

4.1. Evaluation of metal biouptake from analysis of bulk metal depletion kinetics: the case of *E. coli* strain devoid of intracellular MTc

Fig. 1A reports the dependence of the ratio $c_M^*(t)/c_M^*(0^+)$ on time, with $c_M^*(t)$ and $c_M^*(0^+)$ the concentrations of Cd(II) ions at time t in solution and at $t = 0^+$ *i.e.* immediately after the rapid completion (see discussion below) of metal adsorption on JW3434 cells surface. Results are provided for different values of φ specified in the caption. For each φ tested, $c_M^*(0^+)$ was derived from the corresponding initial decrease in Cd(II) concentration after introduction of the cells in the medium. The normalization procedure adopted in Fig. 1 thus masks this initial adsorption process and highlights the decrease in metal concentration over time as the sole result of biouptake. It is stressed that φ remains constant during the whole duration of the experiments and that metal complexation in extracellular HMM medium is negligible.[45] The features underlying time-dependent depletion of Cd(II) from bulk solution as collected for JW3434 cells are qualitatively similar to those reported elsewhere[45] for the transporter-deficient strain *Pseudomonas putida* exposed to Cd(II) solution. Briefly, 3 successive regimes can be distinguished. First, the initial decrease of the bulk metal concentration to the value $c_M^*(0^+)$ invoked above is attributed to the fast metal sorption at the biomembrane surface occurring shortly (within less than 2 minutes, as determined by electrochemical measurements) after addition of the bacteria in the solution. This process is followed by a gradual decrease of c_M^* with time according to an exponential-like decay. Then, at sufficiently long time after the start of the experiment (*i.e.* longer than *ca.* 3 h), metal partitioning equilibrium is achieved at the cell/solution interface and c_M^* asymptotically approaches a finite plateau value denoted as $c_M^*(\infty) \equiv c_M^*(t \to \infty)$. As demonstrated elsewhere[34,35] and in line with eqn (7), this non-zero equilibrium plateau value reflects the occurrence of metal excretion from the intracellular body (efflux), which represents a metal detoxification strategy developed by *E. coli*.[39] Indeed, despite the ZntA metal efflux pump disabled, other non-specific Cd transporter are involved in alternative excretion processes.[56,57] In order to quantitatively address the impacts of MTc on interfacial metal partitioning dynamics, it is required to first evaluate the key biophysical parameters pertaining to Cd(II) uptake by JW3434 reference cells devoid of intracellular MTc. This is the purpose of the developments below.

Theoretical analysis of metal depletion profiles for JW3434 mutant. The step-by-step methodology previously adopted for quantifying the dynamics of Cd uptake by *P. putida*[45] is used here for JW3434. As a prerequisite for the application of the theoretical formalism outlined in Section 2, the hypothesis of time-independent metal biosorption process must be verified.

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

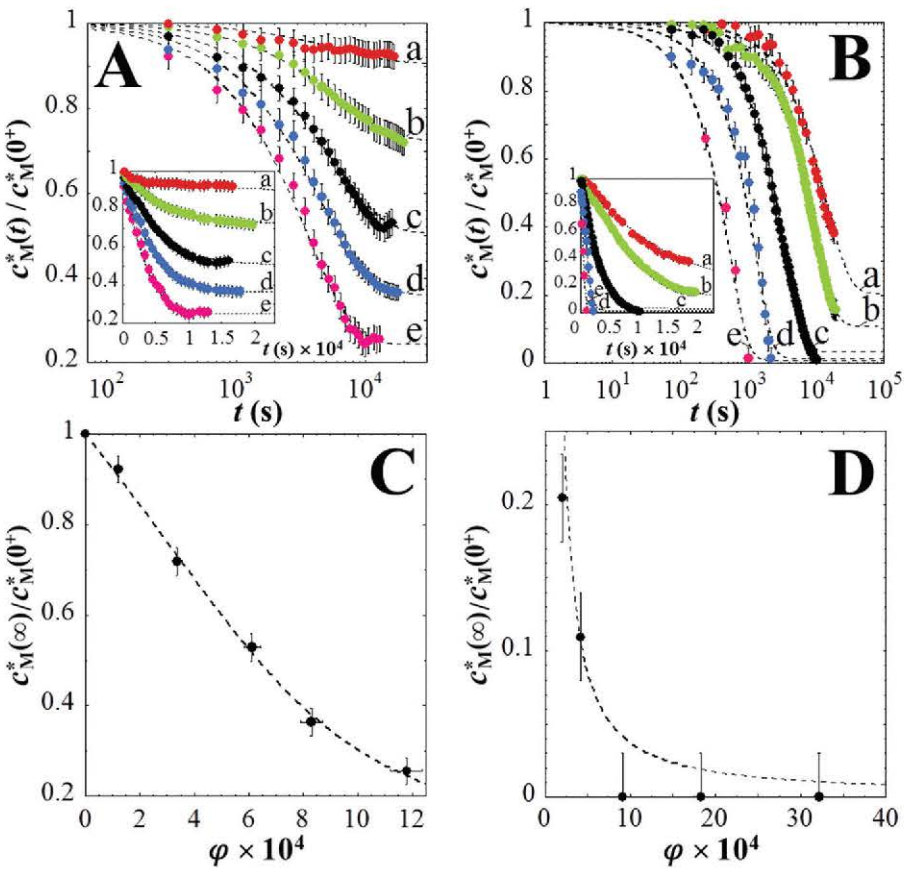


Fig. 1 (A) Dependence of Cd(II) concentration in bulk solution on time as obtained for different volume fractions φ of JW3434 mutant cells, with $\varphi = 1.21 \times 10^{-4}$ (a), 3.37×10^{-4} (b), 6.12×10^{-4} (c), 8.31×10^{-4} (d) and 1.18×10^{-3} (e). Uncertainties on φ are determined from cell size analysis by AFM imaging. Cd(II) concentration $c_M^*(t)$ is normalized by $c_M^*(0^+)$, the concentration of initially introduced metal ions corrected for biosorption (see text for details). The interrupted lines correspond to predictions from theory (Section 2) as detailed in ref. 34 and 45 with the values of k_e, $K_H k_{int}$ and K_M specified in Table 1. Error bars pertain to analytical measurement uncertainties and the inset provides a data representation according to linear time-axis. (B) As in (A) for JW3434-MTc mutant cells, with $\varphi = 2.03 \times 10^{-4}$ (a), 4.23×10^{-4} (b), 9.13×10^{-4} (c), 1.83×10^{-3} (d) and 3.22×10^{-3} (e). The dotted lines correspond to predictions from theory (Section 2) with values of $\bar{K}^*$, λ, k_e, $K_H k_{int}$ and K_M listed in Table 1. (C) Dependence of the ratio $c_M^*(t \to \infty)/c_M^*(0^+)$ on φ for JW3434 cells. Points: experimental data. Interrupted lines: prediction from eqn (7) with $K_M = 3.82 \times 10^{-4}$ mM and $\varphi^* = 2.23 \times 10^{-4}$. Vertical error bars correspond to analytical uncertainties and horizontal ones to uncertainties associated with evaluation of φ. (D) The same as in (C) for JW3434-MTc with $K_M = 3.82 \times 10^{-4}$ mM, $\varphi^* = 1.18 \times 10^{-4}$ and $\bar{K}^* = 3.0$.

This was done by quantifying the amount of metal ions bound to cells surface as a function of t from AAS analysis of batch samples of given φ and prepared according to ligand exchange technique aimed at discriminating between free and surface bound metal fractions. Fig. 2A depicts the corresponding metal biosorption features together with the time-dependent bulk concentration $c_M^*(t)$ of free metals as derived from electro-analytical measurements (Fig. 1A) and from independent AAS analysis. The results clearly demonstrate that the concentration of sorbed metal at the cell surface remains constant with time and that it represents *ca.* 25% of the total metal amount in solution. This ratio value further very well agrees with that evaluated on the basis of the initial drop $c_M^*(0) - c_M^*(0^+)$ detected by electrochemistry (further details in ESI-D†). This reflects that (i) the number of passive adsorption sites at the biosurface is significantly larger than that of internalization sites, and (ii) the saturation of the passive adsorption sites is nearly complete over the whole range of bulk metal concentrations $c_M^*(t)$. Violation of (i) and/or (ii) would indeed necessarily lead to a time-dependent surface metal adsorption, in contrast to experimental findings. In line with these arguments, a linear dependence of the concentration drop $c_M^*(0) - c_M^*(0^+)$ with φ was confirmed, as detailed in ESI-D.† Accordingly, the theoretical formulation provided in Section 2 is applicable pending consideration of the metal concentration $c_M^*(0^+)$ as initial concentration of bioavailable metals (Fig. 1A). As detailed in ref. 45, the quantitative interpretation of the depletion profiles $c_M^*(t)$ displayed in Fig. 1A relies on the preliminary analysis of the decrease in bulk metal concentration $c_M^*(\infty)$ (reached in the equilibrium regime at $t \to \infty$) with increasing φ (Fig. 1C). For that purpose, eqn (7) taken in the limit $\bar{K}^* \ll 1$ (*i.e.* absence of MTc) was used to fit the dependence of $c_M^*(\infty)$ on φ according to Levenberg–Marquardt algorithm used to minimize the difference between experimental data and theoretical prediction.[58,59] For that purpose, the only relevant fitting parameters at this stage are the

 This journal is © the Owner Societies 2017

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

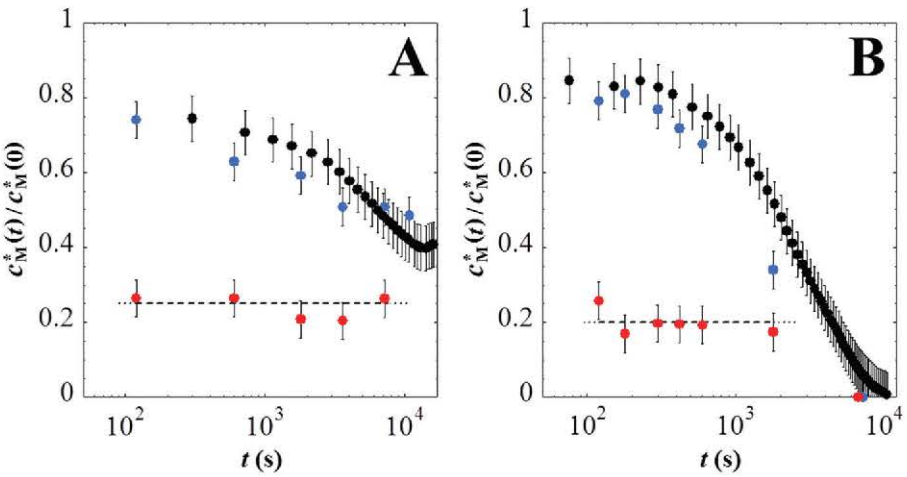


Fig. 2 Time-dependent concentration of Cd(II) adsorbed at cells surface normalized by the concentration of Cd(II) initially present in solution. Results apply for JW3434 mutant cells at $\varphi = 6.12 \times 10^{-4}$ (A) and for JW3434-MTc at $\varphi = 9.13 \times 10^{-4}$ (B). Meaning of symbols: (●) sorbed Cd(II) and (●) Cd(II) in bulk solution as measured by ligand exchange technique and AAS, (●) bulk metal concentration determined from electroanalytical measurements. Error bars pertain to analytical uncertainties.

reciprocal affinity constant K_M of metals for the internalization sites and the effective cell volume fraction $\varphi^* = ak_e/(3\beta_a K_H k_{int})$ introduced in Section 2. The application of eqn (7) requires that the equilibrium Boltzmann relationship $c_M^a(0) = \beta_a c_M^*(0)$ holds (see Section 2) recalling that the equalities $\beta_a = \bar{f}_{el} = 1$ apply under the salinity conditions adopted in this work. The validity of this relationship will be verified *a posteriori* on the basis of the Bosma number Bn determined from interpretation of metal depletion kinetics (Fig. 1A). As shown in Fig. 1C, eqn (7) successfully recovers the experimental findings with values of K_M and φ^* reported in Table 1. Full analysis of the depletion kinetic patterns displayed in Fig. 1A was subsequently performed along the lines detailed in Section 2, *i.e.* from numerical solution of the coupled mass conservation condition and generalized Best equation as formulated by Duval *et al.*[34,35] Reconstruction of the experimental data $c_M^*(t)$ *versus* φ benefits from our prior evaluation of the parameters K_M and φ^* (Fig. 1C). Indeed, as the expression of φ^* involves the ratio $k_e/(K_H k_{int})$, the interpretation of the bulk metal depletion profiles of Fig. 1A obtained under distinct φ conditions is constrained to the adjustment of a single physical quantity, *i.e.* either the excretion rate constant k_e or the product $K_H k_{int}$. The results provided in Fig. 1A evidence the successful reconstruction of the experimental data with a unique set of kinetic (k_e and $K_H k_{int}$) and thermodynamic (K_M) constants over the whole range of cell concentrations and temporal conditions tested. Values of these variables are collected in Table 1 together with those of the maximum metal uptake flux $J_u^* = K_H k_{int} K_M$ and of the reciprocal Bosma number $Bn^{-1} = R_T/R_s = K_H k_{int} a/D_{M,out}$ (Section 2). Comparison of the latter with unity allows to diagnose whether metal biouptake is kinetically limited by metal internalization process ($Bn^{-1} \ll 1$), by metal diffusion from bulk solution to the active cell surface ($Bn^{-1} \gg 1$) or by both internalisation and transport processes $Bn^{-1} \sim 1$.[33] Inspection of Table 1 reveals that uptake of Cd(II) by JW3434 mutant cells is kinetically limited by the internalization process, or, stated differently, metal transport to cell surface is much faster than internalization. This situation corresponds to full equilibrium between surface and bulk metal concentrations all during bulk metal depletion. The result $Bn^{-1} \ll 1$ applicable for the specific metal/cell system treated here therefore justifies the validity of the relationship $c_M^a(0) = \beta_a c_M^*(0)$ that marks the validity of eqn (7) employed for rationalizing the dependence of $c_M^*(\infty)$ on φ. Finally, to further ascertain the consistency of the modeling approach, we verified that all experimental data in Fig. 1A could be correctly represented in the form of a master curve following the procedure detailed in ESI-G† (Fig. S5).

4.2. Evaluation of metal biouptake from analysis of bulk metal depletion kinetics: the case of JW3434-MTc

Fig. 1B shows the dependence of $c_M^*(t)/c_M^*(0^+)$ on time for JW3434-MTc mutants hosting metallothionein protein in their

Table 1 Values of the relevant biophysicochemical parameters involved in the theoretical formalism of Section 2 and adopted for interpreting Cd(II) biouptake and biointerfacial partitioning dynamics for JW3434 and JW3434-MTc mutant cells. $\bar{K}^*$, φ^*, λ and Bn^{-1} are dimensionless quantities

	φ^*	K_M (mM)	k_e (s^{-1})	$K_H k_{int}$ ($m\ s^{-1}$)	J_u^* ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	$\bar{K}^*$	λ	Bn^{-1}
JW3434	$(2.23 \pm 0.25) \times 10^{-4}$	$(3.80 \pm 0.90) \times 10^{-4}$	$(1.53 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	$(1.57 \pm 0.04) \times 10^{-7}$	$(0.6 \pm 0.16) \times 10^{-10}$	$\ll 1$	$\ll 1$	$(9.9 \pm 0.25) \times 10^{-5}$
JW3434-MTc	$(1.18 \pm 0.28) \times 10^{-4}$	3.80×10^{-4}	$(1.53 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ [a]	$(3.65 \pm 0.85) \times 10^{-7}$	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^{-10}$	3.0 ± 0.4	$\gg 1$	$(27.3 \pm 6.4) \times 10^{-5}$

[a] Excretion is immaterial for JW3434-MTc as intracellular sequestration bypasses metal efflux (*i.e.*, $\lambda \gg 1$). Uncertainties in $\bar{K}^*$ were derived after averaging the $\bar{K}^*$ values obtained for the various cell volume fractions φ.

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

cytoplasmic body. The striking features are (i) a comparable rate of bulk metal depletion for both strains at short exposure time and sufficiently small φ values (not shown), (ii) at longer exposure times a steeper decay of $c_M^*(t)/c_M^*(0^+)$ with time for JW3434-MTc as compared to JW3434, (iii) a complete metal removal from solution achieved with JW3434-MTc after 1 to 2 h for cell volume fractions larger than *ca.* 9×10^{-4}. Unlike JW3434, $c_M^*(\infty)$ is now well defined only for $\varphi \geq 9 \times 10^{-4}$ with $c_M^*(\infty) \sim 0$ under such high cell concentration conditions. Representation of the metal depletion kinetic features according to linear axis in time (see insets in Fig. 1) highlights the aforementioned differences observed between JW3434 and JW3434-MTc strains. As an intermediate conclusion, inspection of Fig. 1A and B reveals that intracellular MTc not only leads to modification of metal equilibrium partitioning at $t \to \infty$ but also acts as catalyst for metal biouptake process. On a quantitative level, the amplitude of these effects are intimately tied to the magnitudes of the key parameters λ and $\bar{K}^*$ introduced in the theoretical section (Section 2)[35] and evaluated below.

The adsorption features of metal ions on JW3434-MTc surface were first addressed as a function of time following the methodology detailed in Section 4.1 (Fig. 2B, ESI-D†). Shortly after cells addition in solution, the concentration of adsorbed metals reaches $c_M^*(0^+)$ and subsequently remains constant over time except in the final stage of the experiments (*i.e.* after *ca.* 2 h) where it drops to zero, thus following the trend observed for the concentration of free metal ions in solution. This indicates that the metal fraction initially sorbed at the cells surface is finally integrated within the intracellular cell volume once depletion of free metal ions in solution is nearly complete. The presumably strong affinity of metals for intracellular proteinaceous chelators (see discussion below) thus displaces the surface sorption/complexation equilibria to the intracellular compartment once bulk metal concentration approaches zero value. Accordingly, and similarly to the JW3434 case, theoretical reconstruction of the metal depletion kinetic profiles obtained for JW3434-MTc can be legitimately performed with simply correcting the initial metal concentration for adsorption.

Theoretical analysis of metal depletion profiles for JW3434-MTc. The analysis of the dependence of $c_M^*(\infty)$ on φ, as done for JW3434 cells to evaluate the corresponding K_M and φ^*, is inappropriate for JW3434-MTc mutant cells due to the absence of well-defined plateau regimes at $t \to \infty$ (Fig. 1B) over the whole range of φ. As a result, the interpretation of metal depletion/uptake data necessitates confrontation to theory on the basis of the non-linear set of coupled differential equations briefly recalled in §2 pending adjustment of the quantities λ, $\bar{K}^*$, $K_H k_{int}$, k_e and K_M. To constrain the analysis, we exploit the fact that JW3434 and JW3434-MTc are isogenic (except for the mutation leading to expression of MTc in JW3434-MTc), which allows us to identify the expected orders of magnitude of the kinetic and thermodynamic parameters $K_H k_{int}$, k_e and K_M relevant for JW3434-MTc on the basis of the results obtained for JW3434. We emphasize that attempts to theoretically reproduce the experimental data upon setting λ and $\bar{K}^*$ to zero, *i.e.* with arbitrarily ignoring intracellular metal complexation/sequestration dynamics, systematically failed. In particular, data fitting could be achieved only at the cost of decreasing k_e by two orders of magnitude as compared to the JW3434 situation, which is not compatible with the isogenicity invoked above. Table 1 collects the values of the key variables relative to biouptake and intracellular complexation processes that lead to a consistent interpretation of the data displayed in Fig. 1B over the whole range of φ and exposure time conditions. The dimensionless λ and $\bar{K}^*$ parameters address the chemodynamic features of intracellular metal complexes and strongly affect the kinetics and thermodynamics of metal partitioning between extracellular and intracellular compartments as extensively detailed elsewhere.[35] The reconstruction of the experimental data requires fixing λ to values well above unity. This translates that the rate of metal association with intracellular MTc is much larger than the rate of metal excretion which then becomes inoperative in the whole metal partitioning process. Stated differently, the fast intracellular metal sequestration *via* complexation with MTc bypasses the excretion of free M from cell body to the outer solution. As discussed elsewhere,[35] an increase of λ from zero (JW3434 case) up to $\lambda \gg 1$ (JW3434-MTc) where excretion is completely short-circuited, is accompanied by an increase of the rate of bulk metal depletion especially at large t, which is in line with Fig. 1. At sufficiently short t and small φ, the MTc-induced bypass of the excretion process is rather limited as the amount of internalized metals is not significant. In order to recover the experimental data, it is further necessary to increase by a factor 2 to 3 the value of $K_H k_{int}$ as compared to that derived for JW3434, the affinity constant K_M remaining basically similar for both strains. In turn, the presence of intracellular MTc leads to a *ca.* 2 to 3-fold increase of the maximum metal uptake flux $J_u^* = K_H k_{int} K_M$.

The analysis leads to intracellular (dimensionless) metal complexation constant $\bar{K}^*$ of about 2.6–3.4, which corresponds to a M–MTc stability constant of about 1.4 mol^{-1} m^3 under the conditions adopted in this work if considering an intracellular molar concentration (per cell) of binding sites S with value $\rho_S^{V_i} = 2.1$ mM (see discussion in ESI-F† for estimation of $\rho_S^{V_i}$). As argued in ref. 35, an increase in $\bar{K}^*$ leads to a decrease of $c_M^*(\infty)$ in agreement with comparison between Fig. 1C and D. Fig. 1B further reveals that theory slightly overestimates experimental data under time and φ conditions where $c_M^*(t)$ tends to zero. The reason simply stems from our approximation according to which the amount of adsorbed metals is constant over the whole duration of the experiments, which is not verified at $t \to \infty$ (Fig. 2B). Closer inspection of metal partitioning in this time window would benefit from adequate analytical tools to access such low bulk metal concentrations. Despite this discrepancy, the theory consistently captures the basic metal depletion/biouptake features for JW3434-MTc with a unique set of biouptake parameters (Table 1). This consistency is further supported by the comparison between $c_M^*(\infty)$ *versus* φ data and prediction from eqn (7) using the applicable values of $\bar{K}^*$, $K_H k_{int}$, k_e and K_M (Table 1).

Additional evidence for the sound physicochemical basis of the theoretical framework was provided by independent AGNES

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

electrochemical measurement of the Cd(II)–MTc complex stability constant $\bar{K}^*$ (ESI-F†). Briefly, the measurement consists in the determination of the free and complexed Cd(II) concentrations in a proteinaceous medium containing purified MTc extracts and other proteins extracted from JW3434-MTc cytoplasm. The amount of metal binding sites (here assimilated to the sole thiol groups) in the sample solution – and therewith the concentrations of purified MTc and of the other extracted cytosolic proteins – is fixed to a value consistent with that prevailing in JW3434-MTc cytoplasm[53,54] (ESI-F†). Electrochemical measurements yield $\bar{K}^*$ values from 3 to 5 over the range of ligand-to-metal concentration ratios estimated in the intracellular volume of an individual JW3434-MTc cell under the φ conditions adopted in Fig. 1B (see ESI-F,† Fig. S4). Despite the obvious uncertainties related to proteins purification and to our oversimplified reconstruction of the intracellular JW3434-MTc cell composition (*e.g.* absence of competition between Cd(II) and other metal ions like Ca(II)), the obtained $\bar{K}^*$ is in remarkable agreement with that derived from refined analysis of Cd(II) depletion data. Electrochemical analysis further reveals that metal binding by cytosolic proteins other than MTc is much less significant compared to that by MTc, which supports our approximation $\bar{K}^* \ll 1$ adopted for JW3434 cells.

4.3. Implications

The above analysis highlights the extent by which dynamics of metal biouptake and depletion from solution is modified upon controlled introduction of metal binding proteins in cell cytosol. While metal affinity to internalisation sites remains identical for the two strains of interest, internalization kinetics as subsumed in $K_H k_{int}$ (or J_u^*) is *ca.* 3 fold higher for JW3434-MTc than for JW3434. This reflects a MTc-facilitated metal uptake as a result of the demanding kinetics of intracellular metal complex formation. Accordingly, the reciprocal Bosma number Bn^{-1} pertaining to JW3434-MTc is *ca.* 3 times larger than that for JW3434: MTc favors the kinetics of metal transfer at the membrane and thus leads to a stronger limitation of biouptake by the diffusive transfer of Cd(II) from solution to the active cell membrane, *i.e.* an increase in Bn^{-1}. However, this limitation is not operational for the specific systems considered here as both strains comply with the limit $Bn^{-1} \ll 1$.

5. Conclusions

Overall, the work emphasizes the significant role played by intracellular metal speciation on the dynamics of metal partitioning at metal-accumulating biointerfaces, *i.e.* on the fractionation of metal species over time between intracellular, interfacial and extracellular compartments. Experimental data collected on model bacterial cells genetically modified to overexpress or not strong intracellular metal chelators quantitatively support the physicochemical basis of a recent metal biopartitioning theory that goes beyond the classical thermodynamic paradigm as applied in *e.g.* BLM. The theory indeed integrates the complex interplay existing between the dynamics of the various multiscale processes (metal transport, internalization, excretion, intracellular complexation, bulk depletion) operative at the nano-sized intracellular metal-binding entities, at the microorganism/solution interphase up to the whole cell dispersion. This work may pave the way for a mechanistic and quantitative interpretation of metal toxicity and bioremediation data as it offers a conceptual framework, supported by experiments, that explicitly deciphers the contributions of so-called metal (bio)partition coefficient often introduced in literature in a rather phenomenological manner.

Abbreviations

a	Radius of microorganism (m)
Bn^{-1}	Inverse of the Bosma (or bioavailability) number (dimensionless)
$c_M^a(t)$	M concentration at the membrane surface (mol m^{-3})
$c_M^*(t)$	Bulk M concentration at t (mol m^{-3})
$\bar{c}_M^*(t)$	Dimensionless bulk M concentration $c_M^*(t)/c_M^*(0)$
$\bar{f}_{el}$	Electrostatic Debye correction factor for M diffusion to microorganism membrane surface (dimensionless)
J_u^*	Maximum uptake flux of M (mol m^{-2} s^{-1})
$J_u(t)$	Uptake flux of M at time t (mol m^{-2} s^{-1})
$J_e(t)$	Excretion flux of M at time t (mol m^{-2} s^{-1})
$J_M(t)$	Diffusion flux of metal ions at the membrane surface at time t (mol m^{-2} s^{-1})
$k_{a,d}^*$	Effective kinetic constants for the conversion of free M in the volume V_i into M–MTc complex species (mol^{-1} m^3 s^{-1}), and for M–MTc dissociation (s^{-1}) (subscript 'a' and 'd', respectively)
k_e	Kinetic constant for M excretion (s^{-1})
k_{int}	Kinetic constant for metal internalisation (s^{-1})
K_H	Henry coefficient for the adsorption of M at the internalisation sites S_u (m)
K_M	Reciprocal affinity constant of M for the internalisation sites (mol m^{-3})
$\bar{K}^* = k_a^* \rho_S^{V_i} / k_d^*$	Stability constant of intracellular M–MTc complexes (dimensionless)
M	Stands for free metal ions (valence z_M)
$R_T = 1/(D_{M,out} \bar{f}_{el} a^{-1})$	Extracellular M transport resistance (m^{-1} s)
$R_S = 1/(k_{int} K_H \beta_a)$	M membrane transfer resistance (m^{-1} s)
S_u	Refers to metal-transporter sites (located at the cell membrane).
S	Refers to the metal-binding sites carried by the metallothionein.
x_o	Dimensionless affinity $1/[K_M/(\beta_a c_M^*(0))]$ of M for the internalisation sites S_u.

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

Main greek symbols

β_a	Boltzmann factor applying at the membrane surface (dimensionless)
$\phi_u^{T,M,c}$	Intracellular total concentration of M (subscript 'T'), intracellular concentrations of free M and M–MTc complexes (subscripts 'M' and 'c', respectively) (mol m^{-2})
φ	Cell volume fraction (dimensionless)
φ^*	Critical cell volume fraction defined by $\varphi^* = ak_e/(3\beta_a K_H k_{int})$ (dimensionless)
λ	Dimensionless quantity defined by eqn (6)
$\rho_S^{V_i}$	Molar concentration of binding sites S smeared-out over the intracellular compartment of an individual cell (mol m^{-3}).
Γ	Surface concentration of adsorbed metal ions (mol m^{-2})

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

We acknowledge the Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM, CRPG-CNRS UMR 7358, Vandoeuvre-les-Nancy, France) for metal titration experiments by atomic absorption flame spectroscopy. We kindly thank A. Beaussart, A. Razafitianamaharavo for AFM images and Y. Waldvogel for his help in performing metal depletion experiments (LIEC, UMR7360).

References

1 J. McComb, A. C. Turquoise, H. X. Fengxiang and P. B. Tchounwou, *J. Biorem. Biodegrad.*, 2014, **5**, 1–3.
2 C. E. Outten and T. V. O'Halloran, *Science*, 2001, **292**, 2488–2492.
3 I. Worms, D. F. Simon, C. S. Hassler and K. J. Wilkinson, *Biochimie*, 2006, **88**, 1721–1731.
4 S. Silver and L. T. Phung, in *Encyclopedia of Microbiology*, ed. M. Schaechter, Academic Press, Oxford, 2009, 220–227.
5 S. Silver, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, **27**, 341–353.
6 P. Arosio and S. Levi, *Free Radical Biol. Med.*, 2002, **33**, 457–463.
7 H. Boukhalfa and A. L. Crumbliss, *BioMetals*, 2002, **15**, 325–339.
8 R. L. Romano, C. W. Liria, M. T. Machini, P. Colepicolo and L. Zambotti-Villela, *J. Appl. Phycol.*, 2017, **29**, 811–820.
9 G. Kowald, G. S. Stürzenbaum and C. Blindauer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 65.
10 M. Fomina, S. Hillier, J. M. Charnock, K. Melville, I. J. Alexander and G. M. Gadd, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 371–381.
11 H. Aiking, K. Kok, H. Van Heerikhuizen and J. Van't Riet, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, **44**, 938–944.
12 S. Choi and A. J. Bird, *Metallomics*, 2014, **6**, 1198–1215.
13 M. Solioz and C. Vulpe, *Trends Biochem. Sci.*, 1996, **21**, 237–241.
14 D. Raimunda, M. González-Guerrero, B. W. Leeber III and J. M. Argüello, *BioMetals*, 2011, **24**, 467–475.
15 W. G. Wallace, B. G. Lee and S. N. Luoma, *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, 2003, **249**, 183–197.
16 J. A. Scott and S. J. Palmer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, **33**, 221–225.
17 G. M. Gadd, *Geoderma*, 2004, **122**, 109–119.
18 M. Mejare and L. Bülow, *Trends Biotechnol.*, 2001, **19**, 67–73.
19 M. Urgun-Demirtas, B. Stark and K. Pagilla, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2006, **26**, 145–164.
20 J. Y. Cornu, D. Huguenot, K. Jézéquel, M. Lollier and T. Lebeau, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, **33**, 1–9.
21 M. Pazirandeh, B. M. Wells and R. L. Ryan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4068–4072.
22 M. Pazirandeh, L. A. Chrisey, J. M. Mauro, J. R. Campbell and B. P. Gaber, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **43**, 1112–1117.
23 S. H. Seung, S. Singh, J. Y. Kim, W. Lee, A. Mulchandani and W. Chen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 6317–6320.
24 R. Chaturvedi and G. Archana, *BioMetals*, 2014, **27**, 471–482.
25 K. J. Wilkinson and J. Buffle, in *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*, ed. H. P. van Leeuwen and W. Köster, John Wiley & Sons, Chichester, 2004, vol. 9, p. 445.
26 W. J. Adams, R. Blust, U. Borgmann, K. V. Brix, D. K. DeForest, A. S. Green, J. S. Meyer, J. C. McGeer, P. R. Paquin, P. S. Rainbow and C. M. Wood, *Integr. Environ. Assess. Manage.*, 2011, **7**, 75–98.
27 P. R. Paquin, R. C. Santore, K. B. Wu, C. D. Kavvadas and D. M. Di Toro, *Environ. Sci. Policy*, 2000, **3**, 175–182.
28 D. M. Di Toro, H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin and R. C. Santore, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2001, **20**, 2383–2396.
29 S. Niyogi and C. M. Wood, *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 6177–6192.
30 W. X. Wang and P. S. Rainbow, *Environ. Chem.*, 2006, **3**, 395–399.
31 E. S. Redeker and R. Blust, *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 537–543.
32 P. S. Rainbow, *Environ. Pollut.*, 2002, **120**, 497–507.
33 J. F. L. Duval, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7873–7888.
34 J. F. L. Duval and E. Rotureau, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 7401–7416.
35 J. F. L. Duval, R. M. Présent and E. Rotureau, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30415–30435.
36 J. H. R. Kägi and A. Schäffer, *Biochemistry*, 1988, **27**, 8509–8515.
37 J. L. Phillips, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, **114**, 998–1000.
38 V. I. Slaveykova and K. J. Wilkinson, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 9–24.
39 R. Hajdu, J. P. Pinheiro, J. Galceran and V. I. Slaveykova, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 4597–4602.
40 J. F. L. Duval and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 6443–6451.

 This journal is © the Owner Societies 2017

Published on 17 October 2017. Downloaded by Universite de Lorraine on 27/10/2017 16:22:18.

41 H. P. van Leeuwen and R. M. Town, *J. Solid State Electrochem.*, 2016, **20**, 3255–3262.
42 J. F. L. Duval, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 11802–11815.
43 M. Eigen, *Pure Appl. Chem.*, 1963, **6**, 97–115.
44 J. P. Pinheiro, J. Galceran and H. P. Van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 2397–2405.
45 E. Rotureau, P. Billard and J. F. L. Duval, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 990–998.
46 T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori, *Mol. Syst. Biol.*, 2006, **2**, 1–11.
47 S. Sauge-Merle, C. Lecomte-Pradines, P. Carrier, S. Cuiné and M. DuBow, *Chemosphere*, 2012, **88**, 918–924.
48 R. A. Larossa, D. R. Smulski and T. K. Vandyk, *J. Ind. Microbiol.*, 1995, **14**, 252–258.
49 R. M. Town and H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **509**, 58–65.
50 A. Hynninen, K. Tõnismann and M. Virta, *Bioeng. Bugs*, 2010, **1**, 132–138.
51 B. J. Stone and Y. A. Kwaik, *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 1395–1402.
52 J. M. Raser and E. K. O'Shea, *Science*, 2005, **309**, 2010–2013.
53 S. P. Lavoie, D. T. Mapolelo, D. M. Cowart, B. J. Polacco, M. K. Johnson, R. A. Scott, S. M. Miller and A. O. Summers, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2015, **20**, 1239–1251.
54 P. Dziegiel, B. Pula, C. Kobierzycki, M. Stasiolek and M. Podhorska-Okolow, in *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells*, ed. T. M. Böckers, F. Clascá, Z. Kmiec, B. Singh, P. Sutovsky and J. P. Timmermans, Springer International Publishing, Cham, vol 218, 2016, 2, pp. 3–21.
55 J. Galceran, E. Companys, J. Puy, J. Cecilia and J. L. Garces, *J. Electroanal. Chem.*, 2004, **566**, 95–109.
56 D. Cànovas, I. Cases and V. de Lorenzo, *Environ. Microbiol.*, 2003, **5**, 1242–1256.
57 D. H. Nies and S. Silver, *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007.
58 K. A. Levenberg, *Q. Appl. Math.*, 1944, **2**, 164–168.
59 D. W. Marquadt, *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 1963, **11**, 431–441.

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics.
This journal is © the Owner Societies 2017

ELECTRONIC SUPPORTING INFORMATION

Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial interfaces

Romain M. Présent,[1,2] Elise Rotureau,[*,1,2] Patrick Billard,[1,2] Christophe Pagnout,[3,4] Bénédicte Sohm,[3,4] Justine Flayac,[3,4] Renaud Gley,[1,2] José P. Pinheiro,[1,2] and Jérôme F. L. Duval[*,1,2]

[1] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.

[2] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.

[3] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France.

[4] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France.

Outline of the ESI content:

Section A: Determination of cell volume fraction φ. A1. Bacteria imaging using Atomic Force Microscopy (AFM). A2. Evaluation of the relationship between OD_{600} and cell concentration.
Section B: Electrokinetic measurements.
Section C: Electroanalytical measurements. C1. Preparation of the thin mercury film electrode (TMFE). C2. AGNES and SCP measurement principles. C3. Experimental protocol for electrochemical measurements.
Section D: Addressing metal biosurface sorption as a function of cell volume fraction φ. D1. Quantification of adsorbed cadmium amount at the biosurface using Ligand Exchange Technique. D2. Metal adsorption measurements *versus* φ and conclusions.
Section E: Details on purification of MBP-MT.
Section F: Determination of Cd(II)-MTc complex stability constant from electrochemical measurements.

Section G: Construction of a master curve from Cd(II) depletion kinetic data collected for JW3434 cells (Figure 1A).

5 Figures (Figures S1-S5). References applying to this document are mentioned at the end of the document.

Section A: Determination of cell volume fraction φ.

Cell volume fraction φ was evaluated from bacterial size as determined from atomic force microscopy (AFM) imaging of cells (§A1) and from the relationship, derived from cytometry measurements, that exists between OD_{600} and cells concentration in solution (§A2).

A1. Bacteria imaging using Atomic Force Microscopy (AFM).

The bacterial strains JW3434 and JW3434-MTc were first imaged in HMM liquid media using AFM in peak force tapping mode. For that purpose, glass slides were first coated using 0.1% polyethylenimine (PEI) and then rinsed with ultrapure water. A drop solution containing bacterial cells was deposited onto the PEI-coated glass slides, allowed to rest for 30 minutes and subsequently rinsed with weakly complexing HMM medium. Bacterial cells were then imaged at room temperature with a Dimension FastScan AFM (Bruker AXS, Palaiseau, France) at a frequency of 2 kHz and a scan rate of 1 Hz, using silicon nitride AFM tips with nominal spring constant of 0.24 N/m (SNL, Brucker, Palaiseau). Cross section measurements performed on about 10 cells for JW3434 and 40 cells for JW3434-MTc revealed that *E. coli* strains are rod-shaped cells with lengths and diameters of *ca.* 2.5 µm and 0.7 µm for JW3434 and 3.1 µm and 0.82 µm for JW3434-MTc, respectively. An illustrative example is provided in **Figure S1**. For the sake of simplicity, bacteria were assimilated to spheres with an equivalent radius found to be *ca.* 670 nm and 795 nm for JW3434 and JW3434-MTc, respectively.

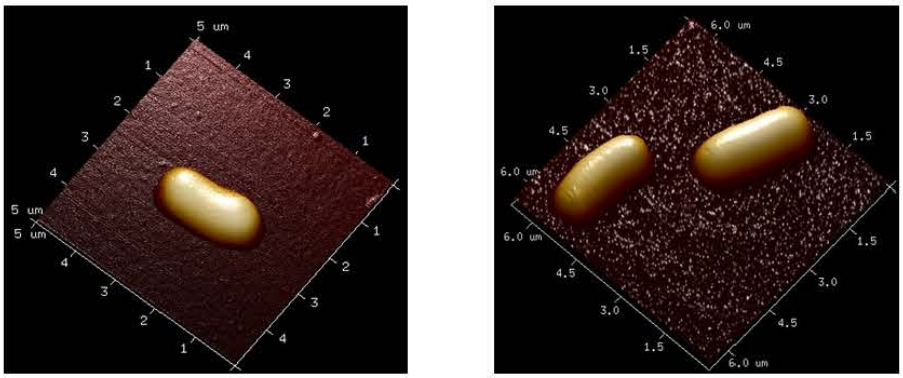


Figure S1. AFM images of JW3434 (left) and JW3434-MTc (right) obtained in HMM medium.

A2. Evaluation of the relationship between OD_{600} and cell concentration.

The equivalency between a measured optical density OD_{600} of unity and the number of bacterial cells per unit volume was determined from cell counting by flow cytometry (C6 Accuri, BD Biosciences). Results demonstrate that an optical density OD_{600} of 1 corresponds to 8×10^8 cells/ml for both JW3434 and JW3434-MTc strains. A series of cell suspensions diluted from a fresh cell culture was then prepared in weakly metal complexing HMM medium and the corresponding absorbance was measured for each cell suspension at 600 nm (OD_{600}). A linear relationship between OD_{600} and cell concentrations was obtained for OD_{600} values lower than unity. For larger density values, the corresponding cell volume concentration was estimated from the cubic spline interpolation of OD_{600} measured at larger cell concentrations. The volume fraction φ involved in the theory outlined in §2 of the main text was then simply evaluated from cell density c_p (m^{-3}) on the basis of the relationship $\varphi = V_p \times c_p$ where V_p stands for the volume of an individual bacterium assimilated to a sphere with equivalent radius obtained from AFM imaging.

Section B: Electrokinetic measurements.

Fresh cell suspensions were centrifuged at 3000 rpm, bacterial cells were then washed with HMM medium and subsequently dispersed at a volume fraction of *ca.* 4×10^{-3} % in $NaNO_3$ electrolyte solutions of concentration 1 mM to 200 mM. **Figure S2** displays the measured electrophoretic mobility μ of JW3434 (●) and JW3434-MTc (●) cells at pH 6.8 over the above range of salinity conditions (measurements details as in [1]). In qualitative agreement with predictions from soft surface electrokinetic theory[2] cell electrophoretic mobility decreases in magnitude with increasing electrolyte concentration as a result of cell surface charge screening by ions from solution. For electrolyte concentration above *ca.* 100 mM, μ reaches a non-zero plateau value that reflects (i) the hydrodynamic softness (*i.e.* ion and water-permeabilities) of the cell membrane, and (ii) a complete screening of cell surface electrostatics.[2–4] **Figure S2** further highlights that JW3434 and JW3434-MTc strains exhibit similar electrokinetic features. The conductivity of the HMM medium under the conditions adopted for metal depletion kinetic measurements is 10 mS cm^{-1}, which corresponds to an equivalent concentration of $NaNO_3$ salt of about 110 mM. **Figure S2** indicates that for such solution salinity level, cell electrostatics is fully screened, which justifies our setting $\beta_a = 1$ in the main text where β_a is the factor for Boltzmann accumulation of metal ions at the cell membrane surface (see §2 in the main text). In addition, AFM imaging did not reveal any protruding soft peripheral surface structures for the cells of interest in this work, which further validates the equality $\overline{f}_{\mathrm{el}} = 1$ adopted for the modeling of the data displayed in **Figure 1** of the main text.

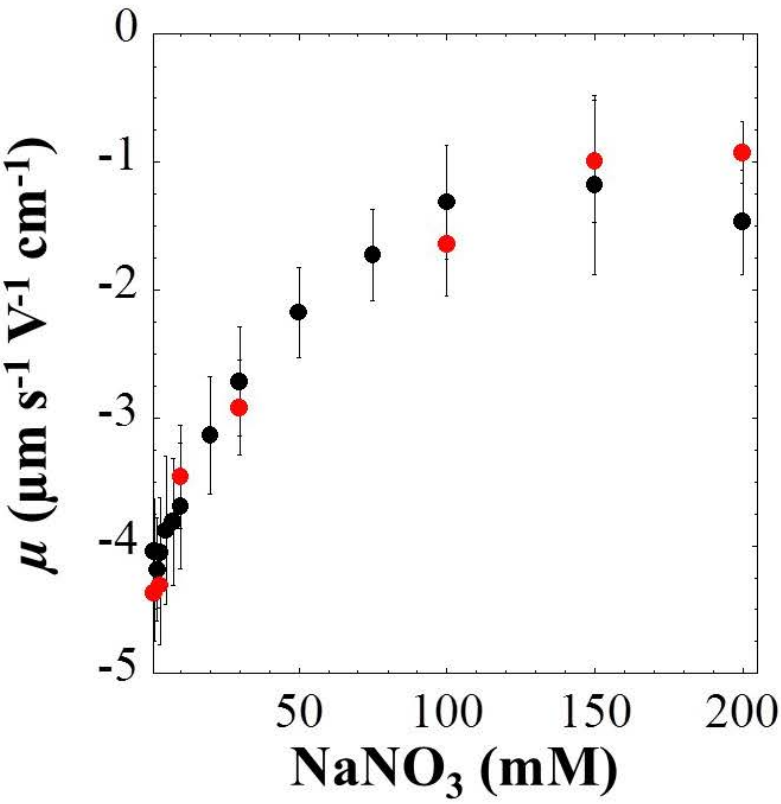


Figure S2. Dependence of the electrophoretic mobility μ on $NaNO_3$ electrolyte concentration for JW3434 (●) and JW3434-MTc cells (●). Metal depletion kinetic experiments (**Figure 1** in the main text) were performed in HMM medium that corresponds to a 110 mM equivalent concentration of $NaNO_3$.

Section C: Electroanalytical measurements.

C1. Preparation of the thin mercury film electrode (TMFE).

The preparation of the TMFE starts with polishing and electrochemical pretreatments as detailed elsewhere.[5] Then, a thin mercury film was plated *ex situ* on the glassy carbon (GC) electrode *via* electrodeposition at -1.3 V (with respect to Ag/AgCl), at 1000 rpm for 240 s in a 0.48 mM mercury (II) nitrate solution under acidic conditions (0.75 mM HNO_3, pH 1.9). Once the experiments completed, the TMFE was cleaned using successive mercury reoxidations in 80 mM ammonium thiocyanate solution buffered with ammonium acetate (pH = 3.4).

C2. AGNES and SCP measurement principles.

Absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping (AGNES) measurements allows the measurement of concentration of free metal ions in a given solution. The reader is referred to the paper by Domingos *et al.*[6] for extensive details. Briefly, AGNES technique consists of two steps, a metal deposition and a metal reoxidation step. The deposition step is performed according to two stages: (i) a potential $E_{1,a}$ (-0.75 V *vs.* Ag/AgCl) corresponding to conditions where metal deposition process is diffusion-limited, is applied for a time $t_{1,a}$ (40 s) while stirring at a rotation speed of 1000 rpm, and (ii) a potential $E_{1,b}$ (-0.655 V *vs.* Ag/AgCl) is then applied for a delay $t_{1,b}$ set equal to $3t_{1,a}$ (120 s, with stirring) in order to reach the specific situation where absence of metal concentration gradient between the solution in the vicinity of the electrode and inside the mercury film is obtained. Then, a constant oxidizing current I_s (3 µA) is applied until the potential reaches a value well beyond the reoxidation transition plateau (-0.4 V *vs.* Ag/AgCl for Cd(II)). The signal representing the time required for reoxidation is measured and leads to the determination of the amount of metal deposited in the first step of the procedure, and this deposited metal amount is then proportional to the searched free metal concentration in bulk solution.[7]

The determination of the total amount of metal species in solution is performed using stripping chronopotentiometry (SCP), also a two-step electrochemical technique. A first step consists in the deposition of metal in the TMFE *via* application of a single potential E_1 (-0.75 V *vs.* Ag/AgCl) for a time delay t_d of 45 s. Then, a constant oxidizing current I_s (3µA) is applied until the potential reaches a value well beyond the reoxidation transition plateau (0.4 V *vs.* Ag/AgCl) for Cd). Similarly to AGNES, analytical signal representing the time required for metal reoxidation is measured and leads to the evaluation of the concentration of free and labile metal concentrations in solution. ‘Labile’ refers here to all metal complex species (*i.e.* formed between metals and ligands -if present- in solution) that may contribute to the SCP signal due to their fast association/dissociation as compared to the timescale of the experiment

(identified here with the timescale required to establish a steady-state diffusion layer in the vicinity of the metal-consuming electrode[8]). It can be legitimately assumed that the fraction of metal ions adsorbed at the bacterial cell walls does not contribute to the measured electrochemical signal due to the very slow diffusion of the bacteria from solution to the electrode (*i.e.* the 'metal-cell complexes' can be viewed as inert within the timescale of the experiments).

C3. Experimental protocol for electrochemical measurements.

A disposable polystyrene cell was placed in a double-walled container thermostated by a refrigerating-heating water circulator to regulate temperature at 35°C with an accuracy of ± 0.1°C during electrochemical measurements. Batch solution of poor metal-complexing medium (HMM) was prepared at pH 4, which ensured that all metal is in free form. Prior to measurements in the presence of bacterial cells, electrochemical calibration with 5×10^{-7} M, 10^{-6} M or 2×10^{-6} M metal concentration solution (ultra-pure certified $Cd(NO_3)_2$, Fluka) was systematically performed. 10 mins prior to the start of SCP or AGNES measurements, nitrogen bubbling was used to remove oxygen from solution. After completion of the calibration, pH was fixed to 6.8 upon addition of 1 M NaOH. Under such conditions, 85% of the total cadmium content is present in free form, a conclusion obtained from V-Minteq thermodynamic metal speciation evaluation.[9] The remaining 15% is mainly engaged in complexes formed with nitrate and chloride anions. In line with the results described elsewhere,[9] free Cd(II) metal ions are considered as the only bioactive species. Then, two electroanalytical methods were employed to follow the decrease over time of the metal ions concentration in the bulk solution as a result of metal biouptake and metal adsorption at the cells surface: Stripping Chronopotentiometry (SCP, see §C2) and Absence of Gradient and Nernstian Stripping (AGNES, §C2). The former allows the measurement of the free and labile metal complexes while the latter enables the detection of the only free metal ions fraction.

Analysis of the results obtained from these two techniques thus makes it possible to identify changes in metal speciation over time. Under the conditions adopted in this study, AGNES and SCP results were similar within analytical uncertainties, thus evidencing the absence of significant changes in metal speciation in the course of biouptake experiments. This therefore excludes the possible excretion of metal complexing ligands by the bacteria. In view of these elements, only SCP results are reported in this work.

Section D: Addressing metal biosurface sorption as a function of cell volume fraction φ.

D1. Quantification of adsorbed cadmium amount at the biosurface using Ligand Exchange Technique.

A set of 40 ml HMM batch solutions containing 1.91×10^{-6} M Cd(II) were prepared as detailed in the main text and bacterial cells were then added into each solution. After 2, 10, 30, 60 and 180 min cell contact with the metal-containing solution, half of the samples were 0.2 µm filtered in order to remove bacterial cells. For the other half, 2 ml of 0.01 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution was added and vortexed for 1 min. After a delay of 10 min, solutions were then filtered and acidified. The Cd(II) content in all solution samples was subsequently determined by atomic absorption flame spectroscopy (Varian 220FS). Analysis of the first series of solutions provided the bulk concentration of Cd(II) and analysis of the second series allowed evaluation of the sum of the concentration of metals adsorbed at the cell surface plus that of metals in bulk solution, recalling here that EDTA is a suitable competing ligand for the determination of the adsorbed metal amount at biosurfaces.[10]

D2. Metal adsorption measurements *versus* φ and conclusions.

As extensively detailed in the main text (see **Figure 2** therein), the metal amount adsorbed at the total biosurface developed in cells suspension remains constant with time. This conclusion is derived from AAS measurements (see §D1) performed on a sample with given cell volume fraction φ, and it is in line with the results independently obtained from electrochemical measurements (**Figure 2**). To further support this conclusion over the whole range of φ conditions tested in **Figure 1**, we report in **Figure S3** the bulk metal concentration drop $c_{\mathrm{M}}^{*}(0)-c_{\mathrm{M}}^{*}(0^{+})$ as detected by electrochemistry immediately after addition of cells in the metal-containing HMM medium. In case of a constant adsorbed amount of metal ions per unit cell surface area with time, it is straightforward to verify that $c_{\mathrm{M}}^{*}(0)-c_{\mathrm{M}}^{*}(0^{+})$ must satisfy the relationship $c_{\mathrm{M}}^{*}(0)-c_{\mathrm{M}}^{*}(0^{+})=3\Gamma\varphi/a$ where Γ is the surface concentration of adsorbed metals per unit cell surface area. The linear dependence of $c_{\mathrm{M}}^{*}(0)-c_{\mathrm{M}}^{*}(0^{+})$ on φ is well confirmed by **Figure S3** for both strains and slope analysis provides $\Gamma =$ 1.8 $\times$ 10^{-7} mol m^{-2} and $\Gamma =$ 7.5 $\times$ 10^{-8} mol m^{-2} for JW3434 and JW3434-MTc cells, respectively.

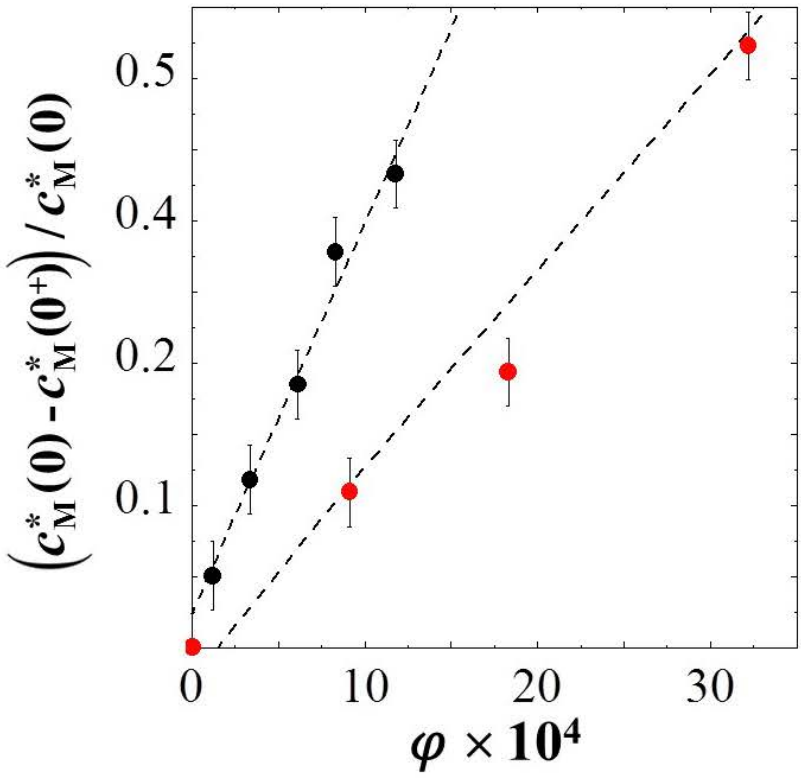


Figure S3. Dependence of $\left(c_M^*(0) - c_M^*(0^+)\right) / c_M^*(0)$ on cell volume fraction φ where $c_{M,total}^*$ is the total metal concentration in solution for JW3434 (●) and for JW3434-MTc (●). Data were derived from SCP electrochemical measurements (see text for details).

Section E: Details on purification of MBP-MT.

JW3434-MTc cells were grown overnight at 37°C to 4 × 10^8 cells/ml ($OD_{600} \simeq 0.5$) in 200 ml rich broth (10% tryptone (w/v), 5% yeast extract (w/v), 2% glucose (w/v)) in the presence of ampicillin at 100 µg/ml concentration. Then, cells were incubated at 37°C for 2 hours with the addition of IPTG at a final concentration of 0.3 mM (in order to optimize the production of MBP-MT). For the sake of completeness, growth cultures of JW3434-MTc without IPTG and of JW3434 with IPTG were processed to confirm the absence of induction of intracellular MTc under such conditions. Cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 20 mins, resuspended in 5 ml of Column Buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl) and frozen at -20°C overnight. Then, cells were thawed in cold water and lysed by French press (1 KBar).

Extracts obtained were centrifuged at 20000 × g for 30 mins at 4°C and supernatants were collected. Total protein concentrations were determined following the Bradford method.[11] MBP-MT was purified by affinity-chromatography on an amylose column following instructions by the manufacturer (New England Biolabs) without EDTA in Column Buffer. Then, ten fractions of 0.6 ml were collected at a satisfactory purity as controlled by SDS-PAGE. MBP-MT suspension was then dialyzed in Tris buffer (50 mM Tris, pH 7.4) with 10 kD tubing (SpectrumLabs) and concentrated using 3 kD Amicon Centrifugal Filter Unit (Millipore) at 4000 g for 10 mins. Finally, MBP-MT suspension was stored at -20°C at a minimum concentration of 1 mg/ml in 30% glycerol. The purification yield was 12.75 mg of MBP-MT per liter of culture, thus leading an intracellular weight of MBP-MT (50 kDa) equal to 1.12×10^{-14}g/cell. As thiol groups are mainly involved in metal sequestration processes, intracellular cysteine number brought by the MBP-MT complex was determined from analysis of the nucleotide sequence. As a result, we found that 20 thiol groups are supported by a single MBP-MT. Accordingly, making use of the molecular weight and mass concentration of MBP-MT per cell as indicated above, the intracellular thiol concentration stemming from intracellular MBP-MT is estimated at 2.1 mM.

Section F: Determination of nanoparticulate Cd(II)-MTc complex stability constant from electrochemical measurements.

From the theoretical analysis of bulk metal depletion kinetic data (**Figure 1B** in the main text), we derived the magnitude of the stability constant $\bar{K}^*$ for nanoparticulate Cd(II)-MTc complexes (**Table 1** in the main text**)**. Cd(II) in the intracellular cell medium bind preferably to sulfide and thiol groups due to their high affinity to such ligands. Accordingly, the effective complexation constant $\bar{K}^*$ should reflect the complexation of intracellular Cd with the total amount of thiol groups supported by the proteins present in the intracellular volume. In the

literature, the total thiol content in a *Escherichia coli* strain similar to that used in this work but lacking intracellular MTc was quantified and estimated to be 9-10 mM.[12] Consequently, for the JW3434-MTc strain of interest here the total intracellular concentration of thiol groups stemming from MBP-MT and from other cytosolic proteins is ca. 12 mM. To confirm $\bar{K}^*$ value as derived from the quantitative interpretation of Cd(II) depletion kinetic features (**Figure 1B**), we attempted an independent evaluation of $\bar{K}^*$ from electrochemical measurements performed in a reconstructed intracellular cytosol-like medium upon successive additions of metal ions. For the sake of realism and to best mimic the conditions prevailing in a living bacterium, the cytosol-like medium consisted of the total amount of MBP-MT and of the other pool of proteins mixed at a representative concentrations ratio applying in real cytosolic medium (pH = 7.0). It is here recalled that intracellular concentration of MBP-MT was determined in Section E and that the concentration of the other intracellular proteins can be derived in a first approximation from the intracellular concentration of thiol groups as reported elsewhere.[12] The intracellular concentrations of metal ions relevant over the range of cell volume fractions tested in **Figure 1B** directly follows from theory and more specifically from the corresponding values of $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}} = \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}} + \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}$ (with $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}$ and $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}$ defined in §2 of the main text) theoretically evaluated under equilibrium conditions reached at $t \to \infty$. In details, for a given $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}}$ (expressed in mol m^{-2}) the corresponding intracellular concentration of metal ions in mol m^{-3} is simply defined by $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}} S_{\mathrm{a}} / V_{\mathrm{p}}$ with S_{a} and V_{p} the surface and volume of an individual bacterium, respectively. However, due to the so-obtained high concentrations of Cd(II) and proteinaceous components in the reconstructed cytosolic medium (which made the electrochemical measurements difficult to perform), we had to reduce by a factor 100 the above concentrations upon keeping the concentration ratios between the various components to magnitudes in line with those applying in true intracellular medium. In details, the purified MTc and the total extracted cytosolic proteins concentrations in the cytosol-like medium were

adjusted so that the ratio between concentration of thiol groups from MTc and that prevailing in the cytosolic compartment is 0.2 (*i.e.* 2 mM/10 mM where 2mM and 10 mM values were derived above). Accordingly, adopted concentrations of MTc and of total extracted cytosolic proteins in the reconstructed medium used for electroanalytical measurements are 0.05 g/L and 0.47 g/L, respectively. Although a precise value of the total ionic strength in intracellular bacterial medium is difficult to evaluate due to its inherent composition complexity, Lodish et al[13] listed the intracellular concentrations of major ions in *Escherichia coli* from which we estimated an intracellular total ionic strength of 150 mM (computed with use of Vminteq speciation code). Therefore, complexation experiments of Cd(II) by purified MBP-MT and other cytosolic proteins were performed in a 150 mM $NaNO_3$ electrolyte solution at 35°C. Measurements in such physico-chemical medium conditions were performed following the procedure detailed in Section C. The results are reported in **Figure S4** below and they reveal that the obtained magnitude of $\bar{K}^*$ is in remarkable agreement with that derived from the refined analysis of kinetics of Cd(II) bulk depletion solution (**Figure 1B**, **Table 1**) in suspensions of JW3434-MTc. AGNES measurements (**Figure S4**) show a *ca.* 2-fold increase of $\bar{K}^*$ at low metal to ligand ratios $(\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}} S_{\mathrm{a}} / V_{\mathrm{p}}) / \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$ (or equivalently high φ) as compared to $\bar{K}^*$ values derived at high ratio $(\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T}} S_{\mathrm{a}} / V_{\mathrm{p}}) / \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$ (or equivalently low φ). It is stressed that the analysis of the bulk metal depletion data (**Figure 1B)** at high φ where $c_M^*(t \to \infty) \to 0$ provides only lowest estimates of $\bar{K}^*$ as these data fall within the regime $\bar{K}^* >> 1$ for which complete depletion of M from solution is achieved.[14] Additional complexation measurements performed in the presence and absence of proteins other than MTc reveal that metal binding by MTc dominates in intracellular cell medium.

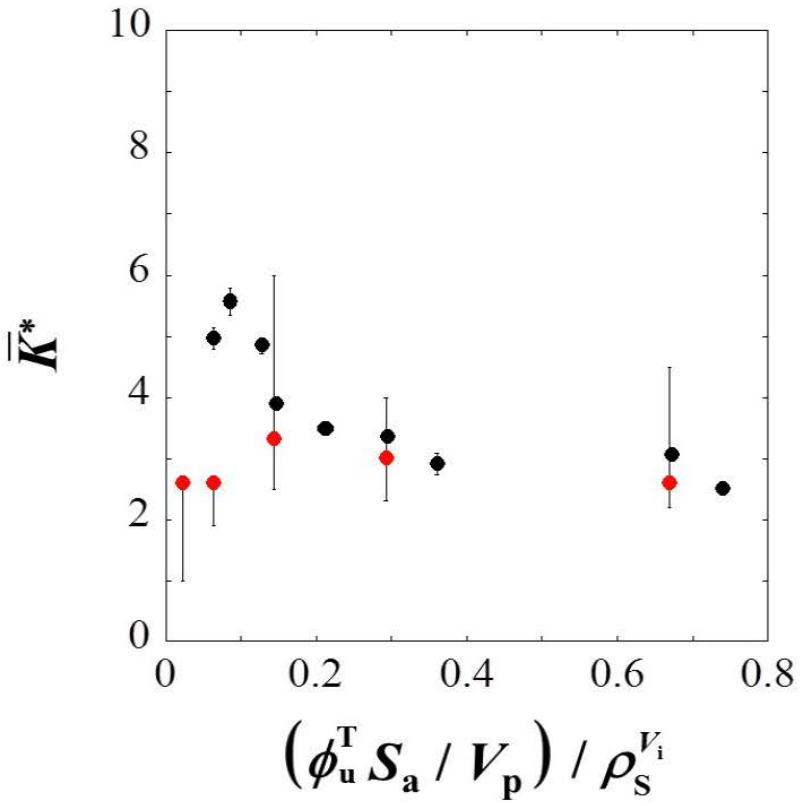


Figure S4. $\bar{K}^*$ values obtained from the analysis of bulk metal depletion kinetics (●) and from AGNES measurements in a reconstructed cytosolic medium (●), where bulk Cd(II) concentration is fixed to the value $\phi_u^T S_a / V_p$ reached at equilibrium ($t \to \infty$) under the cell volume fraction conditions specified in **Figure 1B**. Values of $(\phi_u^T S_a / V_p) / \rho_S^{V_i}$ for φ = 2.03×10^{-4}, 4.23×10^{-4}, 9.13×10^{-4} and 1.83×10^{-3} are 0.67, 0.30, 0.15 and 0.064, respectively. ϕ_u^T was obtained from the theory outlined in §2 of the main text. S_a and V_p are the surface area and the volume of an individual JW3434-MTc cell as computed from the equivalent cell radius *a* obtained from AFM (Section A in ESI). $\rho_S^{V_i} = 12$ mM corresponds to the total concentration of intracellular thiol groups supported by MBP-MT and by the other cytosolic proteins (see ESI text for details). Uncertainties pertaining to the analysis of depletion kinetics (●) correspond to the range of $\bar{K}^*$ values for which the reconstruction of the experimental data are acceptable given the experimental error bars indicated in Figure 1B of the main text. At low $(\phi_u^T S_a / V_p) / \rho_S^{V_i}$ (or high φ), only lower limits of $\bar{K}^*$ are defined for the reason given in the text. Error bars from AGNES measurements (●) correspond to analytical measurement uncertainties.

Section G: Construction of a master curve from Cd(II) depletion kinetic data collected for JW3434 cells (Figure 1A).

For bacterial cells deprived of intracellular MTc (*i.e.* $\lambda << 1$ and $\bar{K}^* << 1$**)** and in line with applicability of the equilibrium relationship $c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(t) = \beta_a c_{\mathrm{M}}^*(t)$ at any time *t* (*i.e.* $Bn^{-1} << 1$), $c_{\mathrm{M}}^*(t)$ verifies the transcendental equation[9,15]

$$F\left(c_{\mathrm{M}}^*(t), c_{\mathrm{M}}^*\left(0^+\right)\right) = t \tag{S1}$$

, where the function *F* in the above limits may be written by eqn (S2) obtained after some straightforward arrangements of eqn (2) given in ref[9]

$$F\left(c_{\mathrm{M}}^*(t), c_{\mathrm{M}}^*\left(0^+\right)\right) = \left\{\frac{\varphi^*}{\varphi}\left(1+\frac{c_+}{K_{\mathrm{M}}}\right)\left(1+\frac{c_-}{K_{\mathrm{M}}}\right)\left(\frac{c_+ - c_-}{K_{\mathrm{M}}}\right)\right\}^{-1} \ln\left\{\frac{\left[\dfrac{\beta_a c_{\mathrm{M}}^*(t) - c_-}{\beta_a c_{\mathrm{M}}^*\left(0^+\right) - c_-}\right]^{p_-(1+\bar{c}_+)}}{\left[\dfrac{\beta_a c_{\mathrm{M}}^*(t) - c_+}{\beta_a c_{\mathrm{M}}^*\left(0^+\right) - c_+}\right]^{p_+(1+\bar{c}_-)}}\right\} \tag{S2}$$

, where c_+ (mol m^{-3}) is obtained from eqn (7) taken in the limit $\bar{K}^* << 1$**.** c_- (mol m^{-3}) and $p_\pm$ (s) are defined by $c_- = (x_0 - 2)K_{\mathrm{M}} - c_+$ and $p_\pm = \dfrac{\varphi^*}{k_{\mathrm{e}}\varphi}\left(1+\dfrac{c_\pm}{K_{\mathrm{M}}}\right)^2$. The latter expressions are derived from those given by Duval et *al.*[15] after realizing that the characteristic timescales τ_{L} and τ_{E} therein defined for the M membrane transfer and M transfer from bulk solution to intracellular compartment, respectively, satisfy -under equilibrium condition- the equality $\tau_{\mathrm{E}} = \tau_{\mathrm{L}}$ with $\tau_{\mathrm{L}} = \varphi^* / (k_{\mathrm{e}}\varphi)$ or equivalently $\tau_{\mathrm{L}} = -\tau_{\mathrm{o}} / x_{\mathrm{o}}$,[9] where τ_{o} is defined in[15] for the practical case where there is no intracellular metal species at $t = 0$.

Equation S1 predicts a linear dependence of $F\left(c_{\mathrm{M}}^*(t), c_{\mathrm{M}}^*\left(0^+\right)\right)$ on time *t* with unit slope, recalling that the equilibrium condition $c_{\mathrm{M}}^*(t) = c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}(t)$ applies for JW3434 strain ($Bn^{-1} << 1$) with $\beta_a = 1$ (see details in main text and in Section B of ESI). To verify the validity of eqn (S1) (and therewith the consistent data modeling displayed in **Figure 1A**), values of $c_{\mathrm{M}}^*(t)$

and $c_M^*(0^+)$ measured under the φ conditions specified in **Figure 1A** were injected into the expression of F (eqn (S2)) with the relevant values of K_M, k_e and φ^* listed in **Table 1**. Within experimental error, the results provided in **Figure S5** very well agree with theoretical prediction and they highlight that all data in Figure 1A can be projected onto a single master curve whose expression is provided by eqns (S1) and (S2).

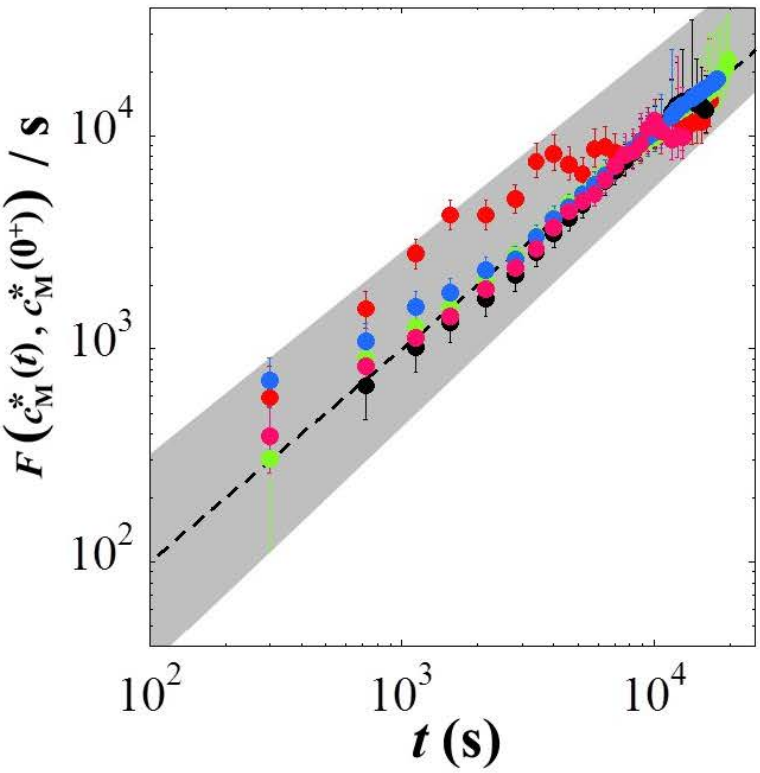


Figure S5. Master curve constructed from the Cd(II) bulk depletion kinetic data provided for JW3434 cells in Figure 1A of the main text (one color corresponds to one given φ condition). See ESI text for details. Error bars pertain to uncertainties on cell volume fractions (estimated at $\pm$ 5%). Data in red dots correspond to the lowest cell volume fraction adopted in Figure 1A ($\varphi = 1.21 \times 10^{-4}$) and they are thus more scattered due to the weaker depletion of Cd(II) concentration in bulk solution. The shaded area brackets all experimental data (including measurement uncertainties).

REFERENCES

1 E. Dague, J.F.L. Duval, F. Jorand, F. Thomas, F. and F. Gaboriaud, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 2612–2621.

2 J. F. L. Duval and F. Gaboriaud, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, **15**, 184–195.

3 J. F. L. Duval and H. Ohshima, *Langmuir* , 2006, **22**, 3533–3546.

4 H. Ohshima, *Adv. Colloid Interface Sci.* 1995, ***62***, 189–235.

5 S.C. Monterroso, H.M. Carapuça, J.E. Simão and A.C. Duarte, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **503**, 203–212.

6 R.F. Domingos, C. Huidobro, E. Companys, J. Galceran, J. Puy and Pinheiro, *J. Electroanal. Chem.* 2008, **617,** 141–148.

7 C. Parat, L. Authier, D. Aguilar, E. Companys, J. Puy, J. Galceran, J. and M Potin-Gautier, *Analyst*, 2011, **136**, 4337–4343.

8 H.P. Van Leeuwen and R.M. Town, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 3945–3952.

9 E. Rotureau, P. Billard and J.F.L. Duval, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 990–998.

10 R. Hajdu, J.P. Pinheiro, J. Galceran and V.I. Slaveykova, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 4597–4602.

11 M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.

12 S.P. Lavoie, D.T. Mapolelo, D. M. Cowart, B.J. Polacco, M.K. Johnson, R.A. Scott, S.M. Miller and A.O. Summers, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2015, **20**, 1239–1251.

13 H. Lodish, A. Berk, P.Matsudaira , C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky and J. Darnell. In *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman and co, New-York,5th edition, 2003, chapt.7, 245-300

14 J.F.L. Duval, R.M. Présent, E. Rotureau, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30415–30435.

15 J.F.L. Duval, E. Rotureau, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 7401–7416.

5 Que perçoit un biosenseur bactérien luminescent spécifique à la détection de métaux ? Résultats de la confrontation entre la théorie fondée sur l'évaluation des flux et données expérimentales

La pollution des eaux et des sols par les activités anthropiques (l'industrie, l'agriculture, les pratiques d'épandage, etc.) constitue des sources de contamination notamment en Elements Traces Métalliques (ETM) dans l'environnement. Des techniques d'analyse des concentrations en ETM dans des échantillons naturels ont été mises au point afin de surveiller le devenir de ces contaminants. Bien que les analyses des échantillons environnementaux par des techniques physicochimiques soient précises et sensibles, elles sont également coûteuses, obligent à transporter les échantillons vers des laboratoires spécialisés et n'apportent pas d'informations sur les fractions en métaux potentiellement disponibles pour les organismes vivants [1, 2]. C'est pourquoi l'utilisation de capteurs biologiques suscite de plus en plus d'intérêt étant donné qu'ils offrent une alternative de mesure rapide, in-situ des concentrations en ETM et perçoivent la fraction biodisponible de métal d'un milieu. Ces capteurs biologiques appelés biosenseurs émettent un signal (optique, électrochimique ou chimique) mesurable qui est considéré dans la littérature comme directement lié à la concentration en élément cible dans le milieu (ici le métal). Parmi les différents types de biosenseurs optiques utilisés figurent ceux qui utilisent la luciférase comme système rapporteur. Jusqu'à présent, la mise en œuvre de ces biosenseurs sur des échantillons naturels s'effectue de la façon suivante : une droite de calibration est établie par l'exposition de biosenseurs à une gamme de concentrations croissante en métal préparée au laboratoire. Puis, l'ajout de biosenseurs à l'échantillon naturel produit un signal qui est comparé à la droite de calibration. Bien que destinés à estimer les concentrations en ETM, les résultats issus de cette méthode ne permettent d'évaluer que qualitativement ou semi-quantitativement la concentration en métal dans l'échantillon. Les raisons avancées sont multiples : perte de l'activité métabolique due à un manque de nutriment ou à la présence de composés inhibiteurs, émission des signaux perturbée par l'exposition des biosenseurs à un mélange de composés toxiques, manque de compréhension de la relation entre la concentration de biosenseurs et le signal mesuré et/ou une contribution des métaux liés à des phases minérales dans l'assimilation globale des espèces métalliques. L'utilisation de biosenseurs par cette méthode repose sur l'hypothèse d'une corrélation directe entre la concentration en métal dans le milieu et la production de photons des biosenseurs. Or, la production de photons est fonction de la concentration en métal *internalisé* par les biosenseurs bactériens, elle-même dépendante de la dynamique de partition des métaux au niveau de la

membrane biologique et conséquemment du milieu extracellulaire. Il est évident qu'une meilleure compréhension des processus extracellulaires, aux interfaces biologiques et intracellulaires qui régissent l'assimilation des métaux permettrait d'établir un lien entre la concentration d'exposition du métal et le signal émis par les biosenseurs, et ainsi de mieux définir la biodisponibilité du métal. Ainsi, il est nécessaire de proposer une nouvelle méthodologie qui, contrairement à l'établissement d'une droite de calibration, renseigne sur la dynamique de partition des métaux aux interfaces bactériennes. C'est dans ce cadre que s'inscrit le chapitre 5, dans lequel le suivi cinétique de l'émission des photons par un biosenseur est lié mécanistiquement et quantitativement au flux d'assimilation des métaux par le microorganisme. Pour ce faire, un développement théorique a conduit à l'établissement d'expressions mathématiques du flux d'émission de photons en fonction du flux de transport des métaux (qui tient compte des interactions électrostatiques entre le métal et la cellule), de l'adsorption, de l'internalisation du métal et de la formation du complexe métallique intracellulaire qui déclenche la production de photons. Afin de valider l'approche théorique, des données expérimentales issues de l'exposition de biosenseurs bactériens à une solution aqueuse contenant Cd(II) et qui est faiblement complexante ont été obtenues par le suivi cinétique d'émission de photons. Trois souches d'*Escherichia coli* mutées pour exprimer différentes tailles de lipopolysaccharides de surface ont été utilisées lors de ces expérimentations. Pour chaque expérimentation, l'une des trois souches bactériennes a été exposée à une gamme de concentrations croissante en cadmium dans des conditions physicochimiques définies. Pour ces systèmes biosenseurs sensibles au Cd(II), l'expression du gène ZntA induite par des concentrations en Cd(II) de l'ordre du nanomolaire et permettant l'excretion des métaux internalisés vers le milieu extracellulaire est exploitée. La viabilité des conditions d'exposition a été confirmée par l'utilisation de souches constitutives. La variation des concentrations en sels et en cellules a permis de déterminer les paramètres physicochimiques qui gouvernent les flux d'assimilation des métaux en tenant compte des effets électrostatiques et des capacités d'adsorption des métaux. Enfin, l'origine de la limitation cinétique de l'assimilation des métaux est identifiée par l'évaluation d'un paramètre de biodisponibilité. Ce dernier a mis en évidence une possible limitation de l'assimilation des métaux due à la diffusion conductive de ceux-ci depuis le milieu vers la membrane biologique pour des conditions d'exposition dans lesquelles les concentrations en sels sont faibles (10mM).
Dans ces travaux de recherches, ma contribution porte sur

- la réflexion préliminaire sur le fonctionnement du biosenseur, qui a mené à l'élaboration de la théorie,
- l'établissement du schéma qui représente le fonctionnement du biosenseur dans ces travaux (Figure 1),
- le choix du milieu d'exposition,
- la détermination de la fraction de Cd(II) adsorbée sur les biosurfaces par des mesures électrochimiques,
- la rédaction de la partie "Materials and Methods".

Références

[1] Shin, H. J. « Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution ». In : *Applied Microbiology and Biotechnology* 89.4 (2011), p. 867–877.

[2] Hynninen, A., Tõnismann, K. et Virta, M. « Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals ». In : *Bioengineered Bugs* 1.2 (2010), p. 132–138.

Sensors & Actuators: B. Chemical 270 (2018) 482–491

Contents lists available at ScienceDirect

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb

What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory

Christophe Pagnout[a,b], Romain M. Présent[c,d], Patrick Billard[c,d], Elise Rotureau[c,d], Jérôme F.L. Duval[c,d,*]

[a] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France
[b] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France
[c] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F54501, France
[d] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Whole-cell bioreporters
Metal biouptake
Adsorption
Electrostatics
Interfacial metal biopartitioning
Diffusion-limited bioaccumulation

ABSTRACT

Whole-cell bioreporters are routinely operated as sentinels for monitoring the concentration of bioavailable and/or toxic metal ions (M) in aquatic media. Despite the importance of metal bioreporters in environmental risk assessment, their use is often limited to the establishment and exploitation of calibration curves relating bioreporters signal and target metal concentration. In this work, a physicochemical rationale is elaborated for the response of metal-sensitive whole-cell bioreporters beyond the restrictive representation of metal partitioning equilibrium at the microorganism-solution interface. The analysis is conducted under poorly metal complexing conditions for steady-state bioreporter functioning defined by a rate of photons production independent of time. The theoretical framework deciphers how this rate is determined by (i) metal biouptake dynamics with contributions from metal conductive diffusion to the cell surface and metal internalisation kinetics, (ii) formation kinetics and stability of intracellular complexes between M and transcriptional regulators, and (iii) the flux of emitted photons resulting from biochemical reactions initiated after activation of transcriptional regulators. The formalism enables quantitative evaluation of bioreporters performance depending on interfacial cell electrostatics, cell concentration and cell metal-adsorption features. The theory is supported by experimental data on cadmium detection by genetically modified luminescent *Escherichia coli* bioreporters exhibiting various lipopolysaccharidic surface structures.

1. Introduction

Whole-cell bioreporters are genetically modified microorganisms producing a signal −be it chemical [1–4], optical [5–8] or electrochemical [9–11]-following the intracellular accumulation of target analytes dispersed in a given aqueous medium. The dose-dependent signal generated by biosensors may be further used as a proxy to address the toxicity of chemicals of environmental importance [12]. The biologically active sensing element of a biosensor is introduced by proper genetic engineering that often exploits transcriptional regulations involved in homeostasis and/or detoxification strategies operational in unmodified microorganisms. These regulatory elements include a stress-response promoter activated after specific binding of a given target analyte to a regulatory protein, which subsequently leads to the specific expression of a fused reporter gene and to the production of a signaling (or reporter) protein, *e.g.* green fluorescent protein or luciferase [13]. Following this methodology, prokaryotic cells have been routinely employed for the detection of several types of pollutants, including metal ions and organics [5]. The methodology commonly adopted to measure analyte concentration in a given medium with biosensors consists in a two-step procedure. First, the whole-cell bioreporters are incubated in a solution containing the target analyte, and the biosensor signal is recorded as a function of time over a given range of known analyte concentrations. A calibration is then established between the analyte concentration and the output signal selected at a given incubation time [5,6,14,15]. Measurement of the biosensor signal is subsequently performed in a sample of interest and the analyte concentration therein is 'read' from pre-established calibration data.

Despite the growing attention drawn by the environmental science community to biosensors, [16] many difficulties remain to interpret quantitatively their response in contact with a solution containing an analyte to be detected. In the case of target metal ions, several reasons may be invoked to explain such difficulties. First, there has been only few attempts to formulate the relationship between biosensors signal

* Corresponding author at: 15 Avenue du Charmois 54501, Vandoeuvre-les-Nancy, France.
E-mail address: jerome.duval@univ-lorraine.fr (J.F.L. Duval).

https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.033
Received 2 March 2018; Received in revised form 7 May 2018; Accepted 8 May 2018
Available online 25 May 2018
0925-4005/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature

List of main symbols

a	Radius of the intracellular compartment of the microorganisms (*i.e.* with excluding the peripheral soft surface layer) (m)
Bn^{-1}	Inverse of the bioavailability (or Bosma) number (dimensionless) devoid of electrostatic contribution
c_M^a	Metal concentration at the outer membrane surface (mol m^{-3})
c_M^*	Bulk metal concentration at t (mol m^{-3})
$c_P = N/V_T$	Cell number density in solution (m^{-3})
$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$	Steady-state flux of photons emitted by the N bioreporters in solution (counts s^{-2})
$\overline{f}_{el}$	Electrostatic Debye correction factor for M diffusion to microorganism membrane surface (dimensionless)
I	Solution ionic strength (mol m^{-3})
$J_{c,ss}$	Production flux of ZntR-M complexes expressed per unit microorganism surface area under steady-state light emission conditions (mol m^{-2} s^{-1})
J_u^*	Maximum uptake flux of M (mol m^{-2} s^{-1})
J_u	Metal uptake flux (mol m^{-2} s^{-1})
$J_{\nu,ss}$	Time-derivative of the luminescence emitted per unit microorganism surface area and normalised by the cell concentration c_P (situation where step (ii) in Fig. 1 governs the rate of light production) (in counts m s^{-2})
$k_{a,d}^*$	Effective kinetic constants for the conversion of free M in the intracellular volume V_i of a given cell into M-ZntR complex species (mol^{-1} m^3 s^{-1}), and for M-ZntR dissociation (s^{-1}) (subscript 'a' and 'd', respectively)
k_{int}	Kinetic constant for metal internalisation (s^{-1})
K_H	Henry coefficient for the adsorption of M at the internalisation sites S_u (m)
$\widetilde{K}_H$	Henry coefficient for the adsorption of M at mere adsorption sites on the cell envelope (m)
K_M	Reciprocal of the affinity constant of M for the internalisation sites (mol m^{-3})
$\overline{K}^* = k_a^* \rho_S^{V_i}/k_d^*$	Stability constant of intracellular M-ZntR complexes (dimensionless)
$\mathcal{L}um(t)$	Luminescence produced at time t by the ensemble of N metal biosensors (counts s^{-1})
M	Stands for free metal ions (valence z_M)
N	Number of whole-cell bioreporters in the medium
$S_a = 4\pi a^2$	Cell surface area (m^2)
t	Delay after introduction of metal ions in the solution containing bioreporters (s)
V_T	Volume of the medium where bioreporters are dispersed (m^3)
x^*	Dimensionless reciprocal of the affinity of M for the internalisation sites S_u ($x^* = \beta_a c_M^*/K_M$) (equivalently, dimensionless bulk concentration of total metal ions in solution)
x_f^*	Dimensionless bulk concentration of bioavailable (free) metal ions in solution ($x_f^* = \beta_a c_{M,f}^*/K_M$)

Main greek symbols

α	Luminescence produced per unit concentration of ZntR-M complexes over the whole sample volume (in counts s^{-1} mol^{-1} m^3)
β_a	Boltzmann factor applying at the membrane surface (dimensionless)
Γ_{ads}	Surface concentration of adsorbed metal ions (mol m^{-2})
κ^{-1}	Electric double layer thickness (m)
$\rho_S^{V_i}$	Molar concentration of binding sites S carried by ZntR and smeared-out over the intracellular compartment of an individual cell (mol m^{-3})

intensity and concentration of internalized metal that triggers the chain of biochemical reactions leading to signal emission [17]. Second, the analysis of speciation and distribution of metal species from bulk solution to biosensors surface is often restricted to the use of thermodynamic models, *e.g.* the Biotic Ligand Model (BLM) and the Free-Ion Activity Model (FIAM) [18–24]. By definition, the latter ignore the possible limitation of metal biouptake by diffusion (supported or not by complexants) [19,22,25–30] and the physicochemical features of the soft interphase formed between biosensors and aqueous medium [31–36]. Finally, the performance of metal-responsive whole-cell bioreporters is tied to intricate energetic requirements that are more or less satisfied depending on bioavailability and quality of nutrients and other essential elements [5,16,37].

In order to broaden the range of conditions in line with a predictable functioning of metal-sensing whole-cell bioreporters, there is therefore an urgent need to elaborate on a mechanistic *and* quantitative levels how biosensors response mirrors the cascade of extracellular and intracellular biophysicochemical processes involving the target analyte. As a first step toward achievement of this objective, a theoretical rationale is here formulated for the time-dependent luminescence produced by genetically modified metal-sensing bacterial reporters under poor metal-complexing conditions where metal speciation in the extracellular solution is kept simple, *i.e.* metal is predominantly present in the form of free metal ion species. The formalism integrates the interplay between chemodynamics of the intracellular complexes formed between metal ions and transcriptional regulatory promoters, and the dynamics of the extracellular metal transfer processes leading to metal biouptake and bioaccumulation. It further establishes the connection between flux of photons emitted by the bioreporters, flux of metal biouptake and concentration of bioavailable metal fraction in solution. Highlights of this work include a comprehensive understanding of the impacts of solution ionic strength, cell surface electrostatics and cell concentration on biosensors response. The work further details a successful comparison between theory and experiments on genetically modified *Escherichia coli* strains producing constitutively luminescence (bioreporter strains) or in the presence of cadmium ions, and differing in terms of lipopolysaccharide (LPS) surface layer structure. The selected cadmium-based bioreporters are commonly adopted in studies dealing with evaluation of metal bioavailability in soils and freshwater samples. In addition, the metal adopted, Cd, is suitable to test the fundaments of the here-reported theory as, under the medium conditions examined, Cd is predominantly present in the form of free ionic species with no significant formation of complexes, in line with the aforementioned objective of the work. Finally, the modulation of the surface phenotypes of the bacterial reporters by varying the extent of LPS truncation enabled to tune the electrostatic properties and the metal biosorption capacities of the bacteria, both shown here to significantly determine the biosensors response. Considering LPS layers with distinct thicknesses further rendered possible the analysis of the LPS-mediated effects on metal diffusion transfer to the cell membrane and therewith on the magnitude of the biouptake flux and the rate of biosensor light production.

2. Materials and methods

2.1. Design of metal-sensing bacterial cells and of their constitutive equivalents

Escherichia coli strains BW25113 and the Keio knock-out mutants JW3601 (Δ*rfaJ*) and JW3596 (Δ*rfaC*) were obtained from the Coli Genetic Stock Center, Yale University [38]. Strains JW3601 and JW3596 displays truncated lipopolysaccharides (LPS) between the GlcII and GlcIII residues and between the KDO and HepI residues, respectively (Fig. 1**C**) [39]. Cadmium luminescent bioreporters, hereafter denoted as BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L, were constructed by introducing the pZNT-lux plasmid harboring a metal-inducible *zntA-luxCDABE* gene fusion [40] into the aforementioned *E. coli* strains. Constitutively luminescent control strains termed BW25113-C, JW3601-C and JW3596-C were further constructed by introduction of a derivative of the pSEVA226 plasmid [41] in which *luxCDABE* is under the control of a synthetic constitutive promoter (laboratory collection). Functioning of the bioreporters [42–45] is schemed in Fig. 1.

2.2. Cell growth conditions

Bacterial cells were streaked from −80 °C glycerol stocks on Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with ampicillin (50 μg ml^{-1}) and kanamycin (30 μg ml^{-1}) for reporter strains, and only with kanamycin (50 μg ml^{-1}) for constitutively luminescent strains. After overnight incubation, single colonies were transferred into liquid LB media with antibiotics and aerobically cultured for 16 h using circular bath shaker (160 rpm, 37 °C). Cells were then washed twice by centrifugation (7000*g*, 5 min) and resuspended in a poor metal-complexing medium (nGGM medium: glucose 0.5%, 40 mM MOPS, 1 mM $MgCl_2$, 12.5 mM NH_4NO_3, 10 mM KNO_3, 5 mM K_2SO_4, 0.068 mM $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, 5 mM β-glycerophosphate, pH = 6.7 adjusted by addition of 0.1 M NaOH) prior to use.

2.3. Measurement of biosensors response and extraction of signal derivative under steady-state biosensor functioning

The response of both reporter and constitutive strains were monitored in opaque white 96-well microtiter plates (Nunc, Thermo Scientific, France) every 15 min during 10 h using a Lumistar Luminometer (BMG LabTechnologies, Germany). Experiments were conducted in 5 fold-diluted nGGM medium (10 mM ionic strength) at 25 °C as a function of cadmium concentration ranging from 0 to 100 nM (obtained from ultra-pure certified standard $Cd(NO_3)_2$ solutions, Fluka), cell number density corresponding to optical density at 600 nm (OD_{600}) between 0.1 and 0.8, and solution ionic strength (10 mM to 100 mM) adjusted upon addition of $NaNO_3$ electrolyte in nGGM medium. Previous work [35] established the conversion relationship between cell number density, hereafter denoted as c_p, and OD_{600}, *i.e.* $c_p = 8 \times 10^8 \times OD_{600}/10^{-6}$ (in m^{-3}). Experiments were performed independently in triplicate. Under all conditions tested, ~90% of the total cadmium content in solution is present in the form of free metal ions, as evaluated from V-Minteq thermodynamic speciation computation [46]. For each condition, the rate of steady-state light production was evaluated according to the procedure detailed in **Supplementary Material (SM-1, Fig. S1)** where we report the typical dependence of bioreporters luminescence on time. This rate corresponds to the slope of the measured luminescence *versus* time in the regime where the increase of luminescence is steepest. The radius *a* of the equivalent spherical volume of the constitutive and non-constitutive cells is 733 ± 63 nm [35].

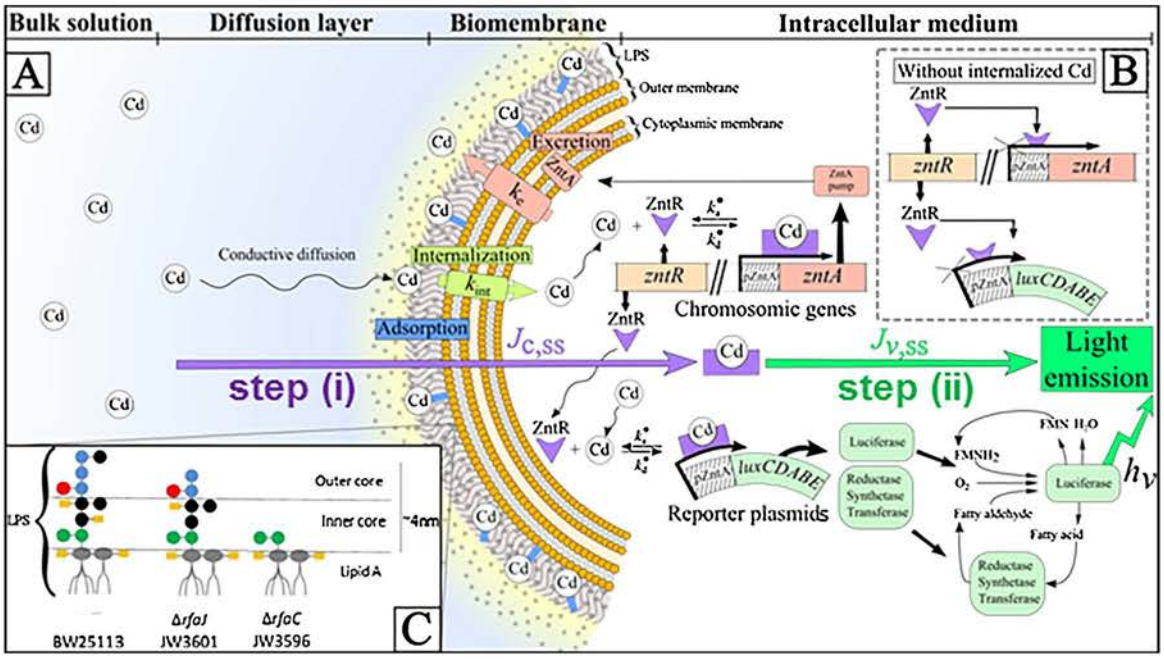


Fig. 1. Schematic representation of the functioning of luminescent whole-cell bacterial reporters. Situation in (A) the presence and (B) absence of Cd(II) ions. ***Step (i)***. After metal transfer from solution and internalisation, Cd(II) ions bind the metalloregulatory ZntR protein [42,43] constitutively produced by the chromosomal gene *zntR* (panel A). The ZntR-Cd complex acts as a transcriptional activator that introduces changes in DNA conformation, thus making the P_{zntA} promoter a better substrate for RNA polymerase [42]. Under such conditions, the transcription of *zntA* coding a P-type ATPase pump involved in Cd(II) efflux is promoted [44]. In the absence of Cd(II) (panel B), ZntR binds the P_{zntA} promoter, which then distorts DNA and inhibits the transcription machinery. ***Step (ii)***. The ZntR-Cd complex interacts with the P_{zntA} of the reporter plasmids and promotes the transcription of the *luxCDABE* genes involved in light production (panel A). In the *luxCDABE* operon, *luxAB* encodes the luciferase and *luxCDE* the fatty acid reductase complex responsible for synthesizing fatty aldehyde for the luminescence reaction. The luciferase catalyzes the oxidation of reduced flavin mononucleotide ($FMNH_2$) and fatty aldehyde in the presence of O_2, leading to photon emission (490 nm) [45]. (panel C) LPS composition and structure of the *E. coli* strains used in this study. Meaning of symbols: (●) Heptose, (●) Glucose, (●) Galactose, (●) KDO, (▬) Phosphate and (●) Glucosamine.

2.4. Evaluation of cell surface electrostatics and metal adsorption features: electrokinetic and electrochemical measurements

2.4.1. Electrokinetic measurements

Fresh cell suspensions were prepared and washed as described in §2.2 and suspended in 5 times-diluted nGGM medium. Electrophoretic mobility measurements were performed on a Zetaphoremeter IV (CAD Instrumentations, Les Essarts le Roi, France) as detailed elsewhere [47]. The electrophoretic mobility of BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L was measured at pH 6.7 and 10 mM to 300 mM solution ionic strengths fixed upon addition of $NaNO_3$ electrolyte in 5-fold diluted nGGM medium. Electrokinetic measurements were collated with approximate Ohshima's theory on electrophoresis of homogeneous soft particles [48] and with rigorous theory for electrohydrodynamics of soft diffuse particles [36]. The analysis leads *in fine* to evaluation of the decrease with increasing solution ionic strength (screening effect) of the electrostatic Boltzmann factor β_a for accumulation of Cd(II) at the bioreporters outer membrane surface. The results are reported and extensively discussed in **SM-2 (Fig. S2)**. Briefly, interpretation evidences that JW3596-L and JW3601-L are significantly more charged than BW25113-L. It further elegantly confirms the presence of protruding soft surface structures with nanometric thickness at the periphery of BW25113-L and (to a lesser extent) of JW3601-L cells (Fig. 1**C**).

2.4.2. Electrochemical measurements

Stripping chronopotentiometry (SCP) [35] was adopted to evaluate the amount of Cd(II) sorbed on cell envelope as a function of bulk metal concentration at room temperature as detailed elsewhere [35] *albeit* with adopting a 300 s deposition of Cd(II) in mercury film electrode. Calibration procedure was performed in 20 mL freshly prepared nGGM medium diluted 5 times upon addition of standardized solution of Cd (II) (ultra-pure certified $Cd(NO_3)_2$, Fluka). A solution containing 20 mL of 5 fold-diluted fresh nGGM solutions and 2 mL of fresh bacterial suspension was prepared to reach a final cell volume fraction of 2.6×10^{-7}. SCP measurements were performed after successive additions of Cd(II) to reach a total metal concentration in solution ranging from 1 nM to *ca.* 35 nM. Using the concentration of Cd(II) determined in solution by SCP, simple mass balance led to evaluation of the total amount of sorbed Cd(II) per unit cell surface area, Γ_{ads} (mol m^{-2}). Metal adsorption was established within minutes after metal introduction in cell suspension and further remains independent of time, in line with previous conclusions [33,35]. Finally, depletion of Cd(II) from bulk solution is insignificant under the condition $OD_{600} \leq 0.6$, as verified by electrochemistry following the procedure detailed elsewhere [33,35].

3. Theory

We consider a swarm of N identical and supposedly spherical engineered bacterial luminescent metal-sensors (Fig. 1) dispersed in an aqueous medium of volume V_T containing metal ions $M^{z_M}+$ (M for short) at initial bulk concentration c_M^*. In the following, $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ pertains to the steady-state flux of emitted photons produced by the ensemble of N metal biosensors and derived from experiments (§2.3). In line with experimental conditions adopted in this work (§2), cell number density $c_p = N/V_T$ (m^{-3}) is independent of time during luminescence measurements. In addition, c_p is sufficiently low to ensure the absence of overlap between individual electric double layers and diffusion layers of different cells [49].

Fig. 1 details the chain of events leading to production of luminescence by Cd(II)-responsive BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L whole-cell bioreporters. Briefly, two successive steps may be distinguished: *step (i)* metal transfer from solution to the biosensor membrane followed by internalisation and formation of ZntR-M complexes, and *step (ii)* conversion of these biochemical sensitive elements into light [42–45,50]. Depending on the biosensor and on the extracellular medium composition (§4), the rate of light production may be determined by the overall formation kinetics of ZntR-M complex (step (i)), by step (ii), or by both. In situations where step (i) is the kinetically-determining step, $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ may be written in the form

$$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max} = \alpha c_p S_a J_{c,ss} (\text{in counts s}^{-2}) \tag{1}$$

with $S_a = 4\pi a^2$ the cell surface area. $J_{c,ss}$ (mol m^{-2} s^{-1}) corresponds to the production flux of ZntR-M complexes (Fig. 1) expressed per unit microorganism surface area under *steady-state light emission conditions*, and α (in counts s^{-1} mol^{-1} m^3) is the luminescence produced per unit concentration of ZntR-M complexes over the whole sample volume V_T. Eq. (1) implies that $\mathcal{L}um(t)$ is proportional to the concentration of ZntR-M complexes smeared-out over the whole solution volume. This proportionality argued in literature [17] reflects the equilibrium between concentration of intracellular ZntR-M complexes and quantity of emitted photons as achieved under the conditions defining the applicability of Eq. (1). In the other dynamic limit where step (ii) solely controls the rate of light production, $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ becomes

$$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max} = c_p S_a J_{\nu,ss} (\text{in counts s}^{-2}) \tag{2}$$

where $J_{\nu,ss}$ (counts m s^{-2}) is then the time-derivative of the luminescence emitted per unit microorganism surface area and normalised by the cell concentration c_p. Eq. (2) holds under conditions where the (equilibrated) process leading to ZntR-M complex formation (step (i)) is fast compared to step (ii). In the general case where both steps (i) and (ii) determine the emission flux of photons, the composite rate of light production is written

$$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max} = c_p S_a [(\alpha J_{c,ss})^{-1} + J_{\nu,ss}^{-1}]^{-1}. \tag{3}$$

The scenarii captured by Eqs. (1) and (2) are retrieved from Eq. (3) in the limits $\alpha J_{c,ss}/J_{\nu,ss} << 1$ and $\alpha J_{c,ss}/J_{\nu,ss} >> 1$, respectively.

After lengthy developments detailed in **SM-3**, it is shown that the steady-state flux $J_{c,ss}$ is defined by

$$J_{c,ss} = \frac{\overline{K}^*}{1 + \overline{K}^*} J_u \tag{4}$$

where $\overline{K}^*$ is the (dimensionless) stability constant of the intracellular ZntR-M complex defined by $\overline{K}^* = k_a^* \rho_S^{V_i} / k_d^*$ with k_a^* (mol^{-1} m^3 s^{-1}) and k_d^* (s^{-1}) the effective kinetic constants [35,51,52] for formation and dissociation of ZntR-M complex, respectively (Fig. 1), and $\rho_S^{V_i}$ is the concentration of metal binding sites carried by ZntR and averaged over the intracellular volume of an individual cell. The here-applicable Michaelis-Menten [53–55] biouptake flux J_u involved in Eq. (4) is expressed by

$$J_u/J_u^* = \frac{x_f^*}{2\beta_a Bn^{-1}} \left(1 + \frac{1 + \beta_a Bn^{-1}}{x_f^*}\right) \left\{1 - \left[1 - \frac{4\beta_a Bn^{-1}}{x_f^*}\left(1 + \frac{1 + \beta_a Bn^{-1}}{x_f^*}\right)^{-2}\right]^{1/2}\right\}. \tag{5}$$

where the maximum biouptake flux J_u^* (mol m^{-2} s^{-1}) is defined by $J_u^* = k_{int} K_H K_M$ with K_M (mol m^{-3}) the reciprocal of metal affinity to internalisation sites S_u, K_H (m) the Henry coefficient for adsorption of M to S_u, and k_{int} (s^{-1}) the metal internalisation rate constant [31]. The dimensionless x_f^* in Eq. (5) is given by $x_f^* = \beta_a c_{M,f}^* / K_M$ where $c_{M,f}^*$ corresponds to the concentration of bioavailable metal ions in bulk solution. It is obtained by correcting the bulk concentration c_M^* of initially introduced M for the rapid metal adsorption on the mere (*i.e.* non-internalisation) adsorption sites of the N cell envelopes in solution [31–34,56]. x_f^* is here defined by (**SM-3**)

$$x_f^* = x^*(1 - c_p S_a \Gamma_{ads}) = x^*(1 - c_p S_a \beta_a \widetilde{K}_H). \tag{6}$$

where $x^* = \beta_a c_M^* / K_M$ and $\Gamma_{ads} = \beta_a \widetilde{K}_H c_M^*$ (mol m^{-2}) is the cell surface

concentration of adsorbed M. Eq. (6) is valid in the linear Henry metal adsorption regime [53] applicable under the experimental conditions examined here (§4.1). The quantity $\beta_a = \exp(-z_M F\psi_a/RT)$ in Eqs. (5) and (6) refers to the equilibrium Boltzmann factor for the accumulation of metal ions (with valence z_M) at the outer membrane surface where the dimensionless potential $F\psi_a/RT$ applies, with F, R and T having their usual meanings. $\widetilde{K}_H$ (m) in Eq. (6) is the intrinsic Henry adsorption coefficient (*i.e.* devoid of electrostatic contribution) of M at the cell envelope and is defined by $\widetilde{K}_H = \sum_i \Gamma_{max,i}/\widetilde{K}_{M,i}$ with $\Gamma_{max,i}$ the surface concentration of mere adsorption sites of type i and $\widetilde{K}_{M,i}$ (mol m^{-3}) the corresponding reciprocal metal affinity constant [53]. Finally, Bn^{-1} in Eq. (5) stands for the dimensionless reciprocal bioavailability number [31,57] (**SM-3**)

$$Bn^{-1} = ak_{int}K_H/D_M \tag{7}$$

with D_M the metal diffusion coefficient in solution. In the extreme $\beta_a Bn^{-1} >> 1$, the overall rate of metal biouptake is controlled by the diffusive transfer of M from solution to the cell membrane surface whereas $\beta_a Bn^{-1} << 1$ corresponds to the Biotic Ligand Model limit [18] that tacitly assumes a slow metal internalisation step compared to the extracellular metal transfer [18,31–34,56]. Eq. (5) identifies with the Best equation [58] rewritten in terms of Bn^{-1} and x_f^*, and corrected for cell surface electrostatics [31].

The steady-state emission flux of photons $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ follows from combining Eqs. (3) and (4), which leads to the dimensionless expression

$$\frac{(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}}{\alpha c_p S_a J_u^* \overline{K}^*(1+\overline{K}^*)^{-1}} = \left(\frac{J_u^*}{J_u} + \frac{\alpha J_u^*}{J_{\nu,ss}}\frac{\overline{K}^*}{1+\overline{K}^*}\right)^{-1} \tag{8}$$

where J_u is defined by Eqs. (5)–(7). Fig. 2 displays the characteristic sigmoidal increase of the dimensionless photon emission flux (left side Eq. (8)) with increasing the (dimensionless) metal concentration x_f^* (Eq. (6)). Simulations are given for cases where $J_{\nu,ss}$ is independent of c_M^*, an approximation that holds for the bioreporters used in this study (see §4). The maximum rate of light production, $\alpha c_p S_a J_u^* \overline{K}^*(1+\overline{K}^*)^{-1}$, is reached under conditions where step (i) in Fig. 1 is the kinetically-limiting step and the metal internalization sites S_u are all operational, *i.e.* $J_u/J_u^* \to 1$. Fig. 2 further shows the decrease of the light production rate with increasing $\alpha J_u^* \overline{K}^*(1+\overline{K}^*)^{-1}/J_{\nu,ss}$, which corresponds to situations where step (ii) in Fig. 1 increasingly determines the response of the biosensor. Linear variation of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ with x_f^* (red curve in Fig. 2) is observed under the

strict conditions $\alpha J_{c,ss}/J_{\nu,ss} << 1$ (Eq. (1)) *and* $J_u/J_u^* << 1$. The latter inequality is satisfied for $x_f^* << 1$, which corresponds to coverage of internalisation sites by metal ions well below unity (**SM-3**). In this practical limit, Eq. (8) reduces to (**SM-3**)

$$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max} = \frac{\beta_a \overline{K}^*(1-\beta_a c_p S_a \widetilde{K}_H)}{(1+\beta_a Bn^{-1})(1+\overline{K}^*)}\alpha c_p S_a k_{int} K_H c_M^* \tag{9}$$

which is consistent with the expression provided in Fig. 2 for $x_f^* << 1$ (red curve). Isolating the terms that depend on cell surface electrostatics (β_a), on c_p and on c_M^*, Eq. (9) can be recast in the forms reported in Table 1.

4. Results and discussion

4.1. Biosensor response versus solution ionic strength

The dependence of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ on solution ionic strength I is displayed in Fig. 3for BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L cells at $OD_{600} = 0.2$ and various c_M^* in the range 5 nM to 100 nM. For all strains examined, three distinct regimes in metal concentration may be distinguished. Taking as illustrative example the case of JW3601-L, a first regime called *regime A*, applicable at sufficiently low c_M^* ($\leq$10 nM), corresponds to (i) an overall decrease of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ with increasing I from 10 mM to 100 mM, (ii) the existence of a plateau or shallow maximum for I in the 10 mM–20 mM range, and (iii) an increase in $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ with c_M^* at fixed I. A second regime (*regime B*) achieved at intermediate c_M^* (~25 nM) is marked by a $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ that is basically independent of I. A third regime (*regime C*) is reached at sufficiently large c_M^* ($\geq$50 nM) and refers to an overall increase of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ over the tested range of salinity and to a biosensor signal that is nearly independent of c_M^*.

Let us first analyze the cells response measured in *regime A*. According to theory (§3, Table 1), at sufficiently low c_M^* (or, equivalently, low $c_{M,f}^*$) the dependence of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ on I is governed by that of the Boltzmann factor β_a independently obtained from cells electokinetic analysis (**SM-2**, Fig. S2F) according to

$$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max} = \frac{\omega_{\beta_a}^{(1)}\beta_a}{(1+\beta_a Bn^{-1})}\left(1-\omega_{\beta_a}^{(2)}\beta_a\right) \tag{10}$$

where $\omega_{\beta_a}^{(1),(2)}$ and Bn^{-1} (all independent of β_a) are defined in Table 1 and by Eq. (7), respectively. For the three strains of interest, within experimental error the dependence of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ on I measured in *regime A* at c_M^*=5 nM, 7.5 nM and 10 nM follows Eq. (10) after Levenberg-Marquardt adjustment [59,60] of Bn^{-1} and $\omega_{\beta_a}^{(1),(2)}$. Conformably to theory, the obtained Bn^{-1} and $\omega_{\beta_a}^{(2)}$ are independent of c_M^* (Table 2), whereas $\omega_{\beta_a}^{(1)}$ increases linearly with c_M^* (**SM-4, Fig. S3**) and the corresponding slope is reported in Table 2. Use of the expression $\omega_{\beta_a}^{(2)}/(c_p S_a) = \widetilde{K}_H$ (Table 1) further allows evaluation of the Henry adsorption coefficient $\widetilde{K}_H$ (Table 2). The latter properly compares with the $\widetilde{K}_H$ reported in Table 2 and *independently* obtained from analysis of the metal adsorption isotherms provided in **SM-5** (Fig. S4) that display linearity between Γ_{ads} and c_M^*, thus validating the applicability of the linear Henry adsorption regime (Eq. (6)).

A straightforward analysis of Eq. (10) reveals the existence of a maximum reached by $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ at the threshold solution ionic strength $I^{\neq}$ to which corresponds the Boltzmann factor $\beta_a^{\neq}$

$$\beta_a^{\neq} = \left(-1+\sqrt{1+Bn^{-1}/\omega_{\beta_a}^{(2)}}\right)/Bn^{-1}. \tag{11}$$

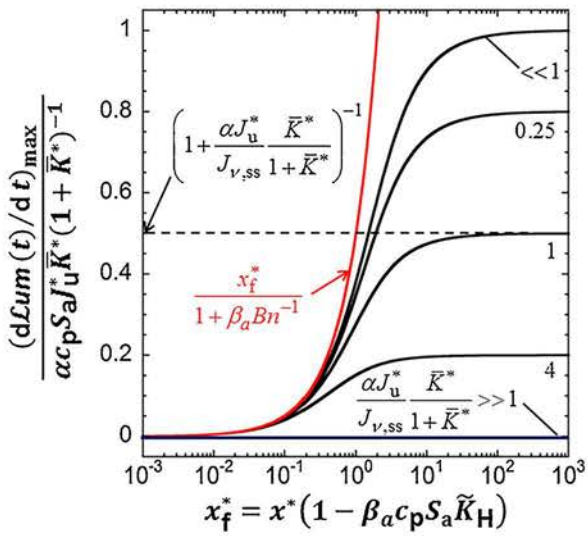


Fig. 2. Theoretical response of metal-sensing whole-cell bioreporters. Typical dependence of the dimensionless photon emission flux (Eq. (8)) on the (dimensionless) concentration x_f^* (Eq. (6)) for different values of $\alpha J_u^* \overline{K}^*(1+\overline{K}^*)^{-1}/J_{\nu,ss}$ (indicated). The expressions applicable in the limits $x_f^* >> 1$ (dashed line) and $x_f^* << 1$, $\alpha J_{c,ss}/J_{\nu,ss} << 1$ (red line) are detailed. Model parameters: $\beta_a Bn^{-1} = 1$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

Table 1
Expressions for the rate of light production $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ derived from eq (9) valid for $x_f^* << 1$ and $\alpha J_{c,ss}/J_{\nu,ss} << 1$. These expressions highlight the dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ on cell surface electrostatics (β_a, 1st line), cell concentration (c_p, 2nd line) and bulk metal concentration (c_M^*, 3rd line); the corresponding definitions of the involved scalars $\omega_{\beta_a,c_p}^{(j=1,2)}$ and $\omega_{c_M^*}^{(1)}$ are specified.

Expression of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$(counts s^{-2})	Expression of the scalars $\omega_{X=\beta_a,c_p,c_M^*}^{(j=1,2)}$
$(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max} = \frac{\omega_{\beta_a}^{(1)}\beta_a}{(1+\beta_a Bn^{-1})}\left(1-\omega_{\beta_a}^{(2)}\beta_a\right)$	$\begin{cases}\omega_{\beta_a}^{(1)} = \frac{\overline{K}^*}{(1+\overline{K}^*)}\alpha c_p S_a k_{int} K_H c_M^* (\text{counts s}^{-2}) \\ \omega_{\beta_a}^{(2)} = c_p S_a \widetilde{K}_H (\text{dimensionless})\end{cases}$
$(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max} = \omega_{c_p}^{(1)} c_p\left(1-\omega_{c_p}^{(2)} c_p\right).$	$\begin{cases}\omega_{c_p}^{(1)} = \frac{\beta_a \overline{K}^*}{(1+\beta_a Bn^{-1})(1+\overline{K}^*)}\alpha S_a k_{int} K_H c_M^* (\text{counts s}^{-2}\text{m}^3) \\ \omega_{c_p}^{(2)} = \beta_a S_a \widetilde{K}_H (\text{m}^3)\end{cases}$
$(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max} = \omega_{c_M^*}^{(1)} c_M^*$	$\omega_{c_M^*}^{(1)} = \frac{\beta_a \overline{K}^*(1-\beta_a c_p S_a \widetilde{K}_H)}{(1+\beta_a Bn^{-1})(1+\overline{K}^*)}\alpha c_p S_a k_{int} K_H (\text{counts s}^{-2}\text{mol}^{-1}\text{m}^3)$

For $I >> I^{\neq}$, $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ decreases with I and is independent of metal adsorption on the mere adsorption sites of the cell envelope ($\omega_{\beta_a}^{(2)}$ term). In this salinity range, biosensors response is dominated by the sole decrease of the metal concentration at the membrane surface and the ensuing decrease in biouptake flux as a result of screening of the attractive metal-biosurface interactions (eq S18 in **SM-3**). For $I << I^{\neq}$, Eq. (10) becomes $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max} \sim \omega_{\beta_a}^{(1)}\left(1-\beta_a\omega_{\beta_a}^{(2)}\right)$ and the (slight) increase of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ with increasing I (or decreasing β_a, Fig. S**2F** in **SM-2**) thus follows a decrease in Γ_{ads} or, equivalently, an increase in the concentration of biovailable metal in solution. For the situation examined here, $I^{\neq} = 15$ mM, which nearly corresponds to the ionic strength of the 5-fold diluted nGGM medium (10 mM) prior to addition of $NaNO_3$. The analysis further leads to a reciprocal bioavailability number Bn^{-1} of *ca.* 0.25 for JW3601-L/JW3596-L and 0.7 for BW25113-L (Table 2). Using β_a results derived from electrokinetics (Fig. S**2F** in **SM-2**), the quantity $\beta_a Bn^{-1}$ decreases from *ca.* 14 to 0.6 and 18 to 0.7 from $I = 10$ mM to 100 mM for JW3601-L and JW3596-L cells, respectively. Kinetics of metal biouptake by these bacterial strains over the here-adopted range of I is therefore significantly limited by the conductive diffusion of Cd(II) from solution to the cell transporter sites. For strains with similar Bn^{-1} (*i.e.* JW3596-L and JW3601-L), this limitation is most pronounced for JW3596-L with highest surface charge density (**SM-2**) and at low I where cell charge screening is least significant, in agreement with previous theoretical anticipation [31]. Despite its lower surface charge density, $\beta_a Bn^{-1}$ for BW25113-L strain decreases from 18 to 1.2 in the range $I = 10$–100 mM and is thus comparable to- or even larger than (depending on I)- that for JW3596-L. This finding is due to the larger magnitude of Bn^{-1} for BW25113-L, which translates into a poor dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ on I (or, equivalently, β_a) at $c_M^* = 7.5$ nM and 10 nM (Fig. 3**A**) as compared to that for the isogenic JW3596-L and JW3601-L. The larger Bn^{-1} for BW25113-L may originate from a larger $k_{int}K_H(=D_M Bn^{-1}/a$, Eq. (7)), which leads to larger biouptake flux and thus to enhanced biouptake limitation by metal transport, and/or from a significant retardation of metal diffusion within the protruding LPS surface structure (Fig. 1**C**). Correction of Eq. (7) for such a retardation leads indeed to $Bn^{-1} = ak_{int}K_H/(\overline{f}_{el} D_M)$[31] with $\overline{f}_{el}$ a (dimensionless) number that decreases with decreasing the ratio $D_{M,in}/D_M$ where $D_{M,in}$ is the metal diffusion coefficient in the LPS surface layer [31].

The responses of the constitutive BW25113-C, JW3601-C and JW3596-C were measured under the c_M^*- and I-conditions adopted in Fig. 3. The results, reported in **SM-6** (Fig. S**5**), show that $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ obtained for the constitutive strains is *independent* of c_M^*, as expected from genetic construction, and most importantly increases with increasing I. These defining features qualitatively correspond to those of *regime C* identified in Fig. 3 for the non-constitutive cells. The signals of the constitutive strains are further reported in Fig. 3 after proper scaling for comparison purposes. For JW3601 and

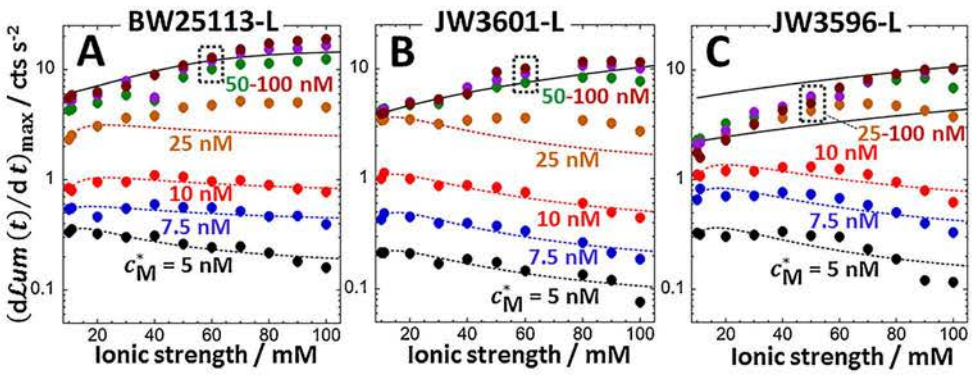


Fig. 3. Dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ on solution ionic strength for BW25113-L (A), JW3601-L (B) and JW3596-L (C) biosensors at various bulk metal concentrations c_M^* (indicated) and $OD_{600} = 0.2$. Points: experiments, dashed lines: theory (Eq. (10), first line in Table 1). Solid lines refer to data pertaining to constitutive cells (**SM-6**) after multiplication by a factor 2 (A, B), and 0.8 and 2 (C) for comparison purposes. In (A) and (B), theoretical data at $c_M^* = 25$ nM are predictions from Eq. (10) with adopting the $\omega_{\beta_a}^{(2)}$ and Bn^{-1} values obtained at lower c_M^*, and with considering for $\omega_{\beta_a}^{(1)}$ the value estimated from linear extrapolation of $\omega_{\beta_a}^{(1)}$ derived at $c_M^* = 5$ nM, 7.5 nM and 10 nM.

Table 2
Values of the parameters derived from theoretical analysis (Eq. (9) and Table 1) of BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L responses with changing solution ionic strength (Fig. 3, evaluation of $\omega_{\beta_a}^{(1),(2)}$ and Bn^{-1}) at $OD_{600} = 0.2$, changing cell number density (Fig. 4, $\omega_{c_p}^{(1),(2)}$) at 10 mM solution ionic strength, and changing bulk metal concentration (linear regime in Fig. 5, $\omega_{c_M^*}^{(1)}$) at $OD_{600} = 0.2$ and 10 mM solution ionic strength. See text for details. [a,b,c]$\widetilde{K}_H$ is derived from theoretical interpretation of the data given in [a] Fig. 3, [b] Fig. 4 and [c] from metal adsorption measurements **(SM-5, Fig. S4)**.

	$d\omega_{\beta_a}^{(1)}/dc_M^*$ (counts $s^{-2}mol^{-1}m^3$)	$\omega_{\beta_a}^{(2)}$ (dimensionless)	$d\omega_{c_p}^{(1)}/dc_M^*$ (counts $s^{-2}mol^{-1}m^6$)	$\omega_{c_p}^{(2)}$ (m^3)	$\omega_{c_M^*}^{(1)}$ (counts $s^{-2}mol^{-1}m^3$)	$\widetilde{K}_H$ (μm)	Bn^{-1} (dimensionless)
JW3601-L	54.9×10^3	$4.04 \pm 0.78 \times 10^{-3}$	$1.42 \pm 0.06 \times 10^{-9}$	$1.90 \pm 0.16 \times 10^{-15}$	$1.74 \pm 0.10 \times 10^5$	$3.75 \pm \pm 0.72^a$ 4.78 ± 0.41^b 5.13 ± 1.18^c	0.24 ± 0.02
BW25113-L	24.7×10^4	$1.40 \pm 0.27 \times 10^{-2}$	$1.69 \pm 0.04 \times 10^{-9}$	$2.30 \pm 0.26 \times 10^{-15}$	$1.65 \pm 0.10 \times 10^5$	12.60 ± 2.5^a 14.20 ± 1.6^b 11.56 ± 2.3^c	0.73 ± 0.34
JW3596-L	94.6×10^3	$5.26 \pm 0.48 \times 10^{-3}$	$2.25 \pm 0.20 \times 10^{-9}$	$1.31 \pm 0.14 \times 10^{-15}$	$2.41 \pm 0.30 \times 10^5$	4.87 ± 0.44^a 2.84 ± 0.30^b 5.18 ± 0.91^c	0.26 ± 0.06

BW25113, this comparison highlights an excellent agreement between constitutive and non-constitutive cells response over the whole range of ionic strengths pending multiplication of the former by a factor 2. Though the comparison is quantitatively less convincing for JW3596, it strongly suggests that the overall rate of photons production in *regime C* is significantly determined by step (ii) in Fig. 1 (flux $J_{\nu,ss}$, Eq. (2)) independently of c_M^*. Differences between constitutive and non-constitutive cells responses in *regime C* probably originate from variation in the energy required to efficiently maintain the cascade of biochemical reactions leading to light production. In particular, this energy requirement is known to depend on solution iso/hyper-tonicity [61].

In the light of the above elements, the intermediate *regime B* in Fig. 3 corresponds to that where both steps (i) and (ii) in Fig. 1 govern the response of the biosensors (Eq. (3)), as further detailed in §4.3.

4.2. Biosensor response versus cell concentration

The theory in §3 (Table 1) predicts that at fixed solution ionic strength I and bulk metal concentration, $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ depends on cell concentration c_p according to the quadratic function

$$(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max} = \omega_{c_p}^{(1)} c_p \left(1 - \omega_{c_p}^{(2)} c_p\right) \tag{12}$$

where $\omega_{c_p}^{(1),(2)}$ are defined in Table 1. Using Eq. (12), it is verified that $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ should reach the maximum $\omega_{c_p}^{(1)}/\left(4\omega_{c_p}^{(2)}\right)$ at the critical cell concentration defined by $c_p^{\neq} = 1/\left(2\omega_{c_p}^{(2)}\right)$. This maximum arises from the balance between metal biouptake and adsorption terms ($\omega_{c_p}^{(1)}$ and $\omega_{c_p}^{(2)}$, respectively) that lead to increasing and decreasing biosensors response with increasing c_p, respectively.

In agreement with theory, experiments evidence the existence of a maximum for $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ (Fig. 4). Quantitatively, data are remarkably recovered with use of Eq. (12) and adjustment [59,60] of $\omega_{c_p}^{(1),(2)}$. Reconstruction of some series in Fig. 4 could be refined upon replacing c_p (or OD_{600}) in Eq. (12) by $c_p - c_p^o$ (or $OD_{600} - OD_{600}^o$) with $OD_{600}^o(\leq 0.1)$ the minimum cell concentration required to obtain a detectable bioluminescence. Obviously, at $OD_{600} > 0.5$ (BW25113-L) and $OD_{600} > 0.6$ (JW3601-L), $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ falls out of the range of validity of Eq. (12) (derived from Eq. (1)). This is explained by the loss of linearity between bioreporter response and c_p as evidenced from measurement of the constitutive biosensor signal **(SM-7**, Fig. **S6)** under the conditions of Fig. 4. Conformably to the expressions given in Table 1, $\omega_{c_p}^{(2)}$ is independent of c_M^* (see values in Table 2) and $\omega_{c_p}^{(1)}$ increases linearly with increasing c_M^* (see Fig. **S3** in **SM-4** and slopes in Table 2) except at sufficiently large c_M^* where the onset of regime B defined in §4.1 is reached. The intercept of the straight line $\omega_{c_p}^{(1)}$ *versus* c_M^* further enables fine evaluation of the minimum metal concentration $c_M^{*,0}$ in line with a measurable sensor signal ($c_M^{*,0} \leq 2$ nM for the 3 strains of interest). Finally, knowledge of $\omega_{c_p}^{(2)} (= \beta_a S_a \widetilde{K}_H$, Table 1) makes it possible an independent estimation of the Henry adsorption coefficient $\widetilde{K}_H$ given the applicable β_a (**SM-2**, Fig. **S2F**) and the known cell dimension (§2.3). For all biosensors tested, the so-obtained $\widetilde{K}_H$ (Table 2) is in good agreement with that derived from adsorption isotherms (**SM-**

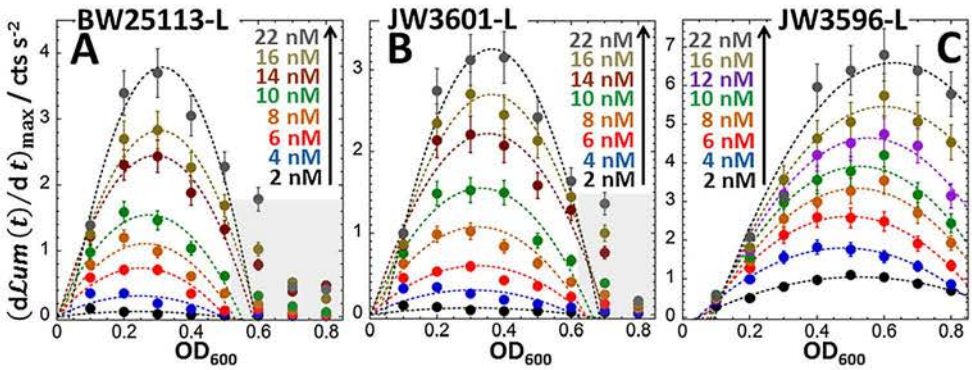


Fig. 4. Dependence of $(d\mathcal{L}um(t)/dt)_{max}$ on cell concentration for BW25113-L (A), JW3601-L (B) and JW3596-L (C) biosensors at various bulk metal concentrations c_M^* (indicated) in 10 mM solution ionic strength. Points: experiments, dashed lines: theory (Eq. (12)). The shaded areas in (A) and (B) identify the ranges of c_M^* where linearity between the time derivative of the constitutive sensor signal and cell concentration is lost (see **SM-7, Fig. S6**).

5, Fig. S4) and from analysis of the dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ on solution ionic strength (Fig. 3). The larger $\widetilde{K}_{\mathrm{H}}\left(=\sum_i \Gamma_{\max,i}/\widetilde{K}_{\mathrm{M},i}\right)$ derived for BW25113 is further consistent with the larger amount of sites that potentially bind metal ions, recalling the absence of LPS truncation (Fig. 1**C**) for this wild type cell and the possible presence of soft surface appendages other than LPS. Indeed, mutations in the *rfa* operon leading to bacterial strains with severely truncated LPS (*e.g.* JW3601 and JW3596) are known to induce pleiotropic effects leading to loss of flagella and reduction of type 1 fimbriae production [62]. Finally, it is verified that $\mathrm{d}\omega^{(1)}_{\beta_a}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}}$ evaluated in §4.1 and $\mathrm{d}\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}}$ obtained *independently* from Fig. 4 are remarkably consistent with the following relation derived from Table 1

$$\mathrm{d}\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}} = \frac{\beta_a}{c_{\mathrm{p}}(1+\beta_a Bn^{-1})}\mathrm{d}\omega^{(1)}_{\beta_a}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}}. \tag{13}$$

The slope $\mathrm{d}\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}}$ basically defines the increment of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ upon increasing c^*_{M} at fixed c_{p} and β_a *in the absence of metal sorption* (*i.e.* $\omega^{(2)}_{c_{\mathrm{p}}}c_{\mathrm{p}} \to 0$ in Eq. (12)). Under such conditions, the performance of the biosensor may indeed be defined by

$$\mathrm{d}(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}} = c_{\mathrm{p}}\mathrm{d}\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}} \tag{14}$$

which is obtained from Table 1. Accordingly, inspection of $\mathrm{d}\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}}$ given in Table 2 for 10 mM solution ionic strength suggests that the performance −at this salinity level- of JW3596-L within regime A of metal concentration is *ca.* 1.6-1.7 and 1.2-1.3 times better than that obtained for JW3601-L and BW25113-L, respectively. Given the inequality $\beta_a Bn^{-1} >> 1$ that holds for the three strains at $I = 10$ mM (see §4.1), it is verified from Eq. (14) and from the expression of $\mathrm{d}\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}/\mathrm{d}c^*_{\mathrm{M}}$ given in Table 1 that this differentiated performance is tied to the magnitude of the sole factor $\alpha \times \overline{f}_{\mathrm{el}}$. Obviously, the performance of the biosensor decreases for cases where metal adsorption is significant, *i.e.* at sufficiently low salt concentrations *and* large cell number densities (Fig. 4).

4.3. Biosensor response versus bulk metal concentration

Fig. 5reports the dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ at $\mathrm{OD}_{600} = 0.2$ and $I = 10$ mM on bulk metal concentration. The results confirm the linearity of the biosensor response with changing c^*_{M} in the (here-refined) regime A identified in Fig. 3. The corresponding slope, termed $\omega^{(1)}_{c^*_{\mathrm{M}}}$ in Table 1, is collected in Table 2. In agreement with Fig. 2, Fig. 5 evidences the metal concentration regime B that marks the transition between regime A (linear sensor response) and regime C where $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ tends to a plateau value (Fig. 2). Quantitatively, the dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ on c^*_{M} in regimes A, B and C could be interpreted with use of Eq. (8) (Fig. 5) and adjustments of the only reciprocal metal affinity constant K_{M} and of the quantity $\frac{\alpha J^*_{\mathrm{u}}}{J_{\nu,\mathrm{ss}}}\frac{\overline{K}^*}{1+\overline{K}^*}$. Together with Bn^{-1}, β_a and $\widetilde{K}_{\mathrm{H}}$ derived in the preceding sections (Table 2), knowledge of K_{M} enables full computation of $J_{\mathrm{u}}/J^*_{\mathrm{u}}$ (Eqs. (5) and (6)) involved in Eq. (8), while the measured plateau reached at sufficiently large c^*_{M} identifies with $\alpha c_{\mathrm{p}} S_{\mathrm{a}} J^*_{\mathrm{u}}\overline{K}^*(1+\overline{K}^*)^{-1}\left(1+\frac{\alpha J^*_{\mathrm{u}}}{J_{\nu,\mathrm{ss}}}\frac{\overline{K}^*}{1+\overline{K}^*}\right)^{-1}$ (Fig. 2). For JW3596-L and JW3601-L, the abrupt transition between linear and plateau regimes requires a sensitivity parameter analysis to properly identify the range of K_{M} and $\frac{\alpha J^*_{\mathrm{u}}}{J_{\nu,\mathrm{ss}}}\frac{\overline{K}^*}{1+\overline{K}^*}$ leading to satisfactory data fitting. The results are provided in Supplementary Material (**SM-8**, **Table S1**). Recalling that $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ at large c^*_{M} is significantly determined by step (ii) in Fig. 1 (conclusion derived in §4.1), it is most likely that $\frac{\alpha J^*_{\mathrm{u}}}{J_{\nu,\mathrm{ss}}}\frac{\overline{K}^*}{1+\overline{K}^*}$for JW3596-L and JW3601-L approaches the upper limit (*ca.* 0.4) of the range given in **Table S1**. The major difference between JW3596-L and BW25113-L/JW3601-L concerns the reduced extension of regime A of metal concentrations (where Eq. (9) applies) for the former biosensor type. This is reflected by the magnitude of K_{M} for JW3596-L ($K_{\mathrm{M}} = 27 \pm 3$ nM) that is *ca.* 2 and 3 times lower than for BW25113-L and JW3601-L, respectively. In turn, the linear Henry regime for Cd(II) adsorption on *internalisation* sites applies over a lower range of c^*_{M} compared to that for BW25113-L/JW3601-L. This conclusion is consistent with the range of c^*_{M} where $\omega^{(1)}_{c_{\mathrm{p}}}$ pertaining to the three biosensors depends linearly on c^*_{M} (**SM-4**, Fig. S3), and with the c^*_{M}-range identified in Fig. 3 where transition between regimes A and B occurs. Results further evidence a stronger contribution of step (ii) (Fig. 1) in governing the rate of photons emission by BW25113-L as $\frac{\alpha J^*_{\mathrm{u}}}{J_{\nu,\mathrm{ss}}}\frac{\overline{K}^*}{1+\overline{K}^*}$ for this cell type is *ca.* 2–3 times larger than for JW3601-L/JW3596-L. Finally, Fig. 5 reports the biosensors response computed from theory for hypothetical conditions where metal internalisation kinetics fully determines biouptake, *i.e.* $\beta_a Bn^{-1} \to 0$ (BLM limit). Obviously, this scenario does not conform to experiments, which confirms that biouptake is here significantly determined by conductive diffusion of Cd(II) from bulk solution to cell membrane.

To conclude, a theory is developed for the response of metal-sensing whole-cell bacterial reporters under poor metal-complexing conditions for which the bioreporter signal reflects the concentration of free metal ions in the exposure medium and their dynamic partitioning at the

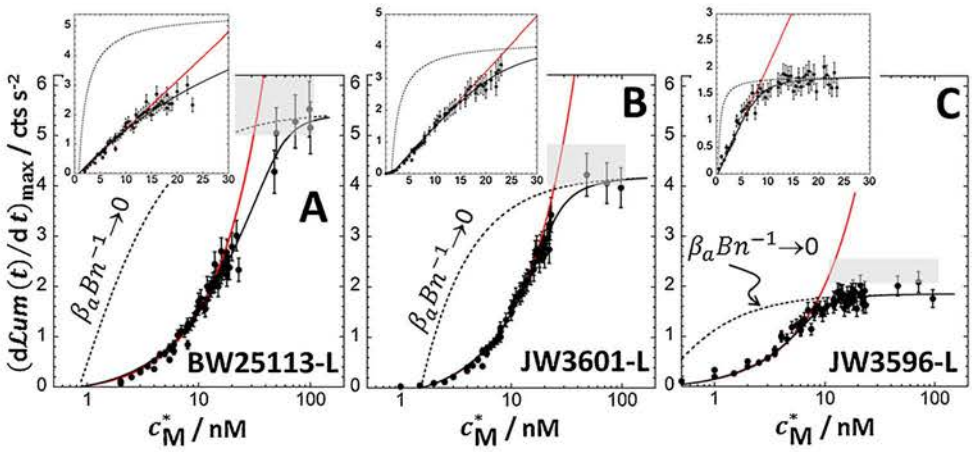


Fig. 5. Dependence of $(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t)_{\max}$ on bulk metal concentration for BW25113-L (A), JW3601-L (B) and JW3596-L (C) biosensors at 10 mM solution ionic strength and $\mathrm{OD}_{600} = 0.2$. Points: experiments. Red solid lines: theory valid for linear biosensor response (Table 1, 3rd line). Black solid lines: theory over the complete range of bulk metal concentrations (Eqs. (5), (6), (8)). Dashed lines: Eqs. (5), (6), (8) with arbitrarily setting $\beta_a Bn^{-1} \to 0$. Insets: representation in linear scale for the metal concentration axis. Shaded areas correspond to the responses obtained for constitutive cells after their scaling according to the procedure given in Fig. 3 and relevant at 10 mM solution ionic strength (*i.e.* scaling factor = 2 (A), 2 (B) and 0.8 (C)).

bacterial/medium interphase. The formalism provides a rationale for the dependence of the steady-state flux of emitted luminescence on concentrations of metal ions and bioreporter cells in solution. It integrates the paramount contributions of cell surface electrostatics and cell metal-binding capacity, both governed by cell surface charge, medium salinity and by the presence of soft peripheral surface layer. Sucessfull confrontation between experiments and theory sheds light on the biophysicochemical determinants of biosensors response and on metal partitioning dynamics between extracellular, interfacial and intracellular compartments. This work paves the way for future developments to decipher biosensor signals measured in environmental media containing (nano)particulate metal complexants. In detail, under conditions where the overall rate of metal biouptake is controlled by diffusive transfer of metal from solution to the cell membrane surface, whole-cell bioreporters are expected to respond to the chemical speciation in solution, *i.e.* the free metal ions *and* the complex species that are *labile* on the measurement timescale. The analysis will benefit from the lability concept recently formulated for nano- to micro-sized metal complexes at metal-responsive biointerfaces [49,52,63]. This lability will play a central role in relating chemodynamics of extracellular metal species and bioreporter response. Extension of the current theory to include the impacts of metal speciation on biosensor response and the explicit coupling between lability of metal complexes, biouptake flux of bioavailable metal ions and kinetics of light bio-production, will be the topic of a forthcoming work. Theoretical predictions will be further confronted to experiments under controlled extracellular metal speciation conditions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.033.

References

[1] M.D. Todd, M.J. Lee, J.L. Williams, J.M. Nalezny, P. Gee, M.B. Benjamin, S.B. Farr, The CAT-Tox (L) assay: a sensitive and specific measure of stress-induced transcription in transformed human liver cells, Toxicol. Sci. 28 (1995) 118–128, http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/28.1.118.

[2] R.H. Valdivia, S. Falkow, Probing bacterial gene expression within host cells, Trends Microbiol. 5 (1997) 360–363, http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01111-6.

[3] T.J. Silhavy, J.R. Beckwith, Uses of lac fusions for the study of biological problems, Microbiol. Rev. 49 (1985) 398–418.

[4] K. de Mora, N. Joshi, B.L. Balint, F.B. Ward, A. Elfick, C.E. French, A pH-based biosensor for detection of arsenic in drinking water, Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 1031–1039, http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-4815-8.

[5] J.R. van der Meer, S. Belkin, Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria, Nat. Rev. Microbiol. 8 (2010) 511–522, http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2392.

[6] A. Hynninen, K. Tõnismann, M. Virta, Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals, Bioeng. Bugs 1 (2010) 132–138, http://dx.doi.org/10.4161/bbug.1.2.10902.

[7] D.M. Close, S. Ripp, G.S. Sayler, Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications, Sensors 9 (2009) 9147–9174, http://dx.doi.org/10.3390/s91109147.

[8] M.-H. Joe, K.-H. Lee, S.-Y. Lim, S.-H. Im, H.-P. Song, I.S. Lee, D.-H. Kim, Pigment-based whole-cell biosensor system for cadmium detection using genetically engineered Deinococcus radiodurans, Bioprocess Biosyst. Eng. 35 (2012) 265–272, http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0610-3.

[9] F. Cortés-Salazar, S. Beggah, J.R. van der Meer, H.H. Girault, Electrochemical As (III) whole-cell based biochip sensor, Biosens. Bioelectron. 47 (2013) 237–242, http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.011.

[10] M. Mehrvar, M. Abdi, Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors, Anal. Sci. 20 (2004) 1113–1126, http://dx.doi.org/10.2116/analsci.20.1113.

[11] I. Biran, R. Babai, K. Levcov, J. Rishpon, E.Z. Ron, Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium, Environ. Microbiol. 2 (2000) 285–290, http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00103.x.

[12] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (Vibrio fischeri) for acute toxicity prediction of chemicals, Environ. Int. 32 (2006) 265–268, http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.022.

[13] A. Hynninen, M. Virta, Whole-cell bioreporters for the detection of bioavailable metals, Whole Cell Sens. Syst. II, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009, pp. 31–63, http://dx.doi.org/10.1007/10_2009_9.

[14] R. Tecon, J.R. van der Meer, Information from single-cell bacterial biosensors: what is it good for? Curr. Opin. Biotechnol. 17 (2006) 4–10, http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2005.11.001.

[15] J. Stocker, D. Balluch, M. Gsell, H. Harms, J. Feliciano, S. Daunert, K.A. Malik, J.R. van der Meer, Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 4743–4750, http://dx.doi.org/10.1021/es034258b.

[16] H.J. Shin, Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution, Appl. Microbiol. Biotechnol. 89 (2011) 867–877, http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2990-8.

[17] H. de Jong, C. Ranquet, D. Ropers, C. Pinel, J. Geiselmann, Experimental and computational validation of models of fluorescent and luminescent reporter genes in bacteria, BMC Syst. Biol. 4 (2010) 55, http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-4-55.

[18] V.I. Slaveykova, K.J. Wilkinson, Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the Biotic Ligand Model, Environ. Chem. 2 (2005) 9–24, http://dx.doi.org/10.1071/EN04076.

[19] K.J. Wilkinson, J. Buffle, Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems, in: H.P. van Leeuwen, W. Köster (Eds.), Physicochem. Kinet. Transp. Biointerfaces, John Wiley & Sons, Ltd, 2004, pp. 445–533, , http://dx.doi.org/10.1002/047009404.

[20] J. Buffle, Z. Zhang, K. Startchev, Metal flux and dynamic speciation at (bio)interfaces. Part I: critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 7609–7620, http://dx.doi.org/10.1021/es070702p.

[21] J. Zhang, Metal flux and dynamic speciation at (bio) interfaces. Part II: evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with particles and aggregates RID A-6102-2011, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 7621–7631, http://dx.doi.org/10.1021/es071117r.

[22] H.P. van Leeuwen, Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3743–3748, http://dx.doi.org/10.1021/es990362a.

[23] E. Ytreberg, J. Karlsson, S. Hoppe, B. Eklund, K. Ndungu, Effect of organic complexation on copper accumulation and toxicity to the estuarine Red Macroalga Ceramium tenuicorne: a test of the Free Ion Activity Model, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 3145–3153, http://dx.doi.org/10.1021/es1039166.

[24] A.M. Craven, G.R. Aiken, J.N. Ryan, Copper(II) binding by dissolved organic matter: importance of the copper-to-dissolved organic matter ratio and implications for the Biotic Ligand Model, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 9948–9955, http://dx.doi.org/10.1021/es301015p.

[25] H.P. van Leeuwen, R.M. Town, J. Buffle, Cleven R.F.M.J, W. Davison, J. Puy, W.H. van Riemsdijk, L. Sigg, Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 8545–8556, http://dx.doi.org/10.1021/es050404x.

[26] C. Fortin, P.G.C. Campbell, Silver uptake by the green alga Chlamydomonas reinhardtii in relation to chemical speciation: influence of chloride, Environ. Toxicol. Chem. 19 (2000) 2769–2778, http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620191123.

[27] S. Jansen, R. Blust, H.P. Van Leeuwen, Metal speciation dynamics and bioavailability: Zn(II) and Cd(II) uptake by mussel (Mytilus edulis) and carp (Cyprinus carpio), Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 2164–2170, http://dx.doi.org/10.1021/es010219t.

[28] C.S. Hassler, K.J. Wilkinson, Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by Chlorella kesslerii, Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 620–626, http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620220322.

[29] F. Degryse, E. Smolders, R. Merckx, Labile Cd complexes increase Cd availability to plants, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 830–836, http://dx.doi.org/10.1021/es050894t.

[30] C.-M. Zhao, P.G.C. Campbell, K.J. Wilkinson, When are metal complexes bioavailable? Environ. Chem. 13 (2016) 425–433, http://dx.doi.org/10.1071/EN15205.

[31] J.F.L. Duval, Dynamics of metal uptake by charged biointerphases: bioavailability and bulk depletion, Phys. Chem. Chem. Phys. 15 (2013) 7873–7888, http://dx.doi.org/10.1039/C3CP00002H.

[32] J.F.L. Duval, E. Rotureau, Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases: impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 7401–7416, http://dx.doi.org/10.1039/C4CP00210E.

[33] E. Rotureau, P. Billard, J.F.L. Duval, Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal depletion kinetics at various cell concentrations: theory and application, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 990–998, http://dx.doi.org/10.1021/es505049f.

[34] J.F.L. Duval, Coupled metal partitioning dynamics and toxicodynamics at biointerfaces: a theory beyond the biotic ligand model framework, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016) 9453–9469, http://dx.doi.org/10.1039/C5CP07780J.

[35] R.M. Présent, E. Rotureau, P. Billard, C. Pagnout, B. Sohm, J. Flayac, R. Gley, J.P. Pinheiro, J.F.L. Duval, Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 19 (2017) 29114–29124, http://dx.doi.org/10.1039/C7CP05456D.

[36] J.F.L. Duval, F. Gaboriaud, Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 15 (2010) 184–195, http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.002.

[37] C.D. Campbell, M. Hird, D.G. Lumsdon, J.C.L. Meeussen, The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of Escherichia coli, Chemosphere 40 (2000) 319–325, http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00302-1.

[38] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko,

M. Tomita, B.L. Wanner, H. Mori, Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Mol. Syst. Biol. 2 (2006), http://dx.doi.org/10.1038/msb4100050 (2006.0008).
[39] Z. Wang, J. Wang, G. Ren, Y. Li, X. Wang, Influence of core oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of Escherichia coli, Mar. Drugs. 13 (2015) 3325–3339, http://dx.doi.org/10.3390/md13063325.
[40] K. Riether, M.-A. Dollard, P. Billard, Assessment of heavy metal bioavailability using Escherichia coli zntAp:lux and copAp:lux-based biosensors, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57 (2001) 712–716, http://dx.doi.org/10.1007/s00253-001-0852-0.
[41] R. Silva-Rocha, E. Martínez-García, B. Calles, M. Chavarría, A. Arce-Rodríguez, A. de las Heras, A.D. Páez-Espino, G. Durante-Rodríguez, J. Kim, P.I. Nikel, R. Platero, V. de Lorenzo, The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes, Nucleic Acids Res. 41 (2013) D666–D675, http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1119.
[42] C.E. Outten, F.W. Outten, T.V. O'Halloran, DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in Escherichia coli, J. Biol. Chem. 274 (1999) 37517–37524, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.53.37517.
[43] J.J. Caguiat, A.L. Watson, A.O. Summers, Cd(II)-Responsive and constitutive mutants implicate a novel domain in MerR, J. Bacteriol. 181 (1999) 3462–3471.
[44] C. Rensing, B. Mitra, B.P. Rosen, The zntA gene of Escherichia coli encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 14326–14331.
[45] M. Boylan, C. Miyamoto, L. Wall, A. Graham, E. Meighen, C. Lux, D and E genes of the Vibrio fischeri luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis, Photochem. Photobiol. 49 (1989) 681–688, http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1989.tb08441.x.
[46] J.P. Gustafsson, Visual MINTEQ version 3.0. KTH, Department of Land and Water Resources Engineering, Stockolm, Sweden, 2009 Available at http://vminteq.lwr.kth.se/.
[47] E. Dague, J. Duval, F. Jorand, F. Thomas, F. Gaboriaud, Probing surface structures of Shewanella spp. by microelectrophoresis, Biophys. J. 90 (2006) 2612–2621, http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.068205.
[48] H. Ohshima, Electrophoretic mobility of soft particles, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 103 (1995) 249–255, http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757(95)03293-M.
[49] J.F.L. Duval, R.M. Town, H.P. Van Leeuwen, Applicability of the reaction layer principle to nanoparticulate metal complexes at a macroscopic reactive (bio)interface: a theoretical study, J. Phys. Chem. C. 121 (2017) 19147–19161, http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b04031.
[50] T. Xu, D.M. Close, G.S. Sayler, S. Ripp, Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment, Ecol. Indic. 28 (2013) 125–141, http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.01.020.
[51] R.M. Town, J. Buffle, J.F.L. Duval, H.P. van Leeuwen, Chemodynamics of soft charged nanoparticles in aquatic media: fundamental concepts, J. Phys. Chem. A 117 (2013) 7643–7654, http://dx.doi.org/10.1021/jp4044368.
[52] H.P. van Leeuwen, J.F.L. Duval, J.P. Pinheiro, R. Blust, R.M. Town, Chemodynamics and bioavailability of metal ion complexes with nanoparticles in aqueous media, Environ. Sci. Nano 4 (2017) 2108–2133, http://dx.doi.org/10.1039/C7EN00625J.
[53] J. Galceran, H.P. van Leeuwen, Dynamics of biouptake processes: the role of transport, adsorption and internalisation, in: H.P. van Leeuwen, W. Köster (Eds.), Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces, John Wiley & Sons, Ltd, 2004, 2018, pp. 147–203, , http://dx.doi.org/10.1002/0470094044.
[54] R.J.M. Hudson, F.M.M. Morel, lron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellular and medium coordination reactions, Limnol. Oceanogr. 35 (1990) 1002–1020, http://dx.doi.org/10.4319/lo.1990.35.5.1002.
[55] F.M.M. Morel, J.G. Hering, Principles and Applications of Aquatic Chemistry, 1st edition, Wiley-Interscience, New York, 1993.
[56] J.F.L. Duval, R.M. Présent, E. Rotureau, Kinetic and thermodynamic determinants of trace metal partitioning at biointerphases: the role of intracellular speciation dynamics, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016) 30415–30435, http://dx.doi.org/10.1039/C6CP05717A.
[57] T.N.P. Bosma, P.J.M. Middeldorp, G. Schraa, A.J.B. Zehnder, Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability, Environ. Sci. Technol. 31 (1997) 248–252, http://dx.doi.org/10.1021/es960383u.
[58] J.B. Best, The inference of intracellular enzymatic properties from kinetic data obtained on living cells. I. Some kinetic considerations regarding an enzyme enclosed by a diffusion barrier, J. Cell. Comp. Physiol. 46 (1955) 1–27, http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1030460102.
[59] K. Levenberg, A method for the solution of certain non-linear problems in least squares, Q. Appl. Math. 2 (1944) 164–168.
[60] D. Marquardt, An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters, J. Soc. Ind. Appl. Math. 11 (1963) 431–441, http://dx.doi.org/10.1137/0111030.
[61] C.A. Varela, M.E. Baez, E. Agosin, Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a Lysine-overproducing strain of Corynebacterium glutamicum, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 4222–4229, http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.7.4222-4229.2004.
[62] P. Genevaux, P. Bauda, M.S. DuBow, B. Oudega, Identification of Tn10 insertions in the rfaG, rfaP, and galU genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect Escherichia coli adhesion, Arch. Microbiol. 172 (1999) 1–8, http://dx.doi.org/10.1007/s002030050732.
[63] J.F.L. Duval, R.M. Town, H.P. van Leeuwen, Lability of nanoparticulate metal complexes at a macroscopic metal responsive (bio)interface: expression and asymptotic scaling laws, J. Phys. Chem. C 122 (2018) 6052–6065, http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11982.

Christophe Pagnout is currently Associate Professor in the Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux at Lorraine University in Metz, France. His research background includes microbiology, microbial diversity analysis and molecular biology. He is currently involved in projects focusing on the evaluation of microbial toxicity-resistance mechanisms to metals and nanoparticles at various scales of biological organizations.

Romain Present is currently a PhD student in the Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux at Lorraine University in Nancy, France. His PhD research deals with the analysis of the intra- and extracellular biophysicochemical processes that govern the dynamics of metal uptake and the accumulation of metallic contaminants by genetically-modified bacterial microorganisms.

Patrick Billard is currently Associate Professor in the Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux at Lorraine University in Nancy, France. His research interests concern the understanding of metal homeostasis in bacteria, the study of the diversity of microbial communities in contaminated field sites and the development of bacterial biosensors for the evaluation of metals and rare-earth elements bioavailability in complex aquatic media.

Elise Rotureau is currently Researcher from the National Centre for Scientific Research (CNRS) in the Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux at Lorraine University in Nancy, France. Her expertise includes the developments of electrochemical techniques for addressing the dynamics of metal speciation in complex environmental media, the interpretation of the response of these electrochemical sensors, and the developments of metal-sensing bio-matrices with controlled physico-chemical properties.

Jérôme F.L. Duval is currently Research Director from the National Centre for Scientific Research (CNRS) in the Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux at Lorraine University in Nancy, France and leader of the group 'Physical-Chemistry and Reactivity of Surfaces and Interfaces'. His current research interests include the analysis of the reactive transfer dynamics of metallic contaminants and nanoparticles to/in organisms, and the development of AFM-based strategies for assessment of nanoparticle toxicity at the single cell level.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

What Do Luminescent Bacterial Metal-Sensors Probe?

Insights from Confrontation between Experiments and Flux-Based Theory

Christophe Pagnout,[1,2] Romain M. Présent,[3,4] Patrick Billard,[3,4] Elise Rotureau,[3,4] Jérôme F. L. Duval*[,3,4]

[1] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France.
[2] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz F-57070, France.
[3] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F54501, France.
[4] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.

* Corresponding author : Jérôme F.L. Duval (jerome.duval@univ-lorraine.fr)

N.B. Unless otherwise specified, all symbols are defined in the main text. A glossary of symbols together with references are provided at the end of this document.

This document contains :

- 6 Figures (S1-S6),
- 19 Equations (eqs S1-S19),
- 1 Table (Table S1).

SM-1. Extraction of signal time-derivative under steady-state biosensor functioning.

Figure S1 displays an illustrative response of the cadmium-sensitive luminescent reporter strains adopted in this study obtained as a function of time t for different values of the bulk concentration c_{M}^{*} of Cd(II). For each condition tested, the rate of steady-state light production was evaluated as follows. First, luminescence signals were interpolated in the time dimension using cubic spline interpolation procedure.[1] The so-obtained interpolated signal was subsequently derived with respect to time over a fine grid of discretized t values covering the tested time conditions. Then, the time $t = t_{\max}$ corresponding to a maximum value of the derivative was evaluated. This value of the derivative at $t_{\max}$ identifies with the sought rate of steady-state light production, *i.e.* the slope of the tangent line at the inflection point of the original data set (**Figure S1**). This data preprocessing was performed in routine using PTC Mathcad 15 computation environment. The theory reported in §3 of the main text details how this slope of the measured signal at $t_{\max}$ depends on bulk Cd(II) concentration, cell number density and solution ionic strength.

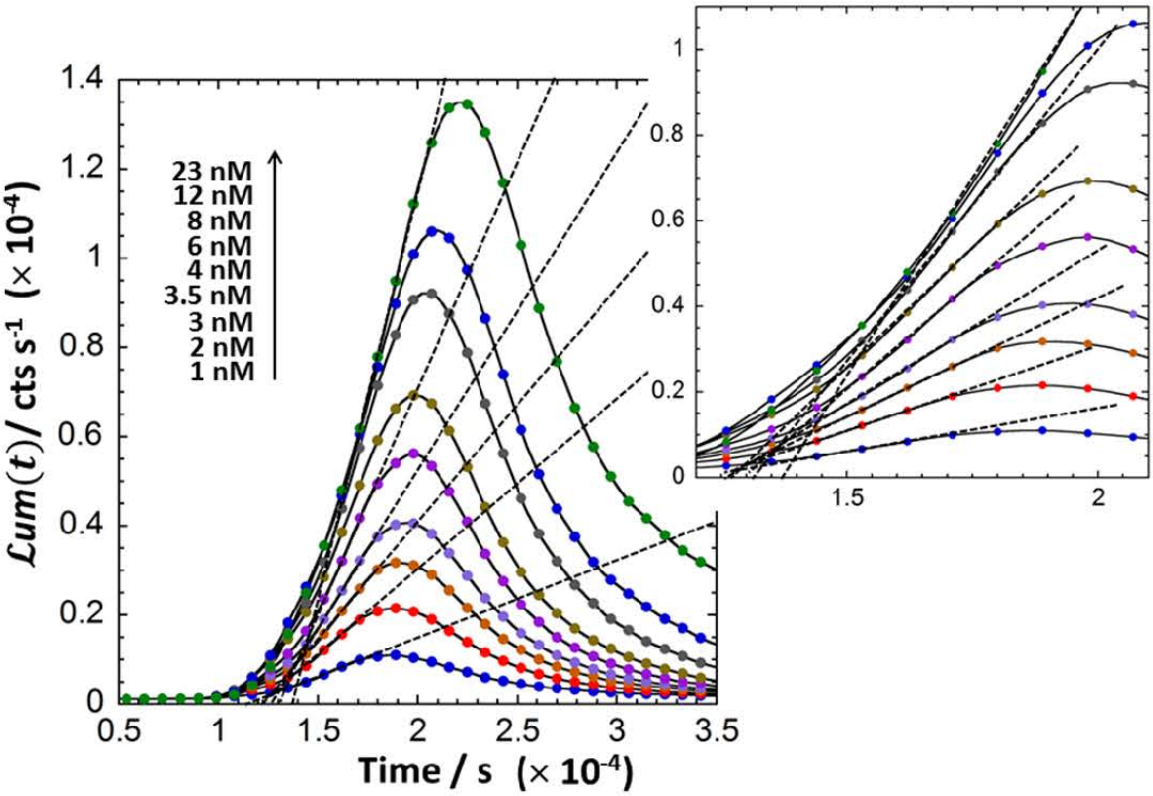


Figure S1. Representative time-dependent luminescence obtained for the bacterial sensors adopted in this work as a function of bulk Cd(II) concentration c_M^* (indicated). The example refers to JW3596-L sensors, OD_{600} = 0.2, solution ionic strength = 10 mM. Points: experimental data. Solid lines: cubic spline interpolation. Dashed lines: tangent lines at the inflection point as derived according to the procedure detailed in SM-1. In inset, a zoom of the data is provided.

SM-2. Electrokinetic measurements and interpretation framework.

The electrophoretic mobility (μ) measurements performed on the bioreporters as a function of solution ionic strength I were collated with approximate theory on soft surface (bio)particle electrokinetics originally developed by Ohshima.[2] According to the latter, μ is provided by the expression

$$\mu = \frac{\rho_o}{\eta \lambda_o^2} + \frac{\varepsilon}{\eta} \frac{\psi^o / \kappa_m + \psi^D / \lambda_o}{1/\kappa_m + 1/\lambda_o} \tag{S1}$$

, where ρ_o represents the effective density of charges carried by the cell soft surface layer (LPS and supporting membrane), κ_m the reciprocal Debye thickness in that layer and λ_o a softness parameter. The quantity $1/\lambda_o$ corresponds to the characteristic penetration length of the electroosmotic flow developed under electrokinetic conditions within the soft surface structure. In eq S1, ψ^o corresponds to the surface potential, *i.e.* the potential at the position corresponding to the location of the outer boundary of the

surface layer, and ψ^{D} the Donnan potential, *i.e.* the electrostatic potential reached within the bulk of that layer. The parameters ψ^{D}, ψ^{o} and κ_{m} all depend on the space charge density ρ_{o} according to the following expressions[2]

$$\psi^{\mathrm{D}} = \frac{RT}{F}\sinh^{-1}\left(\frac{\rho_{\mathrm{o}}}{2FI}\right), \tag{S2}$$

$$\psi^{\mathrm{o}} = \psi^{\mathrm{D}} - \frac{RT}{F}\tanh\left(\frac{F\psi^{\mathrm{D}}}{2RT}\right), \tag{S3}$$

$$\kappa_{\mathrm{m}} = \kappa\left\{\cosh\left(\frac{F\psi^{\mathrm{D}}}{RT}\right)\right\}^{1/2} \tag{S4}$$

, where R is the gas constant, T the absolute temperature and F the Faraday number. Equations S1-S4 are valid at sufficiently large solution ionic strengths I and for moderately to poorly charged biointerfaces in line with the application of the Debye-Hückel approximation for interfacial electrostatics.[2,3] Under conditions where these approximations are not satisfied, the theoretical evaluation of μ requires solving the set of electrohydrodynamic equations for soft (bio)particles with no approximation on particle size and particle electrostatics, as extensively detailed elsewhere.[4–6]

Figure S2A-D reports the dependence of the electrophoretic mobility μ of BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L cells on (5 times diluted nGGM and $NaNO_3$) solution ionic strength I at pH = 6.7. As expected, μ is negative under all tested conditions, which is in line with the sign of the ionogenic charges typically carried by bacterial envelopes at neutral pH.[3,7] In addition, $|\mu|$ systematically decreases with increasing I as a result of charge screening by ions from the medium.[3,4] More interestingly, μ asymptotically tends to a non-zero plateau value at sufficiently large I (inset **Figure S2D**), which is the characteristic electrokinetic signature of soft biointerfaces permeable to ions and water.[2–4] On a quantitative level, experimental data are properly recovered with use of the approximate Ohshima's eqs S1-S4 only at sufficiently large solution ionic strengths ($I > 100$ mM) where the Debye-Hückel approximation and the neglect of double layer polarization effects are legitimate (curves '(a)' in **Figure S2A-C**).[2] In this regime, cell mobility μ is independent of the thickness of the soft surface layer where Donnan electrostatics is established. Least-squares adjustment of the predictions by eqs S1-S4 to experimental data in this salinity range leads to estimation of the volume charge density ρ_{o} (expressed in equivalent concentration ρ_{o}/F of monovalent anionic charges) and of the hydrodynamic penetration length scale $1/\lambda_{\mathrm{o}}$ as detailed in the caption of **Figure S2** for the three strains of interest.

Reconstruction of the dependence of $|\mu|$ over the entire range of I values tested is successfully achieved for the nude JW3596-L strain (**Figure S2C**) by application of the rigorous soft surface electrokinetic (SSE) theory by Duval and Ohshima [4] developed at the non-linear Poisson-Boltzmann level with full integration of double layer polarization (curves '(b)' In **Figure S2A-C**). This formalism, however, still overestimates the magnitude of measured electrophoretic mobility of BW25113-L and JW3601-L cells especially at low ionic strength (10 mM) where electrostatically mediated-extension of the biopolymeric (LPS) soft surface layer may take place as a result of significant repulsion between charges it carries.[4] The account of such a swelling process in SSE theory along the lines detailed elsewhere [4] leads to a full quantitative interpretation of the electrokinetic data collected for LPS-decorated BW25113-L and JW3601-L strains (curves '(c)' in **Figure S2A-B**). Surface layer extension is accompanied by an increase of the friction exerted by the cell envelope on the electroosmotic flow developed under electrokinetic conditions, and it thus leads to a reduction of μ (in absolute value) as compared to the situation where swelling is ignored.[4] In detail, considering a tanh-like radial profile for the density distribution $f(r)$ of soft surface material at the cell surface,[4] the analysis asks for the only adjustment (increase) of the extension α_{H} of the diffuse surface structure protuding from the membrane upon decreasing I [4] (**Figure S2E**). The evaluation of the density profile $f(r)$ obtained at $I = 10$ mM for BW25113-L and JW3601-L cells (inset **Figure S2E**) reveals a surface structure that protrudes *ca.* 4 nm and 2 nm from the outer membrane, respectively. These findings are in remarkable agreement with dimension of the cell surface structure anticipated on the basis of the genetic constructions (and LPS truncation) schemed in **Figure 1C** of the main text.

The successful interpretation of the electrokinetic properties of BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L cells further enables evaluation of the salinity-dependent electric potential ψ_a operative at their respective outer membrane surface. In turn, the dependence of the Boltzmann factor $\beta_a = \exp(-z_{\mathrm{M}} F\psi_a / RT)$ involved in the partitioning of metal ions (with valence z_{M}) at the cell/medium interphase (see theory §3 in the main text) can be evaluated as a function of solution ionic strength *I.* Results are given in **Figure S2F** for Cd(II) and for BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L strains. Altogether, the above electrokinetic analysis evidences that JW3596-L and JW3601-L cells are significantly more charged than WT cells. It further elegantly confirms the presence of protruding soft surface structures with nanometric thickness at the periphery of BW25113-L and (to a lesser extent) JW3601-L cells (**Figure S2E**).

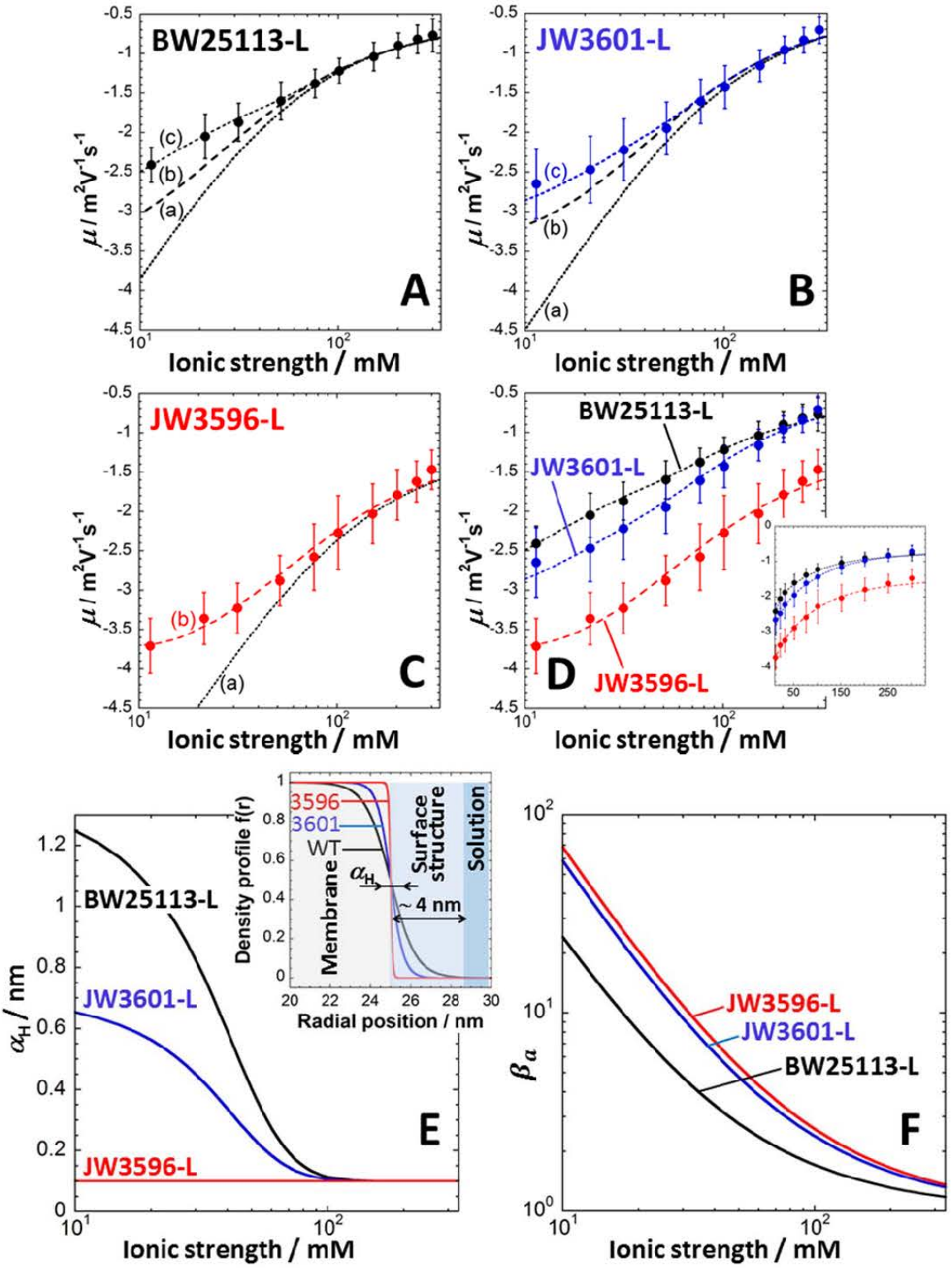


Figure S2. Electrophoretic mobility μ of BW25113-L (A), JW3601-L (B) and JW3596-L (C) *E. coli* strains measured as a function of ionic strength of nGGM-$NaNO_3$ solution at neutral pH = 6.7 (points). Dashed lines correspond to theoretical evaluations according to the approximate Ohshima's eqs S1-S4 (curves (a)), to Duval-Ohshima soft surface electrokinetic theory[4] with step-function (curves (b)), or diffuse (curves (c)) distribution of

biopolymeric material density from the cell membrane to the outer solution. (D) Comparison between electrokinetic profiles measured for the three strains of interest (symbols) with corresponding theoretical reconstructions (dotted lines). Inset: plot of the data according to linear axis in solution ionic strength. Model parameters for curves (a): ρ_o / F = 110 mM (A), 185 mM (B), 205 mM (C), and $1/\lambda_o$ = 0.76 nm (A), 0.51 nm (B), 0.79 nm (C). Model parameters for curves (b): ρ_o / F and $1/\lambda_o$ as before with further adopting an overall soft membrane layer thickness of 25 nm.[8] Model parameters for curves (c): as for curves (b) with the further adjustment of the length scale α_H specified in (E). α_H reflects the extension of the spatial region where there is a gradual transition of the density distribution of peripheral biopolymeric material from the membrane surface to the outer solution. The insert in (E) displays such density distribution profiles at 10 mM (pH = 6.7) for BW25113-L (WT for short), JW3601-L (3601 for short) and JW3596-L (3596 for short) strains. The indicated α_H refers to BW25113-L case. (F) Dependence of the equilibrium Boltzmann factor β_a pertaining to the accumulation of Cd(II) at BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L membrane surface on solution ionic strength. The data are derived from quantitative interpretation of the electrokinetic measurements given in (D).

SM-3. Detailed theoretical developments of the main text.

SM-3.1. Demonstration of the expression defining $J_{c,ss}$ (eq 4 in the main text).

At any time *t* during accumulation of metal ions in the intracellular body, the conditions of rapidly-established (~ ms timescale [9]) steady-state diffusive transport of metal ions M from bulk solution to the cell membrane is written

$$J_M(t) = J_u(t) - J_e(t) \tag{S5}$$

, where J_M (mol m^2 s^{-1}) is the diffusion flux of metal ions from solution to the membrane surface, J_u (mol m^2 s^{-1}) is the metal biouptake flux per unit microorganism surface area, and J_e is the excretion flux of free metal ions from the intracellular body to the outer solution. In agreement with experiments,[10] the uptake of free metal ions M by the microorganisms is assumed to follow a Michaelis-Menten mechanism corresponding to a fast langmuirian adsorption of M at the internalization (or transporter) single type of sites S_u located at the membrane surface, followed by a first-order rate-limiting internalisation step with rate constant k_{int}. Accordingly, the biouptake flux J_u at time *t* is written [9,11–15]

$$J_u(t) / J_u^* = c_M^a(t) / \left(K_M + c_M^a(t)\right) \tag{S6}$$

, where the maximum metal uptake flux J_u^* (mol m^{-2} s^{-1}) is given by $J_u^* = k_{int} K_H K_M$ with K_M (mol m^{-3}) the reciprocal of the metal affinity to sites S_u, K_H (m) the Henry coefficient for adsorption of M to S_u, and c_M^a refers to the concentration of M at the outer membrane surface. The excretion flux J_e at time *t* can be written in the expeditious form $J_e(t) = k_e \phi_u^M(t)$ [16] where k_e (s^{-1}) is the kinetic constant for M excretion and $\phi_u^M(t)$ (mol m^{-2}) is the concentration at time *t* of free M in the intracellular medium

expressed per microorganism unit surface area. The flux J_{M} can be formulated from solution of the applicable steady-state Nernst-Planck equations with account of interfacial cell electrostatics and of the differentiated diffusion coefficients of M inside and outside the peripheral soft surface layer supported by the cell membrane.[11] This differentiation in metal diffusion features is necessary for thick cell surface layers acting as barriers to metal transport from extra- to intra-cellular compartments. Under such conditions, J_{M} is provided by [11]

$$J_{\mathrm{M}}(t) = \overline{f}_{\mathrm{el}} D_{\mathrm{M,out}} \left(c_{\mathrm{M}}^{*} - \beta_a^{-1} c_{\mathrm{M}}^{a}(t) \right) / a \tag{S7}$$

, where $D_{\mathrm{M,out}}$ is the diffusion coefficient of M in the bulk aqueous medium and $\beta_a = \exp\left(-z_{\mathrm{M}} F \psi_a / RT\right)$ refers to the equilibrium Boltzmann factor for metal accumulation at the outer membrane surface where the dimensionless potential $F\psi_a / RT$ applies with F , R and T the Faraday, the gas constant and the temperature, respectively. It is emphasized that β_a depends on solution ionic strength and on the electrostatic properties of the interphase formed between biosensor and outer aqueous solution. This β_a factor is determined from proper theoretical analysis of cell electrokinetic properties as detailed in SM-2. The dimensionless $\overline{f}_{\mathrm{el}}$ in eq S7 involves the surface layer-mediated retardation of M transport to the membrane and the Debye acceleration of the diffusion of positively charged M as a result of the equilibrium electric double layer field at the interphase between solution and negatively-charged microorganisms. The reader is referred to [11,17] for detailed expression of $\overline{f}_{\mathrm{el}}$. In particular, for the practical case of microorganisms whose dimension necessarily complies with the conditions $a >> \kappa^{-1}$ where κ^{-1} is the electric double layer thickness (~ 10 nm to 1 nm for typical salinity levels in fresh waters and oceans, respectively) and $D_{\mathrm{M,in}} / D_{\mathrm{M,out}} \approx 1$ (with $D_{\mathrm{M,in}}$ the metal diffusion coefficient in the soft surface layer), we have $\overline{f}_{\mathrm{el}} \approx 1$. The derivative of the concentration $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}$ of internalized free M with respect to time simply corresponds to the uptake flux $J_{\mathrm{u}}(t)$ corrected for the rate of conversion of intracellular free M due to excretion and complexation with ZntR ligands [9,15]

$$\mathrm{d}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t) / \mathrm{d}t = J_{\mathrm{u}}(t) - k_{\mathrm{e}} \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t) - k_{\mathrm{a}}^{*} \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t) + k_{\mathrm{d}}^{*} \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t) \tag{S8}$$

, where k_{a}^{*} (mol^{-1} m^{3} s^{-1}) and k_{d}^{*} (s^{-1}) are the *effective* kinetic constants pertaining to the conversion of free M *inside the volume* V_{i} of a given cell into ZntR-M complex species, and to the dissociation of these complexes, respectively. Equation S8 tacilty implies that the complexation of M with cytosol compounds other than ZntR is discarded. This approximation is justified on the premise that metal binding affinity of M for ZntR protein is larger than that for the other intracellular ligands. This condition was verified in our

previous study [15] from analysis of Cd(II) biopartitioning at the interface between aqueous solution and genetically-modified bacteria overexpressing another strong protein metal-chelator, the metallothionein. $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}$ in eq S8 refers to the concentration of intracellular ZntR-M complexes per unit microorganism surface area. As extensively detailed elsewhere,[9] k_{a}^{*} and k_{d}^{*} involve both chemical kinetic and intracellular diffusive transport contributions that define chemodynamics of intracellular ZntR-M complexes with account of the confinement of the metal binding sites S within the volume of the ZntR ligands.[18] $\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$ pertains to the molar concentration of intracellular binding sites S smeared-out over the intracellular volume V_i of a given cell. The counterpart of eq S8 for the association/dissociation of metal complexes in the intracellular volume V_i is written [9]

$$\mathrm{d}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)/\mathrm{d}t = k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t) - k_{\mathrm{d}}^{*}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)\,. \tag{S9}$$

For strong intracellular chelators in line with a formation of metal complexes that is much faster than the excretion of internalized free M, the efflux process is inoperative as it is fully kinetically-bypassed by intracellular metal complexation.[15] In turn, it is sufficient to consider eqs S5, S8 and S9 in the limit $k_{\mathrm{e}} \to 0$. After some algebra, the coupling between eqs S5, S6 and S7 in this limit leads to the time-independent expressions for the surface metal concentration c_{M}^{a} and uptake flux J_{u} [11]

$$c_{\mathrm{M}}^{a}/K_{\mathrm{M}} = x^{*}\left\{1 - \frac{1+\beta_a Bn^{-1}}{x^{*}} + \left\{\left[\frac{1+\beta_a Bn^{-1}}{x^{*}} - 1\right]^{2} + \frac{4}{x^{*}}\right\}^{1/2}\right\}/2 \tag{S10}$$

and

$$J_{\mathrm{u}}/J_{\mathrm{u}}^{*} = \frac{x^{*}}{2\beta_a Bn^{-1}}\left(1 + \frac{1+\beta_a Bn^{-1}}{x^{*}}\right)\left\{1 - \left[1 - \frac{4\beta_a Bn^{-1}}{x^{*}}\left(1 + \frac{1+\beta_a Bn^{-1}}{x^{*}}\right)^{-2}\right]^{1/2}\right\} \tag{S11}$$

, respectively, where we introduced the dimensionless bulk metal concentration x^{*}

$$x^{*} = \beta_a c_{\mathrm{M}}^{*}/K_{\mathrm{M}} \tag{S12}$$

, and the reciprocal (dimensionless) bioavailability number Bn^{-1} devoid of electrostatic contribution

$$Bn^{-1} = a k_{\mathrm{int}} K_{\mathrm{H}} / \left(\bar{f}_{\mathrm{el}} D_{\mathrm{M}}\right) \approx a k_{\mathrm{int}} K_{\mathrm{H}} / D_{\mathrm{M}} \tag{S13}$$

, with the second equality being verified for $a >> \kappa^{-1}$ and $D_{\mathrm{M,in}}/D_{\mathrm{M,out}} \approx 1$. Solving of eqs S8-S9 in $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c,M}}(t)$ with adopting the boundaries $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t=0) = \phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{M}}(t=0) = 0$ leads after rearrangements to

$$\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t) = \frac{\bar{K}^{*}}{1+\bar{K}^{*}} J_{\mathrm{u}} t \left\{1 - \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right]\frac{\tau}{t}\right\} \tag{S14}$$

, where J_{u} is defined by eq S11, $\tau = \left[k_{\mathrm{a}}^{*} \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} \left(1 + \bar{K}^{*^{-1}} \right) \right]^{-1}$ (s) is the characteristic timescale for association between intracellular M and ZntR with $\bar{K}^{*} = k_{\mathrm{a}}^{*} \rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} / k_{\mathrm{d}}^{*}$ the (dimensionless) stability constant of the formed complex. Under the time conditions where measurement of the maximal rate of light production is performed (see §2.3 in the main text and SM-1), it is legitimate to assume that the Deborah number defined by t / τ is much larger than unity. Indeed, the limit $t / \tau << 1$ applies to cases where the timescale for measurement of the biosensor response is much shorter than the characteristic timescale for formation of metal complexes, which -according to bioreporter construction- would inherently lead to $\left(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t) / \mathrm{d}t \right) \to 0$. In turn, using eq S14 in the limit $t / \tau >> 1$, the derivative of $\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t)$ with respect to time, or equivalently the sought flux $J_{\mathrm{c,ss}}$, reduces to the simple time-independent expression

$$J_{\mathrm{c,ss}} = \left(\mathrm{d}\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{c}}(t) / \mathrm{d}t \right)_{t/\tau >> 1} = \frac{\bar{K}^{*}}{1 + \bar{K}^{*}} J_{\mathrm{u}} \tag{S15}$$

, which is eq 4 in the main text.

SM-3.2. Treatment in the linear Henry adsorption regime (eqs 6 and 9 in the main text).

In the developments above, it is assumed that all metal ions present in solution are fully bioavailable to the biosensors. This assumption is correct provided that the amount of metal ions adsorbed to the mere (non-transporter) adsorption sites at the cell membrane and at the components of the soft peripheral LPS structure is insignificant compared to the total amount of metal ions. In general, it is however required to correct c_{M}^{*} for such adsorption process that manifests itself as a fast initial decrease in bulk metal concentration.[13,15] Assuming fast adsorption compared to internalization,[9,11–16] equilibrium relationship between surface concentrations of metal ions and of mere adsorption sites can be applied. In the linear Henry adsorption regime valid under the experimental conditions examined in this work (**§SM-5**, **Figure S4**), the surface concentration Γ_{ads} (mol m^{-2}) of metal adsorbed at the biosensor envelope encompassing both the cell membrane and the soft surface layer can be written in the form

$$\Gamma_{\mathrm{ads}} = \beta_{a} \tilde{K}_{\mathrm{H}} c_{\mathrm{M}}^{*} \tag{S16}$$

, where $\tilde{K}_{\mathrm{H}}$ (m) is the intrinsic (*i.e.* devoid of electrostatic contribution) Henry adsorption coefficient of M at the cell envelope defined by $\tilde{K}_{\mathrm{H}} = \sum_{i} \Gamma_{\mathrm{max},i} / \tilde{K}_{\mathrm{M},i}$ with $\Gamma_{\mathrm{max},i}$ the surface concentration of mere adsorption sites of type i and $\tilde{K}_{\mathrm{M},i}$ (mol m^{-3}) the corresponding reciprocal metal affinity constant.[19] For soft peripheral structures with thickness d much smaller than the biosensor radius a (situation met

for the bioreporters adopted in this study), the dimensionless bulk concentration of bioavailable (free) metal ions in solution, denoted as $x_{\mathrm{f}}^{*} = \beta_a c_{\mathrm{M,f}}^{*} / K_{\mathrm{M}}$, is then simply provided by

$$x_{\mathrm{f}}^{*} = x^{*}\left(1 - \beta_a c_{\mathrm{p}} S_a \tilde{K}_{\mathrm{H}}\right) \tag{S17}$$

, which is eq 6 in the main text. In turn, the account of metal adsorption at mere adsorption sites leads to an emission flux of photons that remains determined by eq 8 in the main text after replacing x^{*} in the defining expression of J_{u} (eq S11) by x_{f}^{*}. The limit $x^{*} << 1$ (or, equivalently, $x_{\mathrm{f}}^{*} << 1$ as $x^{*} / x_{\mathrm{f}}^{*} \geq 1$) valid at sufficiently low bulk metal concentrations c_{M}^{*} compared to K_{M} corresponds to practical situations where the coverage of transporter sites by metal ions is so low that eq S11 can be linearized.[11,12] In this linear Henry adsorption regime, Taylor expansions of eqs S10 and S11 corrected for adsorption of M at mere adsorption sites lead to the following expressions for c_{M}^{a} and J_{u}

$$J_{\mathrm{u}} / J_{\mathrm{u}}^{*} = c_{\mathrm{M}}^{a} / K_{\mathrm{M}} = x_{\mathrm{f}}^{*} / \left(1 + \beta_a Bn^{-1}\right). \tag{S18}$$

The emission flux of photons (eq 8 in the main text) then becomes in the dynamic scenario $\alpha J_{\mathrm{c,ss}} / J_{\nu,\mathrm{ss}} << 1$

$$\left(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t) / \mathrm{d}t\right)_{\max} = \frac{\beta_a \bar{K}^{*}\left(1 - \beta_a c_{\mathrm{p}} S_{\mathrm{a}} \tilde{K}_{\mathrm{H}}\right)}{\left(1 + \beta_a Bn^{-1}\right)\left(1 + \bar{K}^{*}\right)} \alpha c_{\mathrm{p}} S_{\mathrm{a}} k_{\mathrm{int}} K_{\mathrm{H}} c_{\mathrm{M}}^{*}. \tag{S19}$$

, which is eq 9 in the main text, applicable in the regime of linear adsorption of M at both mere and transporter adsorption sites.

SM-4. Variation of the parameters $\omega_{\beta_a}^{(1)}$ and $\omega_{c_{\mathrm{p}}}^{(1)}$ with c_{M}^{*}.

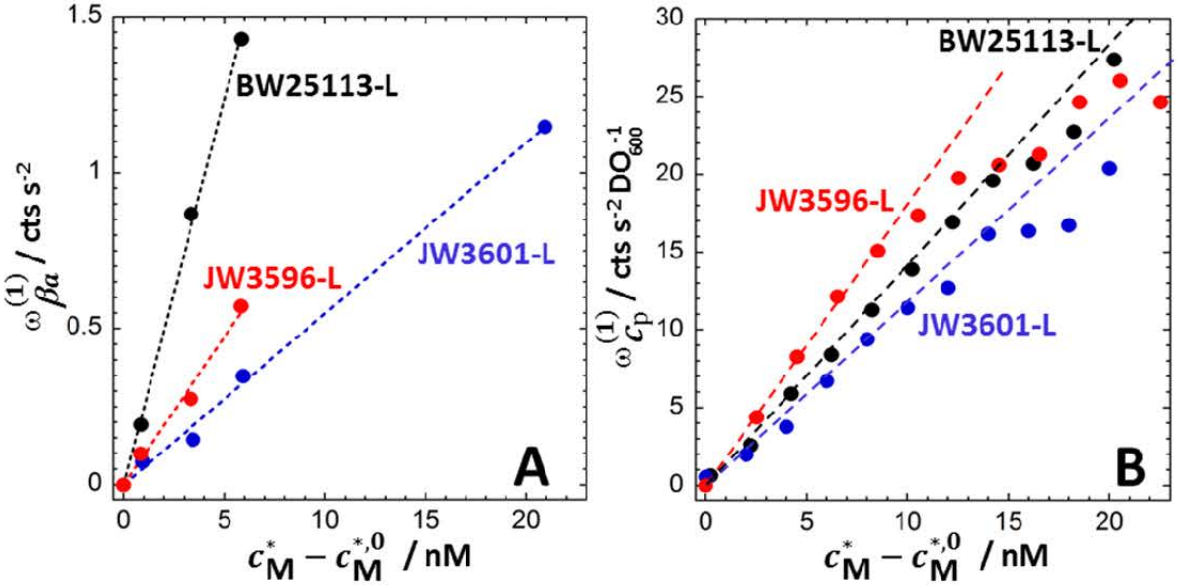


Figure S3. (A) Dependence of the parameter $\omega^{(1)}_{\beta_a}$ on c^*_M as derived from analysis of the data displayed in **Figure 3** using eq 10 in the main text. Dashed lines refer to linear regressions of the data over the relevant regime of c^*_M. (B) Dependence of the parameter $\omega^{(1)}_{c_p}$ (expressed here per unit optical density) on c^*_M as derived from analysis of the data displayed in **Figure 4** using eq 12 in the main text. In (A) and (B), Dashed lines refer to linear regressions of the data over the relevant ranges of c^*_M (termed *regime A* in the main text). Data are plotted as a function of $c^*_M - c^{*,0}_M$ where $c^{*,0}_M$ stands for the minimum bulk concentration in line with a detectable bioluminescence (with $c^{*,0}_M \leq$ 2 nM depending on the physicochemical medium conditions).

SM-5. Cell metal-adsorption features.

Figure S4 shows the adsorption isotherms for Cd(II) on the envelopes of BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L cells as measured by electrochemistry in a 10 mM nGGM solution ionic strength at neutral pH (see §2.4 in the main text). For the sake of completeness, adsorption data are given as a function of free and total bulk metal concentrations in solution ($c^*_{M,f}$ and c^*_M, respectively). Both representations show a linear increase of Γ_{ads} with increasing $c^*_{M,f}$ or c^*_M, which supports the applicability of the linear Henry adsorption regime under the tested conditions and therewith the applicability of eq S16. Using the latter equation, the slope of Γ_{ads} *versus* c^*_M provides the quantity $\beta_a \tilde{K}_H$ for each strain. The further account of the relevant β_a values at 10 mM solution ionic strength (**Figure S2F**) enables evaluation of the intrinsic Henry adsorption coefficient $\tilde{K}_H$, with the result $\tilde{K}_H$ ~ 5.1-5.2 μm for JW3601-L and JW3596-L strains, and $\tilde{K}_H$ ~ 11.6 μm for BW25113-L cells (see **Table 2** in the main text).

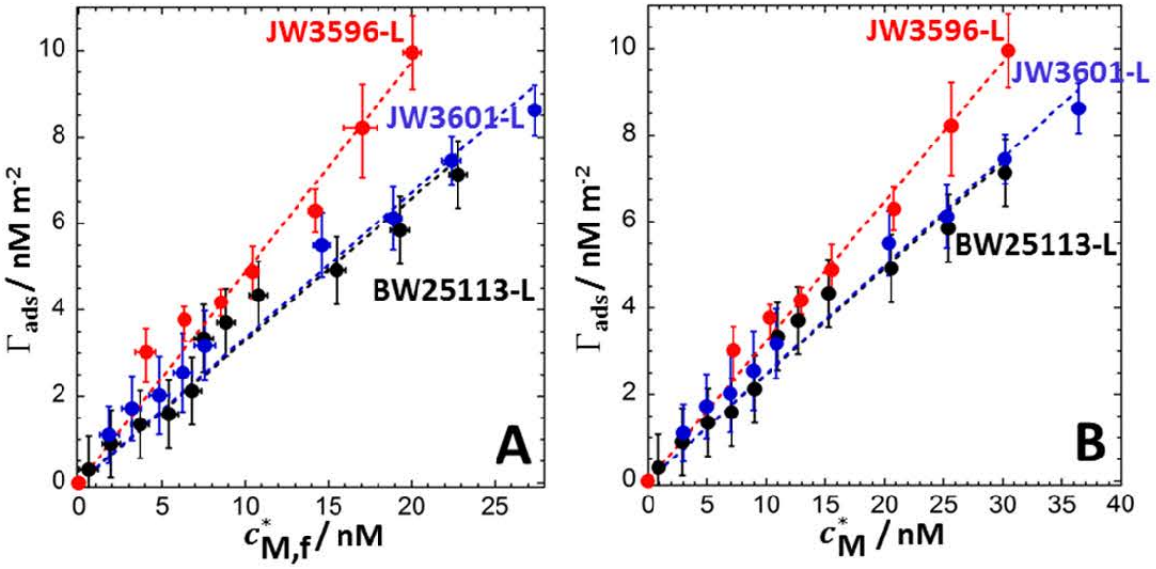
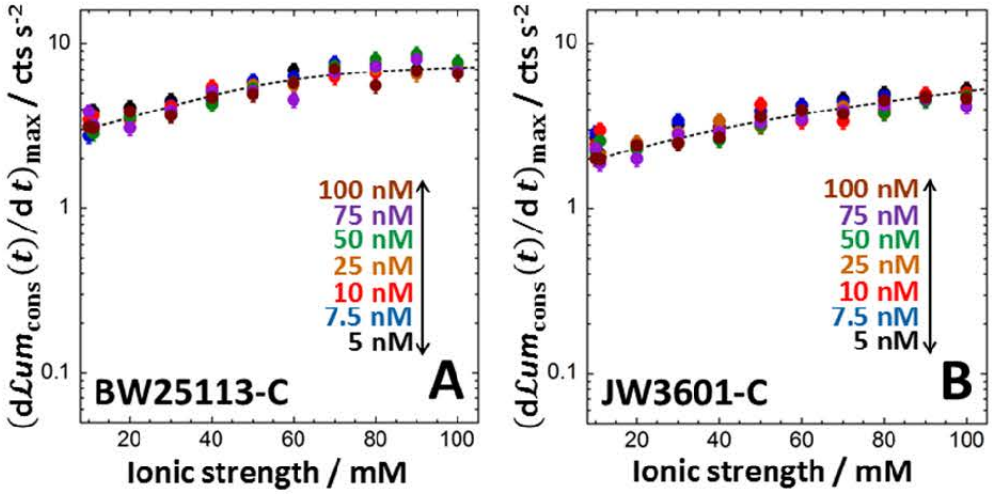


Figure S4. Adsorption isotherms measured by electrochemistry for Cd(II) on BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L cells envelope in 10 mM solution ionic strength at neutral pH. Representation *versus* (A) free and (B) total bulk metal concentrations. Dashed lines refer to linear regression of the data (eq S16).

SM-6. Response of constitutive cells *versus* solution ionic strength and bulk metal concentration



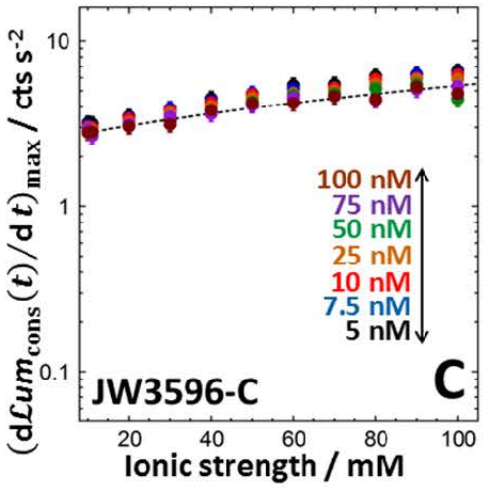
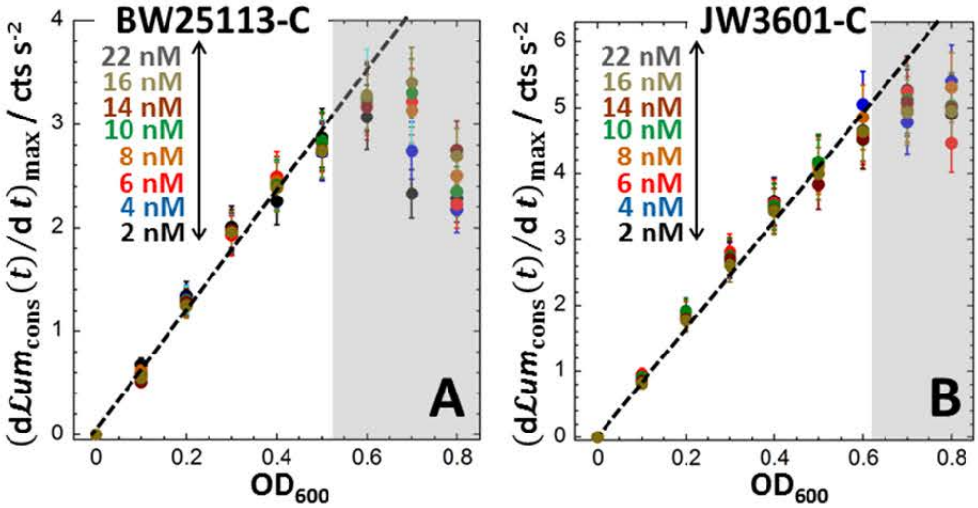


Figure S5. Dependence of $\left(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}_{\mathrm{cons}}(t)/\mathrm{d}t\right)_{\mathrm{max}}$ on solution ionic strength for (constitutive) BW25113-C (A), JW3601-C (B) and JW3596-C (C) biosensors at various bulk metal concentrations c_{M}^{*} (indicated) and OD_{600}=0.2. Dashed curves are guides to the eye. These curves correspond to the solid lines reported in **Figure 3** of the main text prior to scaling.

SM-7. Response of constitutive cells *versus* cell density number and bulk metal concentration.



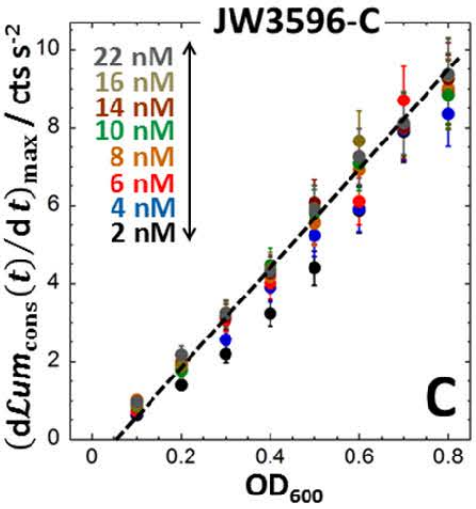


Figure S6. Dependence of $\left(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}_{\mathrm{cons}}(t)/\mathrm{d}t\right)_{\mathrm{max}}$ on cell concentration for (constitutive) BW25113-C (A), JW3601-C (B) and JW3596-C (C) biosensors at various bulk metal concentrations c_{M}^{*} (indicated) in 10 mM solution ionic strength. Dashed lines are linear regressions of the data over the relevant ranges of c_{M}^{*}. The shaded areas in (A) and (B) cover the ranges of c_{M}^{*} where linearity between the time derivative of the constitutive sensor signal and cell concentration is lost (see main text, §4.2, for details).

SM-8. Summary of the parameters used for fitting the data displayed in Figure 5 of the main text on the basis of eqs 5, 6 and 8.

	$\alpha c_{\mathrm{p}} S_{\mathrm{a}} J_{\mathrm{u}}^{*} \frac{\bar{K}^{*}}{1+\bar{K}^{*}}$ (counts s^{-2})	K_{M} (nM)	$\frac{\alpha J_{\mathrm{u}}^{*}}{J_{\nu,\mathrm{ss}}} \frac{\bar{K}^{*}}{1+\bar{K}^{*}}$ (dimensionless)
JW3601-L	4.2-5.9	75 ± 10	≤ 0.40
BW25113-L	9.4-11.1	46 ± 3	0.7-1
JW3596-L	1.9-2.6	27 ± 3	≤ 0.40

Table S1. Values of the parameters derived from analysis of BW25113-L, JW3601-L and JW3596-L responses (**Figure 5**) with changing bulk metal concentration beyond the regime corresponding to a linear biosensor response.

LIST of MAIN SYMBOLS.

a Radius of the intracellular compartment of the microorganisms (*i.e.* with excluding the peripheral soft surface layer) (m)

Bn^{-1} Inverse of the bioavailability (or Bosma) number (dimensionless) devoid of electrostatic contribution

$c_{\mathrm{M}}^{\mathrm{a}}$ Metal concentration at the outer membrane surface (mol m^{-3})

c_{M}^{*} Bulk metal concentration at t (mol m^{-3})

$c_{\mathrm{p}} = N / V_{\mathrm{T}}$ Cell number density in solution (m^{-3})

$\left(\mathrm{d}\mathcal{L}\mathrm{um}(t)/\mathrm{d}t\right)_{\mathrm{max}}$ Steady-state flux of photons emitted by the N bioreporters in solution (counts s^{-2})

$\bar{f}_{\mathrm{el}}$ Electrostatic Debye correction factor for M diffusion to microorganism membrane surface (dimensionless)

I Solution ionic strength (mol m^{-3})

$J_{\mathrm{c,ss}}$ Production flux of ZntR-M complexes expressed per unit microorganism surface area under steady-state light emission conditions (mol m^{-2} s^{-1})

J_{u}^{*} Maximum uptake flux of M (mol m^{-2} s^{-1})

J_{u} Metal uptake flux (mol m^{-2} s^{-1})

J_{e} Metal excretion flux (mol m^{-2} s^{-1})

J_{M} Diffusion flux of metal ions evaluated at the outer membrane surface (mol m^{-2} s^{-1})

$J_{\nu,\mathrm{ss}}$ Time-derivative of the luminescence emitted per unit microorganism surface area and normalised by the cell concentration c_{p} (situation where step (ii) in **Figure 1** governs the rate of light production) (in counts m s^{-2})

$k_{\mathrm{a,d}}^{*}$ Effective kinetic constants for the conversion of free M in the volume V_{i} into M-ZntR complex species (mol^{-1} m^{3} s^{-1}), and for M-ZntR dissociation (s^{-1}) (subscript 'a' and 'd', respectively)

k_{e} Kinetic constant for M excretion (s^{-1})

k_{int} Kinetic constant for metal internalisation (s^{-1})

K_{H} Henry coefficient for the adsorption of M at the internalisation sites $\mathrm{S_u}$ (m)

$\tilde{K}_{\mathrm{H}}$ Henry coefficient for the adsorption of M at mere adsorption sites on the cell envelope (m)

K_{M} Affinity constant of M for the internalisation sites (mol m^{-3})

$\bar{K}^{*} = k_{\mathrm{a}}^{*}\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}} / k_{\mathrm{d}}^{*}$ Stability constant of intracellular M-ZntR complexes (dimensionless)

$\mathcal{L}\mathrm{um}(t)$ Luminescence produced at time t by the ensemble of N metal biosensors (counts s^{-1})

$\mathcal{L}\mathrm{um}_{\mathrm{cons}}(t)$ Luminescence produced by the constitutive counterparts of the metal biosensors at time t

M Stands for free metal ions (valence z_{M})

N Number of whole-cell bioreporters in the medium

$S_{\mathrm{a}} = 4\pi a^{2}$ Cell surface area (m^{2})

$\mathrm{S_u}$ Refers to metal-transporter sites (located at the cell membrane)

S Refers to the metal-binding sites carried by ZntR ligand

t Delay after introduction of metal ions in the solution containing bioreporters (s)

V_{T} Volume of the medium where bioreporters are dispersed (m^{3})

x^{*} Dimensionless reciprocal of the affinity of M for the internalisation sites $\mathrm{S_u}$ ($x^{*} = \beta_a c_{\mathrm{M}}^{*} / K_{\mathrm{M}}$) (equivalently, dimensionless bulk concentration of total metal ions in solution)

x_{f}^{*} Dimensionless bulk concentration of bioavailable (free) metal ions in solution ($x_{\mathrm{f}}^{*} = \beta_a c_{\mathrm{M,f}}^{*} / K_{\mathrm{M}}$)

MAIN GREEK SYMBOLS

α Luminescence produced per unit concentration of ZntR-M complexes over the whole sample volume (in counts s^{-1} mol^{-1} m^{3})

β_a Boltzmann factor applying at the membrane surface (dimensionless)

$\phi_{\mathrm{u}}^{\mathrm{T,M,c}}$ Intracellular total concentration of M (subscript 'T'), intracellular concentrations of free M and M-ZntR complexes (subscripts 'M' and 'c', respectively) (mol m^{-2})

Γ_{ads} Surface concentration of adsorbed metal ions (mol m^{-2})

κ^{-1} Electric double layer thickness (m)

$\rho_{\mathrm{S}}^{V_{\mathrm{i}}}$ Molar concentration of binding sites S smeared-out over the intracellular compartment of an individual cell (mol m^{-3})

τ Characteristic timescale for association between intracellular M and ZntR (s)

REFERENCES.

[1] J.H. Ahlberg, E.N. Nilson, J.L. Walsh, The theory of splines and their applications: mathematics in science and engineering: a series of monographs and textbooks, Academic Press, Elsevier, New-York and London, 1967.

[2] H. Ohshima, Electrophoretic mobility of soft particles, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 103 (1995) 249–255. doi:10.1016/0927-7757(95)03293-M.

[3] J.F.L. Duval, F. Gaboriaud, Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 15 (2010) 184–195. doi:10.1016/j.cocis.2009.12.002.

[4] J.F.L. Duval, H. Ohshima, Electrophoresis of diffuse soft particles, Langmuir. 22 (2006) 3533–3546. doi:10.1021/la0528293.

[5] N. Helfricht, E. Doblhofer, J.F.L. Duval, T. Scheibel, G. Papastavrou, Colloidal Properties of recombinant spider silk protein particles, J. Phys. Chem. C. 120 (2016) 18015–18027. doi:10.1021/acs.jpcc.6b03957.

[6] J.R.S. Martin, I. Bihannic, C. Santos, J.P.S. Farinha, B. Demé, F.A.M. Leermakers, J.P. Pinheiro, E. Rotureau, J.F.L. Duval, Structure of multiresponsive brush-decorated nanoparticles: a combined electrokinetic, DLS, and SANS study, Langmuir. 31 (2015) 4779–4790. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00530.

[7] E. Dague, J. Duval, F. Jorand, F. Thomas, F. Gaboriaud, Probing surface structures of Shewanella spp. by microelectrophoresis, Biophys. J. 90 (2006) 2612–2621. doi:10.1529/biophysj.105.068205.

[8] T.J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The Bacterial cell envelope, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (2010) a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414.

[9] J.F.L. Duval, R.M. Présent, E. Rotureau, Kinetic and thermodynamic determinants of trace metal partitioning at biointerphases: the role of intracellular speciation dynamics, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016) 30415–30435. doi:10.1039/C6CP05717A.

[10] K.J. Wilkinson, J. Buffle, Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems, in: H.P. van Leeuwen, W. Köster (Eds.), Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces, John Wiley & Sons, Ltd, 2004: pp. 445–533. doi:10.1002/0470094044.ch10/summary.

[11] J.F.L. Duval, Dynamics of metal uptake by charged biointerphases: bioavailability and bulk depletion, Phys. Chem. Chem. Phys. 15 (2013) 7873–7888. doi:10.1039/C3CP00002H.

[12] J.F.L. Duval, E. Rotureau, Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases: impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 7401–7416. doi:10.1039/C4CP00210E.

[13] E. Rotureau, P. Billard, J.F.L. Duval, Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal depletion kinetics at various cell concentrations: theory and application, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 990–998. doi:10.1021/es505049f.

[14] J.F.L. Duval, Coupled metal partitioning dynamics and toxicodynamics at biointerfaces: a theory beyond the biotic ligand model framework, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016) 9453–9469. doi:10.1039/C5CP07780J.
[15] R.M. Présent, E. Rotureau, P. Billard, C. Pagnout, B. Sohm, J. Flayac, R. Gley, J. P. Pinheiro, J.F. L. Duval, Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 19 (2017) 29114–29124. doi:10.1039/C7CP05456D.
[16] R. Hajdu, J.P. Pinheiro, J. Galceran, V.I. Slaveykova, Modeling of Cd uptake and efflux kinetics in metal-resistant bacterium Cupriavidus metallidurans, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 4597–4602. doi:10.1021/es100687h.
[17] J.F.L. Duval, H.P. van Leeuwen, Rates of ionic reactions with charged nanoparticles in aqueous media, J. Phys. Chem. A. 116 (2012) 6443–6451. doi:10.1021/jp209488v.
[18] H.P. van Leeuwen, J. Buffle, J.F.L. Duval, R.M. Town, Understanding the extraordinary ionic reactivity of aqueous nanoparticles, Langmuir. 29 (2013) 10297–10302. doi:10.1021/la401955x.
[19] J. Galceran, H.P. van Leeuwen, Dynamics of biouptake processes: the role of transport, adsorption and internalisation, in: H.P. van Leeuwen, W. Köster (Eds.), Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces, John Wiley & Sons, Ltd, 2004: pp. 147–203. doi:10.1002/0470094044.

Conclusion Générale

Les éléments traces métalliques (ETM) sont naturellement présents dans l'environnement du fait qu'ils sont des composants intrinsèques de la croûte terrestre et du monde vivant. En fonction de leur nature ou de leur statut chimique, certains sont indispensables au développement et à la croissance des organismes vivants, tandis que d'autres induisent des effets toxiques. Le relargage croissant dans l'environnement des ETM provenant de l'augmentation de l'activité humaine perturbe les cycles biologiques de ces organismes. Cependant, le lien entre la présence de contaminants métalliques dans l'environnement et la perturbation des organismes vivants est encore mal connu. De ce fait, une meilleure compréhension des interactions entre les espèces métalliques et les organismes vivants est nécessaire. Ces interactions conditionnent la biodisponibilité des métaux, notion dont la définition varie en fonction des champs disciplinaires. Dans ce manuscrit, la biodisponibilité d'un métal envers un organisme est définie comme étant la fraction de métal du milieu d'exposition qui à terme est adsorbée et/ou internalisée par un organisme. La biodisponibilité est fonction du transport des métaux depuis le milieu d'exposition vers la surface biologique, de leur adsorption et de leur internalisation. En fonction des conditions physicochimiques du milieu, des organismes vivants exposés et de leurs réponses biologiques associées, la biodisponibilité des métaux varie. Des études précédentes ont montré que cette biodisponibilité dépend de la dynamique de partition des métaux aux biointerfaces et doit tenir compte notamment des effets électrostatiques entre les métaux et les organismes contenus dans le milieu extracellulaire, des effets de déplétion des métaux par les organismes et des réponses biologiques.

Dans ce contexte, les travaux de recherches théoriques et expérimentaux menés au cours de cette thèse ont porté sur :

- l'extension d'un modèle théorique d'évaluation de la dynamique de partition des métaux aux interfaces en tenant compte d'une complexation intracellulaire des métaux,
- la confrontation de ce modèle théorique avec des données issues d'expérimentations réalisées sur des bactéries chélatrices de métaux dans le compartiment intracellulaire,
- le développement d'une nouvelle approche de détermination de la biodisponibilité des métaux fondée sur l'utilisation de biosenseurs luminescents.

Décrite au paragraphe 1.4 du chapitre 1, cette théorie rationalise la dynamique de partition des métaux aux interfaces biologiques dans les régimes d'équilibre et hors-équilibre. Elle intègre le couplage entre les processus physicochimiques tels que le transport du métal par diffusion conductive depuis le milieu vers la surface membranaire, l'adsorption et l'internalisation du métal à travers la membrane vers le compartiment intracellulaire et l'excrétion du métal vers le milieu extracellulaire, tout en tenant compte de la déplétion du métal dans le milieu d'exposition. A l'occasion du chapitre 3, cette théorie a été étendue afin de tenir compte d'une complexation intracellulaire des métaux. Celle-ci inclut la dimension multi-échelles du système étudié, à savoir de la complexation des métaux sur des sites réactifs répartis dans le volume intracellulaire à une suspension bactérienne exposée aux métaux. Ainsi pour la première fois, des expressions mathématiques établissent un lien entre la dynamique de la distribution des métaux aux interfaces biologiques et la dynamique de complexation intracellulaire des métaux dans le compartiment intracellulaire, en fonction des paramètres physicochimiques qui décrivent les processus impliqués dans l'assimilation des métaux. L'extension de cette théorie tient compte de la

constante de stabilité du complexe métallique intracellulaire formé dont la magnitude impacte la concentration en métal dans le milieu extracellulaire à des temps longs. Elle tient compte aussi d'un second paramètre qui compare les cinétiques de formation de complexe intracellulaire avec la cinétique d'excrétion des métaux et permet d'identifier lequel de ces deux processus contrôle la déplétion des métaux en solution. Dans certains cas particuliers, des expressions analytiques issues de ce formalisme théorique permettent de déterminer (i) la dépendance temporelle des concentrations en métaux à la surface microbienne et en solution et (ii) les concentrations en métaux dans le milieu à l'équilibre. Enfin, ce développement théorique a aussi mis en exergue qu'une formation rapide des complexes métalliques dans le milieu intracellulaire peut générer une "demande" en métal importante et limiter le flux d'internalisation du métal dû à un apport insuffisant du milieu extracellulaire.

Le chapitre 4 confronte l'extension du modèle théorique avec des données expérimentales issues de l'exposition de deux souches bactériennes à une solution de cadmium. L'une de ces deux souches isogéniques comporte de la métallothionéine cytoplasmique (MTc) qui joue le rôle de complexants de métaux. Les données expérimentales ont été obtenues par le suivi cinétique de la déplétion de cadmium par les bactéries dispersées dans une solution métallique. L'interprétation de ces données par le formalisme théorique indique que la déplétion des métaux par la souche qui comporte la MTc est contrôlée par la cinétique de formation du complexe intracellulaire. Elle révèle également que la présence de ces complexants intracellulaires accroît d'un facteur trois le flux d'internalisation des métaux, et résulte d'une "demande" en métal plus forte dans le compartiment intracellulaire. L'augmentation de cette demande en métal se traduit par une augmentation du flux d'internalisation du cadmium, ce qui équivaut à une diminution de la résistance au passage transmembranaire. Bien que cette résistance diminue en présence de MTc, la cinétique d'assimilation des métaux par les deux souches bactériennes étudiées dans ces travaux demeure limitée par le passage à travers la membrane et non par la diffusion du métal dans le milieu. Enfin, la confrontation de ce formalisme théorique avec les cinétiques de déplétion des métaux dans le milieu extracellulaire a permis d'évaluer la constante de stabilité du complexe métallique intracellulaire. Cette évaluation a été confirmée par des mesures indépendantes de constante de stabilité du complexe Cd-MTc réalisées dans un milieu physicochimiquement proche du cytosol contenant de la MTc purifiée.

Le chapitre 5 propose une nouvelle interprétation des signaux lumineux de biosenseurs afin d'évaluer la biodisponibilité d'un métal envers un organisme. Pour ce faire, un formalisme a été développé et relie la cinétique d'émission de photons provenant de l'exposition des biosenseurs, au flux d'internalisation du métal. La production de photons étant déclenchée par la formation d'un complexe métallique intracellulaire, ce formalisme repose sur l'expression du flux de formation d'un complexe intracellulaire et d'un flux d'émission de photons par un complexe enzymatique. Le flux de formation du complexe métallique intracellulaire dépend du flux d'internalisation des métaux et de la constante du complexe intracellulaire. Ce formalisme a été confronté avec succès à des données expérimentales issues de l'exposition de souches bactériennes recouvertes de lipopolysaccharides de surface de différentes tailles à des solutions faiblement complexantes de cadmium dans différentes conditions physicochimiques. L'interprétation des résultats par ce nouveau formalisme permet d'évaluer le paramètre d'affinité du métal pour les sites d'internalisation, le paramètre dit de biodisponibilité, et le coefficient de Henry pour l'adsorption des métaux sur les sites d'adsorption passifs et actifs pour chaque souche testée. Pour ces derniers paramètres, les valeurs des coefficients d'adsorption de Henry ont été confirmées indépendamment par des techniques électroanalytiques de mesure des quantités adsorbées de métaux sur les surfaces bactériennes. Enfin, l'évaluation du paramètre de biodisponibilité corrigé des interactions électrostatiques entre les métaux et la surface biologique a mis en exergue le rôle prépondérant de l'écrantage des charges de surface induit par les conditions physicochimiques du milieu. La constatation d'une plus forte biodisponibilité des métaux pour des forces ioniques décroissantes confirme les limites des modèles thermodynamiques précédemment évoqués.

Perspectives

Ces travaux de recherche ont apporté une meilleure compréhension des processus intracellulaires impliqués dans la dynamique de partition des métaux et ont abouti à une approche nouvelle dans l'évaluation de la biodisponibilité des métaux par les biosenseurs, fondée sur la quantification des flux de métaux aux interfaces. A l'issu de ces travaux de thèse, plusieurs grands axes de développement sont envisagés. Le premier concerne la complexification du milieu d'exposition par l'ajout de vecteurs nanoparticulaires afin de se rapprocher des conditions environnementales. Un deuxième axe porte sur une compréhension plus fine du lien entre la dynamique de partition des métaux dans le milieu intracellulaire et le stress métallique, déclenchant diverses réponses cellulaires. Un troisième et dernier axe propose d'analyser plus finement la formation de complexes métalliques avec des ligands moléculaires fixés sur la biosurface.

Tout d'abord, l'évaluation de la dynamique de partition des métaux par l'approche biosenseurs développée au chapitre 5 a été réalisée dans des conditions simples d'exposition de métaux à une suspension bactérienne dans un milieu faiblement complexant. Ces conditions d'exposition ont permis la mise au point du développement théorique associé à l'extraction des données issues des cinétiques d'émission de photons des biosenseurs. Cependant, elles ne reflètent pas les conditions d'exposition environnementales. C'est pourquoi cette première étape de compréhension des processus aux interfaces par l'approche biosenseur doit être étendue. Un premier axe de recherche consiste à complexifier la solution métallique d'exposition par l'ajout de colloïdes. Des développements théoriques [1] et des travaux expérimentaux initiés au cours de cette thèse seront à poursuivre. Les résultats de ces recherches permettront de déterminer la contribution des phases colloïdales dans le transport global des métaux, c'est-à-dire leur impact sur les flux de diffusion des métaux en fonction des conditions physicochimiques du milieu. Des travaux précédents effectués sur des complexes formés par l'association de nanoparticules avec des molécules organiques ont effectivement mis en évidence le rôle des nanoparticules dans l'augmentation des flux de contaminants vers une surface accumulatrice [2]. Dans un second temps, les conditions d'exposition des bactéries aux métaux pourront être complexifiées par l'ajout de différents ligands nanoparticulaires de propriétés variables (en terme de taille, de caractéristiques électrostatiques, de densité/nombre de sites réactifs et de structure) dans le milieu. Dans ces travaux futurs, des développements théoriques sur les interactions entre nanoparticules et nanoparticules - bactéries en complément des travaux précédents déjà réalisés sur ces sujets ([1]) seront nécessaires.

Le deuxième axe de recherche à développer concerne la compréhension de la chemodynamique intracellulaire des métaux responsable du stress métallique et des effets potentiels observés. La chemodynamique intracellulaire contrôle la réponse des organismes à un stress métallique via l'expression de gènes codant pour des protéines régulatrices des concentrations en métaux adsorbées et/ou internalisées. Comme démontré lors de ces travaux de thèse, la régulation des concentrations dans le compartiment intracellulaire modifie la dynamique de partition des métaux et conséquemment la biodisponibilité des métaux. Ce comportement a déjà été décrit au chapitre 4 par le modèle théorique basé sur l'évaluation des flux de métaux, dans un cas d'exposition de métaux à des bactéries qui comportaient des complexants forts dans le cytoplasme.

Cependant, cette première étude a été conduite dans des conditions particulières d'exposition, et de nombreux verrous propres à la dynamique de régulation des gènes et protéines régulatrices de métaux restent à lever. Le défi scientifique consiste à affiner la corrélation entre la dynamique de partition extracellulaire et intracellulaire des métaux avec la réponse génomique associée en fonction du temps. Pour ce faire, il est nécessaire de développer des techniques de mesure qui permettent d'établir une cartographie fine des variations temporelles des conditions physicochimiques à l'échelle intracellulaire, et de croiser ces résultats avec ceux issus d'analyses transcriptomiques, qui identifient et mesurent l'expression des gènes régulateurs. Ainsi, l'évaluation de la dynamique de partition des métaux dans les compartiments extracellulaires et intracellulaires permettra d'établir un lien direct entre la biodisponibilité d'un métal en solution, les réponses transcriptomiques associées et potentiellement les effets toxiques observés.

Un dernier axe de recherche serait d'identifier de manière précise la nature des complexes métalliques formés par l'association des métaux avec des ligands (spécifiques ou non à un métal donné). D'après la littérature, les ions métalliques s'associent avec des groupes hydroxyles, carboxyles et phosphoryles portés par des lipopolysaccharides de surface, mais aussi (pour les bactéries à Gram négatif) avec des groupes sulphuryles portés par des glycoprotéines, des lipoprotéines et des phospholipides [3]. Il serait donc intéressant de cartographier la répartition des complexes métalliques formés par l'association d'un ion métallique avec un (ou plusieurs) groupe chimique porté par la biomembrane, et ce, pour les différents groupes chimiques présents sur la biosurface. En première approche, il pourrait être intéressant d'analyser les mesures des forces d'interaction issues d'un mapping par AFM d'une surface cellulaire à l'aide d'une pointe fonctionnalisée par un ion métallique.

Références

[1] Duval, J. F. L., Town, R. M. et Van Leeuwen, H. P. « Applicability of the reaction layer principle to nanoparticulate metal complexes at a macroscopic reactive (bio)interface: a theoretical study ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 121.35 (2017), p. 19147–19161.

[2] Zielińska, K., Van Leeuwen, H. P., Thibault, S. et Town, R. M. « Speciation analysis of aqueous nanoparticulate diclofenac complexes by solid-phase microextraction ». In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 28.41 (2012), p. 14672–14680.

[3] Maret, W. et Wedd, A. *Binding , Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells Series Editors :* Royal Society of Chemistry, 2014, p. 911.

Annexes

Structure membranaire des bactéries à Gram positif et négatif

Les microorganismes étudiés dans le cadre de ce travail sont des bactéries, organismes unicellulaires procaryotes [1, 2]. Elles sont composées principalement d'une membrane biologique et d'un milieu intracellulaire appelé cytoplasme dans lequel se trouve un chromosome constitué d'ADN (Acide Désoxyribo-Nucléique), support de l'information génétique du microorganisme. En fonction de leur structure membranaire, les bactéries sont divisées en deux groupes, appelés bactéries à Gram positif et Gram négatif. Cette terminologie est issue d'une méthode datant de la fin du XIXème siècle siècle hasardement trouvée par le Dr. Gram. À la suite d'une maladresse, celui-ci remarqua qu'après avoir été en contact avec du violet de gentiane, du lugol puis de l'éthanol, seulement une partie des bactéries présentes sur un frottis étaient colorées. Il sera compris plus tard que le rinçage par l'alcool élimine la coloration violette uniquement pour des bactéries ayant une paroi cellulaire fine, appelée depuis bactéries à Gram négatif. Depuis, la méthode inclut une dernière coloration rose à la safranine qui permet de révéler les bactéries à Gram négatif [3].

La paroi cellulaire responsable de cette différence de coloration est composée d'une couche épaisse rigide de peptidoglycanes (constitué de polysaccharides et de peptides) qui joue un rôle structurel dans la cellule et la protège de la pression osmotique du cytoplasme. Dans le cas des bactéries à Gram négatif (voir Figure 5.2), la couche de peptidoglycane est plus fine et se trouve dans un espace appelé periplasmique, de par sa position entre deux membranes plasmiques. Ces dernières sont constituées de deux couches de glycérophospholipides, molécules organiques composées d'un glycérol hydrophile et d'une chaîne d'acides gras formant une queue hydrophobe. La répartition des glycérophospholipides en feuillet constitue une barrière physique plus ou moins poreuse pour les ions et molécules du milieu extérieur. Au sein de cette membrane se trouvent des protéines appelées protéines intrinsèques, qui sont en général transmembranaires. D'autres protéines extrinsèques sont fixées à la périphérie de la membrane plasmique. L'ensemble de ces protéines a des fonctions variées. Elles peuvent, par exemple, jouer le rôle de portes d'accès pour l'échange d'ions et de molécules organiques entre la bactérie et le milieu extracellulaire. Comme illustré ci-dessous, il existe 3 systèmes de transport membranaire chez les procaryotes :

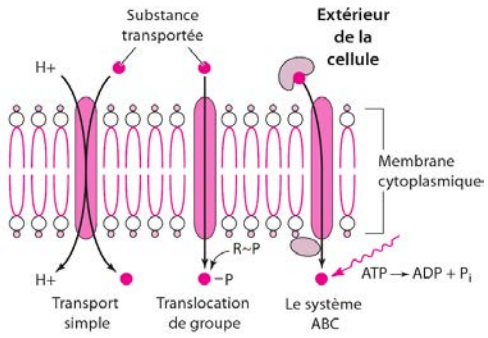


FIGURE 5.1 – Les trois systèmes de transport membranaire chez les procaryotes (d'après [4])

Ces trois processus font intervenir des transporteurs de nature protéique regroupés en trois classes [4] :

- les uniports, qui transportent une molécule dans une seule direction,
- les symports, qui transportent une substance en même temps qu'une autre, dans le même sens,
- les antiports, qui transportent une substance dans une direction et une autre simultanément dans le sens opposé.

Le passage transmembranaire des ions et petites molécules peuvent être soit de type :

- passif, c'est-à-dire que les éléments traversent la membrane plasmique par diffusion simple,
- facilité, c'est-à-dire que le passage transmembranaire par des canaux ou transporteurs protéiques ne nécessite pas d'énergie,
- actif, par l'intermédiaire de pompes ioniques qui nécessite de l'énergie (ATP).

Le passage du Cd(II) depuis l'extracellulaire vers le cytoplasme chez *E.coli* suit probablement la voie d'assimilation d'autres métaux comme par exemple le Zn(II), le Mn(II) et le Co(II) [5] ; à travers la membrane externe via des porines [6] et à travers la membrane cytoplasmique via deux transporteurs :

- la protéine ZupT produite par l'expression du gène zupT (précédemment appelée ygiE). Le mécanisme de transport de cette protéine reste inconnu [7].
- les protéines MntH (perméases) impliquées dans l'internalisation du manganèse dans des conditions où la concentration en Mn(II) dans le milieu est faible.

Certaines protéines (dites ATPases ou pompes) sont consommatrices d'énergie. Elles permettent l'internalisation ou l'excrétion (efflux) d'ions. Elles utilisent l'ATP (Adénosine TriPhosphate, la molécule énergétique commune à toutes les cellules du vivant) pour propulser des ions à travers une membrane contre le gradient de concentration chimique ou le potentiel électrique. Enfin, la membrane plasmique externe est munie de lipopolysaccharides (LPS). Ceux-ci sont composés d'une tête lipidique hydrophobe ancrée dans la biomembrane appelée lipide A, d'un core oligosaccharidique composé de sucres et d'une queue dans le milieu extérieur constituée d'une chaîne polysaccharidique. La présence de LPS contribue à l'intégrité structurelle de la membrane.

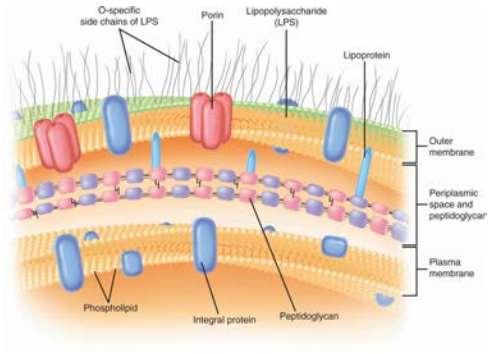


FIGURE 5.2 – Structure de la membrane des bactéries à Gram négatif [8]

Dans le cas des bactéries à Gram positif, seule la membrane plasmique est présente. La paroi cellulaire est en revanche plus épaisse, empêchant ainsi la décoloration du cytosol par l'alcool dans la coloration de Gram. Les bactéries à Gram positif et négatif sont également capables de produire des structures organiques externes pour se protéger contre des attaques extérieures, favoriser leur adhésion sur des surfaces, ou encore se déplacer. Plusieurs types de structure peuvent être rencontrés :

- Pili ou fimbriae : pour des raisons historiques, la terminologie peut varier dans la littérature. Dans ce manuscrit, le choix terminologique est de définir les fimbriae comme les structures protéiques qui permettent de faciliter l'adhésion des bactéries aux surfaces, comme adopté par Ottow [9]. Le terme pili est réservé ici aux structures protéiques dont la fonction est uniquement celle de transfert génétique entre bactéries isogéniques ou isogéniquement proches.
- Flagelle : protubérance hélicoïdale qui tourne sur elle-même pour déplacer la cellule.
- Capsule : couche polysaccharidique plus ou moins épaisse qui recouvre la bactérie et accroît la difficulté pour un macrophage de la phagocyter.
- Spores : sous des conditions défavorables, certaines bactéries peuvent développer des spores au niveau intracellulaire. L'autolyse de la bactérie expose les spores aux conditions du milieu parfois extrêmes. Placées de nouveau dans un milieu favorable, les spores germent pour former de nouvelles bactéries identiques aux bactéries initiales.

Enfin, de manière générale, les bactéries à Gram positif possèdent une forme ronde dite « en coque » (*Streptococcus, Staphylococcus*), tandis que les bactéries à Gram négatif forment des « bâtonnets » appelés bacilles (*Vibrio, Pseudomonas, Escherichia Coli*).

Modifications des structures membranaires et de la composition intracellulaire par mutation génétique et transformation bactérienne

La bactérie modèle utilisée dans ce travail de recherche est *Escherichia coli*. Cette bactérie a été nommée ainsi après sa découverte par le pédiatre Théodore Escherich. Ce dernier a démontré l'implication de cette bactérie dans la physiologie digestive des enfants dans un ouvrage publié en 1886 [10]. En effet, elle fait partie de la flore intestinale humaine et plus largement des mammifères, et se retrouve naturellement dans l'environnement. Sa présence dans les eaux peut être le signal d'une contamination fécale. Certaines souches pathogènes sont d'ailleurs responsables de manifestations cliniques telles que diarrhées, colites et infections urinaires. Des épidémies apparaissent régulièrement dans certaines régions du monde où le traitement des eaux usées est peu développé ou absent. De par ses conditions de culture simples, sa capacité de division cellulaire rapide et le problème historique de santé publique, *E.coli* est largement utilisée en

recherche et décrite dans la littérature. Son type énergétique est aéro-anaérobie facultatif (bactérie qui se développe en présence ou non d'oxygène), peut former des fimbriae, pili et flagelles et s'encapsuler. Enfin, elle est incapable de sporuler.

Le génome d'*E.coli* K-12, une souche parente à la souche d'étude, a été complètement séquencé en 1997 [11]. Ce séquençage a permis l'identification dans l'ordre des nucléotides (polymères qui composent l'ADN, constitués d'une base azotée, d'un pentose et d'un groupe phosphoryle) de l'ensemble de l'ADN bactérien. En 2006, une banque de mutants a été créée à partir de la souche BW25113, une souche parente d'*E.coli* K-12. Chacun de ces mutants correspond à la souche sauvage délétée d'un gène non-essentiel. Ainsi, la banque de souches recense 3985 mutants d'*E.coli* différents. Parmi ces mutants, 4 d'entre eux ont été utilisés dans le cadre cette thèse : BW25113, JW3434, JW3596 et JW3601 (détaillée dans la Figure 2.1.3 du chapitre 2).

La suppression de gènes dans le chromosome bactérien n'est pas la seule voie de modification génétique possible [1, 2]. Certaines bactéries possèdent des brins d'ADN bicaténaires circulaires libres dans le cytoplasme appelés plasmides. Les bactéries sont capables de transférer naturellement ces plasmides à d'autres bactéries identiques ou génétiquement proches par l'intermédiaire des pili sexuels. Une fois les gènes plasmidiques exprimés (c'est-à-dire transcrits par des ARN polymérases en ARN eux-mêmes traduits par des ribosomes pour former des protéines), ceux-ci confèrent à la cellule hôte de nouvelles caractéristiques. Lors de la division cellulaire, les plasmides sont dupliqués dans chaque cellule fille de la même manière que le chromosome bactérien.

Ces transferts entre souches semblables sont d'ailleurs responsables de la propagation de gènes codant pour une résistance à un antibiotique dans les hôpitaux. Dans la recherche en revanche, ces transferts de gènes effectués artificiellement sont d'un fort intérêt pour conférer une caractéristique spécifique à une souche donnée. Sans entrer dans les détails, les plasmides artificiels sont plus petits que leurs homologues naturels (3000 paires de bases pour les plasmides artificiels contre 10 000 paires de bases pour les plasmides naturels). Les plasmides artificiels possèdent une origine de réplication (ou ORI, qui correspond à une séquence d'ADN qui permet l'initiation de la réplication), un gène de résistance à un antibiotique et une région contenant le ou les fragments d'ADN exogènes d'intérêt qui confère à la cellule de nouvelles caractéristiques (cf. Figure 5.3).

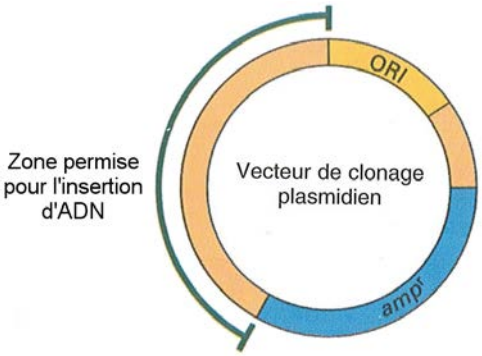


FIGURE 5.3 – Schéma d'un vecteur de clonage plasmidique (d'après [12])

La transformation bactérienne, c'est-à-dire l'insertion artificielle d'un plasmide dans le cytosol bactérien nécessite de rendre la paroi suffisamment poreuse afin de permettre son passage. Les cellules rendues poreuses sont qualifiées de cellules compétentes. Deux méthodes sont classiquement utilisées : l'électroporation (ou électroperméabilisation) et le choc thermique en présence de chlorure de calcium $CaCl_2$. Ces deux méthodes ont pour effet de rendre la membrane cellulaire brièvement perméable, permettant le passage du plasmide. Une fois le plasmide présent dans le cytoplasme, l'expression des gènes qui le compose s'opère de la même manière que l'expression des gènes chromosomiques bactériens. Il suffit ensuite de faire croître les cellules sur un milieu

avec l'antibiotique pour sélectionner les souches transformées.

L'expression des gènes bactériens est modulée en fonction des conditions physicochimiques du milieu d'exposition par des gènes régulateurs (régulations transcriptionnelle). Ces gènes permettent par exemple à la cellule de s'adapter à de nouveaux environnements, comme un changement de milieu nutritif. L'exemple le plus connu est l'opéron *lac*, un groupe de gènes qui codent pour la production d'une enzyme qui dégrade le lactose (voir Figure 5.4). Brièvement, des gènes régulateurs codent pour la synthèse d'une protéine répresseur (ici le répresseur Lac) qui, par affinité, se fixe sur une partie de l'ADN appelée opérateur. Le répresseur ainsi fixé verrouille la poursuite de la lecture de l'ADN par l'ARN polymérase. Le site de fixation du répresseur est suivi par des gènes codant pour la dégradation du lactose en d'autres sucres catalisables par la cellule. L'affinité du répresseur avec le lactose est plus forte qu'avec l'ADN. Ainsi, en présence de lactose, le répresseur est complexé par le métal, et le complexe métallique formé se sépare du brin d'ADN. Par cette séparation, la transcription des gènes codant pour des enzymes dégradant le lactose est "autorisée". Lorsque ce dernier disparaît du milieu, le répresseur reprend sa place sur l'ADN. Cette régulation est une caractéristique intéressante en recherche. Elle permet de contrôler l'expression de certains gènes par l'ajout de composés minéraux ou organiques dans le milieu de culture.

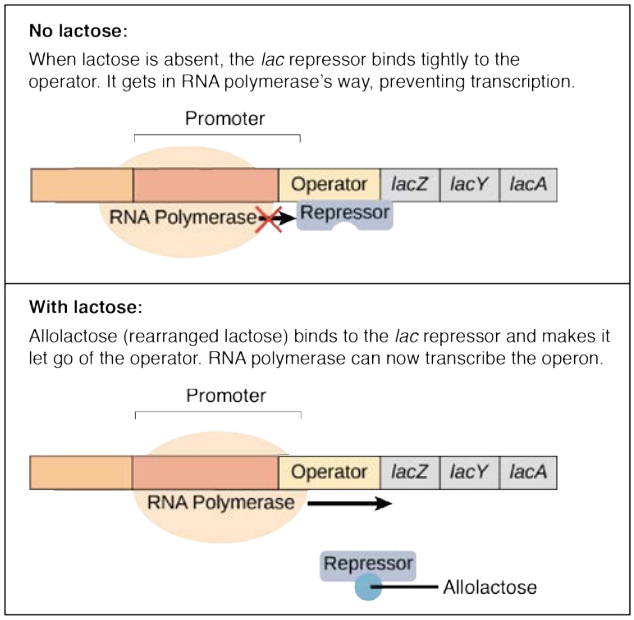


FIGURE 5.4 – Principe de régulation de l'opéron Lac (adapté du site cnx.org) *

Références

[1] LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P. et DARNELL, J. *Biologie moléculaire de la cellule (Troisième Edition)*. 3th. Bruxelles : De Boeck Université, 1997, p. 1344.

[2] NEIDHARDT, F. C. *Escherichia Coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology*. Sous la dir. de NEIDHARDT, F. C., CURTISS III, R., INGRAHAM, J. L., LIN, E. C. C., LOW, K. B., MAGASANIK, B., RFZNIKOPP, W. S., RILEY, M., SCHAECHTER, M. et UMBARGER, H. E. 2nd. Washington, D.C. : ASM Press, 1996, p. 2822.

*. https ://cnx.org/contents/GFy_h8cu@10.8 :drSgdNIj@5/Prokaryotic-Gene-Regulation

[3] Gram, H. C. « Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten ». In : *Forschritte der Medizin* 2 (1884), p. 185–189.

[4] Prieur, D., Geslin, C. et Payan, C. *Manuel de Microbiologie.* Saint-Just-la-Pendue : Dunod, 2015, p. 226.

[5] Horner, T. J., Lee, R. B. Y., Henderson, G. M. et Rickaby, R. E. M. « Nonspecific uptake and homeostasis drive the oceanic cadmium cycle ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.7 (2013), p. 2500–2505.

[6] Waldron, K. J. et Robinson, N. J. « How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? » In : *Nature Reviews Microbiology* 7.1 (2009), p. 25–35.

[7] Grass, G., Grass, G., Franke, S., Franke, S., Taudte, N., Taudte, N., Nies, D. H., Nies, D. H., Kucharski, L. M., Kucharski, L. M., Maguire, M. E., Maguire, M. E., Rensing, C. et Rensing, C. « The metal permease ZupT from Escherichia coli is a transporter with a broad substrate spectrum ». In : *Society* 187.5 (2005), p. 1604–1611.

[8] Willey, J., Sherwood, L. et Woolverton, C. *Prescott, Harley and Klein's Microbiology.* 7th. New York : McGraw-Hill Higher Education, 2008, p. 1088.

[9] Ottow, J. C. G. « Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili ». In : *Annual Review of Microbiology* 29.1 (1975), p. 79–108.

[10] Escherich, T. *Die Darmbakterien des Sauglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung.* Sous la dir. d'Enke. 1st. Stuttgart : Gebrüder Kröner, 1886.

[11] Blattner, F. R., Plunkett III, G., A., B. C., T., P. N., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. et Shao, Y. « The complete genome sequence of escherichia coli K-12 ». In : *Science* 277.5331 (1997), p. 1453–1462.

[12] Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. et Darnell, J. *Biologie Moléculaire de la Cellule (Troisième edition).* De Boeck Université, 1997.

Journal of Electroanalytical Chemistry 752 (2015) 68–74

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Electroanalytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jelechem

Addressing temperature effects on metal chemodynamics studies using stripping electroanalytical techniques. Part 1: Lability of small complexes

Elise Rotureau [a,b,*], Yves Waldvogel [a,b], Romain M. Présent [a,b], Jose Paulo Pinheiro [a,b]

[a] CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France
[b] Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 April 2015
Received in revised form 29 May 2015
Accepted 6 June 2015
Available online 9 June 2015

Keywords:
Dynamic metal speciation
Lability
Scanning stripping chronopotentiometry
Thin mercury film electrode
Temperature effects
Nitrilotriacetic acid (NTA)
Iminodiacetic acid (IDA)

ABSTRACT

Temperature effects on metal speciation dynamics were studied using Stripping Chronopotentiometry at Scanned deposition Potential (SSCP). The temporal and spatial scales of this study are respectively O(10^{-1} s) and O(10^{-5} M), characteristics of the thin mercury film rotating disk, used as working electrode. The lability degree and the association rate constant were evaluated in the temperature interval of 15–40 °C for a significantly non-labile system, cadmium binding by nitrilotriacetic acid, and a quasi-labile system, lead binding by iminodiacetic acid. The results for both systems reveal that the lability of the metal complex significantly increases with temperature. This lability gain results from the thermal augmentation of the association rate constant and the broadening of the diffusion layer thickness.

An evaluation of the metal calibration methodology for SSCP at different temperatures was conducted. It was found that although the variation of diffusion layer thickness can be correctly predicted, changes in standard reduction potential of the metals cannot, thus a calibration must be performed for each temperature studied.

This work constitutes a first step toward the comprehension of the effect of temperature on metal chemodynamics.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Temperature is a key parameter in electrochemical experiments since it directly affects both the thermodynamics and kinetics of the chemical reactions and the transport of the species from the bulk to the electrode surface.

Thermoelectrochemistry is the branch of electrochemistry that focuses on the variation of the temperature as an independent variable. The increase of temperature is obtained by various means, either directly (heating the working electrode) or indirectly (using microwaves to heat the solution) and the experiments can be performed isothermally or non-isothermally [1]. One interesting analytical aspect is that due to the increased mass transport at high-temperatures higher current signals are obtained, hence lower detection limits [2].

Unfortunately there are very few metal chemodynamics or even metal speciation studies at different temperatures although they are certainly significant as demonstrated recently by Hassler et al. [3] in the study of iron speciation in seawater at 4 °C.

For metal speciation studies the common practice is to work at constant temperature, usually by thermostating the working solution, nevertheless there are some situations where this is not possible, for example, during on-site studies in environmental waters ranging from almost freezing conditions in cold climates to warm waters in tropical regions.

In other situations the objective is to examine the effect of temperature, like in the case of the studies of metal interactions with thermoresponsive polymer nanoparticles in which we are especially interested. In recent years there has been an increasing interest in these particles due to their ability to change their properties, such as dimension, structure, interactions, or aggregation state, in response to external stimuli (temperature, pH, pressure, ionic strength, etc.) [4,5].

Chemodynamic modelling requires both the knowledge of thermodynamic equilibrium parameters and the kinetics of the interconversion of metal complex species. Stripping electroanalytical techniques, like Stripping Chronopotentiometry at Scanned deposition Potential (SSCP) are able to provide thermodynamic and

* Corresponding author at: CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.
E-mail address: elise.rotureau@univ-lorraine.fr (E. Rotureau).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.06.010
1572-6657/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

kinetic information at the very low concentration levels of metals in environmental samples [6,7]. Effectively the signal of the stripping electroanalytical techniques is determined by the diffusion and/or kinetic fluxes of the various metal species in solution, both depending on the time-scale of the technique and on the intrinsic characteristics of the complexing species.

The main scientific question of this study concerns the effect of temperature on metal complex lability, especially due to the different influence of temperature on some key parameters. For example the thickness of the reaction layer is affected by the ratio of the diffusion coefficient and the association rate constant of the metal, which both increase with temperature.

Additionally there is a methodological question regarding the possibility of performing the calibration at only one temperature followed by complexation studies at different temperatures. This will depend on our ability to predict both the variations of diffusion coefficients (D_M) and standard potential of reduction and amalgamation of the metal species $E°(M^{n+}/M(Hg))$ at different temperatures.

2. Theory

The theoretical basis for stripping chronopotentiometry (SCP), and its use in SSCP are well established [6,7]. In this work we are using a thin mercury film electrode (TMFE) assembled in a rotating disk electrode that has been thoroughly characterised for SSCP experiments [8]. The principles and key equations relevant for the present work, including the temperature effects, are briefly recalled here.

2.1. Metal ions in absence of ligand: SCP limiting current

In stripping chronopotentiometry the number of moles reduced during the deposition step equals the number of moles reoxidized during the stripping step. The limiting transition time (τ^*_M in s) is given by:

$$\tau^*_M = I^*_d t_d / I_s \quad (1)$$

where t_d (s) is the deposition time, I_s (A) the stripping current and I^*_d (A) the limiting value of the deposition current.

I^*_d which by definition is obtained for deposition potentials (E_d) that are sufficiently negative, so that the concentration of metal ions at the electrode surface approaches zero ($c^0_M \to 0$), is given by:

$$I^*_d = (nFAD_M c^*_M)/\delta_M \quad (2)$$

where c^*_M (mol m^{-3}) is the metal concentration in the bulk solution, A is the electrode surface area (m^2), D_M is the diffusion coefficient of the metal ion (m^2 s^{-1}), n is the number of electrons involved in the reduction, F (C mol^{-1}) is the Faraday constant and δ_M (m) is the diffusion layer thickness. For the rotating disk electrode (RDE) the thickness of the diffusion layer is expressed by [9]:

$$\delta_M = 1.61 D_M^{1/3} \omega^{-1/2} \upsilon^{1/6} \quad (3)$$

where ω (s^{-1}) is the angular speed rotation for the RDE ($\omega = 2\pi v_{rot}$, where v_{rot} is the speed of rotation) and υ is the kinematic viscosity of the solution (m^2 s^{-1}).

The variation of the diffusion coefficient of the metal with temperature follows Stokes–Einstein equation given by [10]:

$$D_M = k_B T / 6\pi\eta r_h \quad (4)$$

where k_B (J K^{-1}) is the Boltzmann constant, r_h (m) is the hydrodynamic radius of the diffusion species, T (K) is the temperature and η (Pa s) is the absolute viscosity of the solution, given in Table 1. The variation of viscosity (absolute and kinematic) with temperature was obtained from NIST recommended values [11].

Table 1
Temperature dependence of the absolute viscosity of water (from Kestin et al. [11]) and the diffusion coefficients for Cd^{2+} and Pb^{2+} ions as determined by Eq. (4) using the reference values (a) and (b) from [30,31], respectively.

Temperature (°C)		15	20	25	30	35	40	45
Absolute viscosity (μPa s)		1138	1002	889	796	718	652	595
Diffusion coefficient ($10^{-9} \times m^2/s$)	Cd	5.56	6.37	7.25[(a)]	8.20	9.23	10.8	11.9
	Pb	6.21	7.13	8.10[(b)]	9.17	10.3	12.0	13.3

The thermal expansion of mercury in the range of temperatures used (288–318 K) is found negligible since it follows the respective variation in density which is −0.54% [12]. Similarly the bulk concentration of metal will be affected by the thermal expansion of water, for which the water density variation is 0.63% (from 288 to 318 K) [13]. Both these volume variations are well below the experimental error of these experiments, so that both the mercury electrode area and volume and the metal concentration are assumed to remain constant within the range of temperatures tested.

From Eqs. (2)–(4) it can be seen that the limiting current depends directly on the temperature through the diffusion coefficient and indirectly through the diffusion layer δ_M dependence on the kinematic viscosity

2.2. Metal ions in absence of ligand: SSCP half-wave potential

The SSCP general equation that describes the relationship between τ and E_d is [7]:

$$\tau = (I^*_d \tau_d / I_s)[1 - \exp(-t_d/\tau_d)] \quad (5)$$

where τ (s) is the transition time, τ_d (s) is the characteristic time constant for the deposition process, which for a TMFE is defined by:

$$\tau_d = V\delta_M / (AD_M\theta) \quad (6)$$

For a TMFE, the volume of the electrode (V in m^3) can be estimated from the charge for reoxidation of the film (Q_{Hg} in C) using Faraday's law and the mercury density:

$$V = M_{w,Hg} Q_{Hg} / 2Fd_{Hg} \quad (7)$$

The parameter θ is the ratio of the surface concentrations ($\theta = c^0_M / c^0_{M^0}$) for the reversible electron transfer reaction, $M^{n+} + ne^- \leftrightarrow M^0$. At a given deposition potential E_d, this parameter is calculated using the following Nernst type equation:

$$\theta = \exp(nF(E_d - E^{0'})/RT) \quad (8)$$

where R (J mol^{-1} K^{-1}) the gas constant and $E^{0'}$ (V) is a parameter related to the standard potential of reduction for the amalgamation reaction relative to the reference electrode used and the ionic strength of the solution. In SSCP the usual potential parameter is the half-wave potential ($E_{1/2}$) which is a function of $E^0_{M/\{M\text{-}Hg\}}$, temperature, ionic strength, diffusion coefficients of the metal amalgamated and in solution, potential of the reference electrode used and the volume of the electrode, V. The standard potential of amalgam electrodes in aqueous solutions, their temperature coefficients and the activity coefficients of metals in mercury have been reviewed by Mussini et al. [14]

The general scheme of a metal amalgam electrode reaction is:

$$M^{z+} + Hg + ze^- = \{M\text{-}Hg\} \quad (9)$$

and for a TMFE, the simplified version of the equation for the metal amalgamation reduction half-wave potential versus the Ag/AgCl reference electrode can be written as:

$$E_{1/2,M} = E^0_{M/\{M\text{-}Hg\}} + \frac{RT}{nF}\ln\frac{f_M}{f_{\{M\text{-}Hg\}}} + \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{D_{\{M\text{-}Hg\}}}{D_M}\right)^{2/3} - E^0_{Ag/AgCl} \quad (10)$$

where f stands for the activity coefficients and D for diffusion coefficients in solution (M) and in the amalgam (M-Hg).

The temperature variation of this equation is quite involved since both the activity coefficients, the diffusion coefficients and the standard potentials are temperature dependent, nevertheless Mussini et al. report a quadratic equation to describe this variation and provide the parameters necessary to perform the computation for several metals.

2.3. Chemodynamics: the general equation for metal ions in presence of complexing ligands

Metal chemodynamics theory and investigation by electrochemical techniques have been recently reviewed [15]. Briefly let us consider the case of an electroactive metal ion, M, that forms an electroinactive complex, ML, with a ligand L,

$$\begin{array}{l} M + L \underset{k_a}{\overset{k_d}{\leftrightarrows}} ML \\ \downarrow\uparrow ne^- \\ M^0 \end{array} \quad (11)$$

where k_a and k_d are the association and dissociation rate constants respectively. The system is dynamic if the rates for the volume reactions are fast on the experimental time scale, t:

$$k_d t,\ k'_a t \gg 1 \quad (12)$$

Under conditions of ligand excess we can define:

$$k'_a = k_a c_L \text{ and } K' = k'_a/k_d = Kc_L \quad (13)$$

where K (L mol^{-1}) is the stability constant of ML ($=c_{ML}/c_M c_L$) and c_L ($=\alpha.c_{L,T}$) is the deprotonated concentration of the ligand species involved in the complexation reaction, where $c_{L,T}$ is the total ligand concentration and α is the deprotonation factor.

During reduction of M, the overall flux of free M towards the electrode surface is governed by the coupled diffusion of M and its various complex species, and the kinetics of their interconversion. The concept of lability quantifies the extent to which the complex species dissociate to release free M on the timescale of their diffusion towards the electrode surface.

The steady-state SSCP curve (Eq. (5)) for dynamic complexes influenced by homogeneous kinetics was deduced on the basis of the Koutecký-Koryta approximation [16]. The parameters I^*_d and τ_d in presence of small ligands, where the complex as the same diffusion coefficient as the free metal, are then given by [17]:

$$I^*_d = nFAc^*_M\left(\frac{\delta_M - \mu}{D_M(1+K')} + \frac{\mu}{D_M}\right)^{-1} \quad (14)$$

$$\tau_d = \frac{V}{A\theta}\left(\frac{\delta_M - \mu}{D_M(1+K')} + \frac{\mu}{D_M}\right) \quad (15)$$

where μ (m) is the thickness of the reaction layer, representing the zone adjacent to the electrode surface in which ML can no longer maintain equilibrium with M. In its simplest form the reaction layer thickness is defined by [18]:

$$\mu = (D_M/k'_a)^{1/2} \quad (16)$$

Thus dividing the limiting current equation in presence of complexes (Eq. (14)) by the limiting current equation in presence of metal alone (Eq. (2)) yields an equation depending on K' and μ for non-labile complexes and K' for labile complexes.

The variation in half-wave potential in presence and absence of complexing ligands ($\Delta E_{d,1/2}$) is determined by the stability of the complexes:

$$\Delta E_{d,1/2} = (RT/nF)[-\ln(1+K') - \ln(\tau^*_{M+L}/\tau^*_M)] \quad (17)$$

where τ^*_{M+L} (s) is the τ^* measured in the presence of ligand. The complex stability constant, K, is obtained from Eq. (17), the mass balance for the metal and the deprotonated concentration of ligand ($\alpha.c_{L,T}$), in all dynamic situations as long as the system remains fully electrochemically reversible.

2.4. Lability criteria

The lability degree ξ is defined as the ratio of the limiting current for dynamic complexes (which is the experimentally measured current, I^*_d), I_{dyn}, and the current for the same conditions assuming that all complexes are labile, I_{lab} (i.e. computed using the experimental parameters of I_{dyn} and imposing in Eq. (14) a value of μ of zero.) both corrected for the free metal contribution, I_{free}, as [19]:

$$\xi = \frac{I_{dyn} - I_{free}}{I_{lab} - I_{free}} \quad (18)$$

This lability degree ranges from near 0 for non-labile systems to 1 for fully labile behaviour and will be strongly dependent on temperature, through both the diffusion coefficients and the rate constants. The temperature effects on lability can be studied using SSCP in non-labile systems.

3. Material and methods

3.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with ultrapure water (MilliQ). Pb(II) and Cd(II) solutions were obtained from dilution of a certified standard solution (Fluka). The ionic strength is set with $NaNO_3$ (Fluka, trace select). Diluted HNO_3 or NaOH solutions (Merck suprapure) were used to adjust the pH. The buffers MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid from Sigma) and MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid from Sigma) were prepared from the solids. Stock solutions of the ligands NTA (Nitrilotriacetic acid from Sigma–Aldrich, >99%) and IDA (Iminodiacetic acid from Fluka, >98%), were prepared from the solids.

3.2. Apparatus

An Ecochemie Autolab type III potentiostat controlled by GPES 4.9 software (Ecochemie, The Netherlands) was used in conjunction with a Metrohm 663VA stand. The auxiliary electrode was a glassy carbon rod and the reference electrode was an Ag/AgCl electrode. The working electrode was a thin mercury film electrode (TMFE) plated onto a rotating glassy carbon (GC) disk of 2 mm diameter (Metrohm). The preparation of TMFE was repeated daily for each set of experiments. GC electrode was conditioned with a polishing and electrochemical pre-treatment according to the reported cleaning procedure [20]. The thin mercury film was plated on the GC electrode ex situ with a 0.48 mM mercury (II) nitrate in acidic medium (HNO_3 0.75 mM, pH 1.9) by electrodeposition at −1.3 V for 240 s and a rotation rate of 1000 rpm. After experiments, the TMFE was cleaned by successive mercury reoxydations in a 80 mM thiocyanate ammonium solution buffered with ammonium acetate (pH 3.4).

3.3. Experimental protocol

For the temperature control, a disposable polystyrene cell is placed in a double-walled container relied to refrigerated-heating circulator. The temperature of the solution is set from 15 to 45 °C with an accuracy of ±0.1 °C.

The experimental protocol for calibration measurement at different temperature consists of preparing a solution made up from 18 ml of pure water, 10 µl of 0.1 M HNO_3 and the appropriate amount of 1 M $NaNO_3$ to fix the ionic strength at 100 mM and leaving the solution under nitrogen bubbling during a few minutes to remove oxygen; a nitrogen blanket is maintained between measurements. The metal is then added in the form of $Pb(NO_3)_2$ or $Cd(NO_3)_2$. The SSCP calibrations are performed at pH lower than 4 so as to obtain the metal predominantly in its free form.

For the Cd-NTA and the Pb-IDA analysis, the experiments are performed as follows. First, the metal calibration is achieved at a fixed temperature, and then a given quantity of ligand solution is added to the solution, together with 200 µL of 0.1 M of buffer solution *i.e.*, MOPS (pH 8) or MES (pH 6.5), respectively. A sufficient quantity of NaOH is then added to fix the pH at 8 for Cd/NTA solution and 6.5 for Pb/IDA solution. SSCP experiments are then performed in the presence of the ligand in solution.

The SCP experimental parameters are as follows: (i) the deposition step is carried out at the specified deposition potential E_d for a time, t_d 45 s for Pb and 90 s for Cd, using a rotation rate of 1500 rpm (ii) a stripping current, I_s of 3 µA for Pb and 2 µA for Cd is applied until the potential reaches a value well past the reoxidation transition plateau. A series of SCP measurements over a range of deposition potentials, E_d, yields the full SSCP waves that are essential in the basic kinetic analysis (see theoretical section).

4. Results and discussion

4.1. Evaluation of the metal calibration methodology

As the temperature variations affect the calibration procedures, these features need to be evaluated carefully before we proceed to study complexation dynamics.

SSCP experiments with metal alone, also called SSCP calibrations, are used to determine three parameters: the effective electrode area (A), the half-wave potential for the metal ($E_{1/2,M}$) and τ^*_M. Within the studies regularly performed using SSCP, there are different methodologies currently employed. When performing titrations with ligand and/or metal concentration variation, at fixed pH, ionic strength and temperature, the calibrations are usually made under the same conditions as those for the titration. In studies with pH variation, the calibrations are done at low pH and the results extrapolated to different pH values [21]. On the other hand for studies at different ionic strengths (constant pH and temperature) it is necessary to perform a calibration per ionic strength [22].

The first parameter obtained from the calibration is the effective electrode area. From a theoretical point of view the thin film electrode area should be equal to the geometrical area of the electrode; nevertheless these electrodes are not truly a film but rather an ensemble of mercury microdroplets. The effective area is thus determined from Eqs. (2)–(4) providing that the metal concentration is rigorously known.

When the temperature changes it can be seen that the limiting current (Eq. (2)) will also vary through the temperature dependence of the diffusion coefficient (Eq. (4)) and the kinematic viscosity dependence of the thickness of the diffusion layer δ_M (Eq. (3)).

In our work the electrode area should remain constant since the thermal expansion of mercury is negligible in this range of temperatures. Fig. 1 shows that for both Cd^{2+} and Pb^{2+} ions the computed

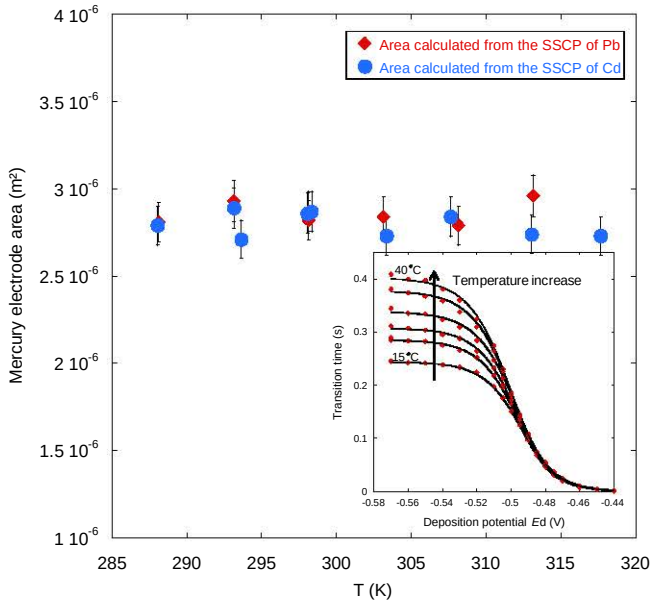


Fig. 1. Calculated area of the thin film mercury electrode as a function of the temperature. Each area is determined from the plateau value of the SSCP wave for the Pb and Cd solutions and the diffusion coefficient of the metals (see Eq. (2)). The diffusion coefficients of the metal ions are summarised in the Table 1. The inset shows examples of SSCP experimental points and simulated curves (plain lines) obtained for Pb solution (5×10^{-7} M) and performed at different temperatures at pH = 4 and an ionic strength of 100 mM $NaNO_3$.

effective area is constant within the experimental error for the temperature range investigated. This effective area was obtained using Eq. (2) with the values of the diffusion coefficient (Table 1) and adjusting the thickness of the diffusion layer δ_M for the respective kinematic viscosity at each temperature (Table 1). Thus for purposes of calibration the effective area, the limiting current (*i.e.* the plateau value of the SSCP curve) can be measured at a given temperature and extrapolated to other temperatures of interest, providing that both the kinematic viscosity and the diffusion coefficient are corrected for each temperature.

For the case of interest the influence of temperature in the potential shift variation, $E_{1/2,M}$ is comprised in Eq. (10). Still the logarithmic nature of the equation and the number of parameters involved imply that the estimated values are affected by a large error. Then again the computation of $E_{1/2,M}$ (Eq. (10)) needs an accurate determination of the mercury electrode volume, V, for which the reoxidation charge measure normally used is insufficiently precise. Thus, for this type of electrode an absolute value of $E^0_{M/M\text{-}Hg}$ is quite difficult to obtain with a good accuracy, consequently it is necessary to calibrate the system for each individual temperature.

4.2. Thermodynamic parameters for the Cd(II)-nitrilotriacetate and Pb(II)-iminodiacetate systems

In this section, we seek to evaluate the robustness of the stripping techniques for the investigation of the temperature dependence of the metal stability constant in presence of small ligands. In the first place, the K parameter describing metal complexation are investigated in the temperature range of 15–40 °C. Fig. 2 depicts the evolution with temperature of the stability constant (log K) of the cadmium complex species in presence of NTA. Values of K are calculated according to the Eq. (17) with $\Delta E_{d,1/2}$ and τ^*_{M+L}/τ^*_M determined from the analysis of the SSCP curves. On the basis of the van't Hoff relationship ($\frac{d\ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}$ with ΔH^0 being

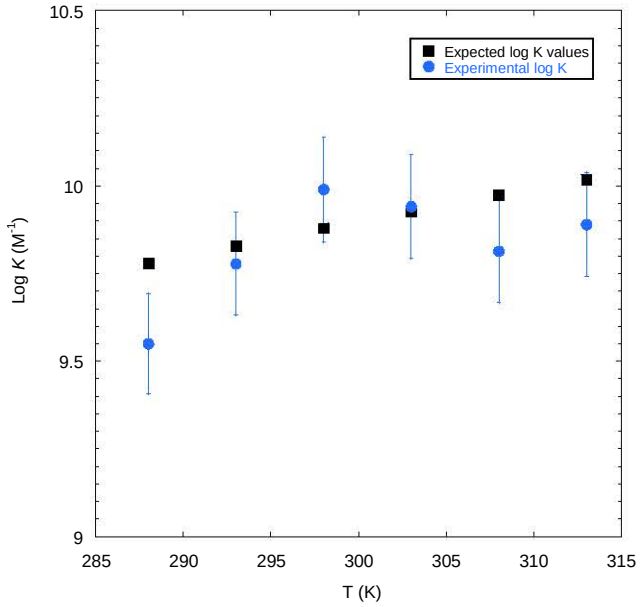


Fig. 2. Estimated log$K$ values corresponding to the formation of the complex Cd with NTA as a function of the temperature. The experimental values are compared to the van't Hoff equation. The total Cd concentration is 2×10^{-6} M and NTA is set to 10^{-5} M, the ionic strength is fixed to 100 mM $NaNO_3$ and the pH to 8.

the standard enthalpy of reaction), the expected temperature dependence of the stability constant is also reported. These data are obtained by using the stability constant at 20 °C (log$K$ = 9.83 at 0.1 M ionic strength) and the enthalpy of the formation of a 1:1 complex $\Delta H^0 = -3.97$ kcal/mol collected from the literature [23]. The results presented in Fig. 2, demonstrate that SSCP results are in good agreement with the theoretical prediction. For Pb-IDA (not shown here), there is also a good consistency between the experimental log$K$ value of 7.8 ± 0.1 at 20 °C and the literature value of 7.45 (at 20 °C, in 0.1 M KNO_3) [24]. Nevertheless, we note that since the experimental error is of the same order of magnitude as the expected variation of the log$K$ in the range of temperature 15–40 °C, SSCP technique is not sufficiently precise to provide a proper evaluation of the temperature dependence of the stability constant.

4.3. Dynamic metal complexes: Cd(II)-nitrilotriacetate and Pb(II)-iminodiacetate

4.3.1. Temperature effects on the lability criteria

To tackle the temperature effect on the lability of a metal complex system, we will consider in this study the simple case of the metal binding with a small molecular ligand where $D_M \cong D_{ML}$. In such situation, the metal complex formation is solely controlled by the chemical kinetics at the complexing sites.

The values of the lability degree ξ were experimentally determined (Eq. (18)) for the Cd binding with NTA and the Pb binding with IDA (Fig. 3(a) and (b)). As expected [25], the Cd-NTA system shows a non-labile behaviour considering the experimental degree of lability lower than 0.1 whereas the Pb-IDA complex displays a quasi-labile behaviour with ξ values ranging from 0.6 to 0.8. The figures reveal that, for both Cd and Pb species, the lability degree increases with temperature, particularly significant for Cd complexes with NTA from 15 to 40 °C (3-fold increase).

At first this result might appear counterintuitive due to the increase in the stability constant, K with temperature T (see Fig. 2) but then again the lability degree is a comparison between currents, i.e. fluxes, thus dependent also on the kinetic and

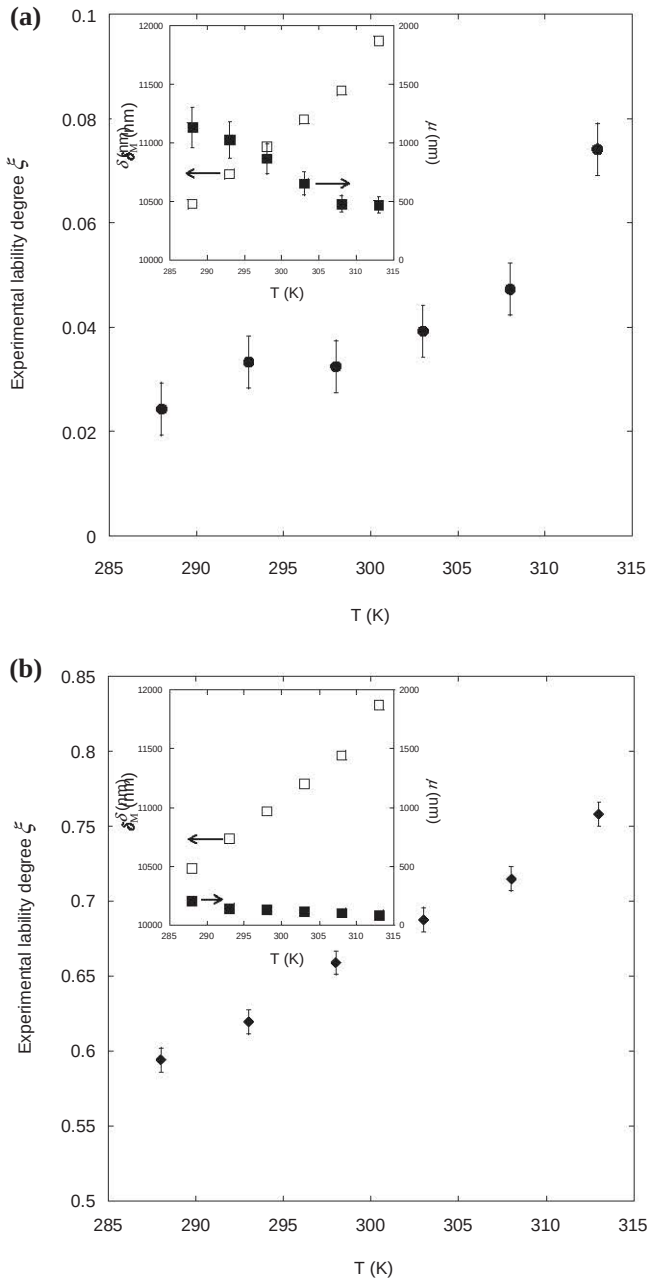


Fig. 3. Variation of the experimental lability criteria ξ as a function of the temperature for (a) Cd-NTA and (b) Pb-IDA systems. The ionic strength is fixed to 100 mM $NaNO_3$ and the pH to 8 for Cd and 6 for the Pb solutions. The inset shows the mean diffusion layer thickness δ_M (open squares) and the reaction layer μ (black squares) for each temperature.

transport properties, namely the thickness of the reaction layer, (μ, experimental value from Eq. (14)) and diffusion layer, (δ_M obtained from Eqs. (3) and (4)). From the insets of Fig. 3 it is evident that increasing the temperature provokes a significant increase of δ_M of *ca.* 1500 nm, while simultaneously μ becomes smaller due to the increase of the association rate constant (Eq. (16)).

From Eq. (14) it can be seen that a fully labile system occurs when μ is much smaller than δ_M. Therefore the kinetic and transport properties variation with temperature (decreasing μ and increasing δ_M) clearly overcomes the effect of the stability constant increase.

4.3.2. Variation of k_a with temperature

The change of the association rate constant, $\log k_a$ (computed using Eq. (16) and the experimental value of μ) with the temperature for the Cd-NTA and the Pb-IDA systems is depicted in Fig. 4. For these type of ligands the exact determination of k_a is difficult due to the influence of the protonated forms of the ligand in the overall metal complexation kinetics as explained by Town et al. [26] The different possible reactive pathways imply that in our study the estimated k_a is an effective rate constant weighted by the respective kinetic rate formation of the various complex species. For the outer-sphere complex formation with the Cd^{2+} ions at pH 8, two possible routes can be considered with the formation of $\{CdNTA\}^-$ and {CdHNTA} species. Therefore, the experimental values should be compared to the calculated association rate constant accounting for the dehydration rate constant k_w from [27] and the parameter $z_M z_L$ *i.e.* the product of the effective charge of the metal and that of the ligand, equals to −6 or −4. For the same reasons, the theoretical association rate constant are reported for the Pb-IDA system with $z_M z_L = -4$ and −2 corresponding to the formation of the outer-sphere complexes of {PbIDA} and $\{PbHIDA\}^+$, respectively. For the two studied systems, the experimental values of k_a at 298 K are comprised between the two theoretical values, underlying the simultaneous formation of the deprotonated and protonated outer-sphere complexes. To understand the temperature dependence of the association constant kinetics, it is necessary to account for the Eigen-Fuoss mechanism describing the metal complex formation. Considering that the stability constant of the outer-sphere complex K_{os} is mainly dependent of the charge of the reacting species and the ionic strength of the medium, this parameter is not significantly affected by the variation of temperature, at least for that probed in our study. Roughly half of the experimentally observed increase of k_a results from the changes in deprotonation ratio of the ligands (α) with temperature while the rest likely originates from the variation in the dehydration rate constant k_w. However, to our best knowledge, there are no literature reports on the k_w values as a function of the temperature. According to our results, we hypothesis that the observed increase in k_w *i.e.* the release of the water molecule from the inner coordination shell is facilitated at higher temperature.

Although the computation of the dissociation rate constant, k_d, is possible using the experimental K' and k_a nevertheless the error associated with the obtained values is too large to allow a meaningful discussion. We can observe that the parameter K increases less with temperature as compared with k_a indicating that k_d should also be increasing with temperature.

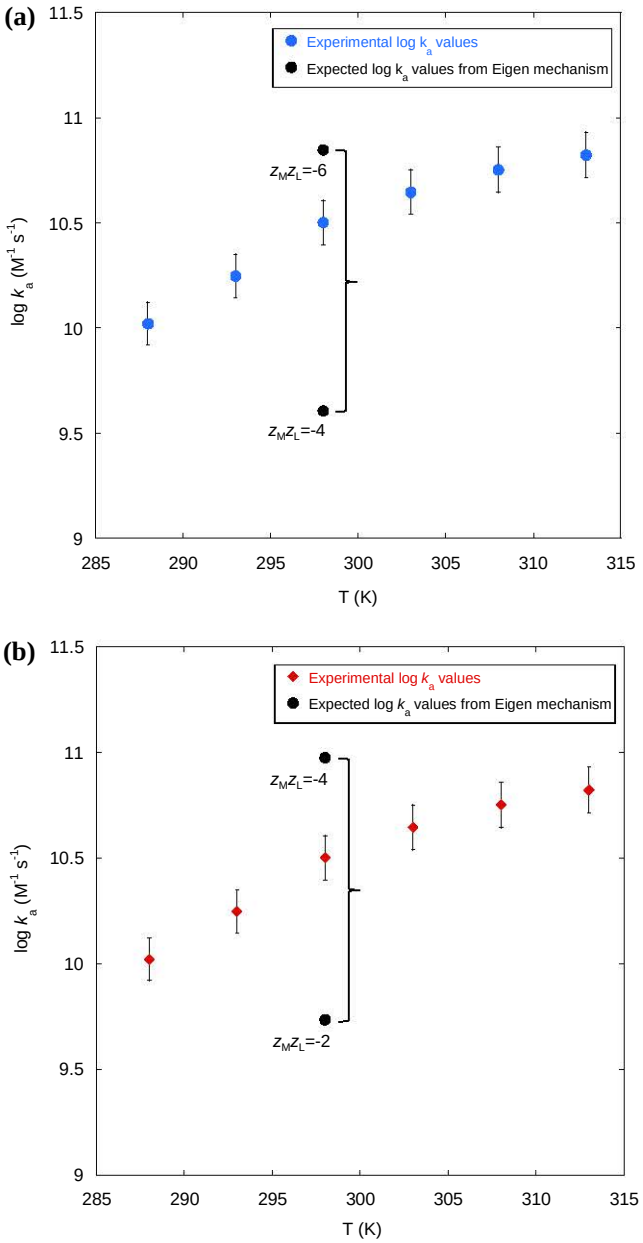


Fig. 4. Experimental values of the association rate constant of the complex formation as a function of the temperature for (a) Cd-NTA and (b) Pb-IDA systems. For the Cd-NTA solution, the total Cd concentration is 2×10^{-6} M and NTA is set to 10^{-5} M, the ionic strength is fixed to 100 mM $NaNO_3$, the pH to 8. For the Pb-IDA solution, the total Pb concentration is 5×10^{-7} M and the IDA concentration is set to 2.6×10^{-3} M, the ionic strength is fixed to 100 mM $NaNO_3$, the pH to 6.

5. Conclusions

The experimental methodology used for the SSCP calibrations was investigated and it was found that for thin mercury film electrodes, it is necessary to calibrate the system for each individual temperature due to the difficulties to predict the shift in the standard potential $E^0_{M/M\text{-}Hg}$ caused by the temperature change.

This study demonstrates that increasing the temperature induces a significant increase of lability of the small metal complex species. This lability variation results from two concomitant processes: (i) the expansion of the thickness of the diffusion layer, due to the increase of diffusion coefficients and decrease of solution viscosity with temperature (ii) the decrease of the reaction layer thickness arising from the augmentation of the association rate constant.

With the small complexes studied here the association rate constant follows a simple Eigen mechanism, while complexation of metal with colloidal ligands generally results from the coupling of the diffusive transport of free-metal ions M and the kinetics of ML complex formation/dissociation within the reactive component of the particle. The kinetic and the mass transport contributions in the association step generally depend on the electrostatic potential, the size, the hydrodynamic and complexation properties of the colloidal dispersions [28,29].

Therefore studying temperature effects on metal binding with colloidal ligands is an interesting challenge that might reveal quite a different behaviour compared to the small complexes.

References

[1] P. Gründler, A. Kirbs, L. Dunsch, Modern thermoelectrochemistry, ChemPhysChem 10 (2009) 1722–1746, http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200900254.

[2] G.G. Wildgoose, D. Giovanelli, N.S. Lawrence, R.G. Compton, High-temperature electrochemistry: a review, Electroanalysis 16 (2004) 421–433, http://dx.doi.org/10.1002/elan.200302875.

[3] C.S. Hassler, F.-E. Legiret, E.C.V. Butler, Measurement of iron chemical speciation in seawater at 4 °C: the use of competitive ligand exchange–adsorptive cathodic stripping voltammetry, Mar. Chem. 149 (2013) 63–73, http://dx.doi.org/10.1016/j.marchem.2012.12.007.
[4] M. Motornov, Y. Roiter, I. Tokarev, S. Minko, Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems, Prog. Polym. Sci. 35 (2010) 174–211, http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.10.004.
[5] J.P. Pinheiro, L. Moura, R. Fokkink, J.P.S. Farinha, Preparation and characterization of low dispersity anionic multiresponsive core–shell polymer nanoparticles, Langmuir 28 (2012) 5802–5809, http://dx.doi.org/10.1021/la2045477.
[6] H. van Leeuwen, R. Town, Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 1. fundamental features, J. Electroanal. Chem. 536 (2002) 129–140, http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(02)01212-3.
[7] R.M. Town, H.P. van Leeuwen, Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP): Part 2. Determination of metal ion speciation parameters, J. Electroanal. Chem. 541 (2003) 51–65, http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(02)01314-1.
[8] L.S. Rocha, J.P. Pinheiro, H.M. Carapuça, Evaluation of nanometer thick mercury film electrodes for stripping chronopotentiometry, J. Electroanal. Chem. 610 (2007) 37–45, http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.06.018.
[9] V.G. Levich, Physicochemical Hydrodynamics, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1962.
[10] A. Einstein, Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, Ann. Phys. 322 (1905) 549–560, http://dx.doi.org/10.1002/andp.19053220806.
[11] J. Kestin, M. Sokolov, W.A. Wakeham, Viscosity of liquid water in the range −8 °C to 150 °C, J. Phys. Chem. Ref. Data 7 (1978) 941–948, http://dx.doi.org/10.1063/1.555581.
[12] G.J.F. Holman, C.A. ten Seldam, A critical evaluation of the thermophysical properties of mercury, J. Phys. Chem. Ref. Data 23 (1994) 807–827, http://dx.doi.org/10.1063/1.555952.
[13] W.M. Haynes, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th ed., CRC Press, 2014.
[14] T. Mussini, P. Longhi, S. Rondinini, Standard potentials of amalgam electrodes in aqueous solutions, temperature coefficients, and activity coefficients of metals in mercury, Pure Appl. Chem. 57 (1985) 169–179.
[15] A.M. Mota, J.P. Pinheiro, M.L. Simões Gonçalves, Electrochemical methods for speciation of trace elements in marine waters. dynamic aspects, J. Phys. Chem. A 116 (2012) 6433–6442, http://dx.doi.org/10.1021/jp2124636.
[16] J. Koutecký, J. Koryta, The general theory of polarographic kinetic currents, Electrochim. Acta 3 (1961) 318–339, http://dx.doi.org/10.1016/0013-4686(61)85008-1.
[17] H.P. van Leeuwen, R.M. Town, Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 4. The kinetic current regime, J. Electroanal. Chem. 561 (2004) 67–74, http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.07.002.
[18] J. Heyrovský, J. Kůta, Principles of Polarography, Academic Press, 1966.
[19] J. Galceran, J. Puy, J. Salvador, J. Cecília, H.P. van Leeuwen, Voltammetric lability of metal complexes at spherical microelectrodes with various radii, J. Electroanal. Chem. 505 (2001) 85–94, http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(01)00475-2.
[20] S.C.C. Monterroso, H.M. Carapuca, J.E.J. Simao, A.C. Duarte, Optimisation of mercury film deposition on glassy carbon electrodes: evaluation of the combined effects of pH, thiocyanate ion and deposition potential, Anal. Chim. Acta 503 (2004) 203–212, http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.034.
[21] E. Rotureau, Analysis of metal speciation dynamics in clay minerals dispersion by Stripping Chronopotentiometry techniques, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects (n.d.), doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.09.006.
[22] D. Goveia, J.P. Pinheiro, V. Milkova, A.H. Rosa, H.P. van Leeuwen, Dynamics and heterogeneity of Pb(II) binding by SiO_2 nanoparticles in an aqueous dispersion, Langmuir 27 (2011) 7877–7883, http://dx.doi.org/10.1021/la2008182.
[23] G. Anderegg, Critical survey of stability constants of NTA complexes, Pure Appl. Chem. 54 (1982), http://dx.doi.org/10.1351/pac198254122693.
[24] G. Anderegg, Komplexone XXXVI. Reaktionsenthalpie und -entropie bei der Bildung der Metallkomplexe der höheren EDTA-Homologen, Helv. Chim. Acta 47 (1964) 1801–1814, http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19640470716.
[25] J. Pinheiro, H. van Leeuwen, Scanned stripping chronopotentiometry of metal complexes: lability diagnosis and stability computation, J. Electroanal. Chem. 570 (2004) 69–75, http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2004.03.016.
[26] H.P. van Leeuwen, R.M. Town, J. Buffle, Impact of ligand protonation on eigen-type metal complexation kinetics in aqueous systems, J. Phys. Chem. A 111 (2007) 2115–2121, http://dx.doi.org/10.1021/jp0673009.
[27] F.M.M. Morel, J.G. Hering, Principles and Applications of Aquatic Chemistry, 1st ed., Wiley-Interscience, New York, 1993.
[28] J.F.L. Duval, J.P.S. Farinha, J.P. Pinheiro, Impact of electrostatics on the chemodynamics of highly charged metal–polymer nanoparticle complexes, Langmuir 29 (2013) 13821–13835, http://dx.doi.org/10.1021/la403106m.
[29] H.P. van Leeuwen, J. Buffle, J.F.L. Duval, R.M. Town, Understanding the extraordinary ionic reactivity of aqueous nanoparticles, Langmuir 29 (2013) 10297–10302, http://dx.doi.org/10.1021/la401955x.
[30] S. Kariuki, H.D. Dewald, Evaluation of diffusion coefficients of metallic ions in aqueous solutions, Electroanalysis 8 (1996) 307–313, http://dx.doi.org/10.1002/elan.1140080402.
[31] L.S. Rocha, W.G. Botero, N.G. Alves, J.A. Moreira, A.M.R. da Costa, J.P. Pinheiro, Ligand size polydispersity effect on SSCP signal interpretation, Electrochim. Acta 166 (2015) 395–402, http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.035.

PCCP

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 31711

Structural effects of soft nanoparticulate ligands on trace metal complexation thermodynamics†

Elise Rotureau,*[ab] Yves Waldvogel,[ab] José P. Pinheiro,[ab] José Paulo S. Farinha,[c] Isabelle Bihannic,[ab] Romain M. Présent[ab] and Jérôme F. L. Duval[ab]

Received 7th October 2016,
Accepted 7th November 2016

DOI: 10.1039/c6cp06880d

www.rsc.org/pccp

Metal binding to natural soft colloids is difficult to address due to the inherent heterogeneity of their reactive polyelectrolytic volume and the modifications of their shell structure following changes in *e.g.* solution pH, salinity or temperature. In this work, we investigate the impacts of temperature- and salinity-mediated modifications of the shell structure of polymeric ligand nanoparticles on the thermodynamics of divalent metal ions Cd(II)-complexation. The adopted particles consist of a glassy core decorated by a fine-tunable poly(*N*-isopropylacrylamide) anionic corona. According to synthesis, the charges originating from the metal binding carboxylic moieties supported by the corona chains are located preferentially either in the vicinity of the core or at the outer shell periphery (p(MA-N) and p(N-AA) particles, respectively). Stability constants (K_{ML}) of cadmium-nanoparticle complexes are measured under different temperature and salinity conditions using electroanalytical techniques. The obtained K_{ML} is clearly impacted by the location of the carboxylic functional groups within the shell as p(MA-N) leads to stronger nanoparticulate Cd complexes than p(N-AA). The dependence of K_{ML} on solution salinity for p(N-AA) is shown to be consistent with a binding of Cd to peripheral carboxylic groups driven by Coulombic interactions (Eigen–Fuoss mechanism for ions-pairing) or with particle electrostatic features operating at the edge of the shell Donnan volume. For p(MA-N) particulate ligands, a scenario where metal binding occurs within the intraparticulate Donnan phase correctly reproduces the experimental findings. Careful analysis of electroanalytical data further evidences that complexation of metal ions by core–shell particles significantly differ according to the location and distribution of the metal-binding sites throughout the reactive shell. This complexation heterogeneity is basically enhanced with increasing temperature *i.e.* upon significant increase of particle shell shrinking, which suggests that the contraction of the reactive phase volume of the particulate ligands promotes cooperative metal binding effects.

1. Introduction

Natural colloids have a large propensity to interact with metallic ions due to their inherently large specific surface area; they therefore play a major role all along the biogeochemical cycle of trace metals in natural waters. Under environmental conditions, colloidal matter is characterized by a broad diversity of sizes, geometries, charges and chemical compositions thus offering a large spectrum of stability constants and association/dissociation rate constants of particulate metal complexes in natural aquatic systems.[1–4] Over the last few years, significant efforts have been undertaken to elaborate a quantitative understanding of the chemodynamic features of (nano)particulate metal complexes with account of the physicochemical particle properties including their size or their functional groups density and distribution.[5–7] As a prerequisite to such an investigation, an adequate physicochemical description of the reactive colloidal surface is obviously of paramount importance. A defining feature of most natural colloids (*e.g.* humic acids,[8] microorganisms[9–11] or polysaccharides[12]) is the diffuse nature of their soft interphase, *i.e.* the gradual distribution of their polymeric-like material from the inner part of the particle to the outer electrolyte solution.[13] The softness degree of the particles basically defines the type of distributions of the charged functional groups, varying from a surface-like repartition in the limiting case of hard particles to a three dimensional distribution for soft porous particles. In this

[a] *CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France*
[b] *Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France. E-mail: elise.rotureau@univ-lorraine.fr*
[c] *Centro de Quimica Fisica Molecular and IN-Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Instituto Superior Tecnico, University of Lisbon, 1049-001 Lisboa, Portugal*

† Electronic supplementary information (ESI) available: Section A. Additional details on AGNES technique. Section B. Supporting Fig. S1 displaying supplementary SSCP results for Cd binding to p(N-AA) particles at an ionic strength of 100 mM and Cd(II) binding to p(MA-N) particles at 15 mM and 100 mM solution ionic strength. See DOI: 10.1039/c6cp06880d

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

latter situation, the spatial confinement of functional groups acting as metal binding sites within the porous particle body has dramatic implications on the association/dissociation rates and stability of particle metal complexes.[6] In particular, recent approaches revisited and extended the conceptual Eigen framework for metal complex formation with molecular ligands[14] to the case of soft colloidal binding entities and proposed a scheme for metal complexation[15–18] which comprises the following processes: (i) the diffusive/conductive transport of free hydrated metal ions (M^{z+}) from bulk solution to particle/solution interface, (ii) the transport of M^{z+} within the particle body towards the metal binding sites carried by the particle, (iii) followed by the formation of an outer-sphere reactant pair, and finally (iv) the release of water from the inner sphere of the metal ion to form a coordination bond with binding sites. This extended Eigen formalism allows the identification of the rate-limiting step (transport *versus* chemical kinetics) of the overall reactive pathway from free metal ions in bulk solution to complexed particulate metal form, according to various physico-chemical parameters such as particle size[5–7,16,19,20] and softness,[20–22] particle charge density,[16,21] or medium ionic strength.[16,21]

Although such approaches have played a key role in our understanding of dynamic interactions between soft particles and metal ions, several questions regarding the impacts of soft particle structure heterogeneity on (thermo)dynamics of their metal complexation remain open. Such chemical and/or physical heterogeneity features will indeed give rise at the scale of a single particle to a distribution of stability constants of intraparticulate metal complexes or, equivalently, a binding site occupation that depends on the metal/complexing site ratio.[23–25] Chemical heterogeneity originates from the polyfunctionality (*e.g.* various types of complexing sites) and polyelectrolytic features (*e.g.* presence of electric charges) of soft colloidal interfaces.[25] Physical heterogeneity generally refers to the geometry of the particle and to the anisotropic arrangement of the material composing the particle throughout its volume. For the sake of illustration, fulvic acids exhibit a heterogeneous assemblage of aromatic and aliphatic components that directly impact the distribution of their functional sites and therewith their metal binding properties.[26] Soft polymeric-like interphases are prone to structural heterogeneity also because of the generally distinct conformational properties of the chains located with the soft colloidal volume compared to those facing the external aqueous solution.[12,27] In addition, structural modifications of soft particle interphase can occur following changes in the physicochemical medium conditions as a result of swelling/shrinking processes depending on pH, ionic strength, temperature or solvent polarity.[11,12] It is timely to analyse in some details the effects of structural organization of reactive soft colloidal interphases on their metal binding properties. This task is all the more urgent as the generic particle heterogeneity described above is seldom integrated within analysis of metal speciation in suspensions of soft particles. In view of these elements, the objective of this work is to measure and properly rationalize the relationship between structural organization of soft colloidal interphase and thermodynamics of its complexation of metal ions. To achieve this objective, the binding of metal ions by a well-characterized soft, charged nanoparticle is investigated here. The core–shell particles adopted here as surrogate for natural colloids consist of a glassy core of poly(methyl methacrylate) (PMMA) supporting a shell of polymer brushes made of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) copolymerized with either poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid), hereafter referred to as p(N-AA) and p(MA-N) nanoparticles, respectively. As extensively detailed in our previous study,[28] these two types of particles differ in terms of location of the carboxylic groups: p(N-AA) carboxylic sites are distributed preferentially at the periphery of the particle whereas those for p(MA-N) particle type are confined in the vicinity of the central particle core. Besides this feature, the PNIPAM-based shell of p(N-AA) and p(MA-N) nanoparticles is multiresponsive as its thickness depends on various stimuli, such as temperature, pH and solution ionic strength.[28,29] The remarkable electrostatic and structural properties of p(N-AA) and p(MA-N) particles have been recently addressed in our previous work as a function of temperature, pH and ionic strength using potentiometric titration, electrokinetics, dynamic light scattering and small angle neutron scattering.[28] This study evidenced the presence of a two-phase shell structure comprising a high density layer condensed on the core surface and a peripheral diluted shell layer. The heterogeneous shell structure revealed in this study together with the distinct locations of the functional carboxylic groups in the two chosen particles types constitute a promising basis for deciphering the role of particle structure on metal binding. Accordingly, the reactivity of p(N-AA) and p(MA-N) particles with respect to cadmium(II) ions, is examined here with use of two complementary stripping electroanalytical techniques that are suitable for the evaluation of the thermodynamic stability of complexes formed between metal ions and particulate ligands. AGNES (Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping) is employed for the direct determination of the free metal concentration, which *in fine* provides an estimation of the stability constants of the complexed metal species in solution.[30] Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP) is further used to address the apparent degree of metal binding heterogeneity.[31,32] The analysis is performed under different temperature and salinity conditions-both controlling the extent of shell swelling, which offers a way to quantify the effects of particle shell structure modification on thermodynamics of particulate metal complex formation.

2. Theoretical section

2.1. Metal complexation analysis by electroanalytical techniques (SSCP and AGNES)

Stripping electroanalytical techniques have been used in trace metal speciation studies due to their extremely low detection limit and their almost unique ability to provide dynamic information on metal complexation processes. Generally the consumption of free metal ions at an electrode surface generates a diffusion layer where equilibrium between free metal ions and

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

metal complexes is affected. In the vicinity of the electrode surface, the complexation is generally schemed as follows:

$$\begin{array}{ccccc} \mathrm{M} & + & \mathrm{L} & \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftarrows}} & \mathrm{ML} \\ + & & & & \\ n\mathrm{e}^- & & & & \\ \uparrow\downarrow & & & & \\ \mathrm{M}^\circ & & & & \end{array} \tag{1}$$

where ML stands for the metal complex formed with ligand L, n is the number of exchanged electrons between electrode and free metal ions M, and M° is the reduced form of M. The constants $k_{a,d}$ correspond to the kinetic constants for ML formation and dissociation (subscripts a and d, respectively). The stability constant of a given metal complex ML is defined by $K_{ML} = k_a/k_d = c_{ML}/(c_M c_L)$ with c_M and c_{ML} the concentrations of free and complexed metal species in solution, respectively, and c_L is the free ligand concentration in solution. The association/dissociation rate constants k_a and k_d define the dynamic character of the complexation. Briefly, if the complexes are able to associate and dissociate while diffusing toward the electrode surface, they are deemed dynamic while if they are unable to do so they are called inert complexes.[33] If a complex is dynamic, it may contribute to the amount of metal reduced at the electrode *via* its dissociation at the electrode surface. Dynamic complexes are labile if the association/dissociation kinetics are much faster than their diffusive transport, which in turn maintains an equilibrium between free and complexed metal concentrations at any time and position within the diffusion layer. In this case the totality of metal species in solution (free and complexed) are reduced.[34]

In the developments below, we briefly recall the basic theory used for the quantitative interpretation of SSCP data. The SSCP signal takes the form of a full voltammetric wave composed of the experimental set of (E_d, τ) couples with E_d the applied deposition potential (V) and τ the measured transition time (or electrolysis time in s). In situations where there is an excess of homogeneous ligands over metal ions, the stability constant K_{ML} can be retrieved from the shift $\Delta E_{1/2}$ between half-wave deposition potential measured in the presence and absence of ligands, irrespectively of the degree of lability of the formed metal complex, according to the DeFord–Hume equation:[35]

$$\mathrm{In}(1 + K') = -(nF/RT)\Delta E_{1/2} - \mathrm{In}\left(\tau^*_{M+L}/\tau^*_M\right) \tag{2}$$

where $K' = K_{ML}c_{L,T}$. The electrolysis times τ^*_M and τ^*_{M+L} in eqn (2) correspond to the limiting values of the wave heights obtained in the absence and presence of ligands, respectively, R is the gas constant, F the Faraday constant, and T the temperature. In the presence of metal complexes with large ligands or loss of lability, the limiting transition time τ^*_{M+L} is lower than τ^*_M since the supply of metal ions to the electrode surface decreases due to the formation of metal complexes in solution. For labile metal complexes, the overall metal flux at the electrode surface is fully controlled by the diffusion of free and complexed metal species from the solution, and the decrease in τ^*_{M+L} is then associated with the decrease in the mean diffusion coefficient of free and complexed metal species, recalling that for particulate ligands L we have $D_{ML} < D_M$ with D_{ML} and D_M the diffusion coefficients of the metal particulate complexes and of free metal ions, respectively. A metal complex stability constant K' function of the aforementioned decrease in the limiting transition time can be formulated using:

$$\frac{\tau^*_{M+L}}{\tau^*_M} = \left(\frac{\bar{D}}{D_M}\right)^p = \left(\frac{1 + \varepsilon K'}{1 + K'}\right)^p \tag{3}$$

where p is a parameter involving the contribution of hydrodynamics to metal mass transport from bulk solution to electrode surface, ε is the diffusion coefficients ratio D_{ML}/D_M and $\bar{D}$ the mean diffusion coefficient of M and ML species weighed by their respective concentrations in bulk solution. For a rotating disk electrode at the surface of which metal transfer is driven by coupled diffusion and convection, we have p = 2/3, which is obtained from application of Levich's equation.[36] For labile metal complexes, the stability constant K' from eqn (3) is equal to K' evaluated from eqn (2), while in case of non-labile systems, the flux is limited by the kinetics of complex dissociation at the electrode surface, and the application of eqn (3) then leads to an overestimation of the equilibrium complex stability constant. Consequently, a lability diagnosis can be elaborated from the comparison between the values of K' obtained from eqn (2) and (3).[6] The reader is referred to ref. 37–39 for further details on lability diagnostic.

As SSCP is a technique sensitive to the physicochemical dynamic conditions prevailing at the electrode surface, signal interpretation becomes necessarily more complicated for heterogeneous metal binding systems. It becomes then advantageous to collect information on metal complexes equilibrium properties in bulk solution, which can be done with use of AGNES technique. The latter is a stripping electrochemical technique that essentially performs potentiometric measurements in a mercury electrode by applying a deposition potential close to the standard reduction potential of the metal-Hg amalgam formation while waiting for a time delay (deposition time) sufficiently long to reach Nernstian equilibrium conditions. This strategy allows for a direct measurement of the free metal ion concentration in bulk solution exactly as an ion selective electrode (ISE), and for the same system as that used in dynamic SCP/SSCP experiments.[30] From the measurement of c_M and the mass balance for the metal, one can then directly determine the stability constant K_{ML}, irrespective of the lability degree or the heterogeneous features of the metal complexes. More details for the evaluation of the stability constants by AGNES technique are given in ESI.†

2.2. Metal binding heterogeneity analysis

In cases where the solution contains metal complexes formed between metal ions and a single type of binding site, the slope ($d\tau/dE_d$) of the SSCP wave is defined by a Nernstian relationship. In contrast, for situations where the solution contains

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

mixtures of metal complexes arising from heterogeneity of the metal binding particles, the description of the slope becomes more complicated.[40]

As each point of a given SSCP curve corresponds to an individual experiment performed at a given deposition potential, one probes metal complexes with distinct stability features all along the SSCP wave. In the foot of the wave, AGNES conditions are reached and one probes free metal ions only. Progressing toward more negative applied potentials, *i.e.* when approaching the top of the wave, more metal ions become reduced thus forcing the dissociation of stronger metal complexes which then contribute significantly to the measured electrochemical signal provided that they are dynamic. As a result, the SSCP wave obtained in the presence of metal complexes characterized by a distribution of stability constants, becomes spread out with respect to the potential axis as compared to that measured for the case of chemically homogeneous ligands. For this study, the magnitude of the heterogeneity degree in metal binding is evaluated from the deviation of the experimental SSCP wave against the homogeneous case, *i.e.* for one single type of ligand. This deviation is evaluated by comparing the full width at half maximum (FWHM) of the derivative plot ($(d\tau/dE_d)$ *vs.* E_d) issued from the experimental curve with that corresponding to the homogeneous case (referring to the Nernstian law[37–39]), and given by $\Delta\alpha = \frac{(\mathrm{FWHM})^{\mathrm{exp}}}{(\mathrm{FWHM})^{\mathrm{homogeneous}}}$. The corresponding ratio $\Delta\alpha$ provides an indicator of the heterogeneity extent of Cd binding with core–shell nanoparticles ($0 < \Delta\alpha \leq 1$ with $\Delta\alpha = 1$ pertaining to the homogeneous case). Prior to calculation of the derivative $d\tau/dE_d$, the (E_d, τ) plots were smoothed using curve fit function available in Kaleidagraph software.

3. Materials and methods

All solutions were prepared with ultrapure water (MilliQ, 18.2 MΩ cm^{-1}). Solutions of divalent cadmium Cd(II) were obtained from dilution of a 1000 ppm-certified standard solution (Fluka) of $Cd(NO_3)_2$. Solution ionic strength was adjusted with use of 1 M $NaNO_3$ stock solution (Fluka, trace select 99.999%), and diluted HNO_3 or NaOH solutions (Merck suprapure, concentrations 0.1 M or 0.01 M) were further used to adjust solution pH. Stock solution of 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS, Sigma) was prepared from the corresponding solid powder and was used as pH buffer.

3.1. Synthesis of multiresponsive core/shell particles

The two core–shell particles adopted in this work were synthesized following the protocol detailed elsewhere.[29,41] Briefly, the particles were prepared according to a two-stage shot emulsion copolymerization technique in ultrapure Milli-Q water. In the first step, the poly(methyl methacrylate) or PMMA core was prepared by batch emulsion polymerization, and in the second stage, a mixture of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) and methacrylic acid (MA) (for p(MA-N) particles) or acrylic acid (AA) (for p(N-AA) particles) was added in three shots, 10 min apart, to the reactive medium at 70 °C, to form the shell around the PMMA core. Potassium persulfate (Aldrich, 99% ACS reagent) was used for the initiator agent and sodium dodecyl sulfate (Sigma, 99% GC grade) as the surfactant. The particles were cleaned by dialysis against Milli-Q water using a Spectra/Por membrane (MWCO of 6–8 kDa), renewing the water bath twice a day for two weeks. Due to the difference in reactivity ratios of the comonomers NIPAM/AA and NIPAM/MA, the comonomer distribution along the p(N-AA) chain differs compared with that of p(MA-N) chain. For the p(N-AA) the carboxylic groups are preferably located at the outer phase of the shell, whereas for p(MA-N) the carboxylic groups are confined in the close vicinity of the particle core component.[29]

3.2. Dynamic light scattering (DLS)

Diffusion coefficient measurements of particles were measured with a Nano ZS Zetasizer from Malvern Instrument (He–Ne red laser source, λ = 633 nm). The apparatus is equipped with a temperature-controlled quartz suprasil measurement cell, an automatic laser attenuator and an avalanche photodiode detector located at 173° relative to the laser source, thus allowing backscattering detection. Experiments and data acquisition were driven by the Dispersion Technology Software from Malvern Instruments. Particles were dispersed at a final concentration of 0.005 vol% in 15 mM and 100 mM $NaNO_3$ electrolyte solutions at pH 7.5. Solution pH and salinity were fixed after addition of appropriate aliquots of 0.1 M NaOH, 0.1 M HNO_3 and 1 M $NaNO_3$ solutions. Prior to measurements at a given pH and salt concentration, particle dispersions were systematically pre-equilibrated at the desired temperature (15, 25 and 35 °C) for a period of at least 40 min. Particle diffusion coefficients were derived from analysis of the measured intensity autocorrelation functions. As a first approximation, the corresponding monomodal (intensity-based) distributions in (hydrodynamic) size of equivalent hard spheres were evaluated on the basis of the Stokes–Einstein equation. These measurements complete those carried out at lower pH values reported in our previous study.[28] We systematically verified that measured particle size was not affected by the presence of metal ions present at the trace level under the conditions of interest in this work, in line with conclusions by Sagou *et al.*[42]

3.3. Electrochemical analysis of metal complexation

An Ecochemie Autolab type III potentiostat controlled by GPES 4.9 software (Ecochemie, The Netherlands) was used in conjunction with a Metrohm 663VA stand. The auxiliary electrode was a glassy carbon rod and the reference electrode was an Ag/AgCl electrode. The working electrode was a thin mercury film electrode (TMFE) plated onto a rotating glassy carbon (GC) disk of 2 mm in diameter (Metrohm). The preparation of TMFE was repeated daily for each set of experiments. GC electrode was conditioned with a polishing and electrochemical pre-treatment according to the procedures reported elsewhere.[43] The thin mercury film was plated *ex-situ* on the GC electrode with use of a 0.48 mM mercury(II) nitrate solution under acidic conditions (0.75 mM HNO_3, pH 1.9) *via* electrodeposition at

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

−1.3 V, 1000 rpm for 240 s. Once the experiments were completed, the TMFE was cleaned using successive mercury reoxidations in 80 mM ammonium thiocyanate solution buffered with ammonium acetate (pH 3.4).

Experimental protocol for electrochemical measurements. For each condition explored in this study, namely the nature of the particle, temperature and ionic strength, the experiments were conducted twice. A disposable polystyrene cell was placed in a double-walled container connected to a refrigerating-heating water circulator in order to set temperature of particles suspensions at 15, 25 or 35 °C with an accuracy of ±0.1 °C during electrochemical measurements. Batch suspension of 0.1% (w/w) PNIPAM particles stabilized in 15 mM or 100 mM $NaNO_3$ electrolyte, 5×10^{-7} M $Cd(NO_3)_2$ and 1 mM MOPS buffer (pH 7.5), was equilibrated at room temperature at least 24 h prior to measurements. The corresponding metal-to-ligand ratios are equal to 0.0016 for p(N-AA) suspensions ($c_{L,T}$ = 3×10^{-4} M) and 0.0018 for p(MA-N) suspensions (with $c_{L,T}$ = 2.7×10^{-4} M). Calibration of the SSCP measurements (E_d in the range −0.78 to −0.65 V *vs.* Ag/AgCl electrode) was performed beforehand in a 5×10^{-7} M Cd(II) solution acidified to pH 3, in the absence of particles under ionic strength conditions similar to those pertaining to experiments conducted in the presence of nanoparticles. The deposition step was carried out at a specified deposition potential E_d for a time delay t_d of 45 s and an electrode rotation speed of 1500 rpm. Then, a 3 μA stripping current I_s was applied until the potential reached a value well beyond the reoxidation transition plateau (−0.4 V for Cd).

AGNES measurements were performed following the hereafter detailed protocol. The metal deposition step at the Hg electrode was divided into two sub-stages: (i) first, a potential $E_{1,a}$ corresponding to conditions where deposition process is diffusion-limited, was applied for a time $t_{1,a}$ while stirring at a rotation speed of 1500 rpm, and (ii) a potential $E_{1,b}$ was then fixed for a delay $t_{1,b}$ set equal to $3t_{1,a}$ (with stirring) in order to establish equilibrium between metal concentrations at the electrode surface and in bulk solution. The magnitude of the potential $E_{1,a}$ was chosen to coincide with the deposition potential at the limiting SSCP wave height (−0.75 V *vs.* Ag/AgCl electrode for Cd), and $E_{1,b}$ at the half wave potential of the SSCP curve. The characteristic times $t_{1,a}$ and $t_{1,b}$ were fixed at 40 s and 120 s, respectively.

4. Results and discussion

4.1. Salinity- and temperature-dependent size and structure of core–shell PMIPAM-based nanoparticles

The charged PNIPAM copolymer brushes confer to the shell an outstanding thermo-, pH- and iono-responsiveness. From our previous work,[28] the overall particle radius (including both particle core and shell compartment) can increase from 50 ± 5 nm in the collapsed shell state, at temperature above 35 °C at pH 4 and 15 mM solution ionic strength, to 110 ± 5 nm in the fully expanded (swollen) shell state at temperature below 25 °C at pH 7.5. Small angle neutron scattering (SANS) and DLS data analysis evidenced the presence of two polymeric phases in the shell, namely a high-density layer condensed on the core surface (detected by SANS) and a low-density polymer brush expanded towards the bulk solution (detected by DLS) at sufficiently low temperatures, which comforts theoretical modeling highlighting a non-ideal brush behaviour for these particulate core–shell systems.[41] SANS study further revealed that the thickness of the condensed shell phase increases from 5 to 10 nm with changing temperature from 15 to 45 °C. This size variation stems from the collapse of the peripheral diluted shell layer upon increasing temperature. In addition, particle electrokinetic and titration studies support the preferential location of the carboxylic groups at the vicinity of the core and at the periphery of the shell for the p(MA-N) and p(N-AA) particle types, respectively. For p(MA-N) particles, charges at the vicinity of the core are likely exposed to hydrophobic patches and accordingly, p(MA-N) nanoparticle exhibits delayed dissociation of the carboxyl groups with pH as compared to that of p(N-AA) nanoparticles.[28]

The current section focuses on the swelling properties of the multi-responsive particles at pH 7.5, which corresponds to the pH condition of the electroanalytical metal-binding experiments detailed later. Fig. 1 displays the temperature dependence of the hydrodynamic radius R_H of p(MA-N) and p(N-AA) particles as determined by DLS in 15 mM and 100 mM $NaNO_3$ solution at pH 7.5. For both particles examined, R_H slightly decreases with increasing temperature from 15 °C to 35 °C. This particle shell shrinking, well-documented for thermoresponsive colloidal systems, is less significant than that measured at lower pH values where magnitude of repulsive interactions between intraparticulate ionogenic charges is lower.[28] At pH 7.5, previously published titration data[28] evidenced that the carboxylic groups located in the shell of p(N-AA) particles are fully deprotonated while their dissociation in p(MA-N) particles shell is not complete. For the latter particle type, 83% and 90% of

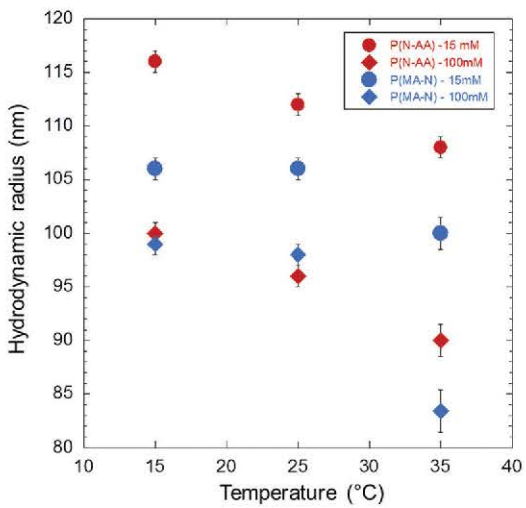


Fig. 1 Hydrodynamic radius R_H of p(MA-N) and p(N-AA) particles computed on the basis of Stokes–Einstein equation using particle diffusion coefficients obtained by dynamic light scattering (DLS) as a function of temperature, at pH 7.5, 15 mM and 100 mM electrolyte concentrations (indicated).

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

the total amount of carboxylic groups are deprotonated in 15 mM and 100 mM $NaNO_3$ (pH 7.5), respectively. Due to the presence of repulsive electrostatic interactions originating from the charges carried by the particle core supported-polymer brushes, the lower critical solution temperature (LCST) is shifted to larger temperature values compared to that typically measured for uncharged PNIPAM polymer, generally between 32–37 °C. In the temperature range of interest in this work (15–35 °C), the polymer chains within the dilute shell phase are significantly expanded, and the particle size is much larger than that found at lower pH and temperature well above the LCST where shell collapse is achieved (R_H = 50 ± 5 nm[28]).

At fixed temperature, the shell tends to shrink upon increasing solution salinity due to classical screening effects.[28] At 15 mM, we note that p(N-AA) particles radius is *ca.* 10 nm larger than that of p(MA-N) particles. This reflects the differentiated location of carboxylic moieties in the shell of these two particles types. For p(N-AA), according to the synthesis procedure charges are preferably positioned at the periphery of the shell so that under conditions where repulsive interactions take place, polymer brushes can freely expand towards bulk solution. This contrasts with p(MA-N) for which the intra-shell repulsive forces are operational mainly in the direct vicinity of the particle core where charges are predominantly distributed.[28,29] At 100 mM ionic strength, particle charge screening is quite effective for both particles, which leads to dampening of the difference in sizes related to the charge distribution in the particle shell. It is emphasized that at 35 °C and 100 mM $NaNO_3$, p(MA-N) particles exhibit a stronger collapse than p(N-AA), which suggests more significant intermolecular hydrophobic interactions for the former particle type under such conditions.

4.2. Thermodynamic stability of soft nanoparticulate metal complexes

Metal complexation studies were performed at pH 7.5 in 15 mM and 100 mM salt concentration at 15 °C, 25 °C and 35 °C. For each condition examined, we performed AGNES measurements and evaluated free metal concentration in solution and therewith the nanoparticulate metal complex stability constant. The apparent K_{ML} values are defined in terms of the average concentrations of the free and complexed species in the dispersion, including the electrostatic contributions to metal binding by nanoparticulate ligands. The so-obtained K_{ML} constants are collected in Table 1.

The results evidence that the stability of Cd-p(MA-N) particle complexes is systematically larger than that obtained with p(N-AA) particles, irrespective of the solution ionic strength and temperature conditions tested. At 15 mM ionic strength, one order of magnitude differentiates the log values of K_{ML} obtained for the two particle types, while at 100 mM solution ionic strength, a 0.4–0.6 difference is obtained depending on temperature. The stability constants calculated at 100 mM $NaNO_3$ concentration are of specific interest since the p(MA-N) and p(N-AA) particles radius and carboxylic dissociation features are comparable at such high salinity level (Fig. 1) The difference observed between stability constants for these two particles under such salt concentration conditions reflects a significant role of the differentiated spatial distribution of the –COOH sites within the shell on their reactivity toward metal ions. In particular, the stronger stability values K_{ML} evaluated with p(MA-N) as particulate ligands may evidence a cooperative effect of carboxylate moieties in metal binding, recalling that the charges significantly reside in the proximity of p(MA-N) particle core and are therefore likely more condensed than p(N-AA) charges, the latter being significantly pushed -according to synthesis- to the shell periphery.[29] A quantitative analysis of this issue will be detailed in the Discussion section from proper examination of the electrostatic contribution to K_{ML}. On a qualitative level, increasing the solution ionic strength impacts metal binding *via* screening of the (negative) particle charges, which results in a reduction of the stability constant of the formed metal complexes. Our results are clearly consistent with this anticipation.

Table 1 Stability constants K_{ML} for soft nanoparticulate Cd(II)-complexes evaluated from AGNES analysis at pH 7.5. The values of K_{ML} correspond to the means of three measurements

		$\log K_{ML}$ (K_{ML} in $m^3\ mol^{-1}$)	
		Ionic strength	
	T (°C)	15 mM	100 mM
p(N-AA)	15	0.95	0.5
	25	1.2	0.7
	35	1.5	0.9
p(MA-N)	15	2.0	1.1
	25	2.3	1.1
	35	2.5	1.4

Fig. 2 reports the dependence of the ML stability constants on temperature at fixed salt concentration for both particle types considered in this work. The standard enthalpy of reaction ΔH^0 is determined from the van't Hoff equation given by

$$\frac{d \ln K_{ML}}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (4)$$

and the entropy change ΔS^0 is evaluated from the basic Gibbs–Helmholtz equation that connects K_{ML} to temperature T according to:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_{ML}. \quad (5)$$

The obtained values of ΔH^0 and ΔS^0 are listed in Table 2 and the ensuing Gibbs–Helmholtz relationships are displayed in Fig. 2 for the sake of comparison with experiments.

The sign of ΔH^0 values evidences an endothermic metal-nanoparticle complex formation reaction that is promoted with increasing temperature. This contrasts with the exothermic formation of metal complexes with small or molecular ligands like nitrilotriacetic acid.[44] Both ΔH^0 and ΔS^0 are positive, which means that metal complex formation is enthalpically unfavourable and is driven by an increase in entropy. The gain in entropy may result from a favourable change in the hydration states of metallic ions upon binding due to the release of water from their hydration sphere and to the replacement of two monovalent ions by one divalent ion in the polymeric shell

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

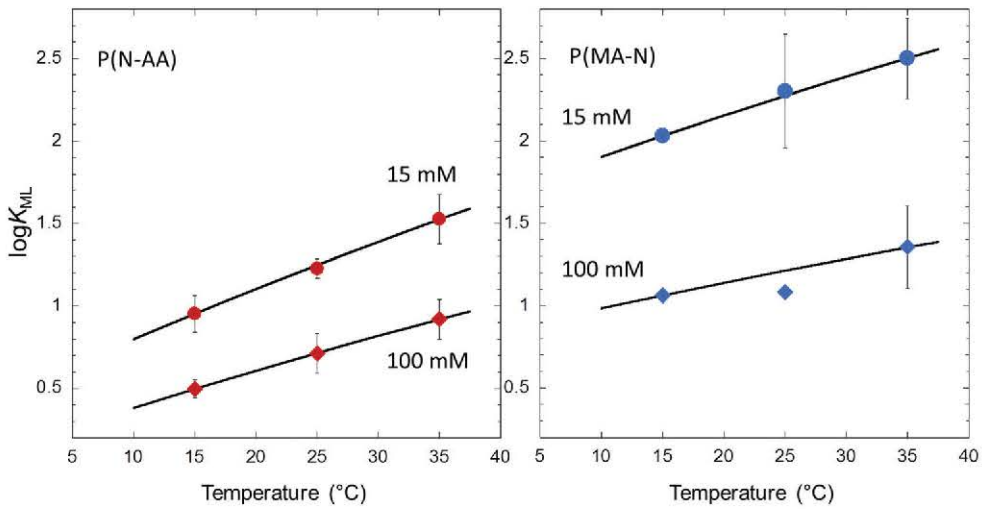


Fig. 2 Temperature dependence of the stability constants K_{ML} for the two core–shell particles (indicated) determined by AGNES technique. The solid line represents the Gibbs–Helmholtz relationship using the value of the standard enthalpy of reaction ΔH^0 and the entropy change ΔS^0 given in Table 2. The values of K_{ML} correspond to the means of three measurements with the uncertainties calculated from the standard deviation.

Table 2 Standard enthalpy ΔH^0 and entropy change ΔS^0 associated with the complex formation reaction between cadmium ions and p(N-AA) or p(MA-N) ligand particles in 15 mM and 100 mM salt concentrations

	15 mM		100 mM	
Ionic strength	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 (J mol^{-1} K^{-1})	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 (J mol^{-1} K^{-1})
p(N-AA)	48.5	186.5	36.0	134.5
p(MA-N)	40.0	177.8	24.7	105.1

phase, as described in ref. 45 and 46. The disparities between entropy and energy values obtained for the two ionic strengths or two particle types tested are not easy to interpret as several processes likely take place when changing salt concentration and/or particle structure, *e.g.* modification in intraparticulate solvent structure and underlying effects on (i) complex formation, (ii) polymer chains configuration and (iii) metal coordination number.

4.3. Temperature-dependent heterogeneity in metal binding by core–shell PNIPAM-based particles

To go further in the evaluation of the metal binding properties of p(N-AA) and p(MA-N) soft particles, SSCP analysis was carried out under pH and temperature conditions similar to those mentioned in Table 1. Illustrative SSCP measurements are given in Fig. 3 for metal binding by p(N-AA) particles in 15 mM salt concentration solution at 15 °C, 25 °C and 35 °C. The qualitatively similar SSCP results for binding of Cd(II) by p(N-AA) at 100 mM ionic strength and p(MA-N) particles at 15 and 100 mM ionic strengths are given in ESI.†

Full-wave SSCP analysis: heterogeneity evidences and lability diagnosis. Experimental SSCP data were analysed according to the theory detailed in ref. 34 that is valid for a single type of ligand. In details, we attempted to fit the SSCP curves by adjusting the potential shift ΔE in order to minimize the difference between the thermodynamic constant K' as derived from eqn (2) and that obtained from AGNES analysis. The resulting computed SSCP waves are reported in Fig. 3 and in Fig. S1 in ESI.† As shown in Fig. 3, the theory successfully reproduces the lower part of the experimental SSCP waves corresponding to the contribution of free metal ions, but it fails to recover the rising portion of the wave. As detailed in Section 2.2, the discrepancy between the rising portion of the experimental SSCP wave and that evaluated for the homogeneous binding situation evidences heterogeneous metal complexation between metal ions and particles where functional groups with various reactivities/affinities towards the metal ions are involved. Accordingly, the next section is devoted to an in-depth comparison of the heterogeneity features of Cd complexation by the here-adopted core–shell nanoparticles as a function of temperature and medium salt content.

For all SSCP results obtained in this work as a function of the type of particulate ligand, the solution temperature and the electrolyte concentration, fitting of experimental data at the foot of the SSCP wave was systematically achieved with equal values of derived from eqn (2) and (3). This evidences the labile nature of the probed metal complexes. Of course, in case of heterogeneous complexation scenario, a decrease in the complex lability upon approaching the top of the wave *i.e.* with applying more negative potentials, can not be ruled out. However, having in mind that the estimation of K' from eqn (3) involves the SSCP plateau value that originates from contributions of all metal species probed by the electrode, it is legitimate to argue that our lability diagnosis pertaining to complexes probed at the foot of the wave applies all along the SSCP curve.

Metal binding heterogeneity analysis. This section is devoted to a quantitative analysis of SSCP data in order to determine the extent of heterogeneity in particle metal binding sites as a function of the type of particulate ligands, temperature and electrolyte concentration. The obtained heterogeneity parameters $\Delta\alpha$ defined in Section 2.2 are collected in Table 3.

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

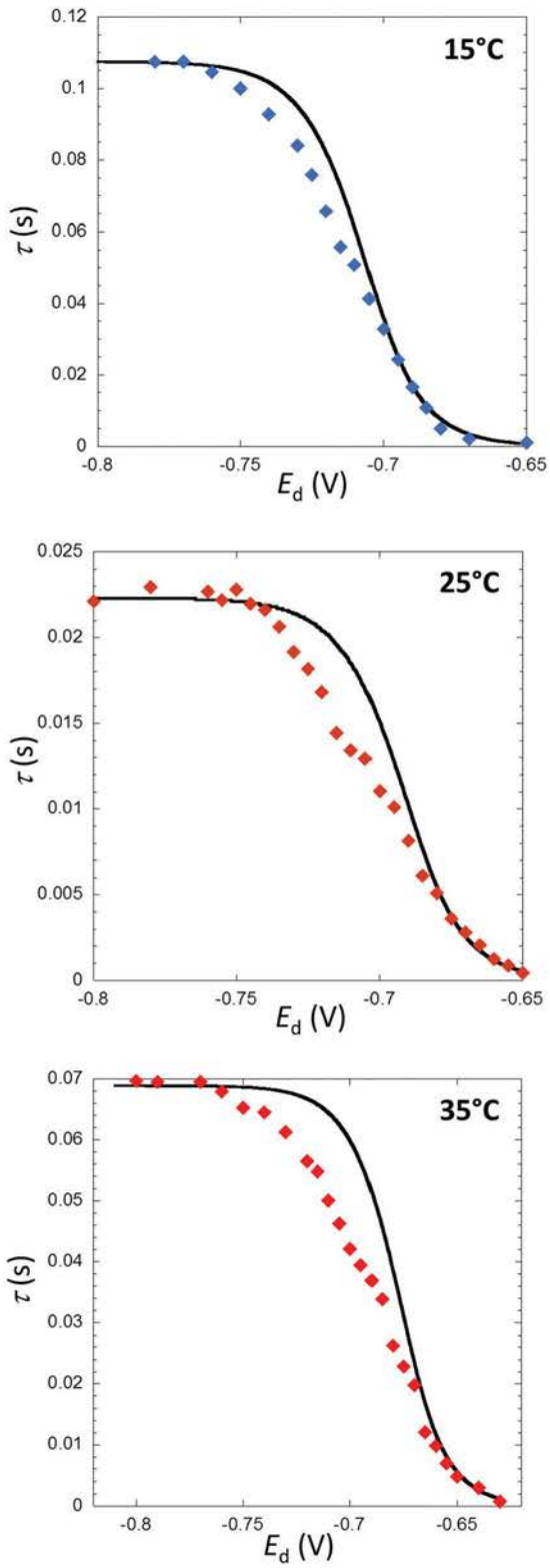


Fig. 3 SSCP experimental points and simulated curves in the presence of Cd (total concentration of 5×10^{-7} M) and p(N-AA) particles at 0.1% (w/w). Experiments were conducted at 15 mM ionic strength and pH 7.5. Solid lines represent the simulated curves for homogeneous metal complexation (see text for details).

The nature of the heterogeneity in metal binding is not straightforward to identify as it may originate from different (and intertwined) processes, *e.g.* the possible formation of complexes with different stoichiometries involving carboxylic groups and/or the lone pair electrons of nitrogen atom, and the distinct chemical environments of the metal binding sites depending on their position across the shell. This latter option likely applies for the core–shell systems of interest, recalling that according to their position and distribution along the chains, carboxylate moieties are more or less exposed to hydrophobic patches: groups protruding towards the outer shell are more hydrated than those close to the core in the condensed polymeric phase. Overall, and in line with this argument, Cd binding by p(MA-N) particles displays a more pronounced heterogeneity than that by p(N-AA). At this stage, it is worth mentioning that there is an inherent interplay between complex stability strength and metal binding heterogeneity: the larger are the stability constants, the more significant is the occupation of binding sites by metal ions, therefore widening the range of metal binding affinities and metal complex stability constants. This is in line with the data given in Tables 1 and 3.

According to the results collected in Table 3, heterogeneity in metal binding increases with temperature for both types of particles investigated. For the results obtained at 15 mM ionic strength, $\Delta\alpha$ values are -within experimental error-similar at 15 °C and 25 °C for both particle types investigated and significantly decrease at 35 °C. Increasing temperature leads to a loss of water from the collapsing (dilute) part of the particles shell as a result of attractive interactions between hydrophobic isopropyl groups of the polymer chains. Although DLS measurements suggest only a small change in particle shell thickness in the temperature range 15–35 °C (Fig. 1), local modifications of water structuration leading to the appearance of hydrophobic effects in the shell cannot be excluded. The resulting shell shrinking, even partial, may also promote cooperative binding effects and thus, the formation of multidentate complexes. Accordingly, with increasing temperature, affinity of metal ions to binding sites will tend to be more heterogeneous and more differentiated along the polymer chains within the particle volume. At 100 mM, $\Delta\alpha$ values also decrease with increasing temperature for both types of particles. We emphasize that for p(MA-N) under such high salt concentration condition a

Table 3 Heterogeneity parameter ($\Delta\alpha$) derived from the ratio between the full width at half maximum of the experimental ($d\tau/dE_d$) plot and that corresponding to the homogeneous complexation situation

		$\Delta\alpha$	
		Ionic strength	
	T (°C)	15 mM	100 mM
p(N-AA)	15	0.66 ± 0.2	0.80 ± 0.2
	25	0.57 ± 0.2	0.79 ± 0.2
	35	0.45 ± 0.2	0.70 ± 0.2
p(MA-N)	15	0.60 ± 0.3	0.79 ± 0.2
	25	0.56 ± 0.2	0.70 ± 0.3
	35	0.38 ± 0.4	0.50 ± 0.4

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

significant change in the heterogeneity degree is observed between 25 °C and 35 °C, as $\Delta\alpha$ goes from 0.70 to 0.50. This is also accompanied by a significant (*ca.* 15 nm) shrinking of the shell (Fig. 1). This feature confirms the aforementioned explanation that invokes the impact of the modification of the hydrophobic/hydrophilic balance in the shell phase induced by an increase in temperature, along with a structural change of the shell on the heterogeneity in metal complexation. As demonstrated in our previous SANS study,[28] the temperature-driven collapse of the dilute polymer phase at the periphery of the particles causes a few nm increase of the thickness of the condensed shell phase located in the vicinity of the particle core. Accordingly, the structural arrangement of the polymeric shell at 35 °C may significantly differ from that prevailing at 15 °C or 25 °C, which in turn may impact the binding properties of the functional sites located close to the particle core surface as reflected by the corresponding $\Delta\alpha$ values.

As an intermediate conclusion, results indicate that metal binding by fine tuneable stimuli-responsive core–shell nanoparticles is dictated by structural and conformational changes of the soft particulate interphase following changes in temperature and medium ionic strength. Small variations in particle size triggered by changes in temperature and/or ionic strength lead to distinct spatial confinements of metal binding sites distributed within the shell, and causes therewith significant modulations of metal complex stability and metal binding heterogeneity. In the next section, we further elaborate a methodology that makes it possible to estimate the location of metal complexes within the particle volume from proper analysis of the dependence of the measured particulate metal complex stability constant on solution ionic-strength. Results are further discussed in connection with the particle shell structure.

Defining the location of the metal binding region within the particle shell. The dependence of the particle–metal complex stability constant on ionic strength (Table 1) putatively stems from corresponding changes in the activity coefficient of metal ions in solution. This contribution can be evaluated by comparing the ratio of the measured K_{ML} values at 15 mM and 100 mM solution ionic strength with the ratio between activity coefficients of the metal ions at these two ionic strengths. The values of $\log\gamma_{M^{2+}}$ are −0.44 at I = 100 mM and −0.21 at I = 15 mM, with γ^{2+} the activity coefficient of metal ions as determined from Davies equation.[47] This provides a ratio $\log(\gamma_{M^{2+}})^{15mM}/\log(\gamma_{M^{2+}})^{100mM}$ of 0.48 within the temperature range 15–35 °C, which is well below the value of *ca.* 2 obtained for the K_{ML} ratio, irrespective of the temperature conditions and the type of particle considered (see Table 1). It is then clear that modification of the activity coefficients of metal ions in solution is not sufficient to explain the change in metal complex stability constants within the tested range of ionic strengths.

Pending a refined analysis of the contribution of intraparticulate electrostatics to metal-complex stability, identification of the nature of metal binding region within the shell is possible. Namely, variation of K_{ML} with changing solution salinity may be governed by two distinct processes: (i) the classical Eigen–Fuoss mechanism[14,48] applicable for the formation of a complex between metal ion and (isolated) binding site, both interacting *via* Coulombic forces or (ii) the metal complexation within or at the surface of a Donnan phase corresponding to the particle shell. To discriminate between these processes, let us first formulate the electrostatic contribution to the apparent stability constant of a ML complex *via* the relationship

$$K_{ML} = K_{int} \times f_{elec}, \tag{6}$$

where K_{int} is the intrinsic (chemical) stability constant and f_{elec} a function that depends on the electrostatic potential metal ion experiences at the location of the binding site. Interpreting the variations of experimental K_{ML} values with increasing salt concentration from 15 mM to 100 mM in terms of the ratio $(K_{ML})^{15mM}/(K_{ML})^{100mM} = (f_{elec})^{15mM}/(f_{elec})^{100mM}$, we can evaluate the type of electrostatic contributions driving metal complex formation, either by considering the complexation of M with loose and isolated binding sites or the binding of M in a smeared-out Donnan-like phase. Each type of metal binding process corresponds to different f_{elec} ratios that we detail below.

The first approach was originally developed by Eigen and Fuoss.[14,48] The theory, if applicable for the systems of interest in this work, implies that Cd binding by carboxylate groups results from an electrostatic contact leading to an ion-pair formation, mainly governed by the outer-sphere stability constant K_{OS}. The formulation of the outer-sphere complex stability and its dependence on salinity *via* screened coulombic interactions are given by ref. 21:

$$K_{OS} = \frac{4\pi}{3} N_a a_g^3 \exp\left(-\frac{z_M z_L e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r k_B T a_{cc}}\left(1 - \frac{\kappa a_{cc}}{1+\kappa a_{cc}}\right)\right). \tag{7}$$

This expression of K_{OS} results from the combination of the Fuoss equation with Debye–Huckel electrostatics for point charge (Coulombic) interaction with account of charge screening by ions from background electrolyte ions. Here z_M and z_L are the charge number of the metal ion and the binding site, respectively, ε_0 and ε_r are the vacuum dielectric permittivity and relative dielectric permittivity of the medium, respectively, with the dependence of ε_r on temperature as reported in ref. 49, a_g is the geometrical center-to-center distance between M and binding site, a_{cc} is the charge center-to-center distance between M and binding site, and κ is the reciprocal screening Debye layer thickness that depends on medium salt concentration according to classical Debye equation. The exponential term in eqn (7) corresponds to the searched f_{elec} applicable for metal complex formation obeying Eigen–Fuoss mechanism.

In the second approach, we consider the formation of the metal complex within a Donnan volume defined by a given volume density of fixed (structural) charges it carries. Assessment of the Donnan potential in an ion-penetrable polymer structure is achieved following the work of Ohshima.[50] According to DLS data (Fig. 1), the shell thickness of the p(N-AA) or p(MA-N) particles ranges from 40 to 72 nm in the temperature and salinity conditions of interest in this work (the core radius is *ca.* 42 nm, see ref. 28). Then, the thickness of the shell is always larger than the Debye thickness κ^{-1} which equals to 2.4 nm and 0.96 nm at 15 mM and 100 mM ionic strength,

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

respectively, which legitimates the application of Donnan representation for the particles adopted in this study under the tested conditions. The relationship between the dimensionless Donnan potential y_D operational in the Donnan volume (dimensionless potentials y are defined here by $y = F\Psi/RT$ with Ψ the potential) and the dimensionless surface potential y_0 applying at the edge of the Donnan volume of the soft particulate ligand is given by:[50]

$$(y_D - y_0) \times \left\{ \frac{\kappa_m(b-a)\cosh[\kappa_m(b-a)] + \left(\kappa_m^2 ab - 1\right)\sinh[\kappa_m(b-a)]}{\kappa_m a \cosh[\kappa_m(b-a)] + \sinh[\kappa_m(b-a)]} \right\} = 2\kappa b \sinh\left(\frac{y_0}{2}\right) \times \left[1 + \frac{2}{\kappa b \cosh^2(y_0/4)} + \frac{8\ln[\cosh(y_0/4)]}{(\kappa b)^2 \sinh^2(y_0/2)}\right]^{1/2} \quad (8)$$

where a is the particle core radius, b the radius of the whole particle including shell compartment, $\kappa_m = \kappa\sqrt{\cosh y_D}$ with $y_D = \sinh^{-1}(\rho_0/2z_L c_\infty F)$ and ρ_0/F the space charge density in the Donnan phase and c_∞ the 1 : 1 bulk electrolyte concentration. Solving the transcendental eqn (8) yields to the evaluation of y_0. Here, the relevant f_{elec} factor to be implemented in eqn (6) is given by the exponential term $\exp(-z_M y_r)$ where y_r is set to y_D or y_0, which corresponds to metal complexation in the particle Donnan volume or at the particle outer shell surface. Accordingly, eqn (8) provides values of $\left(K_{ML}^{y_r}\right)^{15mM}/\left(K_{ML}^{y_r}\right)^{100mM}$ for different electrostatic scenarios, the relevance of which can be apprehended upon comparison with the ratio between stability constants measured at 15 and 100 mM. The analysis is performed below at 15, 25 and 35 °C.

In Fig. 4A, we report the ratio between experimental K_{ML} values at 15 mM and 100 mM as a function of temperature. Results are compared with the ratios $(K_{OS})^{15mM}/(K_{OS})^{100mM}$ and $\left(K_{ML}^{y_r}\right)^{15mM}/\left(K_{ML}^{y_r}\right)^{100mM}$, calculated according to eqn (7) and eqn (6) and (8), respectively. The parameters used for the

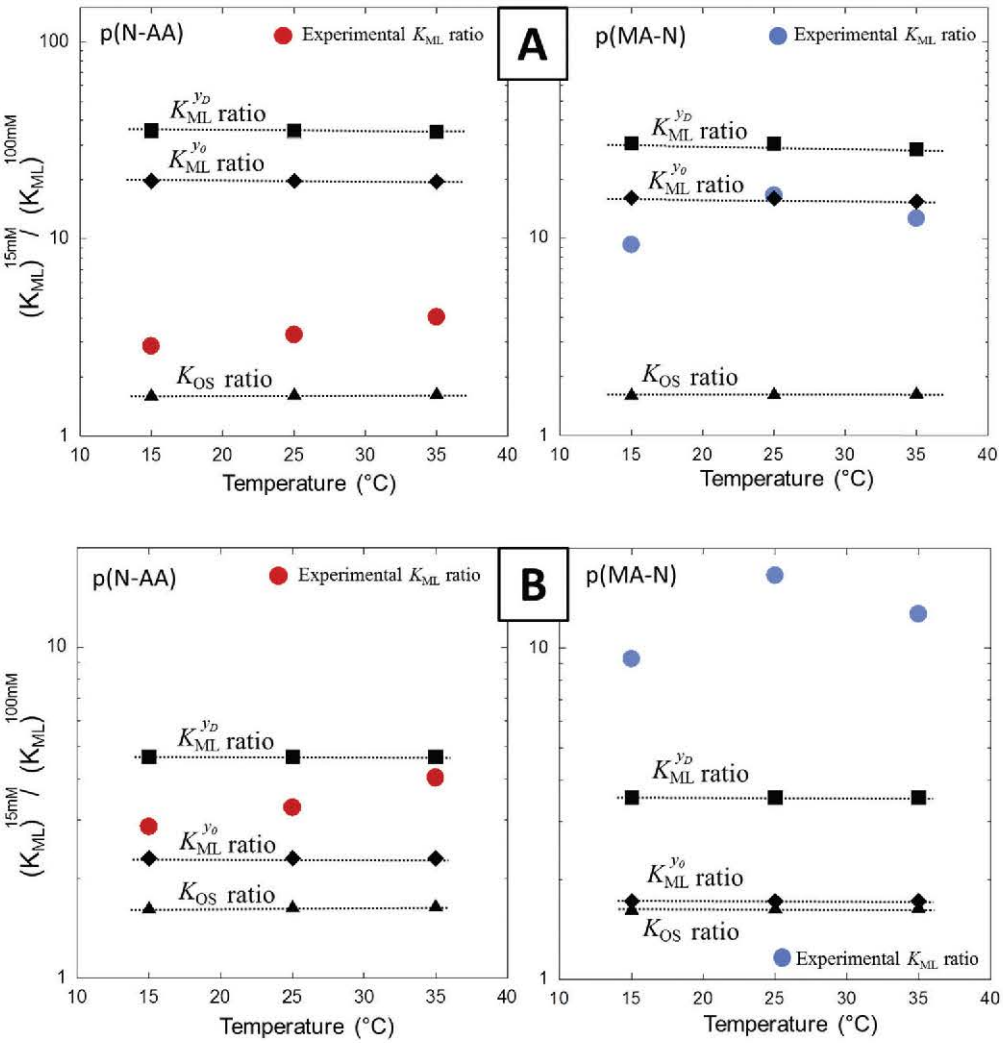


Fig. 4 Ratio between experimental stability constants obtained at 15 mM and 100 mM as a function of temperature (indicated). The data are compared to ratios of K_{OS} or (with $y_r = y_D$ or y_0) values at 15 mM and 100 mM as evaluated according to eqn (7) and eqn (6), (8), respectively (dotted lines). For the calculation of K_{OS}, the parameters a_{cc} and a_g were set to 5 Å.[6] For the determination of $K_{ML}^{y_r}$, the required space charge density was determined from protolytic titration (panel A) and electrokinetic analyses (panel B) detailed in ref. 28 (see text for more details).

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

determination of K_{OS} or $K_{ML}^{y_r}$ are detailed in the figure caption. As shown in Fig. 4, the impact of electrostatics on K_{OS} is very limited as the ratio $(K_{OS})^{15mM}/(K_{OS})^{100mM}$ remains close to unity under the various conditions relevant in this work. In contrast, within the Donnan electrostatic framework, higher values of $\left(K_{ML}^{y_r}\right)^{15mM}/\left(K_{ML}^{y_r}\right)^{100mM}$ are found, which underlies a larger effect of electrostatics on $K_{ML}^{y_r}$.

In Fig. 4A, we first analyse the situation where the space charge densities ρ_0 required for the determination of $K_{ML}^{y_r}$ are directly evaluated from protolytic titration data detailed in ref. 28 and corrected here for shell volume variation measured by DLS at pH 7.5 (Fig. 1). The obtained values of ρ_0/F are approximatively −300 mM and −270 mM for p(N-AA) and p(MA-N), respectively. Using these ρ_0/F values, Fig. 4A reveals two kinds of metal binding scenarios depending on the particle type considered. While metal binding by p(MA-N) particles is consistent with the Donnan approach, metal binding by p(N-AA) particles satisfactorily agrees with Eigen–Fuoss mechanism. From this result, it turns out that for p(N-AA) particle type where reactive sites are significantly exposed to the solution side of the particle/solution interphase due their location at the outer particle shell periphery, ML formation likely follows the binding of metal ions to charges carried by loose polymer chains located within the dilute shell component identified in ref. 28. For p(MA-N) particles, the magnitude of the variation in K_{ML} ratio with changing solution salinity invokes a metal partitioning at the shell interphase phase dominated by a Donnan effect. Such a difference between the two particles emphasizes once again an impact of the charge location within the shell on metal complexation. It is emphasized that the above comparison between experimental results and theory does not involved any adjustable parameter.

Closer inspection of Fig. 4A reveals that experimental results obtained with p(MA-N) as particulate ligand are better reproduced if considering the surface potential y_0 instead of the bulk Donnan potential for the evaluation of the electrostatic contribution f_{elec} of the complex stability constant. This indicates that metal ions in the shell are preferably positioned at the outer particle shell rather than in the particle volume domain, which is *a priori* not consistent with the location of the charges expectedly present in the vicinity of the core. We add however that the density of charges determined from potentiometric titration is taken constant throughout the whole shell phase and therefore the representation of the electric potential profile throughout the shell may be inappropriate as we then neglect the preferential confinement of the charges close to the core surface. Since the radial distribution of charges density across the shell was suggested in ref. 28 as being sharp and highly dense near the core, we attempted to confront our metal binding results obtained with p(MA-N) following the same Donnan approach but with considering a reduced shell thickness that is comparable in size to that of the condensed shell phase, *ca.* 10 nm thick.[28] However, the so-recalculated $K_{ML}^{y_r}$ ratios are then shifted towards higher values due to concomitant enhancement of the volume charge density, and consequently the deviation from experimental data is more pronounced (not shown). To achieve an acceptable fit of data, decreasing value of ρ_0 is necessarily required. The guess of both the volume charge density and the shell thickness parameters without precise knowledge of the charge distribution obviously becomes speculative. Despite these uncertainties, results given in Fig. 4A suggest that only a fraction of the reactive sites, located at the edge of the Donnan volume, significantly contributes to metal complexation.

In Fig. 4B, we treat an alternative scenario where volume charge densities are derived from previously published electrokinetic data.[28] This provides ten-fold lower values of ρ_0 compared to those stemming from potentiometric titrations due to the reduced peripheral shell region probed by the electroosmotic flow under electrophoresis conditions.[28] The electrophoretic particle mobility is indeed determined by the only fraction of carboxylic groups located within the peripheral electrokinetically-active zone of the shell whose thickness is few times the Debye length.[13,51] Following this approach, at pH 7.5 the maximum charge densities achievable are −32 mM and −25 mM for p(N-AA) and p(MA-N) particles, respectively. The corresponding implications on ML stability constant ratio are given in Fig. 4B. Obviously, the tested scenario is not consistent with metal binding by p(MA-N) particles as experimental values now become significantly higher than the resulting $K_{ML}^{y_r}$ ratios. Electrokinetic data then provide a severe underestimation of the volume density of carboxylic groups involved in metal complex formation because they do not involve the contribution of the charges located in the vicinity of the particle core that are not detectable under electrokinetic conditions. On the opposite, a good agreement is found for the p(N-AA) case for which experimental values are now intermediate between scenarios where ML formation occurs at the particle surface and in the Donnan 'volume'. Recalling that the charge density considered here pertains to the carboxylic groups located at the outer shell periphery, we can conclude that metal ions experience electrostatic field in the outer domain of the shell, which is again consistent with the expected location of the metal binding carboxylic moieties. Even more interesting is the variation of the K_{ML} ratios with temperature, which suggests a transition between particle surface complexation to a 'volume' complexation upon increasing temperature from 15 °C to 35 °C. This finding is in line with particle shell shrinking that leads to a reduction in the number of chains freely protruding from the particle surface toward the outer electrolyte solution, and thus to a better definition of a step-like electrostatic Donnan transition from bulk particle to outer electrolyte solution. As a last result, we evaluated the intrinsic component of the K_{ML} constants using values collected in Table 1 and the electrostatic contribution identified according to the above analysis. We obtained $\log K_{int}$ = 0.40, 0.48 and 0.75 for p(N-AA) and $\log K_{int}$ = 0.50, 0.51 and 0.90 for p(MA-N) at 15, 25, 35 °C, respectively. For a given temperature, the K_{int} values are relatively close between the two particles, evidencing a similar intrinsic chemical contribution to the Cd binding with p(N-AA) and p(MA-N) particulate ligands. In agreement with the discussion provided in Section 4.3, the increase of K_{int} with temperature reflects the enhancement of binding cooperative effects triggered by structural changes.

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

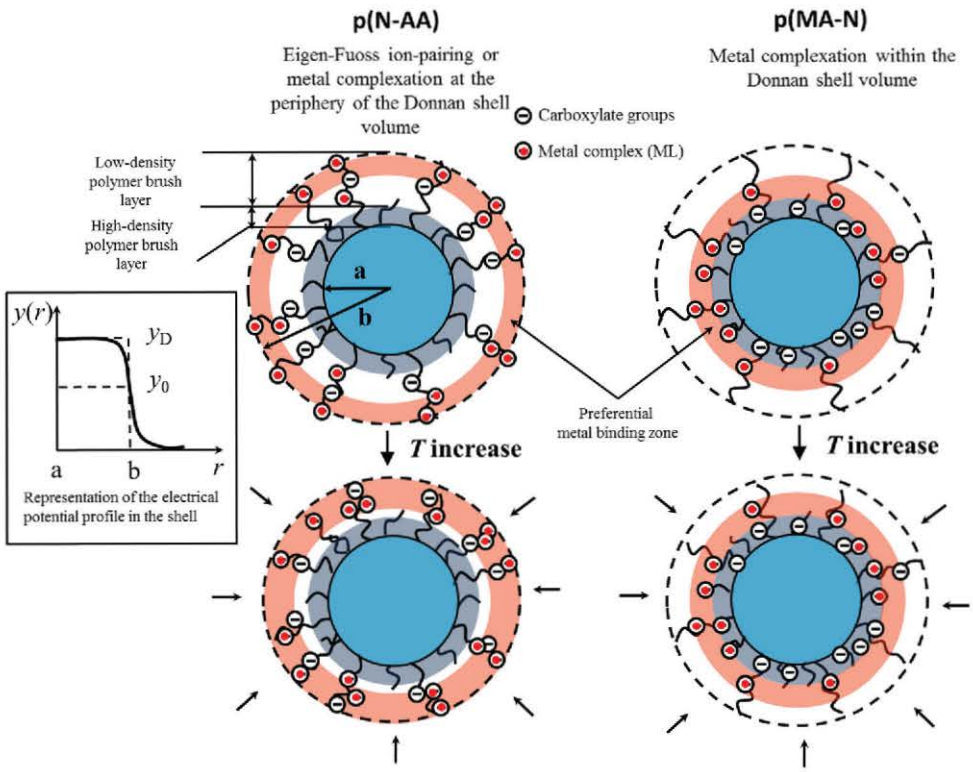


Fig. 5 Schemes representing the preferential locations of metal binding in the shell compartments of p(N-AA) and p(MA-N) particulate ligands according to temperature (see text for more details).

Overall interpretation of metal binding properties of responsive core–shell nanoparticles. To summarize the results, we report in Fig. 5 schemes representing the location of metal complexes within the shell of p(N-AA) and p(MA-N) particles as a function of temperature. At 15 °C, Cd-binding by p(N-AA) particles occurs at the level of the reactive sites preferentially located at the outer region of the shell, leading to a relatively weak heterogeneity in metal binding ($\Delta\alpha$ = 0.66 and 0.80 at 15 mM and 100 mM solution ionic strength, respectively). This scenario is supported either by an ion-pairing complex formation or by metal binding at the edge of a polyelectrolyte Donnan volume. At 35 °C, the formation of metal complexes takes place in a more condensed Donnan volume. Under such temperature condition, the heterogeneity in metal binding is more pronounced as compared to the situation at 15 °C. This is attributed to the shrinking of the polymeric shell that brings metal binding sites closer to each other, which enhances the cooperativity in metal binding process and therewith the heterogeneity in metal complex forms and stability. In the case of p(MA-N) particles, a scenario of ion-pair complexation mediated by Coulombic interactions clearly fails to describe experimental data. The electrostatic contribution to metal binding by carboxylate moieties is better defined by a Donnan approach despite the difficulty to unambiguously define the applicable charge distribution. It should be noted that p(MA-N) particles exhibit higher stability complexes, which evidences efficient cooperativity in metal complexation leading to formation of multidentate complexes as compared to the situation met with p(N-AA) particulate ligands. Cd complexation by p(MA-N) particles thus occurs preferentially within the particle shell, which leads to broader distribution in metal complex stability constants compared to that obtained with p(N-AA) particles.

5. Conclusions

The results reported in this work on the thermodynamics of Cd binding by core–shell p(MA-N) and p(N-AA) nanoparticles give a rich overview about the effects of (i) reactive particulate shell structure and (ii) charges location within the shell on metal complexation processes. Despite weak Cd interactions with carboxylate groups, we demonstrate here that features (i) and (ii) above dramatically affect metal complex stability and heterogeneity in metal binding. The latter mainly stems from the dehydration of the shell through the increase in temperature and the associated spatial condensation and shrinking of the polymeric shell. The results obtained here with a well-controlled and characterized colloidal particle raise several questions regarding the relevance of current thermodynamic framework commonly adopted for quantifying metal binding by environmental colloids, which includes ubiquitous humic matter adsorbed on *e.g.* mineral particles, or various types of bacterial cell walls, all consisting of soft polymeric material. Indeed, these models (*e.g.* NICA-Donnan,[52] WHAM[53]) or mineral surfaces (*e.g.* Dzombak–Morel model[54], CD-Music[55]) mostly ignore details of soft structure organization, stimuli (temperature, pH or salinity)-mediated structure modifications

 This journal is © the Owner Societies 2016

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

and how these affect particle–metal complex stability and intraparticulate metal binding heterogeneity. This work provides a first basis for understanding these effects and it further details a methodology for evaluating the relevant intraparticulate metal binding region from application of refined soft particle electrostatic models.

Acknowledgements

This work was partially supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT-Portugal) and COMPETE (FEDER), project PTDC/CTM-POL/3698/2014.

References

1 J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems: an Analytical Approach*, Ellis Horwood series, Chichester, UK, 1988.
2 M. Filella, in *Environmental colloids and particles: behaviour, separation and characterisation*, ed. K. J. Wilkinson and J. R. Lead, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, UK, 2007, pp. 17–93.
3 G. E. Batley, in *Trace Element Speciation in Surface Waters and Its Ecological Implications*, ed. G. G. Leppard, Springer, US, 1983, pp. 17–36.
4 L.-S. Wen, P. Santschi, G. Gill and C. Paternostro, *Mar. Chem.*, 1999, **63**, 185–212.
5 H. P. van Leeuwen and J. Buffle, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 7175–7183.
6 J. P. Pinheiro, M. Minor and H. P. van Leeuwen, *Langmuir*, 2005, **21**, 8635–8642.
7 H. P. van Leeuwen, J. Buffle, J. F. L. Duval and R. M. Town, *Langmuir*, 2013, **29**, 10297–10302.
8 J. Duval, K. Wilkinson, H. Van Leeuwen and J. Buffle, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 6435–6445.
9 E. Dague, J. Duval, F. Jorand, F. Thomas and F. Gaboriaud, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 2612–2621.
10 J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer and J. F. L. Duval, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 3293–3312.
11 F. Gaboriaud, M. L. Gee, R. Strugnell and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2008, **24**, 10988–10995.
12 E. Rotureau, F. Thomas and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2007, **23**, 8460–8473.
13 J. F. L. Duval and F. Gaboriaud, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, **15**, 184–195.
14 M. Eigen, *Pure Appl. Chem.*, 1963, **6**, 97–116.
15 R. M. Town, J. Buffle, J. F. L. Duval and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2013, **117**, 7643–7654.
16 H. P. van Leeuwen, R. M. Town and J. Buffle, *Langmuir*, 2011, **27**, 4514–4519.
17 R. M. Town, J. F. L. Duval, J. Buffle and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 6489–6496.
18 H. P. van Leeuwen, J. Buffle and R. M. Town, *Langmuir*, 2012, **28**, 227–234.
19 Z. Zhang, J. Buffle and D. Alemani, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41**, 7621–7631.
20 J. F. L. Duval, J. P. Pinheiro and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 7137–7151.
21 J. F. L. Duval, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 2275–2293.
22 J. F. L. Duval and S. Qian, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 12791–12804.
23 J. Lluís Garcés, F. Mas, J. Cecília, E. Companys, J. Galceran, J. Salvador and J. Puy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, **4**, 3764–3773.
24 C. Rey-Castro, S. Mongin, C. Huidobro, C. David, J. Salvador, J. L. Garcés, J. Galceran, F. Mas and J. Puy, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 7184–7191.
25 E. Rotureau and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 7177–7184.
26 J. A. Leenheer, G. K. Brown, P. MacCarthy and S. E. Cabaniss, *Environ. Sci. Technol.*, 1998, **32**, 2410–2416.
27 N. Fatin-Rouge, A. Milon, J. Buffle, R. R. Goulet and A. Tessier, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 12126–12137.
28 J. R. S. Martin, I. Bihannic, C. Santos, J. P. S. Farinha, B. Demé, F. A. M. Leermakers, J. P. Pinheiro, E. Rotureau and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2015, **31**, 4779–4790.
29 J. P. Pinheiro, L. Moura, R. Fokkink and J. P. S. Farinha, *Langmuir*, 2012, **28**, 5802–5809.
30 J. Galceran, E. Companys, J. Puy, J. Cecilia and J. L. Garces, *J. Electroanal. Chem.*, 2004, **566**, 95–109.
31 R. M. Town, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 4014–4021.
32 R. M. Town and H. P. van Leeuwen, *Aust. J. Chem.*, 2004, **57**, 983–992.
33 H. P. van Leeuwen, R. M. Town, J. Buffle, R. F. M. J. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk and L. Sigg, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 8545–8556.
34 J. Pinheiro and H. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 2004, **570**, 69–75.
35 D. D. DeFord and D. N. Hume, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 5321–5322.
36 V. G. Levich, *Physicochemical hydrodynamics.*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1962.
37 H. van Leeuwen and R. Town, *J. Electroanal. Chem.*, 2002, **536**, 129–140.
38 R. M. Town and H. P. van Leeuwen, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 458–471.
39 R. M. Town and H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 2003, **541**, 51–65.
40 H. Van Leeuwen and R. Town, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 3945–3952.
41 S. P. C. Alves, J. P. Pinheiro, J. P. S. Farinha and F. A. M. Leermakers, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 3192–3206.
42 J.-P. S. Sagou, E. Rotureau, F. Thomas and J. F. L. Duval, *Colloids Surf., A*, 2013, **435**, 16–21.
43 S. C. C. Monterroso, H. M. Carapuca, J. E. J. Simao and A. C. Duarte, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **503**, 203–212.
44 G. Anderegg, *Pure Appl. Chem.*, 1982, **54**, 2693–2758.
45 C. G. Sinn, R. Dimova and M. Antonietti, *Macromolecules*, 2004, **37**, 3444–3450.
46 H. D. Burrows, D. Costa, M. L. Ramos, M. d. G. Miguel, M. H. Teixeira, A. A. C. C. Pais, A. J. M. Valente, M. Bastos and G. Bai, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 7950.

47 F. M. M. Morel and J. G. Hering, *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*, Wiley-Interscience, New York, 1st edn, 1993.
48 R. M. Fuoss, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 5059–5061.
49 C. Malmberg and A. Maryott, *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 1956, **56**, 1–8.
50 H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **323**, 92–97.
51 M. Moussa, C. Caillet, R. M. Town and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2015, **31**, 5656–5666.
52 E. Tipping, *Comput. Geosci.*, 1994, **20**, 973–1023.
53 D. G. Kinniburgh, C. J. Milne, M. F. Benedetti, J. P. Pinheiro, J. Filius, L. K. Koopal and W. H. Van Riemsdijk, *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**, 1687–1698.
54 D. A. Dzombak and F. M. M. Morel, *Surface Complexation Modeling: Hydrous Ferric Oxide*, John Wiley & Sons, 1990.
55 T. Hiemstra and W. H. Van Riemsdijk, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **179**, 488–508.

Published on 07 November 2016. Downloaded by Universite de Lorraine on 14/03/2017 13:50:39.

 This journal is © the Owner Societies 2016

Résumé

La biodisponibilité d'un métal pour un organisme donné correspond à la fraction de ce métal qui est potentiellement bioadsorbable et/ou biointernalisable. Elle dépend de la composition physicochimique du milieu, de la nature des surfaces biologiques considérées et elle est modulée par la réponse cellulaire des organismes. Dans un contexte environnemental, l'analyse des processus contrôlant la bioassimilation des métaux est essentielle pour une prédiction fiable de leur biodisponibilité et toxicité. Dans ce manuscrit sont détaillés des développements théoriques et expérimentaux visant à comprendre la dynamique de partition de contaminants métalliques aux interfaces microbiennes et les déterminants de leur biodisponibilité selon une approche qui dépasse les cadres thermodynamiques classiques (modèle BLM). Après une partie introductive et une revue de l'état de l'art, le troisième chapitre de cette thèse est dédié à l'élaboration d'un formalisme pour l'évaluation quantitative de la bio-partition hors-équilibre de métaux traces aux interfaces biologiques. Ce modèle théorique est basé sur les expressions des flux de contaminants depuis la solution extracellulaire vers la surface biologique par diffusion/conduction, des flux d'internalisation et excrétion à travers la membrane, et il tient compte de la cinétique de déplétion des métaux en solution. Le formalisme intègre par ailleurs les processus de complexation intracellulaire des métaux sur la base d'un mécanisme d'Eigen généralisé. Dans le quatrième chapitre, des souches d'*Escherichia coli* ont été génétiquement modifiées pour (i) limiter leurs capacités d'excrétion des métaux et (ii) sur-exprimer des protéines intracellulaires ayant une forte affinité pour ces métaux. Des données expérimentales issues de suivis cinétiques de déplétion de Cd(II) réalisées à différentes fractions volumiques en bactéries ont permis de conforter avec succès les bases de la théorie élaborée dans cette thèse pour la partition de métaux à des biointerfaces molles chargées. Un dernier chapitre est consacré à l'évaluation quantitative de la réponse de biosenseurs luminescents en présence de métaux. Ce formalisme décrit la façon avec laquelle la dérivée temporelle des biosignaux dépend de la dynamique d'internalisation du métal, de la cinétique de formation de complexes intracellulaires régulateurs des processus de transcription et de leurs stabilités, et des processus de bio-sorption passive. Une confrontation avec des données expérimentales issues de biosenseurs sensibles au cadmium a permis de mettre en évidence l'inapplicabilité des modèles d'équilibre de biodistribution des métaux, et de prédire la réponse des biosenseurs à des variations de la salinité du milieu, de la concentration cellulaire et de la concentration bulk de métaux.

Mots clefs : biodisponibilité, spéciation hors-équilibre, biointerfaces, biosenseurs, électrostatique, diffusion, déplétion.

Abstract

Bioavailability of metal ions toward living organisms refers to the metal fraction they potentially adsorb and/or internalize. It is governed by the physicochemical medium composition, the nature of the biological surface considered and it is further mediated by the cellular response of the organisms. Within an environmental context, a fine understanding of the processes controlling metal biouptake is mandatory to predict bioavailability and toxicity of metallic contaminants. Here are detailed theoretical and experimental developments to broaden our knowledge on dynamic partitioning of metallic contaminants at microbial interfaces beyond the standard thermodynamic representation (BLM model). After an introduction and a state of the art section, the third chapter is devoted to the elaboration of a rationale for the evaluation of the processes governing metal biouptake under relevant out-of-equilibrium conditions. The formalism expresses the fluxes of contaminants from bulk medium to the biosurface via conductive diffusion, the biouptake and excretion fluxes with account of metal depletion kinetics in the extracellular medium. It also includes chemodynamics of intracellular metal complexation as described by a generalized Eigen scheme. In the fourth chapter, strains of *Escherichia coli* were genetically modified to limit metal excretion ability and overexpress strong intracellular proteinaceous chelators. Quantitative interpretation of metal depletion kinetic data confort the bases of the theory developed in this PhD work on metal partitioning at soft charged biointerfaces. The final chapter deals with a development of a theoretical framework for understanding -on a mechanistic level- the response of metal-sensitive whole-cell bioreporters. The theory explicitly deciphers how the time derivative of bioreporters signal intensity is governed by the dynamics of metal biouptake, by the formation kinetics and stability of the intracellular complexes acting as transcriptional regulators, and by passive biosorption. The model predictions are successfully collated with cadmium detection data collected with genetically modified *Escherichia coli* luminescent bioreporters that exhibit various lipopolysaccharidic surface structures. The analysis dismisses the applicability of thermodynamic metal biopartitioning models and it clearly defines the physicochemical medium composition in line with optimum biosensing of the bioavailable metal fraction.

Keywords : bioavailability, chemodynamics of metal complexes, biointerfaces, whole-cell metal-sensing bioreporters, electrostatics, diffusion, bulk metal depletion.