

Université de Montréal

**Étude de la spéciation et de la biodisponibilité du
samarium en présence de matière organique naturelle
avec l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii***

Par Justine-Anne Rowell

Département de chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de *Maître ès sciences* (M.Sc.) en chimie

Janvier 2018

© Justine-Anne Rowell, 2018

Résumé

Dans l'optique d'un intérêt technologique croissant pour les éléments de terres rares (ÉTR), il apparaît essentiel d'évaluer leur potentiel impact environnemental. Ainsi, la présente étude porte sur la spéciation et la biodisponibilité de ces éléments métalliques, concepts au cœur desquels se trouve l'ion libre, généralement associé à la biodisponibilité des métaux. Selon les modèles de toxicité actuellement utilisés, la complexation des métaux par des ligands organiques devrait réduire la concentration de l'ion libre et donc, en diminuer la biodisponibilité pour les organismes aquatiques. De récentes études ont toutefois montré des taux d'internalisation supérieurs aux prédictions pour les ÉTR en présence de ligands organiques simples. Ainsi, il semblait nécessaire d'évaluer l'influence de la matière organique naturelle (MON), composée de ligands organiques complexes, sur la spéciation et la biodisponibilité des ÉTR. Dans le cadre de cette étude, le samarium (Sm), un lanthanide de masse molaire intermédiaire, et l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ont été utilisés. La concentration de l'ion libre a été mesurée expérimentalement sur une résine d'échange cationique (IET) en mode dynamique et modélisée par calculs thermodynamiques. Parallèlement, des expériences de bioaccumulation ont permis de mesurer les taux d'internalisation de Sm dans les algues. L'effet de 4 types de MON, d'origine et de composition différentes, a été évalué. Les résultats démontrent clairement que la présence de MON provoque une importante diminution des taux d'internalisation du Sm, les acides humiques semblant responsables d'une plus importante complexation de l'ion libre que les acides fulviques. Les résultats suggèrent également que les concentrations d'ion libre mesurées expérimentalement permettent une meilleure prédiction de l'internalisation du Sm que les concentrations totales ou modélisées avec les constantes d'équilibre existantes, actuellement utilisées dans les calculs thermodynamiques.

Mots-clés : samarium, spéciation, biodisponibilité, bioaccumulation, *Chlamydomonas reinhardtii*, résine d'échange ionique

Abstract

As technological interest for rare earth elements (REE) is growing, it is becoming more important to assess their potential environmental impact. Thus, the present study focuses on the speciation and bioavailability of these metallic elements, concepts at the center of which is the free ion, the metal species considered as the best predictor of metal bioavailability. According to the currently used toxicity models, the complexation of metals by organic ligands should reduce the free ion concentration and thus, decrease its bioavailability for aquatic organisms. However, recent studies have shown higher levels of REE internalization than predicted by the models in the presence of simple organic ligands. Thus, it seemed necessary to evaluate the influence of natural organic matter (NOM), composed of complex organic ligands, on the speciation and bioavailability of REE. In this study, samarium (Sm), a lanthanide of intermediate atomic weight, and the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* were used. The free ion concentration was experimentally measured on a cation exchange resin (IET) in dynamic mode and modeled by thermodynamic calculations. Short-term biouptake experiments were used to determine the internalization flux of Sm in algae. The effect of 4 types of NOM, of different origins and composition, was evaluated. The results clearly show that the presence of NOM induces a significant decrease in the internalization fluxes of Sm and that humic acids appear to be responsible for stronger complexation than fulvic acids. The results also suggest that the experimentally measured free ion concentrations allow a better prediction of the Sm internalization than the total or modeled concentrations with the existing equilibrium constants used in thermodynamic calculations.

Keywords: samarium, speciation, bioavailability, biouptake, *Chlamydomonas reinhardtii*, ion exchange resin

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Liste des tableaux..... | v |
| Liste des figures | vi |
| Liste des sigles | x |
| Liste des abréviations..... | xi |
| Remerciements..... | xiv |
| 1. Introduction | 1 |
| 1.1 Éléments de terres rares | 2 |
| 1.2 Spéciation des métaux..... | 4 |
| 1.3 Biodisponibilité..... | 12 |
| 1.4 Toxicité | 15 |
| 1.5 Matière organique naturelle (MON) | 16 |
| 2. Objectifs du projet | 19 |
| 3. Théorie des méthodes analytiques | 20 |
| 3.1 Modèles de biodisponibilité/bioaccumulation | 20 |
| 3.2 Résine d'échange cationique en mode dynamique | 24 |
| 4. Expériences préliminaires | 26 |
| 4.1 Courbe de croissance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 26 |
| 4.2 Traitement des résultats | 28 |
| 5. Determination of the speciation and bioavailability of Sm to <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> in the presence of natural organic matter | 32 |
| 5.1 Abstract | 33 |
| 5.2 Introduction..... | 34 |
| 5.3 Experimental section..... | 36 |
| 5.4 Results and Discussion | 41 |
| 5.5 Acknowledgments..... | 51 |
| 5.6 Supplementary information for Determination of the speciation and bioavailability of Sm to <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> in the presence of natural organic matter | 52 |
| 6. Conclusion | 58 |
| 7. Bibliographie | 61 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I. Caractéristiques des capteurs de spéciation dynamiques et à l'équilibre. Modifiée de van Leeuwen <i>et al.</i> (2005)..... | 8 |
| Tableau II. Horaire d'inoculation et de collecte de <i>C. reinhardtii</i> | 28 |
| Tableau III. Input data for thermodynamic calculations of Sm speciation using WHAM (Windermere Humic Aqueous Model) or Visual MINTEQ. For the commercially available NOM (Suwannee River fulvic acid, Suwannee River humic acid and Pahokee Peat fulvic acid, input concentrations were determined by gravimetry and verified by total organic carbon (TOC) analysis. The ratio of NOM: TOC was near 2 and in line with literature values (IHSS, 2017). For the Luther Marsh isolate, TOC concentrations were determined and converted to NOM concentrations by using the same estimate of the NOM carbon content (ca. 50%) and previously published measurements indicating that the humic substances were 90-95% humic acids (Al-Reasi, 2012). | 53 |

Liste des figures

- Figure 1.** Carte illustrant la répartition géographique des projets d'exploration minière d'éléments de terres rares (ÉTR) au Canada (NRC 2014). 1
- Figure 2.** Abondance des éléments de terres rares (ÉTR) dans la croûte terrestre (mol kg^{-1}) en fonction de leur numéro atomique (Z). Démonstration de la règle d'Oddo-Harkins. Tirée de Weltje (2003). 3
- Figure 3.** Tirées de Ma *et al.* (1999), ces figures illustrent les résultats d'une expérience portant sur la toxicité du cuivre (Cu) pour *Ceriodaphnia dubia* en présence d'acides humiques. Le pourcentage de survivants est présenté en fonction de la concentration totale de Cu (A) et de la concentration de l'ion libre (Cu^{2+}) (B). Les symboles représentent différentes concentrations d'acides humiques. 6
- Figure 4.** Échelles temporelles et spatiales associées aux principaux capteurs de spéciation pour différents systèmes environnementaux. Les acronymes PLM, DGT et DMT sont définis au tableau I. Modifiée de van Leeuwen *et al.* (2005). 7
- Figure 5.** Représentation modélisée de la structure des substances humiques. Tirée de Schulten *et al.* (1993). 17
- Figure 6.** Principaux processus physicochimiques entourant l'internalisation des métaux par un microorganisme aquatique. La formation de différents complexes entre ligands (L) et métaux (M) est illustrée selon qu'il s'agisse d'un ligand hydrophile (L_H) ou lipophile (L_L). R_{cell} représente des sites de transport membranaires et M_{int} le métal internalisé. Le rôle des ions compétiteurs tels que H^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} , est également pris en compte. Modifiée de Worms (2006). 21
- Figure 7.** Colonne IET remplie de résine d'échange cationique (Dowex 50W-X8), d'une longueur moyenne de 3-4 cm. 25
- Figure 8.** Courbe de croissance de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* sous régime lumineux continu ($60 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$). La densité cellulaire ($\times 10^6 \text{ cellules mL}^{-1}$) est exprimée en fonction du temps (h). Les deux lignes pointillées encadrent la phase de croissance exponentielle correspondant à une densité de $1-5 \times 10^6 \text{ cellules mL}^{-1}$ 27

Figure 9. Évolution de la surface cellulaire ($\text{cm}^2 \text{mL}^{-1}$) de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du temps (h) sous régime lumineux continu ($60 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{m}^{-2}$)27

Figure 10. Flux d'internalisation (J_{int}) du Sm en fonction de la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}) déterminée par calculs thermodynamiques (WHAM 7.0.5). Les données sont ici décrites par l'équation de Michaelis-Menten pour un $J_{\text{max}} = 1.0 \times 10^{-14} \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ et un $K_m = 2.0 \times 10^{-8} \text{M}$29

Figure 11. Représentation graphique schématisée de Lineweaver-Burk pour l'équation de Michaelis-Menten. J_{int} correspond au flux d'internalisation du métal, K_m représente la constante de Michaelis-Menten et $[\text{M}^{z+}]$, la concentration de l'ion libre. 30

Figure 12. Représentation graphique de Lineweaver-Burk du Sm internalisé par *C. reinhardtii* après 60 minutes d'exposition en fonction de la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}) déterminée par WHAM 7.0.5 avec $J_{\text{max}} = 1.9 \times 10^{-14} \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ et $K_m = 2.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 30

Figure 13. Sm internalisé par *C. reinhardtii* après 60 minutes d'exposition en fonction de la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}) déterminée par WHAM 7.0.5. Les données sont ici décrites par la fonction *Exponential rise to maximum* avec $J_{\text{max}} = 1.1 \times 10^{-14} \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ et $K_m = 6.7 \times 10^{-8} \text{M}$ 31

Figure 14. Sm internalization fluxes (J_{int}) for different concentrations of Sm^{3+} (thermodynamic calculations). Solid line corresponds to a weighted non-linear regression of the Michaelis-Menten equation with $J_{\text{max}} = (1.08 \pm 0.07) \times 10^{-14} \text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $K_m = (6.7 \pm 1.5) \times 10^{-8} \text{M}$. The dashed line corresponds to the calculated maximum diffusive flux of Sm^{3+} determined from Fick's (second) law calculations of spherical diffusion ($J_{\text{diff}} = D \cdot 1r + 1\delta \cdot \text{Sm}^{3+}$) using a measured cell radius, r , of $3.7 \times 10^{-4} \text{cm}$; a Sm diffusion coefficient of $6.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ (Yuan-Hui and Gregory 1974, Tan, Yang et al. 2017), and a diffusion layer thickness of $8 \times 10^{-4} \text{cm}$ (Whitfield and Turner 1979)). Error bars correspond to standard deviations determined from three technical replicates..... 42

Figure 15. Sm internalization fluxes (J_{int}) as a function of NOM concentration (mg C L^{-1}): SRFA (●), PPFA (▲), SRHA (■), LMDOM (◆). Error bars correspond to standard deviations determined for 3 technical replicates of 2 independently prepared algal cultures..... 43

Figure 16. Sm internalization fluxes (J_{int}) in the presence of 4 different sources of NOM: SRFA (●), PPFA (▲), SRHA (■), LMDOM (◆) as a function of Sm^{3+} concentrations, calculated using WHAM 7.0.5. The solid curve represents the Michaelis-Menten plot relating Sm biouptake to the concentration of Sm^{3+} as determined in Figure 14. The dashed line corresponds to the calculated maximum diffusive flux of Sm^{3+} . Error bars correspond to standard deviations determined for 3 technical replicates of 2 algal cultures. 44

Figure 17. Internalized Sm as a function of the washing agent (MES, EDTA) and the contact time (1, 5, 10, 15 min) for cells exposed to 1×10^{-7} M Sm for 30 min (pH 6.0) in the presence of 3 SRFA concentrations (1, 3, 5 mg C L⁻¹). Error bars correspond to standard deviations determined for 3 technical replicates. 45

Figure 18. Sm accumulation rates R_{acc} ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$) on the ion exchange resin as a function of calculated free ion concentrations (Sm^{3+}) determined in the absence of ligands (●) or in the presence of EDTA (■) and NTA (▲) (slope = $7.90 \times 10^6 \mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mol}^{-1}$, $R^2 = 0.916$). Error bars represent standard deviations ($n = 2$). 48

Figure 19. Samarium resin accumulation rate R_{acc} ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$) as a function of NOM concentration (mg C L⁻¹): SRFA (●), PPFA (▲), SRHA (■), LMDOM (◆). Error bars represent standard deviations ($n=2$). 49

Figure 20. (A) Internalized Sm in *C. reinhardtii* as a function of exposure time. Algae ($0.15 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$) were exposed to 7×10^{-8} M Sm in 0.01 M MES medium (pH 6.0), resulting in a calculated internalization flux of $(8.5 \pm 1.1) \times 10^{-15} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Error bars represent standard deviations ($n=3$). (B) Dissolved Sm concentrations in the exposure medium during a 60 min exposure of *C. reinhardtii* to 7×10^{-8} M Sm. 54

Figure 21. (A) Internalized Sm in *C. reinhardtii* as a function of exposure time in the presence of the Suwannee River fulvic acid (SRFA). Algae ($0.15 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$) were exposed to 1.2×10^{-7} M Sm and 1 mg C L⁻¹ SRFA in a pH controlled, 0.01 M MES medium, pH 6.0, 10^{-5} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Error bars represent standard deviations ($n=3$). (B) Concentration of dissolved Sm in the exposure medium during a 60 min exposure of *C. reinhardtii* to 1.2×10^{-7} M Sm and 1 mg C L⁻¹ SRFA. 55

Figure 22. Internalized Sm in *C. reinhardtii* after 30 min of exposure to 1×10^{-7} M Sm and 5 mg C L⁻¹ of the Suwannee River fulvic acid (SRFA) in 0.01 M MES medium, pH 6.0, 10^{-5} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Extraction of the surface-bound Sm was performed with either 10 mM EDTA or 10

mM DTPA and compared with controls obtained from an identical treatment of the cells using 10 mM MES. All extractions were conducted using a contact time of 1 min. 56

Figure 23. Resin accumulated Sm as a function of time ($\mu\text{g Sm g}^{-1} \text{min}^{-1}$) for a constant flow rate of 4 mL min^{-1} . $[\text{Sm}] = 1.67 \times 10^{-8} \text{ M}$ in the absence of ligands. The slope and standard deviations were calculated with SigmaPlot (slope = $0.140 \mu\text{g Sm g}^{-1} \text{min}^{-1}$, $R^2 = 0.990$). Error bars represent standard deviations ($n= 2$)..... 57

Liste des sigles

D : coefficient de diffusion du métal en solution ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

EC_{50} : concentration efficace médiane équivalente à un taux de mortalité de 50%

J_{diff} : flux de diffusion du métal en solution à l'état stationnaire ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)

J_{int} : flux d'internalisation du métal à travers la membrane cellulaire ($\text{mol cm}^2 \text{s}^{-1}$)

J_{max} : flux maximal d'internalisation du métal à travers la membrane cellulaire ($\text{mol cm}^2 \text{s}^{-1}$)

K_M : constante de Michaelis-Menten (M)

K_{Me} : constante de stabilité qui décrit la liaison du métal avec le site de transport (M^{-1})

L : ligand

M : métal d'intérêt

r : rayon cellulaire (cm)

R_{acc} : taux d'accumulation du métal sur la résine ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$)

δ : épaisseur de la couche de diffusion à proximité de la surface cellulaire (cm)

Liste des abréviations

La signification des abréviations est donnée en français et/ou en anglais, selon la langue originale. Aussi souvent que possible, les abréviations françaises sont utilisées. Par ailleurs, seules les abréviations anglaises sont employées au chapitre 5, comme il s'agit d'une publication rédigée en anglais. Lorsque nécessaire, une traduction est indiquée.

| | |
|----------------------|---|
| AF / FA | acide fulvique / <i>fulvic acid</i> |
| AH / HA | acide humique / <i>humic acid</i> |
| BDH | <i>British Drug Houses</i> |
| BLM | modèle du ligand biotique / <i>biotic ligand model</i> |
| Da | Dalton |
| DET | équilibration diffusive en couche mince / <i>diffusive equilibration in thin film</i> |
| DGT | gradients de diffusion sur couche mince / <i>diffusive gradients in thin films</i> |
| DMT | technique de membrane Donnan / <i>Donnan membrane technique</i> |
| DTPA | acide diéthylènetriaminepentaacétique |
| EDTA | acide étylènediaminetétraacétique |
| ÉTR / REE | éléments de terres rares / <i>rare earth elements</i> |
| FIAM | <i>free-ion activity model</i> |
| FQT | <i>fluorescence quenching titrations</i> |
| GIME | microélectrode à gel intégré / <i>gel-integrated microelectrode</i> |
| ICP-MS | spectrométrie de masse couplée à l'ionisation au plasma inductif / <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> |
| IDA | acide iminodiacétique |
| IET | technique d'échange ionique / <i>ion exchange technique</i> |
| IHSS | <i>International Humic Substances Society</i> |
| ISE | électrodes sélectives / <i>ion selective electrodes</i> |
| LMDOM | matière organique dissoute du marais Luther / <i>Luther marsh dissolved organic matter</i> |
| MES | acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique |
| mg C L ⁻¹ | milligramme de carbone par litre |

| | |
|-----------|---|
| MON / NOM | matière organique naturelle / <i>natural organic matter</i> |
| NIST | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| NTA | acide nitrilotriacétique |
| pH | potentiel hydrogène |
| PLM | perméation liquide sur membrane / <i>permeation liquid membrane</i> |
| PPFA | acide fulvique de la tourbière Pahokee / <i>Pahokee peat fulvic acid</i> |
| PTFE | polytétrafluoroéthylène |
| PVC | polychlorure de vinyle |
| rpm | rotation par minute |
| SRFA | acide fulvique de la rivière Suwannee / <i>Suwannee river fulvic acid</i> |
| SRHA | acide humique de la rivière Suwannee / <i>Suwannee river humic acid</i> |
| TAP | tris-acétate-phosphate |
| TOC | carbone organique total / <i>total organic carbon</i> |
| WHAM | <i>Windermere Humic Acid Model</i> |
| Z | numéro atomique |

« Imagination is more important than knowledge. »

- Albert Einstein

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Kevin J. Wilkinson, pour son accueil et sa confiance. À travers ce parcours riche et diversifié, j'ai pu bénéficier de son expérience, de sa patience et de son écoute attentive. C'est entourée de ressources intellectuelles et matérielles toujours renouvelées que j'ai eu la possibilité d'évoluer, personnellement et professionnellement, durant ces années passées au Laboratoire de biophysicochimie de l'environnement. Dans cette optique, j'aimerais aussi souligner les aventures, les défis et la complicité que j'ai eu la chance de partager avec mon binôme, Élise Morel. Ces trois années n'auraient définitivement pas été les mêmes sans notre amitié.

C'est avec toute mon affection que j'aimerais remercier Julien Bélanger, mon inépuisable source d'amour et d'encouragement, et mon inspirante petite sœur, Marie-Camille Rowell. Je remercie aussi les collègues et ami(e)s qui m'ont maintes fois écoutée, conseillée et encouragée : Madjid Hadioui, Ildephonse Nduwayezu, Laurie Fréchette-Viens, Ibrahim Greige, Trevor Theoret, Fabian Herzog, Caroline Peyrot, Elena Nadezhina, Stéphanie Poirier, Sébastien Maillette, Geneviève Granger, Geneviève Knapp, Cui Lei, Zhizhong Li, Faraz Mahmood Golmohamadi, François Fournel et tous les autres. Un merci tout spécial à Marc-Alexandre Fillion et Haleh Hadian, stagiaires qui ont significativement contribué à l'avancement de mon projet de recherche. Leur dévouement et leur implication resteront pour moi une immense source de fierté.

Merci à ma famille – Maman, Papa, Lyne, François, Florence et Adrien - pour leur fidèle soutien ainsi qu'aux précieux(ses) ami(e)s qui ont ponctué mon parcours d'imprévisibles projets : mon cercle de fermières – Florence, Mia, Camille, Véronique, Élisabeth, Anne et Carine – mes âmes sœurs nordiques – Gwyneth, Émilie et José – et La brume dans mes lunettes et son équipe – Anik, Luc, Alex, Anne, Zachary, Audrey, Véro et Marc-André – pour l'ambiance chaleureuse et le fabuleux café.

1. Introduction

Les métaux de la série des éléments de terres rares (ÉTR), composée des 15 lanthanides, du scandium (Sc) et de l'yttrium (Y) (Kogel 2006), sont connus pour leurs propriétés optiques, catalytiques et magnétiques uniques (Bauer, Diamond et al. 2010, Hurst 2010, Tse 2011). Entre autres sous forme d'aimants permanents, ces métaux sont utilisés dans la fabrication d'une multitude de produits de haute technologie tels que les panneaux solaires, les éoliennes et les véhicules électriques (NRC 2014). La consommation mondiale des ÉTR augmente de 8 à 12 % par année depuis près de 15 ans, une tendance qui promet de s'accroître avec le temps (NRC 2014).

La Chine contrôle actuellement une vaste majorité (> 90 %) du marché mondial des ÉTR et tend à en réduire l'exportation (NRC 2014, Migaszewski and Gałuszka 2015). Dans ce contexte, de nombreux pays, incluant les États-Unis, l'Australie et le Canada, s'intéressent à l'extraction minière de ces métaux sur leur propre territoire. De récentes estimations indiquent d'ailleurs que les gisements d'ÉTR canadiens pourraient représenter de 40 à 50 % des réserves mondiales (NRC 2014). Ainsi, un nombre grandissant de projets d'exploration minière s'installent sur le territoire canadien (figure 1). En 2017, aucun projet d'exploitation, de production ou de raffinage n'était toutefois entré en activité.

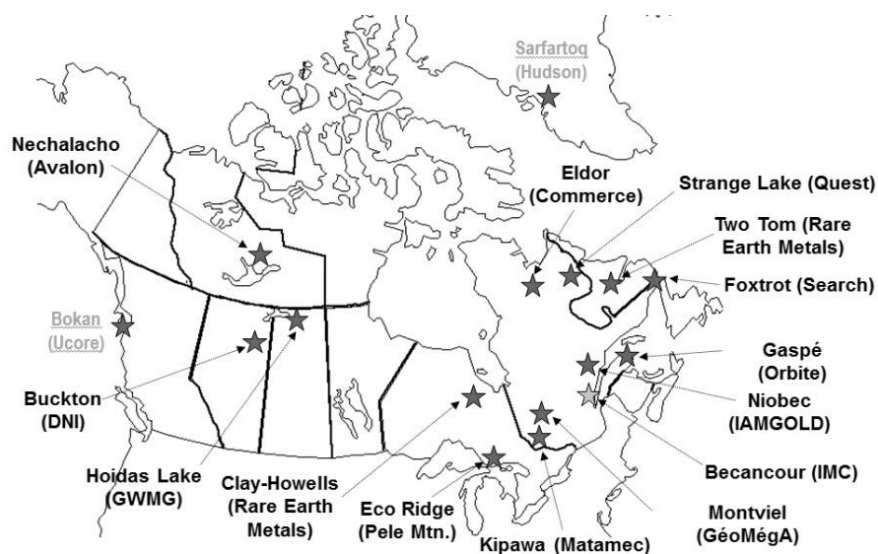


Figure 1. Carte illustrant la répartition géographique des projets d'exploration minière d'éléments de terres rares (ÉTR) au Canada (NRC 2014).

L'exploitation de ces ressources n'est cependant pas sans risques. En effet, alors que des concentrations de l'ordre du nanomolaire (nM) sont naturellement retrouvées dans les milieux aquatiques, des concentrations de l'ordre du micromolaire (μM) sont maintenant mesurées à proximité des sites miniers (Miekeley, Coutinho de Jesus et al. 1992, Noack, Dzombak et al. 2014). Pour favoriser une saine gestion des ressources minières, il apparaît donc essentiel d'étudier les potentiels risques environnementaux associés aux ÉTR. En effet, des études relatives au devenir de ces contaminants dans les rivières et les sols, et particulièrement sur les facteurs qui influencent leur spéciation et leur biodisponibilité, sont nécessaires.

Cette première section traitera des principaux enjeux entourant l'étude de la spéciation et de la biodisponibilité des métaux, et plus spécifiquement des ÉTR, ainsi que des connaissances actuelles sur le rôle de la matière organique naturelle (MON) sur la biophysicochimie de cette série d'éléments métalliques.

1.1 Éléments de terres rares

La série des éléments de terres rares (ÉTR) est composée du scandium (Sc), de l'yttrium (Y) et des 15 lanthanides ($Z = 21, 39, 57-71$) (Kogel 2006). Ces métaux présentent des propriétés catalytiques, optiques et magnétiques uniques (Bauer, Diamond et al. 2010, Hurst 2010, Tse 2011), facilitant leur utilisation dans une variété d'applications technologiques et industrielles : des batteries rechargeables aux semi-conducteurs, en passant par l'imagerie de résonance magnétique et le polissage du verre (Migaszewski and Gałuszka 2015).

Bien qu'ils soient surnommés « terres rares », ces éléments ne le sont pas particulièrement. En effet, le cérium (Ce) est plus abondant dans la croûte terrestre que le cuivre (Cu) ou le plomb (Pb) et la plupart des ÉTR sont plus communs que l'argent (Ag) et le mercure (Hg) (Taylor and McLennan 1985). Ils sont ainsi surnommés parce que leur découverte et leur isolation ne se sont complétées qu'en 1953 avec la purification du lutétium (Lu) (Emsley 2001). Par ailleurs, les ÉTR possédant un numéro atomique (Z) pair sont reconnus pour être jusqu'à 7 fois plus abondants dans la croûte terrestre que leurs voisins au numéro atomique impair, phénomène que l'on nomme « Effet d'Oddo-Harkins » (figure 2). Cet effet, selon lequel les atomes au numéro atomique pair sont plus abondants dans la croûte terrestre que ceux au numéro atomique impair,

a été observé pour la première fois en 1917 par Giuseppe Oddo et William Draper Harkins (Gonzalez, Vignati et al. 2014).

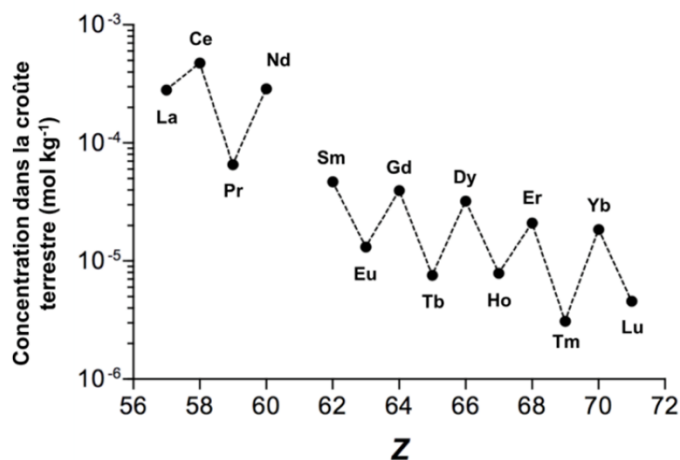


Figure 2. Abondance des éléments de terres rares (ÉTR) dans la croûte terrestre (mol kg⁻¹) en fonction de leur numéro atomique (Z). Démonstration de la règle d'Oddo-Harkins. Tirée de Weltje (2003).

Classés dans la 6^e période du tableau périodique, les lanthanides sont majoritairement trivalents; le cérium et l'euprium représentant l'exception en adoptant différents états d'oxydation (Ce⁴⁺ et Eu²⁺) si les conditions sont particulièrement oxydantes, ou réductrices (Henderson 1984). Tous les lanthanides possèdent une orbitale f peuplée d'électrons, caractéristique leur conférant des propriétés différentes de celles des éléments du bloc d. La contraction des lanthanides, définie comme la diminution du rayon atomique avec l'augmentation du numéro atomique, représente aussi une caractéristique propre aux lanthanides (Sonke 2006).

Présentant des propriétés physicochimiques similaires, les ÉTR sont difficiles à isoler les uns des autres (NRC 2014). Par ailleurs, ils présentent des rayons ioniques et une valence semblables aux actinides trivalents tels que l'uranium (U) et le thorium (Th) (Migaszewski and Gałuszka 2015), favorisant l'extraction simultanée d'ÉTR et d'éléments radioactifs (NRC 2014). Des risques radiatifs s'ajoutent donc, en cas de co-extraction, aux risques écotoxicologiques auxquels doivent faire face les écosystèmes et les travailleurs à proximité des sites miniers.

Principalement lithophiles, les ÉTR présentent une forte affinité pour la matière particulaire en suspension, les sédiments et les sols (Sneller, Kalf et al. 2000, Xinde, Xiaorong et al. 2000), et ont tendance à former des complexes avec des ligands organiques et inorganiques en milieux aquatiques. Les faibles concentrations d'ÉTR sous forme d'ion libre mesurées en eaux douces naturelles, du picomolaire (pM) au nanomolaire (nM), sont donc intimement liées à leur faible solubilité (Sneller, Kalf et al. 2000). La solubilité et le transport des ÉTR sont ainsi fortement influencés par le type de complexes métalliques formés. Il a en effet été démontré que les complexes de lanthanides formés de nitrates, de sulfates et de chlorures sont solubles, contrairement aux complexes formés de carbonates, de phosphates et d'hydroxydes (Wells and Wells 2000). Dans les sols de surface, les concentrations naturelles d'ÉTR peuvent atteindre 100 à 200 mg kg⁻¹ (Tyler 2004, Liang, Zhang et al. 2005). Les activités humaines peuvent toutefois contribuer à faire augmenter ces concentrations jusqu'à 1000 mg kg⁻¹ (Li, Chen et al. 2013). Malgré cela, les technologies de recyclage actuelles ne permettent que de récupérer une petite fraction de ces métaux, accentuant la contamination des sites d'enfouissement (Dodson, Hunt et al. 2012).

Le samarium (Sm), un lanthanide de numéro atomique intermédiaire ($Z = 62$) a été choisi dans le cadre de cette étude pour représenter la série des ÉTR. Découvert en 1879 par le chimiste français Paul Émile Lecoq de Boisbaudran, le Sm est aujourd'hui largement employé dans la fabrication d'aimants samarium-cobalt, résistants aux hautes températures et à la démagnétisation (Du and Graedel 2011). Également utilisé dans les réacteurs nucléaires pour la capture de neutrons (Weber and Reisman 2012), le Sm possède un total de 7 isotopes, parmi lesquels 3 sont plus stables (¹⁴⁷Sm, ¹⁴⁸Sm et ¹⁴⁹Sm) et 4 autres le sont moins (¹⁴⁴Sm, ¹⁵⁰Sm, ¹⁵²Sm et ¹⁵⁴Sm) (Adachi, Imanaka et al. 2004).

1.2 Spéciation des métaux

La spéciation des éléments métalliques, définie comme la distribution des formes chimiques sous lesquelles ces métaux peuvent être retrouvés dans un environnement donné, constitue la base d'une étude approfondie de leur biodisponibilité (Worms and Wilkinson 2008, Crémazy, Campbell et al. 2013, Liu 2015, Zhao and Wilkinson 2015). En milieu naturel, les métaux traces peuvent être retrouvés sous une multitude de formes chimiques, incluant sous forme d'ions libres (M^{Z+}), de complexes (Haraguchi, Itoh et al. 1998), ou d'espèces adsorbées à des colloïdes et des

particules en suspension dans la colonne d'eau. Les complexes peuvent être qualifiés d'inorganiques lorsqu'ils impliquent des ligands tels que les carbonates (CO_3^{2-}), les sulfates (SO_4^{2-}) et les phosphates (PO_4^{3-}), ou encore organiques, en présence de ligands organiques simples, d'origine synthétique ou naturelle, ou de matière organique naturelle (MON). Cette dynamique de complexation peut, à son tour, être influencée par le pH, la force ionique et la température du milieu. La présence de cations compétiteurs, tels que les ions H^+ ou les cations majeurs que sont le calcium (Ca^{2+}) et le magnésium (Mg^{2+}), peut aussi limiter la formation de complexes métalliques, et donc significativement modifier la spéciation des métaux (Buffle 1988).

Pour illustrer l'influence des conditions environnementales sur la spéciation chimique des métaux, comparons la distribution des espèces chimiques du Sm dans une eau typique du fleuve Saint-Laurent et dans l'eau Milli-Q. L'eau du fleuve Saint-Laurent peut être caractérisée par la présence de cations ($[\text{Ca}^{2+}] = 6.8 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Mg}^{2+}] = 2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Na}^+] = 4.3 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{K}^+] = 3.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) et d'anions majeurs ($[\text{Cl}^-] = 4.8 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{SO}_4^{2-}] = 2.4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{F}^-] = 2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$; $[\text{PO}_4^{3-}] = 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 1.3 \times 10^{-3} \text{ M}$), par un pH moyen de 7.6 et une concentration d'acides fulviques (AF) avoisinant les 5 mg L^{-1} . L'eau Milli-Q, quant à elle, se caractérise par l'absence de ligands ou d'ions compétiteurs. En effectuant une simulation par calculs thermodynamiques avec le logiciel WHAM 7.0.5 (*Windermere Humic Aqueous Model*), pour une concentration totale de Sm de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, il est possible d'obtenir la concentration des différentes espèces chimiques présentes en solution. Sous conditions naturelles, le Sm se trouve principalement complexé par la MON (> 97 %), l'ion libre (Sm^{3+}) représentant, quant à lui, moins de 1 % de la concentration totale. Inversement, en absence de ligands, l'ion libre représente plus de 99.99 % de la concentration totale, alors que le complexe hydroxyde SmOH^{2+} occupe la toute petite fraction restante.

Un consensus scientifique existe toutefois quant au rôle fondamental de l'ion libre. Généralement utilisé comme indice de prédiction de la biodisponibilité (Morel and Hering 1993, Campbell 1995, Zhao and Wilkinson 2015), et donc des potentiels effets biologiques des métaux, l'ion libre se trouve au cœur des mesures de spéciation (Ma, Kim et al. 1999). La figure 3 illustre l'importance de faire une distinction entre la concentration totale du métal et la concentration de l'ion libre. L'étude de Ma *et al.* (1999), portant sur la toxicité du Cu pour *Ceriodaphnia dubia* en

présence d'acides humiques, démontre clairement qu'une relation existe entre le taux de survie et la concentration de l'ion libre (Cu^{2+}), mais que cette corrélation est inexistante lorsque seule la concentration totale est prise en compte.

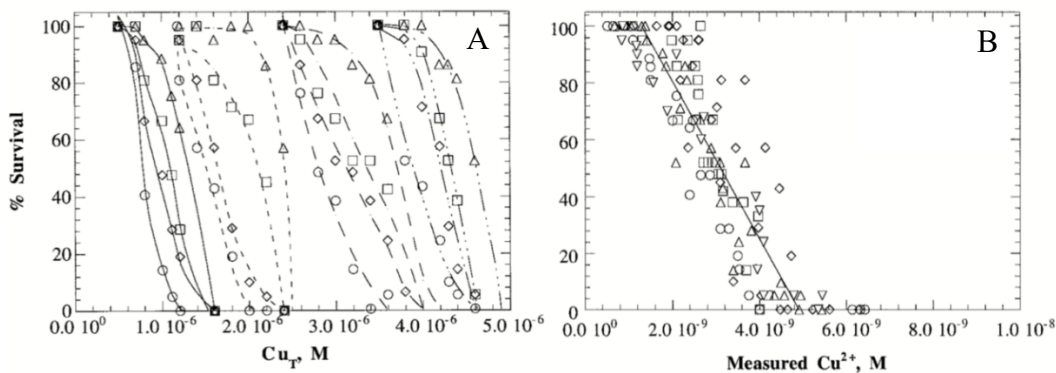


Figure 3. Tirées de Ma *et al.* (1999), ces figures illustrent les résultats d'une expérience portant sur la toxicité du cuivre (Cu) pour *Ceriodaphnia dubia* en présence d'acides humiques. Le pourcentage de survivants est présenté en fonction de la concentration totale de Cu (A) et de la concentration de l'ion libre (Cu^{2+}) (B). Les symboles représentent différentes concentrations d'acides humiques.

Ne représentant qu'une faible proportion de la concentration métallique totale, la détection et la quantification de l'ion libre exigent des techniques analytiques d'une grande sensibilité, permettant de travailler à de très faibles concentrations. Par ailleurs, ces techniques doivent être spécifiques à l'ion libre, tout en évitant de perturber la spéciation originale de l'échantillon. Pour être efficace en milieu naturel, un capteur de spéciation devrait également pouvoir être utilisé sous une vaste gamme de conditions physicochimiques, permettre une analyse multiélément et être suffisamment rapide pour constituer une analyse de routine (Crémazy, Leclair et al. 2015).

De nombreuses techniques analytiques permettent d'évaluer qualitativement et quantitativement la spéciation chimique des métaux. De manière générale, une méthode est caractérisée par des échelles temporelle et spatiale efficaces ou par une fenêtre cinétique qui définit les espèces métalliques mesurées en fonction de leur labilité. Défini comme la capacité d'un complexe à se dissocier et se réassocier à l'intérieur de l'échelle temporelle d'un capteur, le concept de labilité est essentiel à l'étude de la spéciation chimique. Ainsi, pour s'assurer que la technique utilisée mesure les espèces d'intérêt, il est nécessaire de tenir compte de la labilité des complexes en

solution (van Leeuwen, Town et al. 2005). Selon van Leeuwen *et al.* (2005), trois principales échelles temporelles peuvent être identifiées, soit :

- (i) La diffusion, durant laquelle les éléments sont transportés sur des distances variant entre 10-100 μm , à travers les membranes et gels de diffusion des capteurs.
- (ii) L'accumulation, dont la durée peut varier de quelques heures à plusieurs jours, est associée à l'adsorption des métaux sur la résine ou l'électrode de certains capteurs.
- (iii) L'équilibre, soit le temps requis pour atteindre l'état d'équilibre, pour un échantillon auquel aurait été ajouté un réactif ou après que les conditions physicochimiques aient été modifiées, par exemple.

Les deux premières échelles temporelles et leurs capteurs associés sont présentés à la figure 4.

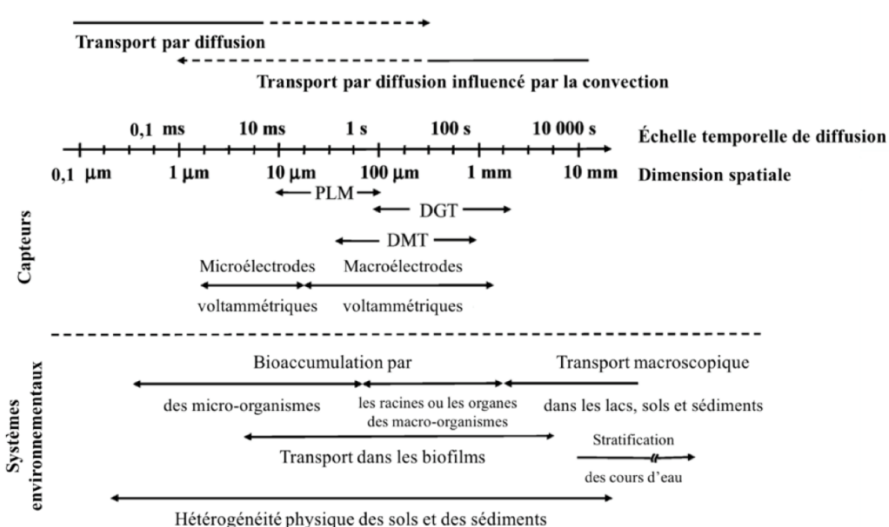


Figure 4. Échelles temporelles et spatiales associées aux principaux capteurs de spéciation pour différents systèmes environnementaux. Les acronymes PLM, DGT et DMT sont définis au tableau I. Modifiée de van Leeuwen *et al.* (2005).

Une première catégorie de capteurs permet d'étudier la spéciation dynamique, soit l'ion libre et une fraction des complexes labiles. Ces capteurs dynamiques sont basés sur la détection de flux métalliques ou sur l'accumulation de métaux durant une période donnée. Une autre catégorie de techniques est, quant à elle, basée sur l'atteinte de l'état d'équilibre après un temps donné. Les principales caractéristiques de ces techniques sont résumées au tableau I.

Tableau I. Caractéristiques des capteurs de spéciation dynamiques et à l'équilibre. Modifiée de van Leeuwen *et al.* (2005).

| | Méthodes | Bases physicochimiques | Espèces mesurées |
|---------------------------------|---|---|---|
| Techniques dynamiques | Voltampérométrie | Diffusion à travers l'échantillon | Ion libre + complexes dynamiques |
| | Gel-Integrated Microelectrode (GIME) Microélectrode à gel intégré | Diffusion radiale dans un gel | Ion libre + complexes dynamiques pénétrants |
| | Diffusive Gradients in Thin Film (DGT) Gradients de diffusion en couche mince | Diffusion planaire dans un gel | Ion libre + complexes dynamiques pénétrants |
| | Permeation Liquid Membrane (PLM) Perméation liquide sur membrane | Diffusion planaire dans l'échantillon et une membrane | Ion libre + complexes dynamiques |
| | Ion-Exchange Technique (IET) Technique d'échange ionique | Équilibre échantillon / résine | Ion libre |
| Techniques à l'équilibre | Ion selective electrodes (ISE) Électrodes sélectives | Équilibre ou potentiel de membrane stationnaire | Ion libre |
| | Diffusive Equilibration in Thin Films (DET) Équilibration diffusive en couche mince | Équilibre gel / échantillon | Toutes les espèces pénétrantes |
| | Donnan Membrane Technique (DMT) Technique de membrane Donnan | Équilibre échantillon / accepteur | Ion libre + une partie des complexes cationiques pénétrants |
| | Permeation Liquid Membrane (PLM) Perméation liquide sur membrane | Équilibre solution émettrice / réceptrice | Ion libre |
| | Ion-Exchange Technique (IET) Technique d'échange ionique | Équilibre échantillon / résine | Ion libre |

Parmi ces techniques, on compte :

La voltampérométrie qui permet la réduction ($M_{aq} + e^- \rightarrow M^0$) et l'accumulation du métal d'intérêt sur une électrode par l'application d'un potentiel spécifique. Le courant de réduction peut ensuite être associé aux flux d'accumulation d'ions libres et de complexes dynamiques.

La technique de microélectrode à gel intégré (*Gel-Integrated Microelectrode – GIME*) se caractérise, quant à elle, par une ou plusieurs microélectrodes séparées de l'échantillon liquide par une couche d'hydrogel. Cette dernière permet d'exclure les colloïdes de grande taille, considérés comme de potentiels interférents. Le système GIME est d'abord équilibré avec l'échantillon, puis le métal subit une réduction dans le gel selon un principe semblable à celui de la voltampérométrie.

La technique de gradients de diffusion en couche mince (*Diffusive Gradients in Thin Film – DGT*) est constituée d'un hydrogel positionné au-dessus d'une couche de résine Chelex. Les espèces métalliques diffusent vers la résine, à travers le gel, et s'y accumulent, créant un gradient de concentration entre l'échantillon et la résine. La labilité et les coefficients de diffusion des complexes sont directement liés à la quantité de métal qui s'accumulera sur la résine. Cette quantité, divisée par le temps de déploiement du dispositif permet de calculer le flux métallique.

La technique d'équilibration diffusive en couche mince (*Diffusive Equilibration in Thin Film – DET*) implique, quant à elle, l'équilibration de l'hydrogel et de la solution en absence de résine. Les espèces accumulées sur le gel sont ensuite analysées.

La technique de perméation liquide sur membrane (*Permeation Liquid Membrane – PLM*) est basée sur la séparation liquide/liquide et consiste en un solvant organique contenant un ligand sélectif au métal d'intérêt, intégré à une membrane hydrophobe, elle-même disposée entre deux solutions, l'échantillon et la solution réceptrice. La concentration du métal est mesurée en fonction du temps dans la solution réceptrice. Ainsi, si la diffusion au sein de la solution échantillon est limitante, la technique mesure à la fois l'ion libre et les complexes labiles. À l'inverse, si la diffusion à travers la membrane est limitante, seul l'ion libre est comptabilisé. La technique PLM peut également être utilisée en mode équilibre, pour mesurer la

concentration de l'ion libre, en laissant la diffusion s'effectuer jusqu'à l'atteinte de l'état d'équilibre.

La technique de résine d'échange ionique (*Ion-Exchange Technique* – IET) consiste en une colonne remplie de résine échangeuse d'ions permettant d'isoler et de quantifier la concentration de l'ion libre. Cette technique peut être employée en mode dynamique, en effectuant un suivi de l'accumulation du métal sur la résine en fonction du temps, ou en mode équilibre, en laissant la solution percoler à travers la résine jusqu'à ce que la concentration de métal soit identique à l'entrée et à la sortie de la colonne.

Le principe des électrodes sélectives (*Ion selective electrode* – ISE) est basé sur l'équilibre de l'ion intérêt entre une membrane ionique hydrophobe et la solution échantillon. Le potentiel de membrane à l'état d'équilibre est mesuré et permet de calculer la concentration de l'ion libre. Les électrodes sélectives sont différentes des électrodes classiques d'abord parce qu'elles sont chacune spécifique à un ion métallique, puis parce qu'elles n'impliquent pas de réactions d'oxydoréduction. Ainsi, l'élément fondamental d'une électrode sélective idéale est une fine membrane qui ne se lie qu'à l'élément d'intérêt.

La technique de membrane Donnan (*Donnan Membrane Technique* – DMT) est constituée d'une membrane poreuse chargée positionnée entre l'échantillon et une solution réceptrice. Les espèces sont donc séparées selon leur charge. Les mesures sont effectuées après l'atteinte de l'état d'équilibre.

Il existe également des modèles d'équilibre thermodynamique simplifiés qui permettent de dresser un portrait de la spéciation chimique d'un ou plusieurs éléments dans un milieu donné. Parmi ces modèles, on compte les logiciels WHAM (*Windermere Humic Aqueous Model*) (Tipping 1998) et Visual MINTEQ, qui permettent de calculer la spéciation et les équilibres chimiques des espèces métalliques au sein d'environnements aquatiques. Ils permettent de calculer les formes chimiques sous lesquelles ces métaux seront retrouvés dans un système en équilibre thermodynamique et ainsi en prédire la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité. Concrètement, ces calculs permettent d'obtenir les concentrations des différents complexes métalliques présents en solution pour une ou plusieurs espèces données. Les différents

complexes de Sm (SmOH^{2+} , $\text{Sm}(\text{CO}_3)_2^-$, SmCO_3^+ , SmHCO_3^{2+} , SmNO_3^{2+} , Sm : NOM, SmEDTA^- , etc.) ainsi que la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}), sont ainsi calculées pour une variété de conditions expérimentales : en présence et en absence de ligands (EDTA, NTA, AF, AH, etc.).

Dans ces modèles, la spéciation est calculée à partir d'une connaissance complète de la composition chimique de la solution et des constantes de stabilité des différents complexes métalliques (Fortin and Campbell 1998). Les constantes sont généralement déterminées expérimentalement, souvent par titrage, et compilées dans des bases de données telles que NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Il est cependant beaucoup plus difficile d'obtenir des constantes de stabilité pour des complexes avec ligands hétérogènes et polydispersés tels que les substances humiques. En effet, les métaux ne sont généralement pas liés à des ligands hydrophiles simples, pour lesquels les constantes sont bien connues, mais font plutôt partie de complexes hétérogènes, polyélectrolytiques et polydispersés avec les acides fulviques et humiques qui forment la matière organique naturelle (MON) (voir section 1.5) (Thurman 1985, Buffle 1988, Campbell, Twiss et al. 1997). Dans un tel cas, la valeur de la constante de stabilité changera en fonction du rapport métal:ligand, et par conséquent, il sera plus difficile de faire des prédictions précises à l'aide de bases de données thermodynamiques. Dans la mesure du possible, les calculs thermodynamiques de spéciation devraient toujours être confirmés expérimentalement (Twiss, Errécalde et al. 2001).

WHAM comprend les constantes de stabilités associées aux substances humiques, soit les acides fulviques et humiques, alors que Visual MINTEQ ne les inclus pas. Au contraire, Visual MINTEQ permet d'étudier les interactions entre les ÉTR et certains composés organiques tels que l'EDTA, le NTA, l'acide citrique et l'acide malique. Ainsi, les logiciels peuvent être utilisés en complémentarité pour une évaluation plus approfondie de la spéciation chimique des ÉTR. Pour assurer une constance dans les résultats obtenus, des paramètres d'entrée identiques ou équivalents doivent être introduits dans les deux logiciels. Les paramètres utilisés pour la présente étude sont présentés au tableau III (voir chapitre 5).

Dans la littérature, il y a cependant très peu de constantes de stabilité disponibles pour l'interaction des lanthanides et de la MON. Les constantes de stabilité (K_c) des complexes formés d'ÉTR et de MON ont d'abord été mesurées par électrophorèse capillaire par Sonke *et al.* (2006), sous une gamme de conditions naturelles (pH 6-9, $[\text{NaNO}_3] = 0.001\text{-}0.1 \text{ M}$, $[\text{ÉTR}] = 1\text{-}1000 \text{ nM}$, $[\text{MON}] = 10\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$) :



où MON^{-} représente les groupements carboxyliques déprotonés. La variabilité des constantes individuelles est intimement liée à la contraction des lanthanides. En effet, une augmentation de la valeur de K_c de 2 à 3 ordres de grandeur est observée du lanthane (La) au lutétium (Lu) ($8.9 < \log K_c < 16.5$), parallèlement à la diminution du rayon ionique, phénomène couramment appelé la contraction des lanthanides (Sonke and Salters 2006). Ces constantes restent les seules utilisées par le logiciel WHAM jusqu'à maintenant.

Plus récemment, Nduwayezu *et al.* (2016) ont évalué la constante de stabilité d'un complexe formé de Sm et d'acides fulviques de la rivière Suwannee (SRFA) par *quenching* de fluorescence, et ce, à différents pH. Variant entre 3.7 et 5.7, pour un pH se situant entre 5 et 7, ces $\log K_c$ sont nettement inférieurs aux constantes proposées par Sonke *et al.* (2006), suggérant que les modèles thermodynamiques surestiment à l'heure actuelle la complexation de l'ion libre, et donc en sous-estiment la concentration réelle. Étant donnés les problèmes associés avec la détermination des constantes d'équilibre et l'interprétation des techniques analytiques de spéciation chimique, les prédictions issues des modèles thermodynamiques comme WHAM doivent être interprétées avec précaution (Unsworth, Warnken et al. 2006).

1.3 Biodisponibilité

La biodisponibilité est définie comme la capacité d'un métal à interagir avec un récepteur biologique. Le concept de bioaccumulation, quant à lui, est décrit comme la capacité d'un élément à traverser les membranes biologiques et peut être défini par la concentration ou le flux de métal internalisé par un organisme, ici nommé flux d'internalisation (Worms, Simon et al. 2006). La biodisponibilité, souvent mesurée à travers la bioaccumulation, n'est toutefois pas seulement fonction des processus d'internalisation, mais également des conditions

physicochimiques du milieu, de la taille et de la nature de l'organisme (Worms, Simon et al. 2006).

Plusieurs facteurs influencent les effets biologiques que peuvent avoir les contaminants métalliques sur un organisme aquatique : les concentrations de métaux et de ligands, le pH, la force ionique et la température en sont de bons exemples. Ces facteurs peuvent influencer la biodisponibilité d'un élément en affectant directement la physiologie ou le métabolisme de l'organisme, ou encore y contribuer indirectement en modifiant la physicochimie du milieu étudié et donc la spéciation du métal.

De manière générale, les études cherchent à relier la spéciation chimique et la biodisponibilité des métaux d'intérêt. Elles tentent de démontrer la validité et l'applicabilité des modèles, ou d'en souligner les exceptions. Souvent focalisées sur la corrélation entre le flux d'internalisation et la concentration de l'ion libre, plusieurs études se sont toutefois attardées aux effets de compétition des cations majeurs et à l'influence des paramètres physicochimiques. Par souci de synthèse, les études présentées ci-dessous ne concernent que des algues vertes unicellulaires d'eau douce, bien que les conclusions des études puissent s'appliquer à une variété d'organismes aquatiques.

Parmi ces études, Slaveykova *et al.* (2002) ont pu démontrer que l'internalisation du Pb par l'algue verte *Chlorella vulgaris* pouvait être prédite par la concentration de l'ion libre (Pb^{2+}) en présence d'acides nitrilotriacétique (NTA), iminodiacétique (IDA), malonique et citrique. Ils ont également observé une diminution des flux d'internalisation à basse température et ont pu documenter l'effet compétiteur du Ca (Slaveykova and Wilkinson 2002). Des résultats similaires ont été obtenus par Kola *et al.* (2005), qui ont montré que l'internalisation du cadmium (Cd) par *Chlamydomonas reinhardtii* pouvait être prédite par la concentration de Cd^{2+} même en présence de MON. Ils ont souligné l'effet inhibiteur de plusieurs métaux : le molybdène (Mo), le manganèse (Mn) le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le calcium (Ca) et le plomb (Pb), sur l'internalisation du Cd, et l'absence d'effet compétiteur pour des concentrations similaires de magnésium (Mg) et de fer (Fe). Inversement, Slaveykova *et al.* (2003) ont observé des flux d'internalisation de Pb plus élevés que ceux prédits par l'activité de l'ion libre en présence de MON. Enfin, Worms *et al.* (2007)

ont démontré l'effet inhibiteur des cations H^+ et Mg^{2+} sur l'internalisation du Ni par *C. reinhardtii*, leur constante d'affinité pour les sites de transport membranaires étant du même ordre de grandeur que celle du Ni ($K_H = 10^{5.3} M^{-1}$; $K_{Mg} = 10^{5.1} M^{-1}$; $K_{Ni} = 10^{5.1} M^{-1}$). La compétition des cations d'aluminium (Al^{3+} ; $K_{Al} = 10^{8.0} M^{-1}$), de zinc (Zn^{2+} ; $K_{Zn} = 10^{6.5} M^{-1}$) et de cuivre (Cu^{2+} ; $K_{Cu} = 10^{6.6} M^{-1}$) s'est par ailleurs montrée beaucoup plus importante, proportionnellement à la valeur de leur constante d'affinité.

Bien que les métaux divalents aient été abondamment étudiés, le nombre d'études examinant la biodisponibilité des métaux trivalents reste limité (Di Toro, Allen et al. 2001). Dans cette optique, Crémazy *et al.* (2013) ont souligné l'incapacité des mesures d'ion libre seules à prédire l'internalisation du Sc, un métal trivalent non essentiel, par *C. reinhardtii*. Les résultats ont permis de mettre en lumière le rôle des hydroxo-complexes, dominant la spéciation des métaux trivalents, dans l'internalisation de ces derniers. Des résultats similaires ont été obtenus pour des études sur d'autres métaux trivalents comme l'Al (Wilkinson, Campbell et al. 1990) et le Fe (Shaked, Kustka et al. 2005), pour lesquels les complexes semblaient contribuer à la fraction biodisponible.

Yang *et al.* (2014) ont étudié l'internalisation de l'Eu par *C. reinhardtii* en présence d'acide malique et citrique ainsi que les effets compétiteurs du Sm. Tel qu'observé pour les métaux divalents, l'internalisation de l'Eu s'est trouvée inhibée par la présence du Sm. Toutefois, l'internalisation en présence de ligands s'est avérée supérieure aux prédictions basées sur la concentration de l'ion libre. L'étude semble également montrer que les complexes d'ÉTR contribuent à la biodisponibilité. Zhao *et al.* (2015) ont aussi étudié la biodisponibilité des ÉTR pour *C. reinhardtii* et montré qu'en présence de ligands organiques simples, l'internalisation mesurée était plus importante que les valeurs prédites par la concentration d'ions libres. Dans le cadre de cette étude, ces importants flux d'internalisation ont été attribués à la formation d'un complexe ternaire entre le complexe métallique (M-L) et le récepteur biologique. Plus récemment, Tan *et al.* (2017) ont validé ces résultats pour l'internalisation du Sm, toujours par *C. reinhardtii*, et montré qu'en présence de ligands organiques simples, l'internalisation ne pouvait pas être uniquement prédite par la concentration de l'ion libre. La contribution des complexes fut encore une fois proposée. Par

ailleurs, les effets de compétition de cations majeurs (Ca^{2+} et Mg^{2+}) et de trois lanthanides (La, Ce et Eu) ont aussi été démontrés dans cette étude.

En résumé, l'utilisation de l'ion libre semble être le meilleur prédicteur de l'internalisation des métaux traces en présence d'ions compétiteurs, bien que son utilisation ne semble pas être suffisante en présence de ligands, particulièrement pour les métaux trivalents. Malgré les avancées significatives de notre compréhension de l'évaluation des risques environnementaux des métaux, la complexité des milieux naturels reste difficile à circonscrire dans le cadre d'un modèle simplifié. Les effets cumulatifs des changements climatiques, des mélanges de métaux et des contaminants émergents, ainsi que la complexité des ligands naturels, feront partie des enjeux dont devront tenir compte les études futures pour mieux comprendre les relations qui unissent spéciation et biodisponibilité.

1.4 Toxicité

Naturellement, des effets biologiques peuvent être associés à l'internalisation de métaux traces. Ils peuvent entre autres se traduire par une altération de la photosynthèse, de la respiration, de la motilité ou de la croissance d'un organisme (Campbell, Errécalde et al. 2002). La toxicité d'un élément métallique dépend en effet d'une multitude de facteurs tels que la nature de l'organisme étudié, la voie d'exposition et la forme chimique de l'élément (Zielhuis 2006).

Jusqu'à maintenant, le La et le Ce semblent être les éléments pour lesquels la toxicité a été la plus étudiée, alors que les organismes modèles les plus utilisés sont les arthropodes, les algues et les poissons. Seulement 9 % des études identifiées par Gonzalez *et al.* (2014) portent sur le Sm. De plus, une majorité des études (89 %) portent sur les mélanges de lanthanides plutôt que sur leurs effets individuels.

Tai *et al.* (2010) ont démontré qu'administrés individuellement, 13 lanthanides (La, Ce, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb et Lu) inhibent de manière similaire la croissance de l'algue marine unicellulaire *Skeletonema costatum*, avec un EC_{50} (concentration efficace médiane pour un taux de mortalité de 50%) de $29.04 \pm 0.61 \mu\text{mol L}^{-1}$ pour une exposition de 96 h. Ils ont montré, par la même occasion, que l'intensité de l'inhibition de croissance ne

présentait pas de corrélation avec l'abondance naturelle de chaque élément. Ils ont aussi montré que l'algue n'est pas en mesure de différencier les lanthanides, c'est-à-dire que l'inhibition mesurée en présence des 13 éléments précédemment mentionnés était équivalente à la toxicité d'une même concentration totale d'un seul élément. Une différence a toutefois été observée entre la toxicité du Sc, de l'Y et des lanthanides, suggérant que ces éléments puissent être différenciés par l'algue. Enfin, la composition des milieux d'exposition semble jouer un rôle majeur dans l'étude de la toxicité des lanthanides (Gonzalez, Vignati et al. 2014).

1.5 Matière organique naturelle (MON)

Représentant l'ensemble des molécules issues de la dégradation des tissus organiques - végétaux, animaux, etc. - la matière organique naturelle (MON) est omniprésente dans les milieux aquatiques. Sa concentration et sa composition sont grandement influencées par son origine, allochtone ou autochtone, ainsi que par la température, la force ionique, le pH et la présence de cations majeurs. La MON d'origine autochtone est générée à même la colonne d'eau, par des macrophytes, des algues et des bactéries. Elle est davantage biodégradable que la MON d'origine allochtone, qui est, quant à elle, issue du lessivage des sols entourant les cours d'eau (Leenheer and Croué 2003).

La MON regroupe un nombre incalculable de macromolécules hétérogènes dites polyélectrolytiques, c'est-à-dire qu'elles présentent des charges multiples, généralement négatives. Cette répartition des charges peut varier, selon l'intensité de la complexation, provoquant des changements de conformation. La molécule se déploiera, par exemple, lorsque sa densité de charge augmentera, les charges se repoussant entre elles. Elles sont aussi polyfonctionnelles, comportant une variété de groupements fonctionnels riches en oxygène, tels que les acides carboxyliques et les groupes phénoliques, pouvant former des chélates avec les cations en solution (figure 5) (Thurman 1985). Leurs taille et masse molaire varient grandement, les plus petites molécules possédant une masse inférieure à 1000 daltons (Da) et les plus imposantes, une masse supérieure à 100 000 Da (Thurman 1985).

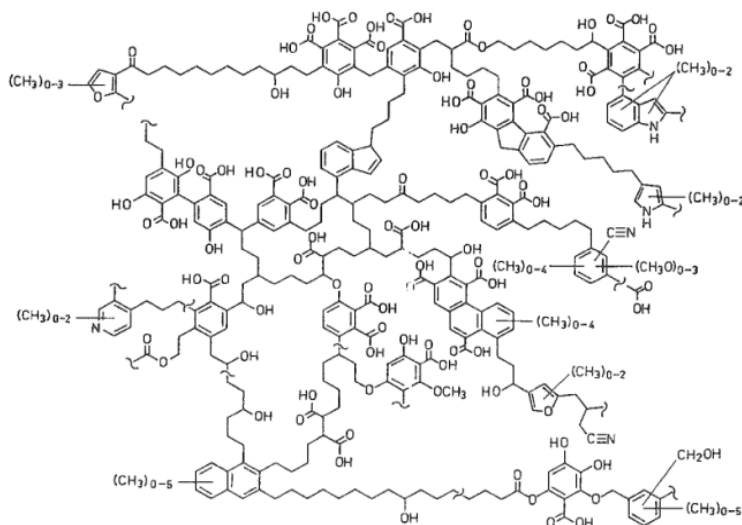


Figure 5. Représentation modélisée de la structure des substances humiques. Tirée de Schulten *et al.* (1993).

Retrouvée dans tous les environnements aquatiques, la MON est typiquement présente à des concentrations pouvant varier entre 1 et 15 mg carbone (C) L⁻¹ (Thurman 1985). Leenheer *et al.* (2003) vont jusqu'à mentionner des concentrations variant entre 0.1 mg C L⁻¹ dans les eaux souterraines et 50 mg C L⁻¹ dans les tourbières. Dans le cadre de cette étude sont distinguées deux principales catégories de MON aquatique, soit les acides humiques (AH) et les acides fulviques (AF), qui composent à elles seules 50 à 80 % de la matière organique dissoute (Buffle 1988). Connus pour posséder une masse molaire plus faible que les acides humiques, les acides fulviques présentent toutefois une composition en oxygène plus élevée, les rendant donc plus hydrophiles. Présentant des caractéristiques aussi variées et une abondance en milieux aquatiques, qu'ils soient tropicaux ou nordiques, il n'est pas étonnant que les molécules de MON soient impliquées dans un aussi grand nombre de processus biogéochimiques, qu'il s'agisse de la complexation et des réactions d'oxydo-réduction des métaux, des transformations photochimiques ou du cycle des nutriments. Plusieurs publications font d'ailleurs état des interactions, et de la possible accumulation de la MON sur les surfaces biologiques (Campbell, Twiss *et al.* 1997).

En ce qui concerne la bioaccumulation des métaux en présence de la MON, dès 1996, Parent *et al.* ont étudié la toxicité de l'Al pour l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* en présence d'AF

provenant de sols. Ils ont montré que l'internalisation n'était pas proportionnelle à la concentration de l'ion libre (Al^{3+}). Ils ont également démontré que l'adsorption de la MON sur la surface cellulaire était responsable d'une augmentation de la perméabilité membranaire. Inversement, l'exposition à l'Al semblait associée à d'une diminution de cette perméabilité. De plus, la présence d'AF semblait faciliter la croissance des algues par un apport en phosphore (P). Ainsi, Parent *et al.* (1996) ont mis en lumière l'importance de ne pas considérer que les effets de la MON sur la complexation métallique, mais aussi ses effets directs sur la physiologie et le métabolisme de l'organisme. Slaveykova *et al.* (2003) ont également porté une attention particulière aux effets directs de la MON sur l'algue verte *Chlorella kesslerii*, tout en étudiant l'internalisation du Pb en présence d'AF. Encore une fois, l'internalisation ne semblait pas uniquement prédite par la concentration de l'ion libre (Pb^{2+}), mesurée par électrode sélective. Une altération chimique de la membrane cellulaire, due à l'adsorption de MON, semblait expliquer cette sous-estimation des flux. Worms *et al.* (2015) ont reproduit cette étude en évaluant l'internalisation de Pb par *C. reinhardtii*. Tout en observant des résultats similaires pour *C. kesslerii*, ils ont pu montrer que l'internalisation de Pb par *C. reinhardtii* pouvait être prédite par la concentration de l'ion libre, mesurée par résine d'échange ionique.

Lamelas *et al.* (2009) ont, quant à eux, étudié l'effet des AH sur la bioaccumulation du Cd, du Cu et du Pb par *C. kesslerii*. En présence de 10 mg L^{-1} AH, les flux d'internalisation de Cd et de Cu étaient convenablement prédits par la concentration de l'ion libre. Pour le Pb, les flux d'internalisation et la quantité de plomb liée aux sites de transport et d'adsorption étaient toutefois nettement plus élevés que ce qui avait été mesuré en présence d'acide citrique, pour une même concentration d'ion libre. Ils ont alors suggéré la formation d'un complexe ternaire avec les sites de transport cellulaires. Ils ont pu démontrer qu'il existe une importante différence entre les processus d'internalisation de Cu, Cd et Pb, ainsi qu'entre leur spéciation dans la paroi cellulaire. Ils suggèrent finalement de tenir compte de la spéciation dans cette dernière, ainsi qu'à l'interface paroi/membrane cellulaire.

2. Objectifs du projet

À la lumière des résultats précédemment observés, le principal objectif de l'étude était d'évaluer l'influence de la MON sur la spéciation et la biodisponibilité des éléments trivalents de la série des ÉTR. Dans le cadre de cette étude, le samarium (Sm), un lanthanide de numéro atomique intermédiaire ($Z = 62$), a été choisi pour représenter la série des ÉTR. Nous avons initialement posé l'hypothèse que la complexation des métaux par la MON conduirait à une réduction de leur biodisponibilité, proportionnellement à la diminution de la concentration de l'ion libre. Nous avons d'abord étudié la biodisponibilité du Sm pour un organisme modèle – l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* – par le biais d'expériences de bioaccumulation réalisées en milieux contrôlés. Nous avons ensuite travaillé à l'optimisation d'une technique d'échange cationique de manière à quantifier expérimentalement les concentrations de Sm libre, utilisant des milieux expérimentaux identiques à ceux utilisés pour les expériences de bioaccumulation. Enfin, la biodisponibilité et la spéciation du Sm ont été évaluées en présence de quatre types de MON, d'origine et de composition différentes, de manière à vérifier l'applicabilité des modèles d'équilibre thermodynamique pour l'évaluation des potentiels risques environnementaux de ces importants éléments métalliques.

3. Théorie des méthodes analytiques

Les aspects théoriques des méthodes analytiques et modèles employés sont compilés dans la présente section. Y sont décrits les principaux processus biophysicochimiques entourant les expériences de bioaccumulation et l'utilisation de la technique de résine d'échange ionique. Les protocoles utilisés sont détaillés au chapitre 5.

3.1 Modèles de biodisponibilité/bioaccumulation

Des modèles d'équilibre thermodynamique, tels que le *Free-Ion Activity Model* (FIAM) et le Modèle du Ligand Biotique (*Biotic Ligand Model* - BLM) ont été développés pour faciliter l'étude des interactions entre métaux traces et organismes aquatiques (Campbell, Errécalde et al. 2002). Permettant de prédire la biodisponibilité des éléments métalliques en fonction de leur spéciation en solution, ces modèles sont couramment utilisés pour évaluer leurs potentiels risques écotoxicologiques. Ces modèles ont été développés à partir de nos connaissances actuelles sur l'interaction d'un métal avec les sites sensibles d'un organisme aquatique, qui sont elles-mêmes largement fondées sur les principes entourant l'interaction des métaux avec une électrode. De nombreuses études ont participé à la création et à l'amélioration de ces modèles, affinant leurs hypothèses et clarifiant leurs limites. Ayant fait ses preuves en milieu contrôlé, le BLM a effectivement facilité l'étude de nombreux métaux divalents tels que l'Ag, le Pb, le Cu et le Cd.

L'internalisation d'un métal trace par un organisme aquatique implique une série d'étapes spécifiques (figure 6) : (i) le transport ou la diffusion du métal de la solution externe vers la surface biologique, (ii) l'adsorption rapide et réversible du métal sur la surface cellulaire, représentée par un transporteur membranaire ou des sites d'adsorption non spécifiques sur la membrane ou la paroi cellulaire, (iii) une internalisation relativement lente du métal par l'organisme (Bates, Tessier et al. 1982, Hudson, Morel et al. 1990, Wilkinson and Buffle 2004).

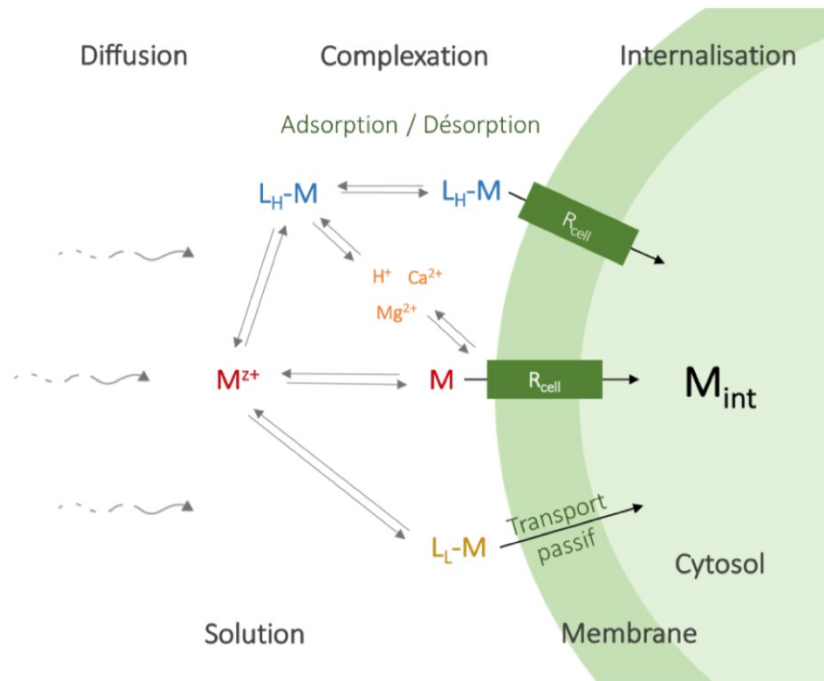


Figure 6. Principaux processus physicochimiques entourant l’internalisation des métaux par un microorganisme aquatique. La formation de différents complexes entre ligands (L) et métaux (M) est illustrée selon qu’il s’agisse d’un ligand hydrophile (L_H) ou lipophile (L_L). R_{cell} représente des sites de transport membranaires et M_{int} le métal internalisé. Le rôle des ions compétiteurs tels que H^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} , est également pris en compte. Modifiée de Worms (2006).

Le flux d’internalisation (J_{int} , $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) peut ainsi être calculé à partir de la pente du métal internalisé (mol cm^{-2}) en fonction du temps (s), et être décrit par l’équation de Michaelis-Menten (Slaveykova and Wilkinson 2005) :

$$J_{int} = \frac{J_{max}[M^{z+}]}{K_m + [M^{z+}]} \quad (2)$$

où J_{max} ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) représente le taux d’internalisation maximal, K_m (mol L^{-1}) est la constante de Michaelis-Menten correspondant à la concentration d’ion libre pour laquelle le transport est à demi saturation et où $[M^{z+}]$ représente la concentration de l’ion libre. En présumant que l’internalisation est l’étape limitante, ce qui est le cas lorsqu’un système est à

l'équilibre, la constante de stabilité (K_M, M^{-1}), qui décrit la liaison du métal avec le site de transport peut être calculée à partir de K_m :

$$K_M = \frac{1}{K_m} \quad (3)$$

Si l'internalisation est effectivement l'étape limitante, le phénomène peut se résumer par l'équilibre thermodynamique entre les espèces métalliques en solution et celles associées aux ligands biotiques sur la surface biologique. Il est toutefois possible que l'étape de diffusion ou de transport des espèces métalliques soit l'étape limitante. Le flux de diffusion peut être calculé à partir de la seconde loi de Fick :

$$J_{\text{diff}} = D \cdot \left(\frac{1}{r} + \frac{1}{\delta} \right) \cdot [M^{z+}] \quad (4)$$

où D est le coefficient de diffusion du métal, r représente le rayon cellulaire, et δ est l'épaisseur de la couche de diffusion.

Par exemple, Hassler *et al.* (2003) ont démontré que l'accumulation du Zn par *Chlorella kesslerii* n'était pas sous contrôle thermodynamique. Comme le Zn est un oligoélément, son transport à travers la membrane cellulaire est contrôlé par l'organisme et peut atteindre les limites imposées par sa diffusion. Dans ce cas, les complexes labiles, c'est-à-dire ceux qui sont susceptibles de se dissocier et de se réassocier à l'intérieur du temps de transport du métal vers la surface biologique, pourraient aussi contribuer à la bioaccumulation. En effet, les complexes pourraient contribuer à augmenter la concentration de l'ion libre au niveau de la surface biologique et ainsi faciliter son internalisation. Puisque les complexes représentent typiquement > 90 % de la concentration totale du métal dans les milieux aquatiques, leur participation aux processus biophysicochimiques est donc extrêmement importante. Le flux d'internalisation précédemment calculé doit donc toujours être plus faible ou égal au flux de diffusion maximal. La comparaison des deux flux est très utile pour évaluer si les complexes peuvent être biodisponibles pour l'organisme.

Ces processus d'internalisation se basent toutefois sur un ensemble de postulats :

- (i) L'interaction du métal et de l'organisme aquatique doit principalement se faire via la membrane plasmique. Cette dernière est considérée comme homogène, c'est-à-dire qu'elle ne contient qu'un type de site de transport.
- (ii) Les sites de transport ne peuvent prendre en charge qu'un seul élément à la fois et présentent une distribution homogène des charges.
- (iii) La molécule qui prend en charge le transport du métal à travers la membrane ne doit pas subir de modifications, en conformation ou en concentration, durant le transport.
- (iv) La diffusion ou le transport du métal vers la surface biologique ne doit pas être l'étape limitante.
- (v) La cinétique de complexation à l'interface biologique ne doit pas être limitante.
- (vi) Les constantes de dissociation entre l'élément métallique et le site de transport sont les mêmes de chaque côté de la membrane.
- (vii) Les gradients chimiques à l'interface de la solution externe et de la surface biologique n'affectent pas le transport ou les réactions avec les sites de transport.
- (viii) La réponse biologique provoquée par l'internalisation du métal est directement proportionnelle au flux d'internalisation, ou à la concentration de complexes de surface entre les éléments métalliques et les sites de transport (Campbell, Errécalde et al. 2002, Slaveykova and Wilkinson 2005).

En réalité, ces conditions se trouvent à la base des modèles thermodynamiques comme le BLM, permettant d'étudier les interactions entre un soluté et un ligand biotique, dans un milieu aquatique **à l'équilibre**. Pour reprendre le dernier postulat, l'internalisation d'un métal par un organisme aquatique est directement proportionnelle à la concentration de l'ion libre, toujours selon la relation de Michaelis-Menten. C'est donc dire que des phénomènes tels que la présence d'ions compétiteurs ou la complexation de l'ion libre devraient réduire la biodisponibilité d'un métal trace, proportionnellement à la réduction de la concentration de l'ion libre en solution.

3.2 Résine d'échange cationique en mode dynamique

La technique de résine d'échange cationique (*Ion-exchange technique* - IET) permet d'estimer directement la concentration de l'ion libre. Cette méthode permet d'étudier la spéciation de plusieurs métaux à la fois et peut être utilisée à de très faibles concentrations. Elle présente peu d'interférences dues aux métaux compétiteurs, mais surtout, son efficacité n'est pas altérée par l'adsorption de MON (Cantwell, Nielsen et al. 1982). En effet, Fortin *et al.* (1998) ont démontré que les acides fulviques ne modifiaient pas les propriétés de la résine DOWEX, couramment utilisée.

D'abord développée par Cantwell *et al.* (1982), la IET a fait l'objet de nombreuses études en laboratoire et sur le terrain, et ce, pour une multitude de métaux divalents (ex. Cd, Co, Cu, Zn, etc.), ainsi qu'en présence de ligands synthétiques et naturels (Leguay, Campbell et al. 2016). D'abord utilisée pour étudier les concentrations d'ions libres à l'équilibre, la IET peut être employée en colonne ou en *batch*. Dans un cas comme dans l'autre, il suffit de mettre en contact la solution d'échantillon et la résine jusqu'à ce qu'un équilibre s'établisse entre la concentration du métal en solution et la quantité de métal adsorbé sur la résine.

Leguay *et al.* (2016) ont, par exemple, utilisé la méthode *batch* pour déterminer la concentration en ions libres de Ce, Eu, La et Nd. La méthode s'est avérée efficace en présence de nitrates, d'acides malique et nitrilotriacétique. Ils ont également évalué la concentration des espèces inorganiques de l'Eu en présence de MON. Les résultats semblaient concorder avec les modèles thermodynamiques à pH 4.00, mais des optimisations restent nécessaires à pH plus élevés.

L'équilibre semble cependant plus difficile à atteindre pour l'étude des lanthanides tel que l'ont démontré Nduwayezu *et al.* (2016) en tentant de mesurer la concentration du Sm^{3+} par IET sur colonne. En effet, l'équilibre n'était toujours pas atteint après 12 h de percolation. Ainsi, un mode dynamique a été développé pour faciliter les mesures d'ions libres des lanthanides. Plus spécifiquement, la méthode consiste à pomper un échantillon liquide à travers une colonne contenant une petite quantité de résine (Dowex 50W-X8) sur laquelle s'effectue un échange ionique entre l'ion libre et le contre-ion, initialement présent sur la résine (figure 7).

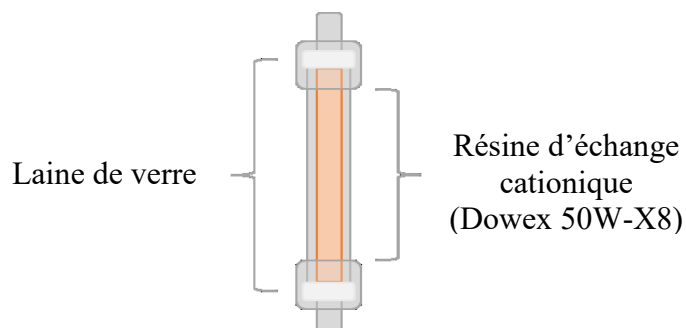


Figure 7. Colonne IET remplie de résine d'échange cationique (Dowex 50W-X8), d'une longueur moyenne de 3-4 cm.

Les groupements sulfoniques de la résine sont d'abord convertis sous la forme sodium par une solution de NaOH. Ne présentant qu'une faible affinité pour les cations, ces groupements fonctionnels facilitent les échanges et permettent d'éviter la saturation des sites de liaison. L'équation (5) illustre ces échanges ioniques :



où R-Na représente les sites d'interaction faible, Sm^{3+} représente l'ion libre et $R_2\text{Sm}^+$ et $R\text{Sm}^{2+}$ représentent deux formes que peut prendre le métal adsorbé sur la résine. Il est ainsi possible de présumer que seul l'ion libre est retenu sur la résine.

Afin d'étalonner la résine, des solutions possédant une concentration totale connue de métal sont pompées à travers la colonne et l'accumulation du métal sur la résine ($\mu\text{g g}^{-1}$) est mesurée en fonction du temps (min). Le taux d'accumulation du métal sur la résine (R_{acc} , $\mu\text{g g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) peut ainsi être déterminé à partir de la pente de cette précédente relation et posé en fonction de la concentration de l'ion libre. Déterminée par calculs thermodynamiques, la concentration de l'ion libre est estimée par le logiciel WHAM 7.0.5 pour des conditions simples : en absence de ligand, ou en présence de ligands pour lesquels les constantes de stabilité sont établies et reconnues. L'équation de cette courbe d'étalonnage, représentant le taux d'accumulation du métal en fonction de la concentration de l'ion libre, permet ensuite de calculer la concentration en ions libres d'une solution dont la concentration totale du métal n'est pas connue. Des précisions méthodologiques sont fournies au chapitre 5.

4. Expériences préliminaires

4.1 Courbe de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*

Une fois transférées en milieux liquides, les cultures algales de *C. reinhardtii* ont été soumises à un régime lumineux continu ($60 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), assumant que cela permettrait d'éviter la duplication synchronisée des cellules. Permettant de faciliter la réalisation d'expériences de bioaccumulation selon un horaire irrégulier, l'utilisation du régime lumineux continu assure avant tout un mélange des cellules à différents stades de croissance.

Tel que décrit au chapitre 5, les cellules sont systématiquement récoltées lorsque la culture atteint le stade de croissance exponentielle, soit une concentration d'environ $1-5 \times 10^6$ cellules mL^{-1} (Harris 1989). Comme les protocoles disponibles pour la culture de *C. reinhardtii* ne faisaient état que des données de croissance sous régime lumineux alternatif, il a fallu établir une nouvelle courbe de croissance sous régime lumineux continu.

Pour assurer un suivi de la croissance, la densité (nombre de cellules mL^{-1}) et la surface cellulaires ($\text{cm}^2 \text{ mL}^{-1}$) ont été mesurées périodiquement sur une période de 72h à l'aide d'un appareil de comptage particulaire (Multisizer 3 compteur de particules, 50 μm aperture, Beckman Coulter). Cinq cultures ont été étudiées durant cette période, inoculées à différents moments de la journée (figures 8 et 9).

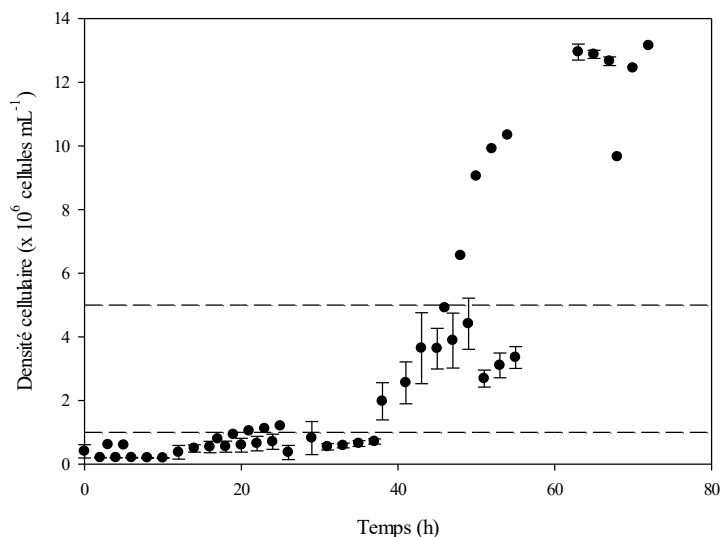


Figure 8. Courbe de croissance de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* sous régime lumineux continu ($60 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{m}^{-2}$). La densité cellulaire ($\times 10^6$ cellules mL^{-1}) est exprimée en fonction du temps (h). Les deux lignes pointillées encadrent la phase de croissance exponentielle correspondant à une densité de $1\text{-}5 \times 10^6$ cellules mL^{-1} .

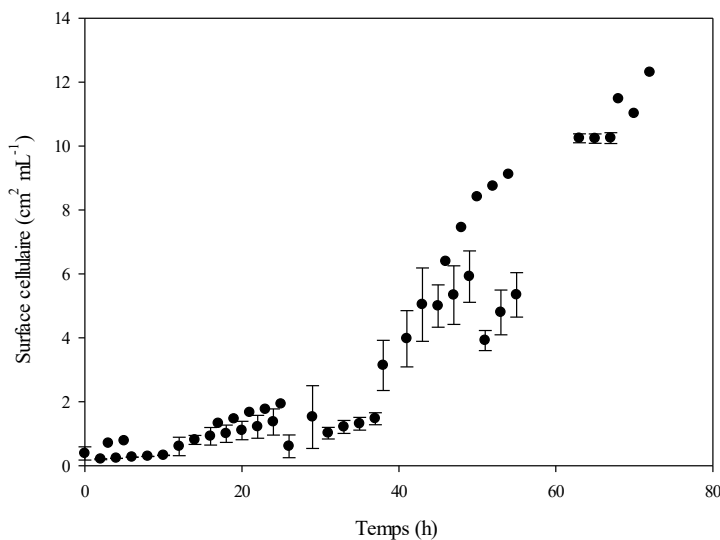


Figure 9. Évolution de la surface cellulaire ($\text{cm}^2 \text{mL}^{-1}$) de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du temps (h) sous régime lumineux continu ($60 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{m}^{-2}$).

Les résultats obtenus suggèrent qu'une concentration cellulaire de $1-5 \times 10^6$ cellules mL^{-1} est atteinte entre 38 et 50 heures de croissance. Cultivées en 2 étapes successives, les algues ont donc d'abord été cultivées dans un petit volume de milieu de culture (75 mL) pour 48 heures, puis transférées dans une nouvelle flasque contenant 400 mL de milieu de culture pour une deuxième période de croissance de 42 heures (tableau II).

Tableau II. Horaire d'inoculation et de collecte de *C. reinhardtii*.

| Jour | Heure | Activité |
|----------|-------|---------------------------------------|
| Lundi | 16h00 | Inoculation des algues (75 mL) |
| Mercredi | 16h00 | Transfert des algues (400 mL) |
| Vendredi | 10h00 | Récolte des algues par centrifugation |

Par ailleurs, une optimisation des conditions lumineuses pour chacun des incubateurs utilisés a été nécessaire. Des bulbes fluorescents à large spectre ont été installés et remplacés en alternance pour garantir une luminosité moyenne de $60 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Un suivi mensuel, puis hebdomadaire, de la luminosité des incubateurs a été instauré pour favoriser l'uniformité des cultures algales.

4.2 Traitement des résultats

Une fois les résultats regroupés pour former la courbe typique de Michaelis-Menten, il a été nécessaire de déterminer quelle fonction allait mieux décrire le jeu de données. Ce traitement préliminaire a été effectué en totalité avec SigmaPlot 12.3.

Trois principaux essais ont été réalisés, soit (i) l'application directe de l'équation de Michaelis-Menten, (ii) l'application de la relation de Lineweaver-Burk et (iii) l'utilisation de la fonction *Exponential rise to maximum*.

(i) Équation de Michaelis-Menten

Tel que mentionné précédemment, l'internalisation d'un élément métallique par un organisme aquatique unicellulaire peut être décrite par l'équation de Michaelis-Menten ($J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}}[M^{Z+}]}{K_m + [M^{Z+}]}$).

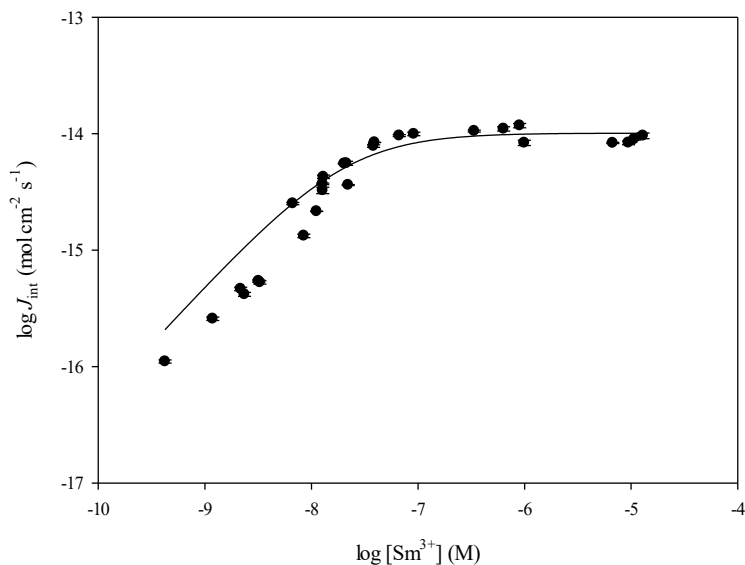


Figure 10. Flux d'internalisation (J_{int}) du Sm en fonction de la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}) déterminée par calculs thermodynamiques (WHAM 7.0.5). Les données sont ici décrites par l'équation de Michaelis-Menten pour un $J_{\text{max}} = 1.0 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et un $K_m = 2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$.

L'application directe de cette équation ne semblait toutefois pas représentative des données expérimentales, telle qu'illustrée à la figure 10. En effet, une évidente disparité entre les mesures à faible et haute concentration de Sm^{3+} est apparente. Cette fonction n'a donc pas été retenue pour la description des données expérimentales.

(ii) Lineweaver-Burk

La représentation graphique de Lineweaver-Burk, décrite par Hans Lineweaver et Dean Burk en 1934, permet également l'analyse de l'équation de Michaelis-Menten (Lineweaver and Burk 1934). Contrairement à l'utilisation d'une régression non linéaire telle que l'équation de Michaelis-Menten, les figures 11 et 12 présentent plutôt une relation linéaire entre la

réciroque du taux d'internalisation ($\frac{1}{J_{\text{int}}}$) et celle de la concentration de l'ion libre ($\frac{1}{[M^{z+}]}$). La pente et l'ordonnée à l'origine permettent ensuite de déduire les termes J_{max} et K_m .

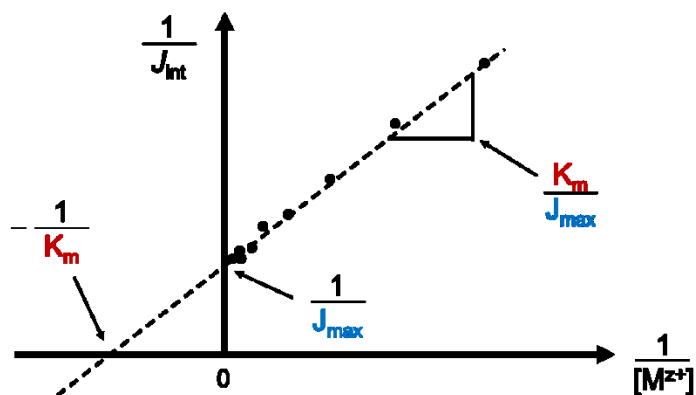


Figure 11. Représentation graphique schématisée de Lineweaver-Burk pour l'équation de Michaelis-Menten. J_{int} correspond au flux d'internalisation du métal, K_m représente la constante de Michaelis-Menten et $[M^{z+}]$, la concentration de l'ion libre.

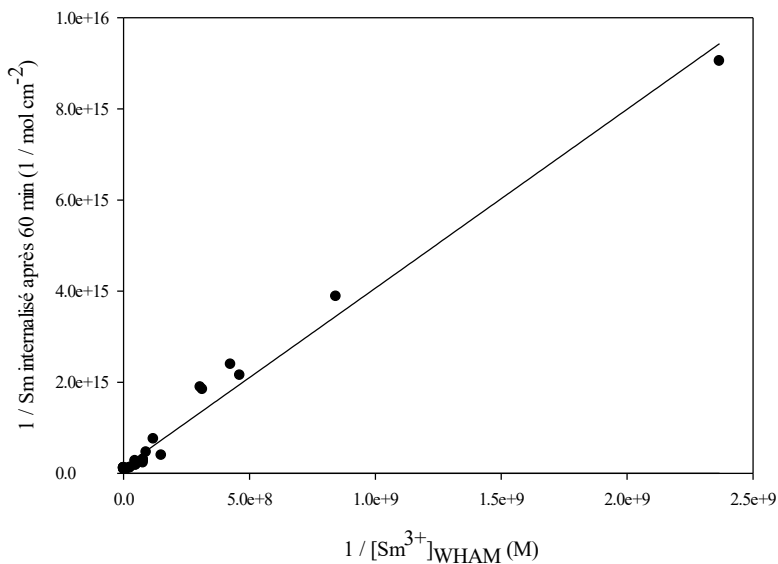


Figure 12. Représentation graphique de Lineweaver-Burk du Sm internalisé par *C. reinhardtii* après 60 minutes d'exposition en fonction de la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}) déterminée par WHAM 7.0.5 avec $J_{\text{max}} = 1.9 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et $K_m = 2.0 \times 10^{-9} \text{ M}$.

Les données expérimentales n'étant pas réparties de manière uniforme entre les extrémités de cette régression linéaire, la représentation graphique de Lineweaver-Burk n'a pas été retenue.

(iii) *Exponential rise to maximum*

Précédemment utilisée par Tan *et al.* (2017) et décrivant avec le plus de justesse notre jeu de données, la fonction *Exponential rise to maximum* a été choisie pour la mise en forme des données d'internalisation.

$$J_{\text{int}} = a (1 - e^{-b[M^{z+}]}) \quad (6)$$

L'équation de la fonction (6) fait intervenir les variables a et b qui correspondent respectivement à J_{max} et $\frac{1}{K_m}$.

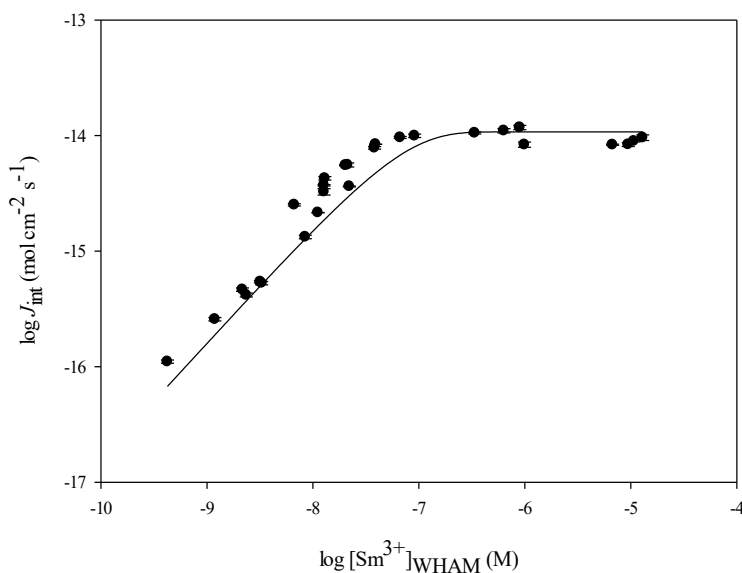


Figure 13. Sm internalisé par *C. reinhardtii* après 60 minutes d'exposition en fonction de la concentration de l'ion libre (Sm^{3+}) déterminée par WHAM 7.0.5. Les données sont ici décrites par la fonction *Exponential rise to maximum* avec $J_{\text{max}} = 1.1 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et $K_m = 6.7 \times 10^{-8} \text{ M}$.

5. Determination of the speciation and bioavailability of Sm to *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of natural organic matter

Justine-Anne Rowell¹, Marc-Alexandre Fillion¹, Scott Smith², Kevin J. Wilkinson^{1*}

¹Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal, H3C 3J7, Canada.

²Department of Chemistry, Wilfrid Laurier University 75 University Avenue West, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3C5

*Corresponding author: Phone +1-514 343 6741; fax: +1-514 343 7586; e-mail: kj.wilkinson@umontreal.ca

Submitted to: Environmental Toxicology and Chemistry

Participation des auteurs

Description de ma participation : J'ai réalisé la majorité des manipulations en laboratoire menant aux résultats présentés dans l'article et j'ai rédigé l'entièreté de celui-ci, accompagnée et corrigée par mon directeur de recherche, M. Wilkinson.

Description de la participation des coauteurs : En tant que stagiaire estival en 2016, Marc-Alexandre Fillion a réalisé toutes les expériences de résine d'échange cationique en présence de matière organique naturelle. M. Smith, professeur à l'Université Wilfrid Laurier, a fourni un échantillon naturel de matière organique, qui a été collecté, isolé et purifié par son équipe de recherche. M. Wilkinson, à titre de directeur de recherche a grandement contribué à l'orientation scientifique et méthodologique de l'article ainsi qu'à sa correction. Naturellement, il a fourni tout le matériel nécessaire à la réalisation des travaux en laboratoire.

5.1 Abstract

As technological interest and environmental emissions of the rare earth elements (REE) increase, it is becoming more important to assess their potential environmental impact. Samarium (Sm) is a lanthanide of intermediate molar mass that is used in numerous high technology applications including wind turbines, solar panels and electric vehicles. The present study relates the speciation of samarium (Sm) determined in the presence of natural organic matter (NOM) to its bioavailability to the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. The free ion concentration was determined using a cation exchange resin (IET) in dynamic mode and compared to thermodynamic modelling. Short-term biouptake experiments were performed in the presence of 4 types of NOM: Suwannee River fulvic acids, Pahokee Peat fulvic acids, Suwannee River humic acids and a Luther Marsh dissolved organic matter isolate (90-95% humic acids). The results clearly showed that even a small amount of NOM (0.5 mg C L^{-1}) resulted in a significant decrease (10x) in the Sm internalization fluxes. Furthermore, complexation with humic acids (and the corresponding reduction in Sm bioavailability) was stronger than for the fulvic acids. The results showed that the experimentally measured (free) Sm was a better predictor of Sm internalization than either the total concentrations or the free ion concentrations obtained using thermodynamic modelling.

Keywords: samarium, speciation, bioavailability, biouptake, *Chlamydomonas reinhardtii*, ion exchange resin

5.2 Introduction

The rare earth elements (REE, $Z = 21, 39, 57-71$) (Kogel 2006) are known for their unique optical, magnetic and catalytic properties (Bauer, Diamond et al. 2010, Hurst 2010, Tse 2011). They are increasingly used for the manufacturing of high tech products, including wind turbines, electric vehicles and photovoltaic cells. While nanomolar (nM) concentrations of the metals are usually measured in natural waters, micromolar (μM) concentrations can now be found near mining sites (Miekeley, Coutinho de Jesus et al. 1992, Noack, Dzombak et al. 2014). Nonetheless, to date, few studies have evaluated the mobility, bioavailability and toxicity of these metals.

It is now commonly accepted that metal bioavailability in aquatic systems is best predicted by taking into account measurements of chemical speciation (Morel and Hering 1993, Campbell 1995, Zhao and Wilkinson 2015). In natural systems, trace metals are found in a large number of chemical forms, including free ions, inorganic and organic complexes and metals bound to colloids (Buffle, Altmann et al. 1990). Although the free ion generally represents only a small fraction of the total metal concentration in aquatic systems (Buffle, Altmann et al. 1990), it is generally recognized as being the best predictor of metal bioavailability and consequently, metal toxicity (Morel and Hering 1993, Campbell 1995, Zhao and Wilkinson 2015). Indeed, models, such as the biotic ligand model (BLM) have been elaborated to predict bioavailability for numerous divalent metals and for a large number of organisms (Slaveykova and Wilkinson 2002, De Schamphelaere, Stauber et al. 2005, Worms and Wilkinson 2007, Zeng, Yang et al. 2009). Complexation (inorganic and organic) and competition (e.g. protons, hardness metals) appear to be the major factors responsible that influence metal bioavailability (Slaveykova and Wilkinson 2005, Worms, Parthasarathy et al. 2007, Worms and Wilkinson 2007).

While the BLM has been used to assess the ecological risks of several divalent metals, it has not yet been validated for the emerging, often trivalent, metals. In that case, several studies where bioavailability is greater than that predicted solely on the basis of the free ion activities have been documented in the literature. For example, fluoro- and hydroxo- aluminium complexes are thought to increase metal bioavailability through the formation of a ternary

complex for *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Salmo salar* (Wilkinson, Campbell et al. 1990, Pitre, Boulemant et al. 2014). Similarly, Crémazy *et al.* (2013) implicated the contribution of hydroxo complexes to Sc biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii* in waters above pH 6.5 (Crémazy, Campbell et al. 2013). Using the same microorganism, our group has also observed enhanced biouptake with respect to predictions that are based upon the free ion when in the presence of hydrophilic complexes of the rare earth elements (REE: Eu, Sm, Tm) (Yang, Tan et al. 2014, Zhao and Wilkinson 2015, Tan, Yang et al. 2017). Given the above observations, it is important to evaluate whether concentrations of the free ion are sufficient for predicting the bioavailability of the trivalent REE, especially in the presence of environmentally relevant ligands such as the ubiquitous humic substances.

The main objective of this study was to assess the role of NOM on the speciation and bioavailability of a (trivalent) REE. The REE are known to be chemically similar elements and preliminary indications suggest that they have similar chemical properties and toxicities (Migaszewski and Gałuszka 2015). In this study, samarium (Sm), a lanthanide of intermediate atomic weight, was chosen as the model REE. Sm biouptake was assessed using *Chlamydomonas reinhardtii* under controlled experimental conditions. Our hypothesis was that Sm complexation by NOM would lead to a reduction in Sm biouptake that was directly proportional to the concentration of free Sm, in line with previous results using divalent metals. An ion exchange technique (IET) was employed in order to quantify free Sm concentrations (Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016) in the presence of four humic substances. Sm biouptake was then related to experimentally measured free Sm in order to test the applicability of the thermodynamic models (i.e. BLM) for predicting Sm bioavailability.

5.3 Experimental section

Algal culture maintenance and growth

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (wild-type CC-125) was used as test organism because of its well-known biology and its abundance in a number of different habitats (Harris 1989). Algae were manipulated under laminar flow (Heraeus, Germany) or near a flame to avoid biological contamination (Twiss, Errécalde et al. 2001). They were first cultured on agar plates prepared in tris-acetate-phosphate (TAP) medium in 1.5% agar (Harris 1989), then transferred into an autoclaved, diluted (4x) TAP solution (dTAP). Liquid algal cultures were first grown in an incubator (Multitron, Infors) at 20°C under a continuous light regime ($60 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) and agitation (100 rpm) until they reached their mid-exponential growth phase ($1\text{-}5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$; ca. 2 days). Subsequently, an algal aliquot was transferred into a larger volume of dTAP and left to attain mid-exponential growth (ca. 1½ days). Cells were harvested by centrifugation at 3000 rpm (1882 g) for 3 min then washed (2x) by resuspending them in an experimental medium (see below) that contained no metal. The final cell concentrate obtained by centrifugation was collected for use in the biouptake experiments. Algal cell densities and surface areas were measured using a Multisizer 3 particle counter (50 μm aperture, Beckman Coulter).

Experimental media

For both biouptake and speciation experiments, experimental media were prepared in polycarbonate flasks using 0.01 M NaMES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic sodium; Acros Organics) as a pH buffer, 0.01 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma Aldrich) (to preserve the biological cell wall integrity) and a pH of 6.0 (Twiss, Errécalde et al. 2001). The simplified experimental medium was used in order to ensure a careful control of the chemical speciation. Although the absence of nutrients is likely to influence biouptake fluxes (Lavoie, Fortin et al. 2012), REE will precipitate in the presence of phosphate. Therefore, short-term experiments (≤ 1 hour) were employed so that algae could survive using stored nutrient concentrations. We hypothesize that effects on the biouptake fluxes due to trace metal complexation will be similar in the presence or absence of the nutrients. When necessary, pH was adjusted using

ultrapure HNO₃ (BDH). Sm was added from a 1000 µg mL⁻¹ stock solution of Sm(NO₃)₃ in 5% HNO₃ (Inorganic Ventures). All other chemicals were at least of analytical grade. Milli-Q water ($R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, total organic carbon $< 2 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) was used to prepare all solutions. Polymerware was soaked in 2-4% HNO₃ for a minimum of 24 h then rinsed 7x with Milli-Q water and dried under laminar flow (Nriagu, Lawson et al. 1993). In some cases, simple organic ligands with well-defined stability constants (ca. ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate - EDTA; and nitrilotriacetic acid - NTA) were added in order to control chemical speciation. Following the addition of Sm and/or ligands, solutions were equilibrated for at least 18 h on a rotary shaker (100 rpm). pH was verified and adjusted, if necessary, immediately prior to the experiments.

Sm³⁺ concentrations were varied between 10⁻⁹ and 10⁻⁵ M. In order to evaluate adsorptive losses and potential contamination, metal concentrations in experimental media were systematically measured at the start and end of each experiment. Samples were weighed in order to determine volumes and dilution factors with precision. Mass balances were performed and samples were rejected when they exceeded $\pm 10\%$.

Natural Organic Matter (NOM)

Four types of NOM - three commercially available humic substances: Suwannee River fulvic acid (SRFA – 2S101F), Pahokee Peat fulvic acid (PPFA – 2S103F), Suwannee River humic acid (SRHA – 2S101H) and a well characterized terrigenous dissolved organic matter (DOM) isolate (Luther Marsh, LMDOM) (Al-Reasi, Scott Smith et al. 2012) were used. Lyophilized Suwannee River and Pahokee Peat humic substances were purchased from the International Humic Substances Society (IHSS), while the Luther Marsh isolate (LMDOM; 1356 mg C L⁻¹) was isolated by D.S. Smith (Wilfrid Laurier University). Parallel factor analysis (PARAFAC) has shown that the Luther Marsh sample is ca. 90-95% humic acids (Al-Reasi, Scott Smith et al. 2012). One g L⁻¹ stock solutions of the SRFA, PPFA and SRHA were prepared by dissolving the lyophilized solids in Milli-Q water and letting them equilibrate at least 24 h. Diluted stock solutions were used for the experimental media and to determine total organic carbon (TOC) content using an IO Aurora 1030 carbon analyzer, calibrated with potassium biphthalate.

Biouptake experiments

In order to quantify metal bioavailability, a unicellular microorganism was exposed to a known concentration of metal over a short exposure period (≤ 60 min). Short-term experiments are used to ensure that efflux is negligible with respect to uptake and to minimize free Sm losses due to complexation with exudates or adsorption to polymerware. Biouptake experiments were initiated by spiking a small volume of cell concentrate (ca. ~ 0.45 - 2.5 mL) into 145-800 mL of the exposure media to obtain an experimental cell surface area of $0.15 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ (ca. $\sim 8 \times 10^4$ cells mL^{-1}). In a first batch of experiments, data points were collected at 1, 20, 40 and 60 min. At each time point, 5 mL of 0.1 M EDTA (Sigma-Aldrich) was added to triplicate 45 mL samples of the algae in order to stop further biouptake and remove extracellular metals (Bates, Tessier et al. 1982, Hassler, Slaveykova et al. 2004). Samples were then filtered through 2 superimposed nitrocellulose filters (pore size $3.0 \text{ }\mu\text{m}$, Millipore)-algae were retained on the top filter, while bottom filter was used to quantify metal losses via adsorption. The filters and collected algae were rinsed 3 times with 15 mL of 0.01 M EDTA, then transferred into 15 mL polypropylene tubes where they were digested in 0.3 mL of concentrated (69%) ultrapure HNO_3 at 85°C for 12 h (DigiPREP MS – SCP Science). The optimization and justification of the EDTA washing procedure for use with Sm biouptake is given below. Sm biouptake was calculated as the concentration difference between the top and bottom filters. Samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, PerkinElmer, NexION 300x).

Biological internalization fluxes (J_{int} , $\text{mol cm}^2 \text{ s}^{-1}$) were determined from the slope of the accumulated metal (mol cm^{-2}) as a function of time (s). When plotted against the free ion concentrations, fluxes could be described by the Michaelis-Menten equation (Slaveykova and Wilkinson 2005):

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

where J_{max} ($\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) represents the maximum internalization flux and K_m (mol L^{-1}) is the Michaelis-Menten constant corresponding to the concentration of free ion for which transport is half-saturated. Under the assumption that biological internalization is the rate-limiting step

(i.e. equilibrium conditions), the conditional stability constant (K_{Me} , M^{-1}) describing the binding of metal to the transport site can be calculated from the reciprocal of K_m .

After establishing that Sm biouptake was linear over 60 min with a negligible y-intercept, a number of experiments were performed using a single data point sampled at 60 min. In that case, triplicate data points were collected and experiments were replicated using different algal cultures. Experiments were first conducted using nominal Sm concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-5} M. For experiments performed in presence of NOM, 0 to 7 mg C L^{-1} of NOM was added to 5×10^{-8} M of Sm.

Sm speciation by ion exchange technique (IET)

An ion exchange technique (IET) developed for use with Sm was used to evaluate free ion concentrations (Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016). In brief, homemade columns were made from 3-4 cm pieces of cut pipettes and the ends of 1 mL syringes (BDTM TB) filled with 60.0 ± 0.3 mg of resin (Dowex 50W-X8 resin, 50-100 mesh, Sigma Aldrich). For a single IET experiment, 8 columns were used in order to measure 4 time points in duplicate. Luer connectors (Cole-Parmer) were used to connect the mini-columns to polytetrafluoroethylene (PTFE # 18 AWG) tubing, that was in turn connected to polyvinyl chloride peristaltic tubing (PVC - Accu.Rated - 1.65 mm ID BB-Length 16") installed on a Gilson MINIPULS peristaltic pump. Columns were pre-conditioned at a constant flow rate of 4 mL min^{-1} in 5 distinct steps: (i) 10% (v/v) ultrapure HNO_3 for 4 min (resin wash); (ii) Milli-Q water for 4 min; (iii) 0.1 M NaOH (Acros Organics) for 4 min (conversion of resin to R-Na form); (iv) Milli-Q water for 4-5 min; and (v) treatment of the resin using the experimental solution without Sm (0.01 M NaMES, 10^{-5} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pH 6.0) for 4 min (resin equilibration). Columns were re-built after 1 month.

IET experiments were conducted in dynamic mode, meaning that the accumulation of Sm on resin was monitored as a function of time, similar to the biouptake experiments. When the IET is used in this mode, it is possible to assume that only the free metal ion and labile metal complexes will be retained by the weakly binding cation exchange resin (Dowex 50W-X8) (Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016). Solutions were pumped through columns at a flow

rate of 4 mL min^{-1} for a maximum of 120 min. Duplicate 1 mL effluent samples (exiting the column) were collected at 30, 60, 90 and 120 min in pre-weighed tubes. Columns were rinsed briefly (4 min at a 4 mL min^{-1} flow rate) using Milli-Q water in order to remove non-adsorbed metal. They were then disconnected from the pumping system so that PTFE and PVC tubes could be washed with 10% v/v HNO_3 for 20 min (0.4 mL min^{-1}) in order to quantify adsorptive losses. Sm adsorbed to the columns was eluted using 0.4 mL min^{-1} of 10% v/v HNO_3 over 100 min. Sm concentrations were determined by sampling the experimental medium at the beginning and end of the experiment. For all samples (effluent, losses to tubes, column eluates), nitric acid concentrations were adjusted to 1% v/v prior to analysis by ICP-MS.

IET calibration curves were prepared from solutions containing Sm concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-6} M in the absence of ligands or for 5×10^{-8} M Sm in the presence of EDTA or NTA using ligand:Sm ratios ranging from 0.25 to 1. The calibration curve was subsequently used to determine free Sm in the experimental solutions (0 to 7 mg C L^{-1} NOM and a constant Sm concentration of 5×10^{-8} M).

ICP-MS analysis

Samples were analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (Perkin Elmer, NexION 300x), using a ^{115}In internal standard to correct for instrumental drift. A seven-point Sm calibration curve was acquired every 20 samples and blank and quality control samples were run every 10 samples.

Data analysis

In the absence of ligands or in the presence of EDTA and NTA, free Sm concentrations were calculated using WHAM 7.0.5 and Visual Minteq 3.0. WHAM 7.0.5 was used for free Sm determinations in the presence of NOM. Parameters used in the models are provided in Table S1. SigmaPlot 12.3 was used to generate graphs, plot regressions and calculate slopes. A one-way analysis of variance (ANOVA) and a Student t-test were used to identify significant differences among the data ($p < 0.05$). Comparisons were performed using Microsoft Excel 2010 software. A linear regression, including 95% confidence and prediction intervals, was

plotted using data for concentrations that were below K_m on the Michaelis-Menten plot, within the expected range of linearity. Data obtained in the presence of NOM were then compared to the regression obtained in its absence.

5.4 Results and Discussion

Samarium biouptake in the absence of added ligand

In the absence of ligand, equilibrium calculations predicted that at pH 6.0, 98% of Sm in the MES medium would be found as Sm^{3+} . For exposures from 10^{-9} M to 10^{-5} M Sm, biouptake normally increased linearly with time, with a small, generally negligible intercept (Figure 21A) and concentrations of dissolved Sm that were relatively stable over the duration of the experiment (ca. $\leq 10\%$ variation) (Figure 21B).

Metal biouptake (60 min) increased linearly as a function of the free ion concentration up to 3×10^{-8} M Sm^{3+} (slope of 0.95 on the log-log graph), where it is assumed that saturation of the biological uptake site occurred. The presence of a single plateau for both Sm biouptake (Figure 14) and the results from previous competition experiments with other lanthanides (Tan, Yang et al. 2017) suggests that only a single transporter with a maximum internalization flux (J_{max}) of $(1.08 \pm 0.07) \times 10^{-14}$ mol cm^{-2} s^{-1} and a half saturation constant, K_m , of $(6.7 \pm 1.5) \times 10^{-8}$ M was being used by the algae. Under the (reasonable) assumption of a steady-state uptake, the stability constant for the binding of Sm to the metal transporter ($K_{\text{Sm-R}}$, M^{-1}) can be obtained from the reciprocal K_m value. The log $K_{\text{Sm-R}}$ of 7.2 is very similar to previously obtained values for Eu (7.0) (Yang, Tan et al. 2014), Tm (7.1) (Zhao and Wilkinson 2015) and Sm (7.0) (Tan, Yang et al. 2017), reinforcing the contention that all of the REE share a common uptake site. Furthermore, for *C. reinhardtii*, the constant indicates a relatively strong interaction with the metal transporter in comparison with log K values obtained for *C. reinhardtii* for divalent metals under similar conditions (Cd: 6.0 (Kola and Wilkinson 2005); Ni: 5.1 (Worms and Wilkinson 2007); Cu: 5.8 and Pb: 5.9 (Chen, Zhu et al. 2010); Zn : 5.1 (Lavoie, Campbell et al. 2012)).

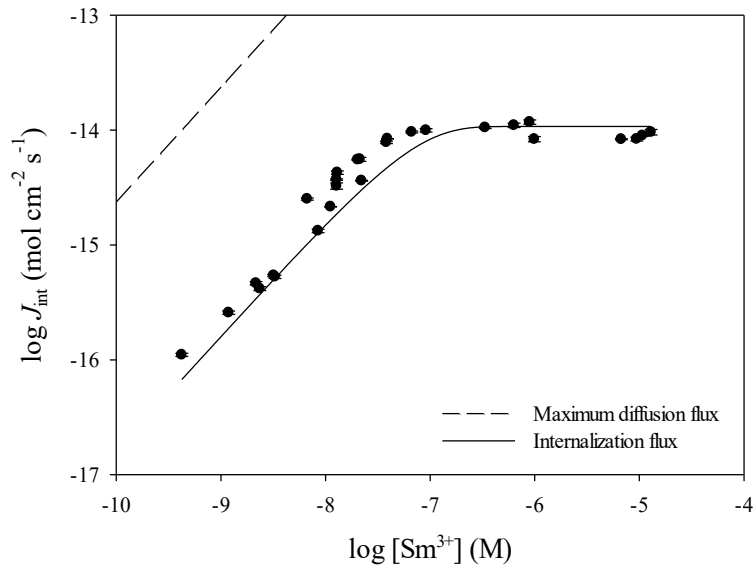


Figure 14. Sm internalization fluxes (J_{int}) for different concentrations of Sm^{3+} (thermodynamic calculations). Solid line corresponds to a weighted non-linear regression of the Michaelis-Menten equation with $J_{\text{max}} = (1.08 \pm 0.07) \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $K_m = (6.7 \pm 1.5) \times 10^{-8} \text{ M}$. The dashed line corresponds to the calculated maximum diffusive flux of Sm^{3+} determined from Fick's (second) law calculations of spherical diffusion ($J_{\text{diff}} = D \cdot \left(\frac{1}{r} + \frac{1}{\delta}\right) \cdot [\text{Sm}^{3+}]$) using a measured cell radius, r , of $3.7 \times 10^{-4} \text{ cm}$; a Sm diffusion coefficient of $6.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Yuan-Hui and Gregory 1974, Tan, Yang et al. 2017), and a diffusion layer thickness of $8 \times 10^{-4} \text{ cm}$ (Whitfield and Turner 1979)). Error bars correspond to standard deviations determined from three technical replicates.

Samarium biouptake in the presence of natural organic matter

Biouptake experiments were then performed in the presence of 0.5 to 7.0 mg C L^{-1} of four humic substances: Suwannee River fulvic acid (SRFA), Pahokee Peat fulvic acid (PPFA), Suwannee River humic acid (SRHA) and Luther Marsh DOM (LMDOM). For a constant Sm concentration ($5 \times 10^{-8} \text{ M}$) in the presence of 0.5 mg C L^{-1} of any of the four NOM, an approximate 10x decrease in Sm biouptake was observed (Figure 15). Further increases to the NOM concentration decreased biouptake further. There were small, but generally significant differences between uptake fluxes determined for the different NOM with the greatest

decrease on biouptake observed for the humic acids with respect to the fulvic acids (SRFA < PPFA < LMDOM < SRHA). Nonetheless, when plotted against free ion concentrations determined by WHAM 7.05, biouptake fluxes were much higher than those predicted by the Michaelis-Menten curve determined in the absence of NOM (Figure 16). Several hypotheses were evoked to explain the apparent ‘excess’ biouptake observed in Figure 16: (i) surface bound Sm increased in the presence of NOM and was not efficiently extracted by the EDTA; (ii) Sm (NOM) complexes were bioavailable and contributed to Sm biouptake; (iii) free Sm was underestimated by the thermodynamic calculations.

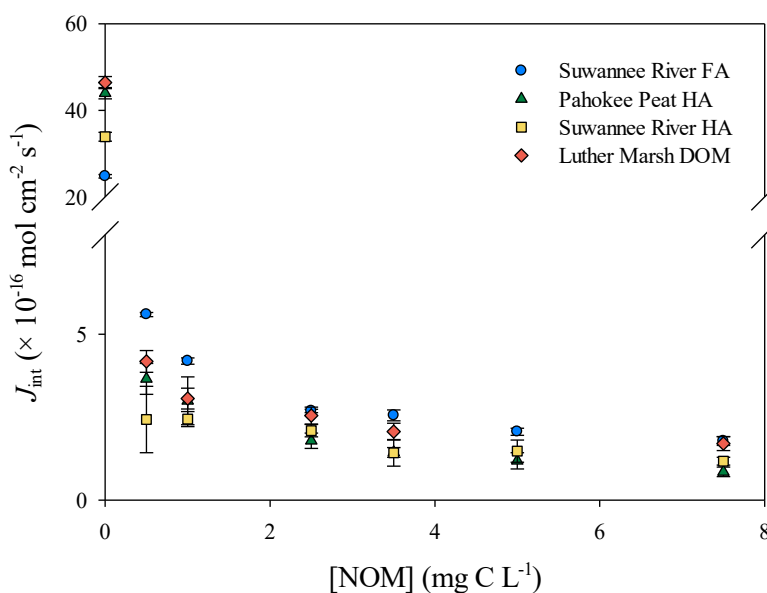


Figure 15. Sm internalization fluxes (J_{int}) as a function of NOM concentration (mg C L^{-1}): SRFA (●), PPFA (▲), SRHA (■), LMDOM (◆). Error bars correspond to standard deviations determined for 3 technical replicates of 2 independently prepared algal cultures.

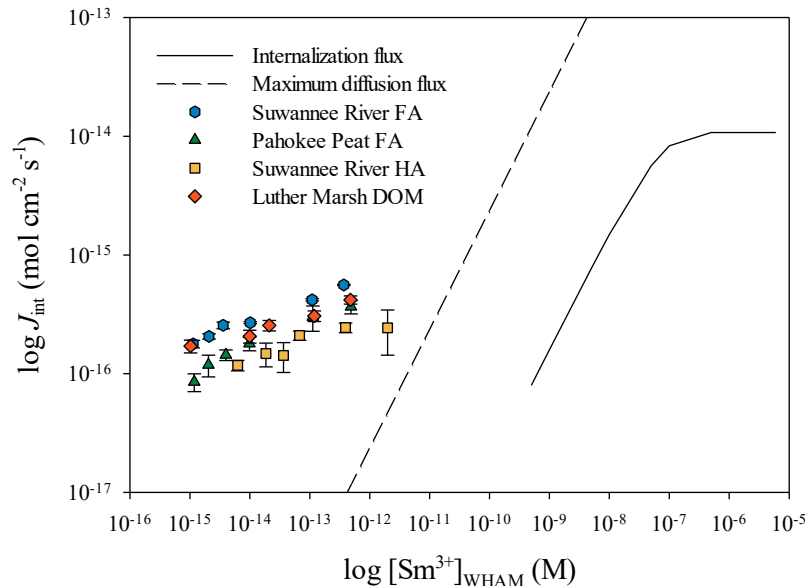


Figure 16. Sm internalization fluxes (J_{int}) in the presence of 4 different sources of NOM: SRFA (\bullet), PPFA (\blacktriangle), SRHA (\blacksquare), LMDOM (\blacklozenge) as a function of Sm^{3+} concentrations, calculated using WHAM 7.0.5. The solid curve represents the Michaelis-Menten plot relating Sm biouptake to the concentration of Sm^{3+} as determined in Figure 14. The dashed line corresponds to the calculated maximum diffusive flux of Sm^{3+} . Error bars correspond to standard deviations determined for 3 technical replicates of 2 algal cultures.

Hypothesis (i): Artifact of the EDTA extraction efficiency

For a metal to be biologically available, it is assumed that it must first cross a biological membrane or react with a biologically sensitive site on the membrane surface (Lidon and Henriques 1993, Rand, Wells et al. 1995). Strong chelating agents such as EDTA are generally used to distinguish surface-bound (non-biologically available metal) from internalized (biologically available) metal (Hassler, Slaveykova et al. 2004). The underlying assumption of these extractions is that the charged EDTA will not cross the biological membrane (for short contact times) and that it will strongly complex (and extract) surface bound metal. In this study, cells that had been exposed to Sm were washed for 1 min using 10 mM EDTA in order to remove the adsorbed REE (Zhao and Wilkinson 2015). However, given the propensity of humic substances to accumulate at biological surfaces (Campbell, Twiss et al. 1997), it is

conceivable that the biouptake flux could be overestimated in the presence of NOM, resulting from adsorption of Sm to the biological surface (i.e. reduced EDTA extraction efficiency).

The efficiency of the EDTA wash was verified either by varying the nature and concentration of the ligand or by increasing EDTA contact time. Indeed, with respect to a wash using 0.01 M MES medium (pH 6.0), under otherwise identical conditions, both 10 mM EDTA and 10 mM DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) removed significantly more Sm from the algal surface (Figure 23). Furthermore, for algae exposed to 1×10^{-7} M of Sm, in the presence of three concentrations of SRFA (1, 3, 5 mg C L⁻¹), no systematic differences were observed for EDTA wash times of 1, 5, 10 and 15 min (Figure 17). Non-EDTA extractible Sm did decrease as a function of increasing NOM, however, this was consistent with biouptake results shown above. Given that the cell associated (non EDTA extractible) Sm decreased by less than 4% as the cell wash time increased from 1 to 15 minutes, it is highly unlikely that differences in the wash efficiency can explain the three orders of magnitude excess biouptake observed in Figure 16.

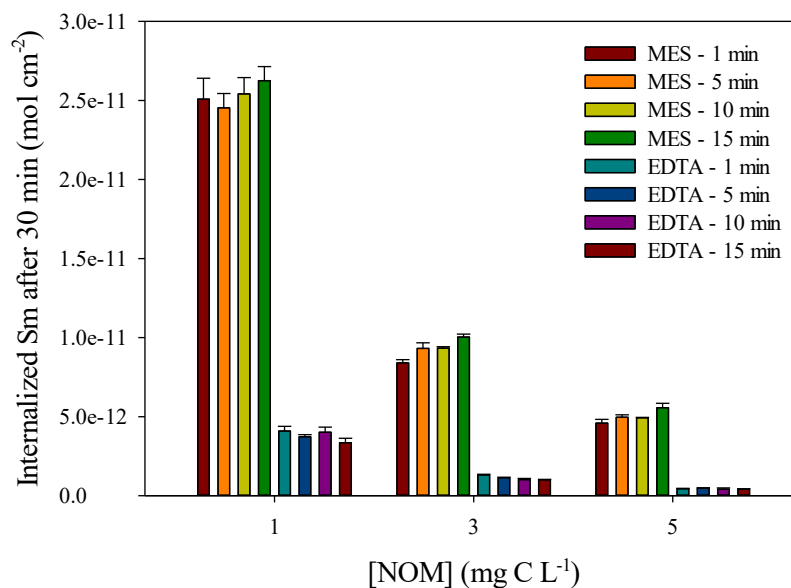


Figure 17. Internalized Sm as a function of the washing agent (MES, EDTA) and the contact time (1, 5, 10, 15 min) for cells exposed to 1×10^{-7} M Sm for 30 min (pH 6.0) in the presence of 3 SRFA concentrations (1, 3, 5 mg C L⁻¹). Error bars correspond to standard deviations determined for 3 technical replicates.

Hypothesis (ii): Bioavailability of the Sm NOM complexes

For the Sm-NOM complexes to be bioavailable, they must either provide free Sm to the cell following complex dissociation (complex lability) OR the complex itself should be able to react with sensitive sites on the surface of the organism (formation of a ternary complex) (Zhao and Wilkinson 2015, Zhao, Campbell et al. 2016). In order for labile REE complexes to contribute to the biouptake flux, the mass transport flux of the Sm^{3+} to the cell surface must be rate-limiting. In other words, if the biological internalization flux does not deplete free ion in the diffusion layer at the surface of the microorganism, there is simply no need for the organism to use free ion that would result from the dissociation of the metal complexes. In the biouptake experiments with *C. reinhardtii*, mass transport is likely to occur by spherical diffusion, with the calculated maximum mass transport flux shown by the dotted line in Figures 14 and 16. While biological internalization did appear to be rate-limiting in the absence of NOM (Fig. 14), the measured biological uptake flux in the presence of NOM was higher than the diffusive flux for Sm^{3+} alone (Figure 16), suggesting that the diffusion and dissociation of Sm-REE complexes could contribute free Sm to the biological transport sites. In this case, the observed ca. ~10x reduction in the biouptake flux (Figure 15) in the presence of the NOM would be attributed to a combination of a reduction in the diffusive flux of the metal complex (ca. 3x with respect to the free ion, (Buffle, Zhang et al. 2007)) and the dissociation kinetics of the REE-NOM complex (van Leeuwen 1999, Buffle, Zhang et al. 2007). However, given that the association (and dissociation) rate constants of the REE are relatively rapid[‡], while this mechanism cannot be excluded, it is considered to be unlikely. Furthermore, even though *small* hydrophilic complexes (malic, citric and diglycolic acids, NTA) of the REE (Eu, Sm, Tm) appear to be bioavailable to *C. reinhardtii* via the formation of a ternary complex (Yang, Tan et al. 2014, Zhao and Wilkinson 2015, Tan, Yang et al.

[‡] The association/dissociation kinetics of metal complexes can be predicted from their water loss rate constants. Values for the REEs are more similar to the divalent cations than to slowly reacting (trivalent) cations such as Al^{3+} or Fe^{3+} Buffle, J., Z. Zhang and K. Startchev (2007). "Metal flux and dynamic speciation at (bio)interfaces. Part I: Critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances." *Environmental Science & Technology* **41**(22): 7609-7620..

2017), ternary complexes are unlikely to form with the bulky fulvic or humic acids. Therefore, while there was no solid evidence to preclude the bioavailability of the Sm complexes, other explanations were also tested.

Hypothesis (iii): Validity of the thermodynamic data

Unlike for many synthetic ligands such as EDTA and NTA, or well-studied metals, few papers have reported stability constants for REE complexes with humic substances (e.g. (Tipping 1993, Glaus, Hummel et al. 2000, Chen, Fabbicino et al. 2015, Leguay, Campbell et al. 2016)). Using capillary electrophoresis, Sonke and Salters (2006) estimated a conditional equilibrium constant of $\log K$ (pH 6.0) ≈ 9.6 for Sm complexes with SRFA, a value that is currently used in the WHAM model calculations (Sonke 2006, Tipping, Lofts et al. 2011, Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016). More recently, Sm speciation was evaluated in the presence of the Suwannee River fulvic acid using an ion-exchange technique, IET (Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016). In that case, the authors validated their measurements by comparing their data from fluorescence quenching titrations (FQT). Given that the constants estimated from the ion exchange and fluorescence quenching techniques (conditional $\log K$ (pH 6.0) ≈ 5.0) were significantly smaller than values obtained using capillary electrophoresis, it appeared essential to measure free Sm using the precise conditions of the biouptake experiments.

Samarium speciation in the absence of natural organic matter

The accumulation of Sm on an ion exchange resin has been shown to be directly proportional to the concentration of free Sm (and certain small complexes) (Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016). In the absence of added ligand, Sm accumulated linearly on the ion exchange resin over 2 h (Figure 24). Sm concentrations in the test solutions were the same before and after each experiment and recovery was systematically between 90 and 105%. For experiments performed in the absence of ligand or in the presence of NTA or EDTA (ligand:Sm ratios 0.25 to 1), Sm accumulation rates, R_{acc} ($\mu\text{g Sm g}^{-1} \text{ resin min}^{-1}$), were plotted as a function of thermodynamically calculated (Visual Minteq 3.0) Sm^{3+} concentrations (M) (Figure 18). Accumulation rates increased linearly as a function of the free Sm ($R^2 = 0.916$). This curve

was then used to determine Sm^{3+} concentrations in the experimental solutions containing NOM by interpolation of an experimentally measured R_{acc} .

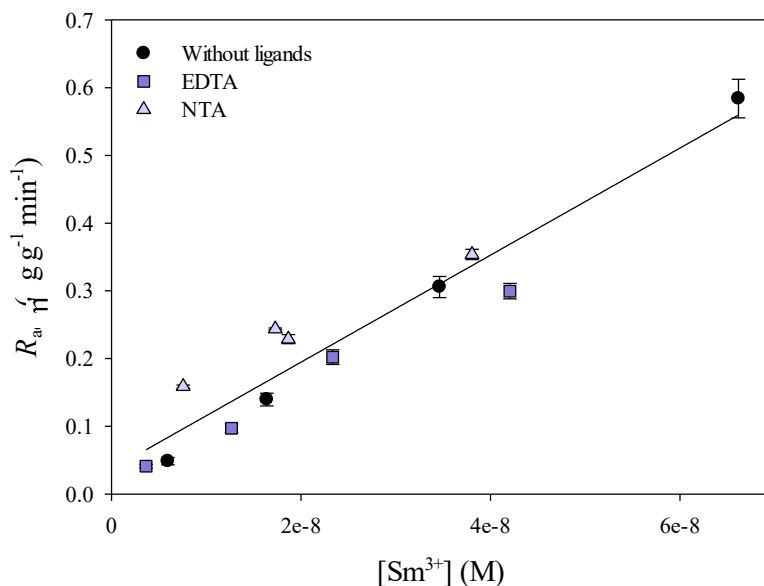


Figure 18. Sm accumulation rates R_{acc} ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$) on the ion exchange resin as a function of calculated free ion concentrations (Sm^{3+}) determined in the absence of ligands (\bullet) or in the presence of EDTA (\blacksquare) and NTA (\blacktriangle) (slope = $7.90 \times 10^6 \mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mol}^{-1}$, $R^2 = 0.916$). Error bars represent standard deviations ($n = 2$).

Sm speciation in the presence of natural organic matter

For a constant Sm concentration of $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, the increase of 0.5 to 7 mg C L^{-1} NOM resulted in a large decrease in R_{acc} (proportional to Sm^{3+}) (Figure 19). Humic acids were shown to more strongly complex Sm than fulvic acids. For example, the addition of as little as 0.5 mg C L^{-1} of NOM was enough to complex over 93 % of the Sm^{3+} , while greater than > 99 % of the Sm^{3+} was bound in the presence of 1.5 mg C L^{-1} NOM. The observed decrease in free Sm in the presence of NOM was consistent with previous data determined using the IET and FQT (Nduwayezu, Mostafavirad et al. 2016).

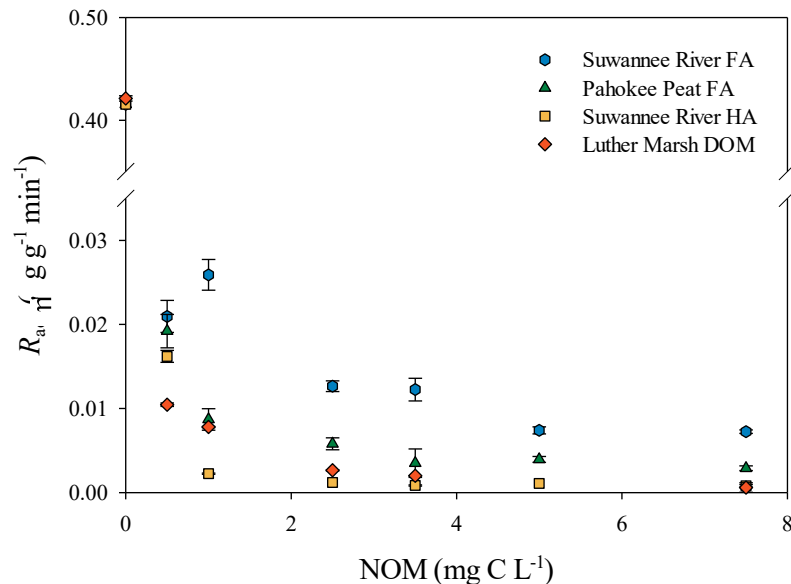
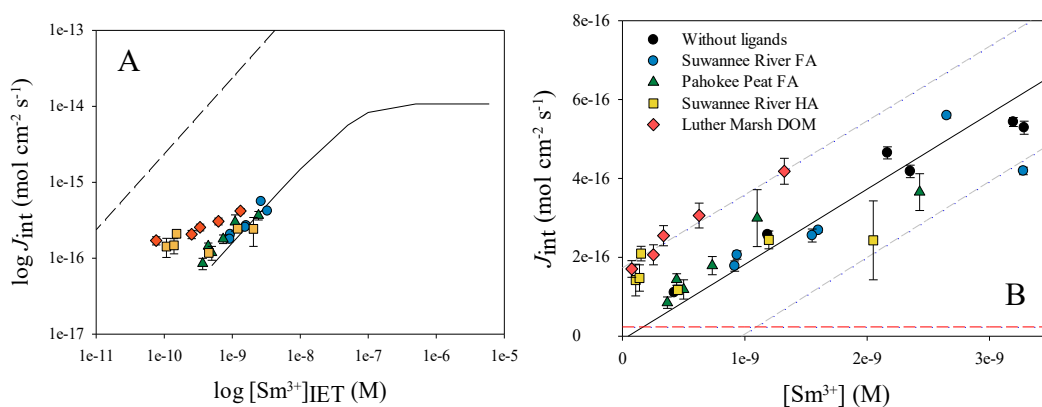


Figure 19. Samarium resin accumulation rate R_{acc} ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$) as a function of NOM concentration (mg C L^{-1}): SRFA (●), PPFA (▲), SRHA (■), LMDOM (◆). Error bars represent standard deviations ($n=2$).

IET determined Sm^{3+} concentrations were much larger than values predicted by thermodynamic modelling, in line with prior IET observations made for Eu at pH 6.2 (Leguay, Campbell et al. 2016). When experimentally determined Sm^{3+} concentrations were used to predict biouptake fluxes, a much better agreement was obtained with the previously generated Michaelis-Menten curve (Figure 20A). Unlike what was observed in Fig. 16, experimentally determined internalization fluxes were at least one order of magnitude lower than the maximum diffusion flux. Furthermore, the vast majority of data obtained in the presence of NOM were found within the 95% prediction interval of a regression plotted on the linear portion of the Michaelis-Menten curve (from 0 to $3.0 \times 10^{-8} \text{ M Sm}^{3+}$, Figure 20B). Nonetheless, biouptake in the presence of the fulvic acids tended to be better predicted by the free ion concentration than was biouptake in the presence of humic acids. Indeed, biouptake data obtained for the Luther Marsh DOM isolate was the least well described by predictions generated in the absence of ligand, suggesting that there may have been more interactions between the more hydrophobic organic ligands of this natural sample and the surface of the microorganism (Campbell, Twiss et al. 1997) than for the commercial humic substances.

Nonetheless, most of the discrepancy observed in Fig. 16 could be attributed to an overprediction of the complexation of the humic substances (i.e. x-axis data) than to any major differences in biouptake (y-axis data) (c.f. Fig. 20).



(A). Internalization fluxes (J_{int}) for Sm in the presence of NOM: SRFA (●), PPFA (▲), SRHA (■), LMDOM (◆) as a function of experimentally measured Sm^{3+} concentrations. The solid curve corresponds to the Michaelis-Menten plot relating J_{int} for Sm biouptake to the free Sm concentrations (i.e. Fig. 14). The dashed line corresponds to the calculated maximum diffusive flux for Sm^{3+} . Error bars correspond to standard deviations determined from 3 technical replicates of 2 separate algal cultures. (B) Internalization fluxes (J_{int}) in the absence of ligand as a function of the experimentally determined Sm^{3+} concentration in the linear portion of the Michaelis-Menten curve (0 to 3.0×10^{-8} M Sm^{3+}). The solid black line corresponds to the plotted linear regression and the gray dashed curves represent the 95% prediction interval. The red dashed curve corresponds to the detection limit of J_{int} calculated from a biouptake experiment performed in the absence of ligand. Sm internalization fluxes (J_{int}) determined in the presence of the four different types of NOM were added for statistical comparison. Most of the observations were well within the prediction interval, indicating that biouptake could be predicted from experimentally determined values of Sm^{3+} .

In the presence of NOM, Sm biouptake was well predicted by the experimentally determined concentrations of free Sm. This result differs somewhat from previous work that examined the role of small hydrophilic Sm complexes, but is reassuring since most of the REE found in the environment are likely to be bound by natural organic matter. Consequently, consistent with

previous work on divalent metals, the best predictor of bioavailability (and toxicity) of the REE in natural systems is likely to be the free ion concentration. Given the weak agreement between IET and prior measurements of free Sm (ligand exchange using capillary electrophoresis), other measurements of Sm (REE) speciation will be highly desirable in order to rigorously evaluate ecological risk.

5.5 Acknowledgments

Funding for this work is provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies* and Environment Canada. Technical assistance from Haleh Hadian was greatly appreciated.

5.6 Supplementary information for Determination of the speciation and bioavailability of Sm to *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of natural organic matter

Justine-Anne Rowell¹, Marc-Alexandre Fillion¹, Scott Smith², Kevin J. Wilkinson^{1*}

¹Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal, H3C 3J7, Canada.

²Department of Chemistry, Wilfrid Laurier University 75 University Avenue West, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3C5

*Corresponding author: Phone +1-514 343 6741; fax: +1-514 343 7586; e-mail:

kj.wilkinson@umontreal.ca

Thermodynamic calculations

Tableau III. Input data for thermodynamic calculations of Sm speciation using WHAM (Windermere Humic Aqueous Model) or Visual MINTEQ. For the commercially available NOM (Suwannee River fulvic acid, Suwannee River humic acid and Pahokee Peat fulvic acid, input concentrations were determined by gravimetry and verified by total organic carbon (TOC) analysis. The ratio of NOM: TOC was near 2 and in line with literature values (IHSS, 2017). For the Luther Marsh isolate, TOC concentrations were determined and converted to NOM concentrations by using the same estimate of the NOM carbon content (ca. 50%) and previously published measurements indicating that the humic substances were 90-95% humic acids (Al-Reasi, 2012).

| Parameter | Unit | |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|
| T° | °C | 21.5 |
| pCO ₂ | ppm | 400 |
| pH | - | 6.0 |
| [Ca ²⁺] | M | 10 ⁻⁵ |
| [NO ₃ ⁻] | M | 2 x 10 ⁻⁵ |
| [NOM] ¹ | mg L ⁻¹ | 0-15 |
| [Organic compounds] ² | M | 0-5 x 10 ⁻⁸ |
| [Sm] | M | 0-10 ⁻⁵ |

¹ It is not possible to consider NOM in Visual MINTEQ

² Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and nitrilotriacetic acid (NTA)

Biouptake experiments

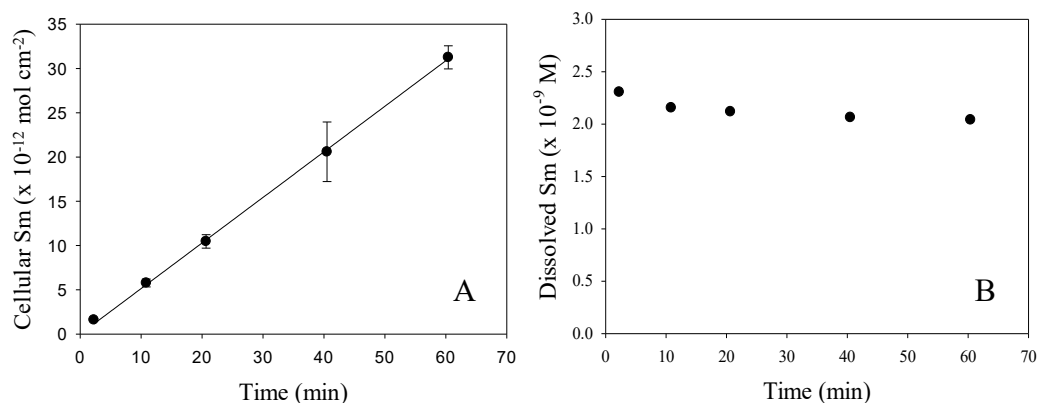


Figure 20. (A) Internalized Sm in *C. reinhardtii* as a function of exposure time. Algae ($0.15 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$) were exposed to $7 \times 10^{-8} \text{ M Sm}$ in 0.01 M MES medium (pH 6.0), resulting in a calculated internalization flux of $(8.5 \pm 1.1) \times 10^{-15} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Error bars represent standard deviations ($n=3$). (B) Dissolved Sm concentrations in the exposure medium during a 60 min exposure of *C. reinhardtii* to $7 \times 10^{-8} \text{ M Sm}$.

In the Sm biouptake experiments, a linear increase in cellular Sm was systematically observed over time, suggesting that the internalization flux was constant and that Sm efflux could be neglected over this time scale (Figure 21A). Internalization fluxes, J_{int} , were calculated from the slope of the linear regression of cellular Sm as a function of exposure time (Figure 14; $\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Dissolved Sm was constant over time with $\leq 10\%$ variation (Figure 21B).

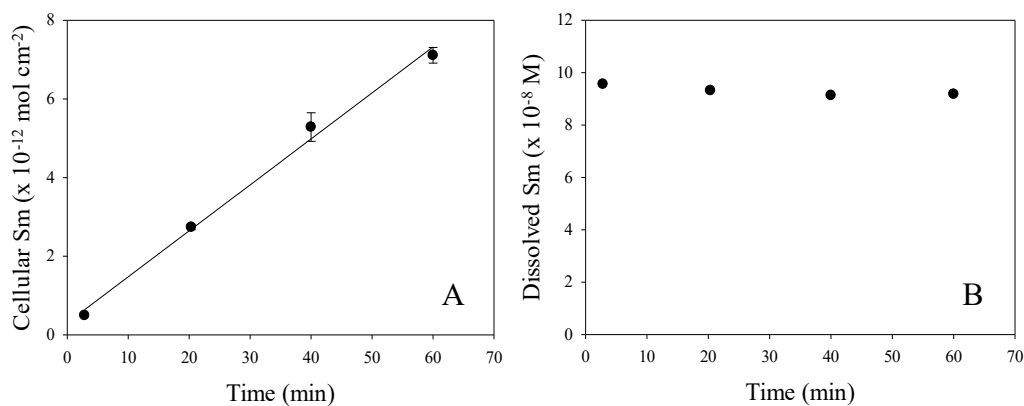


Figure 21. (A) Internalized Sm in *C. reinhardtii* as a function of exposure time in the presence of the Suwannee River fulvic acid (SRFA). Algae ($0.15 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$) were exposed to $1.2 \times 10^{-7} \text{ M Sm}$ and 1 mg C L^{-1} SRFA in a pH controlled, 0.01 M MES medium, $\text{pH } 6.0$, $10^{-5} \text{ M Ca(NO}_3)_2$. Error bars represent standard deviations ($n=3$). (B) Concentration of dissolved Sm in the exposure medium during a 60 min exposure of *C. reinhardtii* to $1.2 \times 10^{-7} \text{ M Sm}$ and 1 mg C L^{-1} SRFA.

As observed in the absence of ligand, Sm internalization increased linearly over time in the presence of NOM (60 min; Figure 22A). Dissolved Sm concentrations were relatively constant over the same time period with $\leq 20\%$ variation in their concentrations (Figure 22B).

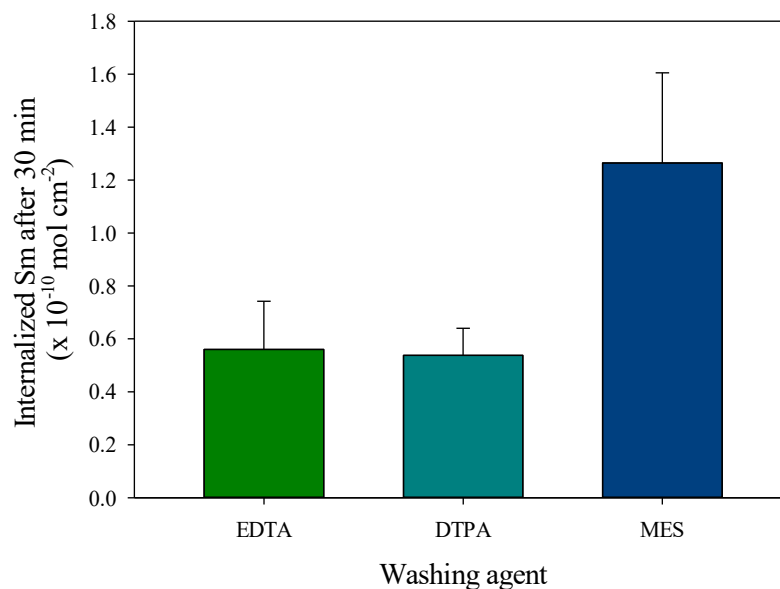
EDTA extraction efficiency

Figure 22. Internalized Sm in *C. reinhardtii* after 30 min of exposure to 1×10^{-7} M Sm and 5 mg C L^{-1} of the Suwannee River fulvic acid (SRFA) in 0.01 MES medium, pH 6.0, 10^{-5} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Extraction of the surface-bound Sm was performed with either 10 mM EDTA or 10 mM DTPA and compared with controls obtained from an identical treatment of the cells using 10 mM MES. All extractions were conducted using a contact time of 1 min.

EDTA and DTPA were clearly more efficient for extracting surface bound Sm than was the experimental medium containing MES (Figure 23). No significant difference was observed between the EDTA and DTPA extractions ($p < 0.05$, Student t-test).

Ion exchange resin measurements

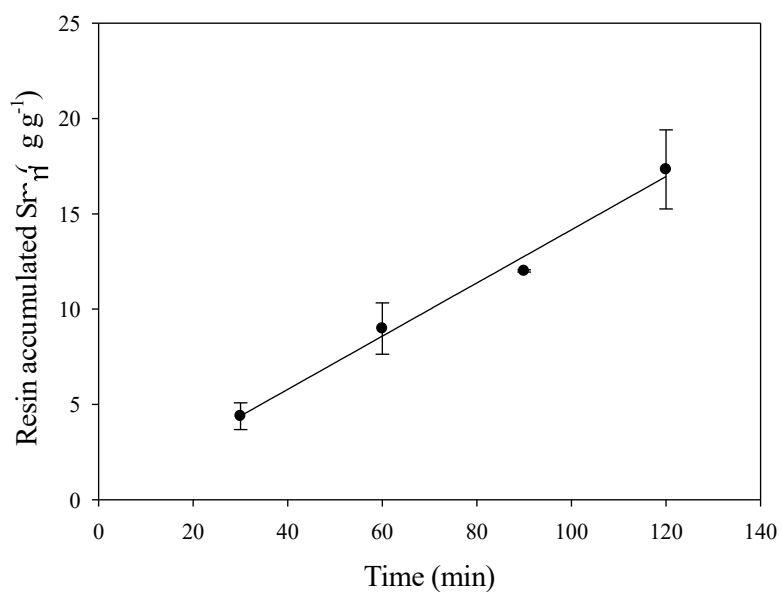


Figure 23. Resin accumulated Sm as a function of time ($\mu\text{g Sm g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) for a constant flow rate of 4 mL min^{-1} . $[\text{Sm}] = 1.67 \times 10^{-8} \text{ M}$ in the absence of ligands. The slope and standard deviations were calculated with SigmaPlot (slope = $0.140 \mu\text{g Sm g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.990$). Error bars represent standard deviations ($n=2$).

6. Conclusion

En somme, la présente étude s'est penchée sur les relations qui unissent la spéciation et la biodisponibilité des éléments de terres rares (ÉTR) en présence de quatre types de matière organique naturelle (MON), d'origine et de composition différentes, soit des acides humiques et fulviques de la rivière Suwannee, des acides fulviques de la tourbière Pahokee, ainsi qu'un échantillon de matière organique dissoute composé de 90 à 95 % d'acides humiques. Y ont été étudiées les interactions entre le samarium (Sm), un lanthanide de masse molaire intermédiaire, et l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, un microorganisme aquatique couramment utilisé comme organisme modèle.

L'étude vient avant tout confirmer l'importance de l'ion libre dans les mesures de spéciation. Considéré comme la principale espèce biodisponible, l'ion libre est généralement associé aux effets biologiques des métaux traces (Morel and Hering 1993, Campbell 1995, Zhao and Wilkinson 2015). En milieu contrôlé et en absence de ligands, le samarium libre (Sm^{3+}) représente en effet plus de 98 % de la concentration totale, alors que ce pourcentage chute typiquement à moins de 1 % en milieu naturel. Dans le cadre de la présente étude, les concentrations d'ion libre ont été déterminées par calculs thermodynamiques et mesurées expérimentalement par résine d'échange cationique. Utilisée en mode dynamique, cette technique permet une mesure directe des concentrations d'ion libre, et ce, même à de faibles concentrations. Les résultats démontrent que la présence de MON est liée à une importante diminution de la concentration de l'ion libre. La complexation du Sm^{3+} est majeure, et ce, même à de faibles concentrations de MON. En effet, une concentration d'environ $0,5 \text{ mg C L}^{-1}$ suffit pour que plus de 93 % de l'ion libre soit retrouvé sous forme de complexes. Les acides humiques semblent par ailleurs responsables d'une complexation plus importante de l'ion libre que les acides fulviques.

En parallèle, des expériences de bioaccumulation ont permis la détermination des flux d'internalisation du Sm en absence de ligands, à des concentrations totales de 10^{-9} à 10^{-5} M ainsi qu'en présence de MON pour une concentration totale constante d'environ 5×10^{-8} M. En absence de ligands, l'internalisation du Sm par *C. reinhardtii* est correctement prédite par

la concentration de l'ion libre, telle que modélisée par calculs thermodynamiques avec le logiciel WHAM 7.0.5. En présence de ligands, les modèles d'équilibre thermodynamique prédisent une réduction de l'internalisation proportionnelle à la diminution de la concentration de l'ion libre. D'étonnants résultats sont toutefois obtenus lorsque les variations de concentration de l'ion libre sont modélisées par calculs thermodynamiques. En effet, les flux d'internalisation calculés sont jusqu'à 3 ordres de grandeur plus importants que les prédictions basées sur la courbe de Michaelis-Menten. Des conclusions similaires ont été proposées par Parent *et al.* (1996) qui ont entre autres démontré que l'internalisation de l'Al ne pouvait être convenablement prédite par la concentration de l'ion libre (Al^{3+}) en présence d'AF. Crémazy *et al.* (2013) ont fait de même avec le Sc, Wilkinson, Campbell *et al.* (1990) avec l'Al et Shaked, Kustka *et al.* (2005) avec le Fe. Il semble donc clair que lier la spéciation à la biodisponibilité des éléments métalliques en présence de MON est une problématique importante. Dans le cadre de la présente étude, les mesures expérimentales de l'ion libre, réalisées par résine d'échange ionique, semblent toutefois permettre une prédiction nettement plus juste des taux d'internalisation de Sm par *C. reinhardtii* en présence de MON. Cette conclusion illustre d'ailleurs l'importance de comparer les résultats de calculs thermodynamiques avec des valeurs mesurées expérimentalement.

Les résultats de cette étude soulignent également la complexité du développement de modèles d'équilibre thermodynamiques, tels que le modèle du ligand biotique (BLM), qui doivent tenir compte d'une multitude de facteurs, parfois imprévisibles ou difficilement mesurables. Ces modèles, qui permettent d'évaluer les risques écologiques associés aux éléments métalliques, doivent en effet combiner une large gamme de conditions physicochimiques, incluant la spéciation et la concentration des métaux, la concentration des différents ligands et la présence d'ions compétiteurs, sans parler de la diversité des organismes aquatiques potentiellement impliqués.

À la lumière de ces résultats, il apparaît essentiel de poursuivre l'étude de la spéciation et de la biodisponibilité des éléments de terres rares, de manière à mieux cerner leurs potentiels risques écotoxicologiques. Présents dans une variété d'environnements, et ce, à des concentrations toujours croissantes, il est urgent d'identifier et d'optimiser des méthodes

permettant d'évaluer leur spéciation et leur biodisponibilité, concepts intimement liés à leur toxicité. Avant tout effectuées en milieux contrôlés, des mesures par résine d'échange cationique et des expériences de bioaccumulation gagneraient à être réalisées avec des échantillons naturels, représentant la réelle complexité des milieux aquatiques.

7. Bibliographie

Adachi, G., N. Imanaka and Z. C. Kang (2004). Binary rare earth oxides. Dordrecht, Netherlands, Springer Science & Business Media.

Al-Reasi, H. A., D. Scott Smith and C. M. Wood (2012). "Evaluating the ameliorative effect of natural dissolved organic matter (DOM) quality on copper toxicity to *Daphnia magna*: improving the BLM." Ecotoxicology **21**(2): 524-537.

Bates, S. S., A. Tessier, P. G. Campbell and J. Buffle (1982). "Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas varuabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture." Journal of Phycology **18**(4): 521-529.

Bauer, D., D. Diamond, J. Li, D. Sandalow, P. Telleen and B. Wanner (2010). US Department of Energy Critical Materials Strategy. USA.

Buffle, J. (1988). Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach. New York, NY, USA, John Wiley and Sons.

Buffle, J., R. Altmann, M. Filella and A. Tessier (1990). "Complexation by natural heterogeneous compounds: site occupation distribution functions, a normalized description of metal complexation." Geochimica et Cosmochimica Acta **54**(6): 1535-1553.

Buffle, J., Z. Zhang and K. Startchev (2007). "Metal flux and dynamic speciation at (bio)interfaces. Part I: Critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances." Environmental Science & Technology **41**(22): 7609-7620.

Campbell, P. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. A. Tessier, Turner, D. New York, John Wiley: 45-102.

Campbell, P., O. Errécalde, C. Fortin, V. P. Hiriart-Baer and B. Vigneault (2002). "Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **133**(1–2): 189-206.

Campbell, P., M. R. Twiss and K. J. Wilkinson (1997). "Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **54**(11): 2543-2554.

Cantwell, F. F., J. S. Nielsen and S. E. Hrudey (1982). "Free nickel ion concentration in sewage by an ion exchange column-equilibration method." Analytical Chemistry **54**(9): 1498-1503.

Chen, Y., M. Fabbicino, M. F. Benedetti and G. V. Korshin (2015). "Spectroscopic in situ examination of interactions of rare earth ions with humic substances." Water Res **68**: 273-281.

Chen, Z., L. Zhu and K. J. Wilkinson (2010). "Validation of the biotic ligand model in metal mixtures: Bioaccumulation of lead and copper." Environmental Science & Technology **44**(9): 3580-3586.

Crémazy, A., P. Campbell and C. Fortin (2013). "The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: possible role of hydroxo-species." Environmental Science & Technology **47**(5): 2408-2415.

Crémazy, A., S. Leclair, K. Mueller, B. Vigneault, P. Campbell and C. Fortin (2015). "Development of an in situ ion-exchange technique for the determination of free Cd, Co, Ni, and Zn concentrations in freshwaters." Aquatic Geochemistry **21**(2-4): 259-279.

De Schampelaere, K. A. C., J. L. Stauber, K. L. Wilde, S. J. Markich, P. L. Brown, N. M. Franklin, N. M. Creighton and C. R. Janssen (2005). "Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu²⁺-ion activity when pH is varied." Environmental Science & Technology **39**(7): 2067-2072.

Di Toro, D. M., H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin and R. C. Santore (2001). "Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(10): 2383-2396.

Dodson, J. R., A. J. Hunt, H. L. Parker, Y. Yang and J. H. Clark (2012). "Elemental sustainability: Towards the total recovery of scarce metals." Chemical Engineering and Processing: Process Intensification **51**: 69-78.

Du, X. and T. E. Graedel (2011). "Global in-use stocks of the rare earth elements: a first estimate." Environmental Science & Technology **45**(9): 4096-4101.

Emsley, J. (2001). Nature's Building Blocks: An A-Z guide to the elements, Oxford University Press.

Fortin, C. and P. G. Campbell (1998). "An ion-exchange technique for free-metal ion measurements (Cd²⁺ Zn²⁺): applications to complex aqueous media." International Journal of Environmental Analytical Chemistry **72**(3): 173-194.

Glaus, M. A., W. Hummel and L. R. Van Loon (2000). "Trace metal–humate interactions. I. Experimental determination of conditional stability constants." Applied Geochemistry **15**(7): 953-973.

Gonzalez, V., D. A. L. Vignati, C. Leyval and L. Giamberini (2014). "Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: Are they a uniform group beyond chemistry?" Environment International **71**: 148-157.

Haraguchi, H., A. Itoh, C. Kimata and H. Miwa (1998). "Speciation of yttrium and lanthanides in natural water by inductively coupled plasma mass spectrometry after preconcentration by ultrafiltration and with a chelating resin." Analyst **123**(5): 773-778.

Harris, E. H. (1989). Chlamydomonas in the laboratory. The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego, Academic Press: 25-63.

Hassler, C. S., V. I. Slaveykova and K. J. Wilkinson (2004). "Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(2): 283-291.

Henderson, P. (1984). "General geochemical properties and abundances of the rare earth elements." Rare Earth Element Geochemistry **2**(1): 32.

Hudson, R. J., F. M. Morel and F. Morel (1990). "Iron transport in marine phytoplankton: Kinetics of cellular and medium coordination reactions." Limnology and Oceanography **35**(5): 1002-1020.

Hurst, C. (2010). China's rare earth elements industry: What can the west learn? Washington, USA, Institute for the Analysis of Global Security (IAGS): 42.

IHSS (International Humic Substances Society) (2017) <http://humic-substances.org/elemental-compositions-and-stable-isotopic-ratios-of-ihss-samples/>. Accessed 30-12-2017.

Kogel, J. E. (2006). Rare Earth Elements. Industrial minerals & rocks: commodities, markets, and uses. J. E. Kogel, Trivedi, N.C., Barker, J.M., Krukowski, S.T. Littleton, Colorado, USA, Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc.: 769-792.

Kola, H. and K. J. Wilkinson (2005). "Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling." Environmental Science & Technology **39**(9): 3040-3047.

Lavoie, M., P. G. Campbell and C. Fortin (2012). "Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga." Environmental Science & Technology **46**(21): 12129-12136.

Lavoie, M., C. Fortin and P. G. C. Campbell (2012). "Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations." Environmental Toxicology and Chemistry **31**(7): 1445-1452.

Leenheer, J. A. and J.-P. Croué (2003). "Characterizing aquatic dissolved organic matter." Environmental Science & Technology **37**(1): 18A-26A.

Leguay, S., P. G. Campbell and C. Fortin (2016). "Determination of the free-ion concentration of rare earth elements by an ion-exchange technique: implementation, evaluation and limits." Environmental Chemistry **13**(3): 478-488.

Leguay, S., P. G. C. Campbell and C. Fortin (2016). "Determination of the free-ion concentration of rare earth elements by an ion-exchange technique: implementation, evaluation and limits." Environmental Chemistry **13**(3): 478-488.

Li, X., Z. Chen, Z. Chen and Y. Zhang (2013). "A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China." Chemosphere **93**(6): 1240-1246.

Liang, T., S. Zhang, L. Wang, H.-T. Kung, Y. Wang, A. Hu and S. Ding (2005). "Environmental biogeochemical behaviors of rare earth elements in soil-plant systems." Environmental Geochemistry and Health **27**(4): 301-311.

Lidon, F. C. and F. S. Henriques (1993). "Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants." Journal of Plant Nutrition **16**(8): 1449-1464.

Lineweaver, H. and D. Burk (1934). "The determination of enzyme dissociation constants." Journal of the American Chemical Society **56**(3): 658-666.

Liu, J. (2015). "Lanthanide-dependent RNA-cleaving DNazymes as metal biosensors." Canadian Journal of Chemistry **93**(3): 273-278.

Ma, H., S. D. Kim, D. K. Cha and H. E. Allen (1999). "Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(5): 828-837.

Miekeley, N., H. Coutinho de Jesus, C. L. Porto da Silveira, P. Linsalata and R. Morse (1992). "Rare-earth elements in groundwaters from the Osamu Utsumi mine and Morro do Ferro analogue study sites, Poços de Caldas, Brazil." Journal of Geochemical Exploration **45**(1): 365-387.

Migaszewski, Z. M. and A. Gałuszka (2015). "The characteristics, occurrence, and geochemical behavior of rare earth elements in the environment: a review." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **45**(5): 429-471.

Morel, F. M. and J. G. Hering (1993). Principles and applications of aquatic chemistry. New York, Wiley-Interscience.

Nduwayezu, I., F. Mostafavirad, M. Hadioui and K. J. Wilkinson (2016). "Speciation of a lanthanide (Sm) using an ion exchange resin." Analytical Methods **8**(37): 6774-6781.

Noack, C. W., D. A. Dzombak and A. K. Karamalidis (2014). "Rare earth element distributions and trends in natural waters with a focus on groundwater." Environmental Science & Technology **48**(8): 4317-4326.

NRC (2014). The Rare Earth Elements Industry in Canada - Summary of Evidence. S. C. o. N. Resources: 30.

Nriagu, J. O., G. Lawson, H. K. Wong and J. M. Azcue (1993). "A protocol for minimizing contamination in the analysis of trace metals in Great Lakes waters." Journal of Great Lakes Research **19**(1): 175-182.

Pitre, D., A. Boullemant and C. Fortin (2014). "Uptake and sorption of aluminium and fluoride by four green algal species." Chemistry Central Journal **8**(1): 8.

Rand, G., P. Wells and L. McCarty (1995). Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate, and risk assessment. Introduction to aquatic toxicology. North Palm Beach, Florida, USA, Taylor and Francis Publishers: 3-67.

- Shaked, Y., A. B. Kustka and F. M. Morel (2005). "A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton." Limnology and Oceanography **50**(3): 872-882.
- Slaveykova, V. and K. Wilkinson (2005). "Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model." Environmental Chemistry **2**(1): 9-24.
- Slaveykova, V. I. and K. J. Wilkinson (2002). "Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*." Environmental Science & Technology **36**(5): 969-975.
- Slaveykova, V. I. and K. J. Wilkinson (2005). "Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the biotic ligand model." Environmental Chemistry **2**(1): 9-24.
- Sneller, F., D. Kalf, L. Weltje and A. Van Wezel (2000). Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for rare earth elements (REEs). Bilthoven, The Netherlands: 60.
- Sonke, J. E. (2006). "Lanthanide–humic substances complexation. II. Calibration of Humic Ion-Binding Model V." Environmental science & technology **40**(24): 7481-7487.
- Sonke, J. E. and V. J. Salters (2006). "Lanthanide–humic substances complexation. I. Experimental evidence for a lanthanide contraction effect." Geochimica et Cosmochimica Acta **70**(6): 1495-1506.
- Tan, Q.-G., G. Yang and K. J. Wilkinson (2017). "Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*." Chemosphere **168**: 426-434.
- Taylor, S. R. and S. M. McLennan (1985). The continental crust: its composition and evolution. Palo Alto, CA, USA, Blackwell Scientific Pub.
- Thurman, E. (1985). Developments in biogeochemistry: organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff/Dr W. Dordrecht, The Netherlands, Junk Publishers.
- Tipping, E. (1993). Modelling the Binding of Europium and the Actinides by Humic Substances. Radiochimica Acta. **62**: 141.
- Tipping, E. (1998). "Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances." Aquatic Geochemistry **4**(1): 3-47.
- Tipping, E., S. Lofts and J. Sonke (2011). "Humic Ion-Binding Model VII: a revised parameterisation of cation-binding by humic substances." Environmental Chemistry **8**(3): 225-235.
- Tse, P.-K. (2011). China's rare-earth industry. Virginia, USA, US Department of the Interior, US Geological Survey Reston.
- Twiss, M. R., O. Errécalde, C. Fortin, P. G. C. Campbell, C. Jumarie, F. Denizéau, E. Berkelaar, B. Hale and K. van Rees (2001). "Coupling the use of computer chemical speciation models and

culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity." Chemical Speciation & Bioavailability **13**(1): 9-24.

Tyler, G. (2004). "Rare earth elements in soil and plant systems - A review." Plant and Soil **267**(1-2): 191-206.

Unsworth, E. R., K. W. Warnken, H. Zhang, W. Davison, F. Black, J. Buffle, J. Cao, R. Cleven, J. Galceran and P. Gunkel (2006). "Model predictions of metal speciation in freshwaters compared to measurements by in situ techniques." Environmental Science & Technology **40**(6): 1942-1949.

van Leeuwen, H. P. (1999). "Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes." Environmental Science & Technology **33**(21): 3743-3748.

van Leeuwen, H. P., R. M. Town, J. Buffle, R. F. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk and L. Sigg (2005). "Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems." Environmental Science & Technology **39**(22): 8545-8556.

Weber, R. J. and D. J. Reisman (2012). Rare earth elements: A review of production, processing, recycling, and associated environmental issues. U. S. E. P. Agency. Cincinnati, Ohio: 135.

Wells, W. H. and V. L. Wells (2000). "The lanthanides, rare earth metals." Patty's Toxicology **43**.

Whitfield, M. and D. R. Turner (1979). Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. Chemical modeling in aqueous systems, American Chemical Society. **93**: 657-680.

Wilkinson, K. J. and J. Buffle (2004). Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces. H. P. v. Leeuwen and W. Köster. Chichester, UK, Wiley Online Library. **9**.

Wilkinson, K. J., P. G. Campbell and P. Couture (1990). "Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **47**(7): 1446-1452.

Worms, I., D. F. Simon, C. Hassler and K. Wilkinson (2006). "Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake." Biochimie **88**(11): 1721-1731.

Worms, I. A. and K. J. Wilkinson (2008). "Determination of Ni²⁺ using an equilibrium ion exchange technique: Important chemical factors and applicability to environmental samples." Analytica Chimica Acta **616**(1): 95-102.

Worms, I. A. M., N. Parthasarathy and K. J. Wilkinson (2007). "Ni uptake by a green alga. 1. Validation of equilibrium models for complexation effects." Environmental Science & Technology **41**(12): 4258-4263.

Worms, I. A. M. and K. J. Wilkinson (2007). "Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects." Environmental Science & Technology **41**(12): 4264-4270.

Xinde, C., W. Xiaorong and Z. Guiwen (2000). "Assessment of the bioavailability of rare earth elements in soils by chemical fractionation and multiple regression analysis." Chemosphere **40**(1): 23-28.

Yang, G., Q. G. Tan, L. Zhu and K. J. Wilkinson (2014). "The role of complexation and competition in the biouptake of europium by a unicellular alga." Environmental Toxicology and Chemistry **33**(11): 2609-2615.

Yuan-Hui, L. and S. Gregory (1974). "Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments." Geochimica et Cosmochimica Acta **38**(5): 703-714.

Zeng, J., L. Yang and W.-X. Wang (2009). "Cadmium and zinc uptake and toxicity in two strains of *Microcystis aeruginosa* predicted by metal free ion activity and intracellular concentration." Aquatic Toxicology **91**(3): 212-220.

Zhao, C.-M., P. G. C. Campbell and K. J. Wilkinson (2016). "When are metal complexes bioavailable?" Environmental Chemistry **13**(3): 425-433.

Zhao, C.-M. and K. J. Wilkinson (2015). "Biotic ligand model does not predict the bioavailability of rare earth elements in the presence of organic ligands." Environmental Science & Technology **49**(4): 2207-2214.

Zielhuis, S. W. (2006). Lanthanide bearing radioactive particles for cancer therapy and multimodality imaging, Utrecht University.