

N° d'ordre : 2968

Thèse

Présentée à

L'Université Bordeaux 1

Ecole doctorale

**Sciences du vivant, Géosciences et
Sciences de l'Environnement**

Par

Hélène MORLON

Pour l'obtention du titre de

Docteur Mention Sciences

Spécialité

Ecotoxicologie

**Mécanismes de prise en charge du sélénite – Se(IV)-
chez l'algue verte unicellulaire
Chlamydomonas reinhardtii.
Bioaccumulation et effets induits sur la croissance et
l'ultrastructure.**

Soutenue le 4 Mars 2005

Après avis de :

Mme CASELLAS, C., Professeur, Université de Montpellier, Rapporteur

Mme FILELLA, M., Chercheur, Université de Genève, Suisse, Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme CAPDEPUY, M., Professeur, Université Bordeaux 1, Président du jury

Mme CASELLAS, C., Professeur, Université de Montpellier, Rapporteur

Mme FILELLA, M., Chercheur, Université de Genève, Suisse, Rapporteur

Mme GARNIER-LAPLACE, J., HDR, IRSN Cadarache, Directrice de thèse

Mr BOUDOU, A., Professeur, Université Bordeaux 1, Co-directeur de thèse

Mme ADAM, C., Chercheur, IRSN Cadarache, encadrante IRSN

Mr FORTIN, C., Professeur, INRS Eau-Terre-Environnement, Québec, Examineur

Mr COURNAC, L., Chercheur, CEA/DSV/DEVM, Examineur

Remerciements

En m'accueillant dans leur équipe, Jacqueline Garnier-Laplace et Jean-Christophe Gariel m'ont permis de découvrir le domaine passionnant de l'Ecotoxicologie. Ils ont ensuite fait preuve d'une compréhension dont je leur suis profondément reconnaissante en me permettant de réorienter ma thèse à ses débuts. J'ai particulièrement apprécié chez Jacqueline son dynamisme, qui fait du laboratoire un endroit stimulant, ainsi que ses grandes qualités scientifiques et humaines. En tant que directrice de thèse, elle a toujours été disponible malgré un emploi du temps chargé et m'a accordé la confiance, le soutien, et la liberté dont j'avais besoin dans mes recherches.

Ces travaux ont bénéficié du savoir dans le domaine de l'Ecotoxicologie d'Alain Boudou, qui a assuré la co-direction de ma thèse. Les discussions avec lui ont été particulièrement efficaces et m'ont permis de prendre du recul.

Claude Fortin m'a initié à l'univers de *Chlamydomonas reinhardtii* et n'a cessé de m'aider à distance depuis le Québec, avec la précision et la rigueur qui le caractérisent. Il a toujours su se rendre disponible et m'a beaucoup appris. Je lui dois aussi, ainsi qu'à son épouse Sophie, une chaleureuse hospitalité et quelques expressions québécoises.

Christelle Adam a apporté ses idées, corrections et encouragements, avec un sourire constant.

Toute une partie de ce document est le fruit des heures passées par Magali Floriani devant le microscope électronique à transmission avec sérieux, compétence, et ...sens de l'observation. La contribution scientifique de Frank Denison (« Monsieur Spéciation »), Laureline Février (« Madame Sélénium ») et Rodolphe Gilbin (« Monsieur Tout ») a été d'un grand support. Laurent Cournac a porté intérêt à ces travaux et a fourni une aide aussi spontanée que constructive.

Marcel Morello a effectué les dosages en scintillation liquide avec rapidité, explications, et amabilité. De nombreuses analyses ont également été réalisées grâce au travail précieux de Virginie Camilleri, Isabelle Cavalie, Gaëlla Grasset et Daniel Orjolle.

Mes excuses à Catherine Pradines, pour n'avoir pas eu le temps d'appliquer ses enseignements en biochimie, ainsi qu'à Virginie Wiktor, qui a réalisé des expériences dont les résultats n'ont, pour les mêmes raisons, pas été exploités.

J'ai eu plaisir à travailler au LRE, grâce à une équipe amicale et bienveillante que j'ai beaucoup appréciée. Merci à tous. En particulier, pour les bons moments passés ensemble, coups de pouce, encouragements et sourires tout au long de ces années, merci à : la charmante Cathy et sa chaleur ; Claudine, sa bonne humeur et ses efforts pour nous faciliter la vie ; Elodie, sa gentillesse sous ses faux airs grognons ; Franky, ses « fingers crossed for you » ; le très très chouette Fred ; Laetitia et notre bout de vie parallèle ; Laureline, qui n'a pas compté son temps pour répondre à mes questions ; Magali, avec laquelle on doit toujours aller danser ; Nono et son souci de mes états d'âme ; Olivier - qui a largement pardonné ma sensibilité pour les petits poissons - ; « Super Roro », qui n'a pas volé son surnom ; Thierry, à qui je devrais donner mon chemisier bleu ; Toutouille, son esprit nature et ses zozios ; Winny et ses blagues. Pour le stress de la dernière ligne droite, merci en particulier à Hervé avec son bonjour du matin, à Jean-Marc et ses coucous depuis la fenêtre, et à l'inséparable trio KikiSandraVictor, pour leur promptitude à aider et la grande sympathie qu'ils m'ont montrée.

J'ai été à plusieurs reprises pendant ma thèse exilée à Bordeaux, moments qu'Arnaud, Aurélie, Damien et Sophie ont su rendre agréables. Le monitorat m'a fait connaître la délicate et dévouée Elise ainsi que le sympathique statisticien Gilles.

Je n'en serais pas arrivée là sans Anne, Blandine, Camille, Gaëlle, Peggy et Yann, qui m'ont marquée, et entre autres fait aimer l'Ecologie et mettre de côté les Maths : je ne regrette pas !

Merci pour l'évasion à tous ceux qui m'ont accompagnée sur les falaises ou la glace, en canyon, en montagne ou en mer : Angela la colombienne, le bien cool Bud, Fred et sa fameuse soirée pizza, l'adorable Helen, Juju et l'Ardèche, Lolo et ses skis, le souriant Nicolas, le serviable Olivier, Paul si doux, Popeye « Mémepaspeurdelamort », l'attachant ours ReRe, Thierry & Thierry, Tonton Tony,...

... Et pour en plus leurs nombreux témoignages d'affection et de soutien : Bej et son sens de l'amitié ; Fanfou, qui prend tellement soin de moi ; Fred, qui m'a intégrée dans son vaste harem ; J.m, sa sensibilité, sa Forza et ses boucles ; Jojo et sa main sur son grand cœur ; ma « grande sœur » Louloute et ses intentions pour moi.

Et il y a bien sûr ceux, malheureusement éparpillés un peu partout, qui m'entourent depuis déjà de nombreuses années et aventures, et qui, je le sais, me soutiendront toujours. Une pensée particulière : aux Perrins, les « bios » de Mérindol avec Fanny, au merveilleux naturel ; à : Mily, sa vieille et durable amitié ; Olivier le Suisse, avec sa constance ; Flo et Géraldine, compagnes fidèles d'années de labeur ; Le « bel Olivier » et ses copains les livres ; Franc et Mélanie, leur regard sur le monde et leurs pensées positives ; Fifine et Pierrot, ces gens tellement bien.

Enfin, par l'immense confiance qu'ils ont en moi, par le soutien et la protection inestimables qu'ils m'ont procurés, mes parents « mon pilier et mon refuge », toujours là, ont su me rassurer et me permettre de surmonter mes moments de doute. J'avoue avoir bien perturbé leur tranquillité et avoir profité de la période de rédaction pour me faire plaindre et dorloter... et même, avec un peu de honte, avoir infligé à ma mère la relecture de mon manuscrit...

*A toutes ces personnes, j'adresse ma reconnaissance,
Ainsi que mes profonds remerciements.*

*A mes parents,
A mon frère,
Je dédie cette thèse.*

Résumé

Le sélénium est un élément essentiel, présent à des concentrations variant dans l'environnement du nM au μM . Il peut rapidement devenir toxique, et la pollution par cet élément est un phénomène mondial. L'objectif des recherches menées était d'accroître les connaissances relatives à l'interaction entre le sélénite -Se(IV)- et un organisme phytoplanctonique d'eau douce : l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

Afin d'étudier les mécanismes de prise en charge, nous avons exposé les cellules à du sélénite marqué (^{75}Se , émetteur β), pendant une courte durée ($\sim 1\text{h}$), et dans des milieux inorganiques de physico-chimie contrôlée. L'interprétation des résultats s'est appuyée sur l'utilisation du logiciel JChess afin d'établir un lien entre la spéciation chimique et la prise en charge de l'élément. Nous avons montré que l'adsorption du sélénite sur la surface algale est négligeable tandis que son flux d'internalisation est élevé ($0,2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Un système de transport membranaire de haute affinité saturant rapidement a été mis en évidence pour des concentrations d'exposition de l'ordre du nM. Aux concentrations plus élevées, la prise en charge est assurée par un transport de faible affinité ne saturant qu'à de très fortes concentrations ($\sim \text{mM}$). Celui-ci est inhibé par des concentrations croissantes en sulfate, suggérant des voies de transport communes aux deux éléments. Enfin, la spéciation du Se (IV) en solution a peu d'effet sur sa prise en charge.

Afin d'étudier la toxicité et la bioaccumulation du sélénite sur des échelles de temps plus réalistes d'un point de vue environnemental, nous avons exposé les cellules à du sélénite stable pendant la durée de la croissance algale (96h). Nous avons mis en évidence des effets toxiques sur la croissance et sur l'ultrastructure à des concentrations élevées. La concentration d'exposition induisant une réduction de 50% de la densité cellulaire maximale atteinte est estimée à $80 \mu\text{M}$, et les premiers effets visibles en microscopie électronique à transmission apparaissent à $50 \mu\text{M}$. Ceux-ci sont principalement dirigés vers le chloroplaste. Aux concentrations plus élevées ($500 \mu\text{M}$), les algues accumulent de l'amidon de façon significative, et des granules denses sont formés. Les analyses en spectrométrie par dispersion en énergie (EDS) révèlent que ceux-ci contiennent du sélénium et sont riches en phosphore et calcium. Nous avons montré que la toxicité est fortement corrélée à la quantité de sélénium bioaccumulée, que l'effet d'inhibition induit par le sulfate sur la prise en charge à court terme ($<1 \text{ h}$) du sélénite se répercute par un effet d'inhibition sur la bioaccumulation à plus long terme (96 h). Enfin, l'importante capacité de bioaccumulation algale est confirmée dans le cas de *C. reinhardtii*, avec, dans nos conditions expérimentales, un facteur de concentration (exprimé sur la base du poids sec) variant entre 690 et 7 100.

Liste des abbréviations

ANDRA : Agence Nationale de la gestion des Déchets Radioactifs
BCF : Bioconcentration Factor
BLM : Biotic Ligand Model
DIC : Dissolved Inorganic Carbon
EC : Effect Concentration
FIAM : Free Ion Activity Model
GPx : Glutathion Peroxidase
GSSG : Glutathion réduit
GSH : Glutathion oxydé
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
LOEC : LOwest Effect Concentration
LSD : Least Square Difference
NIST : National Institute of Standards and Technology
NOEC : NO Effect Concentration
OECD : Organisation for Economic Cooperation and Development
OECD-NEA : Organisation for Economic Cooperation and Development. Nuclear Energy Agency
RNVL : RadioNucléide à Vie Longue
RUBISCO : RibUscose 1,5 BisPhosphate Carboxylase/Oxygenase
SeCys : Sélénocystéine
SeMet : Sélénométhionine
SL : Sélénocystéine Lyase
SPS : SélénoPhosphate Synthetase
THT : Très Haute Tension
USEPA : US Environmental Protection Agency

Table des matières

1. INTRODUCTION	5
1.1. CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	5
1.1.1. Contexte général	5
1.1.2. Objectifs de recherche	6
1.1.2.1. Les mécanismes de prise en charge	6
1.1.2.2. La toxicité et la bioaccumulation	6
1.2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1.2.1. Le sélénium dans l'environnement aquatique	7
1.2.1.1. Sources, concentrations et impacts	7
Sources et concentrations	7
Impacts	8
1.2.1.2. Formes chimiques	9
Formes inorganiques	9
Formes organiques	9
1.2.1.3. Cycle biogéochimique du sélénium et rôle du phytoplancton	13
Cycle biogéochimique du sélénium	13
Importance de la voie trophique dans le cycle biogéochimique du sélénium	13
Comparaison des états de valence	14
1.2.2. Rôle et métabolisme du sélénium chez les organismes	15
1.2.2.1. Rôle du sélénium	15
1.2.2.2. Métabolisme du sélénium	16
1.2.3. Mécanismes de prise en charge	18
1.2.3.1. Structure de l'interface biologique	18
1.2.3.2. Mécanismes généraux et cas des éléments anioniques	18
Diffusion et adsorption à la surface cellulaire	19
Transport à travers la membrane plasmique	19
1.2.3.3. Prise en charge du sélénite et comparaison avec les autres états de valence	21
1.2.3.4. Inhibition du transport membranaire du sélénite par des anions chez les organismes phytoplanctoniques et comparaison avec les autres états de valence ..	22
Effet des phosphates	23
Effet des sulfates	23
Effet des nitrates	24
Effet des carbonates	24
Influence de la spéciation chimique du sélénite sur le transport	24
1.2.4. Bioaccumulation et toxicité	25
1.2.4.1. Généralités et cas des éléments anioniques	25
1.2.4.2. Cas du sélénium	25
Mécanismes de toxicité	25
Mécanismes de tolérance	26
1.2.4.3. Bioaccumulation et toxicité du sélénite chez les organismes phytoplanctoniques	27
Bioaccumulation	27
Toxicité	27
1.2.5. Synthèse bibliographique	29
1.3. MODELE BIOLOGIQUE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE	35
1.3.1. Modèle biologique sélectionné: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	35

1.3.2.	Démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier la prise en charge du sélénite	36
1.3.3.	Démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier la toxicité et la bioaccumulation du sélénite	37
1.4.	VUE D'ENSEMBLE DU CONTENU DU MEMOIRE.....	37
2.	<u>MATERIEL ET METHODES.....</u>	41
2.1.	GENERALITES	41
2.1.1.	Algues.....	41
2.1.2.	Milieux de culture et d'exposition.....	41
2.1.2.1.	Choix des milieux.....	41
2.1.2.2.	Préparation des milieux	42
2.1.3.	Analyses statistiques.....	43
2.2.	ETUDE DE LA PRISE EN CHARGE: EXPOSITIONS DE COURTE DUREE.....	44
2.2.1.	Protocole expérimental.....	44
2.2.2.	Dosage du ⁷⁵ Se	45
2.2.3.	Modélisation thermodynamique.....	48
2.3.	Etude de la bioaccumulation et de la toxicité: expositions de longue durée.....	49
2.3.1.	Protocole expérimental.....	49
2.3.2.	Dosage des ions majeurs	50
2.3.3.	Dosage du sélénium stable	50
2.3.4.	Modélisation de la croissance algale et estimation des EC _x s.....	53
2.3.5.	Microscopie Electronique à Transmission (MET) et Spectrométrie par Dispersion en Energie (EDS)	55
3.	<u>RESULTATS</u>	61
3.1.	PRISE EN CHARGE DU SELENITE CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	61
3.1.1.	Introduction	61
3.1.2.	Article 1 : "Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> "	63
3.1.3.	Principales avancées et conclusion.....	88
3.2.	TOXICITE DU SELENITE CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	90
3.2.1.	Introduction	90
3.2.2.	Article 2 : "Toxicity of selenite in the unicellular green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : comparison between effects at the population and sub-cellular level".....	92
3.2.3.	Principales avancées et conclusion.....	121
3.3.	BIOACCUMULATION A LONG TERME DU SELENITE CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	123
3.3.1.	Introduction	123
3.3.2.	Article 3: "Cellular burdens and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ".....	125
3.3.3.	Effet du sulfate sur la bioaccumulation à long terme du sélénite.....	138
3.3.3.1.	Introduction	138
3.3.3.2.	Matériel et méthode.....	138
3.3.3.3.	Résultats et discussion.....	138
3.3.3.4.	Conclusion et conséquences pour l'environnement	141
3.3.4.	Ordre de grandeur du facteur de concentration du sélénite et comparaison avec d'autres éléments.....	142
3.3.5.	Principales avancées et conclusion.....	143

4. CONCLUSION GENERALE	145
4.1. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS	145
4.1.1. Résultats concernant le transport membranaire.....	145
4.1.2. Résultats concernant la toxicité	147
4.1.3. Résultats concernant la bioaccumulation	148
4.2. PERSPECTIVES	148
4.2.1. Concernant les mécanismes de transport membranaire.....	149
4.2.2. Concernant les mécanismes de toxicité et bioaccumulation	149
4.3. CONSEQUENCES POUR L'ENVIRONNEMENT ET EXPLOITATION OPERATIONNELLE DES RESULTATS	151
Références.....	153
Annexe : certificats d'étalonnage des sources de Se⁷⁵ utilisées.....	161

1. INTRODUCTION

1.1. Contexte général et objectifs de recherche

1.1.1. Contexte général

Le sélénium (Se) est un élément métalloïde (groupe VI.A du tableau périodique) qui se trouve naturellement dans l'environnement. Aux principales sources naturelles (dégradation des roches et du sol, activités volcaniques,...), s'ajoute une dispersion anthropique liée à ses multiples utilisations. Le Se est employé principalement dans la fabrication de produits électroniques et photographiques, ainsi que dans la fabrication du verre, et en agriculture comme produit de fertilisation ou en complément alimentaire chez les animaux. Le sélénium mobilisé dans l'environnement provient également du cycle du charbon ainsi que de l'exploitation de mines de phosphate ou de différents minerais. Dans le domaine du cycle du combustible nucléaire, son isotope radioactif ^{79}Se , émetteur β , fait partie de la liste des radionucléides à vie longue (RNVL, $T_p=1,1.10^6$ ans) présents dans les sites de stockage des déchets radioactifs et est présenté par l'ANDRA (Agence Nationale de la gestion des Déchets Radioactifs) comme élément prioritaire au sens de l'évaluation de la sûreté.

Le sélénium est présent chez les organismes vivants où il joue un rôle ambivalent, car il est à la fois essentiel et potentiellement toxique. L'écotoxicité du sélénium dans l'environnement aquatique s'est déjà manifestée à plusieurs reprises, pouvant engendrer des malformations, des problèmes liés à la reproduction ou encore une mortalité accrue chez des populations de poissons ou d'oiseaux aquatiques (Ohlendorf *et al.*, 1986a; Hoffman *et al.*, 1988; Saiki et Ogle, 1995). La contamination de populations sauvages est un phénomène mondial (Lemly, 2004). De nombreux événements toxiques attribués au sélénium ont été rapportés dans la littérature, et son utilisation croissante dans le monde en fait un élément d'intérêt écotoxicologique majeur (USEPA, 1998; Fan *et al.*, 2002; Hamilton, 2004; Lemly, 2004).

Le sélénium est présent dans l'environnement sous plusieurs états d'oxydation et sous diverses formes chimiques qui conditionnent sa mobilité, sa biodisponibilité et sa toxicité. Dans les milieux aquatiques, en condition oxydante à modérément oxydante, les formes inorganiques solubles sont les oxyanions sélénite (SeO_3^{2-}) et séléniate (SeO_4^{2-}). Nous avons concentré nos études sur le sélénite car il est souvent considéré comme responsable de la plupart de la bioaccumulation et de la toxicité globale dans l'environnement aquatique (Skorupa, 1998).

1.1.2. Objectifs de recherche

Dans ce cadre général, les recherches que nous avons menées visent à acquérir des connaissances relatives à l'impact environnemental du sélénite. Les trois objectifs qui ont amené les trois axes de recherche développés dans ce mémoire sont d'acquérir, pour un modèle biologique unicellulaire faisant partie des producteurs primaires -l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* -, des connaissances relatives *i)* aux mécanismes de prise en charge du sélénite *ii)* aux effets induits par le sélénite *iii)* à la bioaccumulation du sélénite.

1.1.2.1. Les mécanismes de prise en charge

Le sélénite est principalement présent sous forme d'oxyanions (HSeO_3^- , SeO_3^{2-}) en milieu oxygène. La majorité des recherches menées en écotoxicologie concerne des métaux sous forme cationique en solution (Ag, Cu, Cd, Fe, Hg, Mn, Zn...), pour lesquels différents modes de transport au niveau des membranes biologiques ont été mis en évidence (transport passif, facilité, actif, ...) (Simkiss et Taylor, 1995). Afin de formaliser les connaissances quant aux interactions entre le métal et l'organisme étudié, des modèles conceptuels ont été développés comme le modèle de l'ion libre (FIAM) (Morel, 1983) ou le modèle du ligand biologique (BLM) (Pagenkopf, 1983). En revanche, les études concernant les éléments anioniques sont rares et les connaissances relatives à leur transport membranaire sont limitées. Les théories avancées pour les cations n'ont à notre connaissance pas été testées sur les anions, ni d'autres théories proposées. Les formes anioniques ont pourtant tendance à être mobiles dans l'environnement. Elles sont potentiellement biodisponibles et toxiques. L'objectif de ce premier axe de recherche est d'acquérir des connaissances relatives au transport membranaire du sélénite et de tester sur cet élément des caractéristiques générales pouvant être attendues vis à vis du transport membranaire d'éléments anioniques.

De façon plus précise, les objectifs sont : *i)* de distinguer la fraction d'élément adsorbée à la surface cellulaire de la fraction internalisée ; *ii)* de caractériser le transport en étudiant la dépendance de la prise en charge vis-à-vis du temps et de la concentration de sélénite dans le milieu d'exposition ; *iii)* d'étudier la dépendance de la prise en charge vis-à-vis des concentrations en différents nutriments anioniques, potentiellement compétiteurs : sulfate, phosphate, nitrate et carbonate ; et *iv)* d'étudier le lien entre la spéciation chimique du sélénite et sa prise en charge.

1.1.2.2. La toxicité et la bioaccumulation

Dans un objectif plus appliqué à long terme, visant à comprendre, modéliser et prédire les flux et effets du sélénite à l'échelle des écosystèmes aquatiques continentaux, étudier les flux et effets au niveau du phytoplancton est une étape clef. En effet, avec sa place de premier maillon trophique, le phytoplancton joue un rôle fondamental dans le transfert des polluants du compartiment abiotique aux compartiments biotiques en fixant les éléments traces présents au sein de la colonne d'eau et en les transférant aux niveaux trophiques supérieurs. L'importance de ce flux trophique dépend en premier lieu de la capacité de bioaccumulation du phytoplancton mais également de sa biomasse. Celle-ci peut être affectée par une potentielle toxicité de l'élément sur la croissance algale. D'autre part, comme principal producteur primaire, le phytoplancton joue un rôle majeur dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Ainsi, un impact sur le phytoplancton peut avoir des conséquences sur l'écosystème dans son ensemble. L'objectif de cet axe de recherche est d'étudier la toxicité du sélénite à la fois sur la croissance et sur l'ultrastructure algales, ainsi que d'estimer la capacité de bioaccumulation algale et son lien avec la toxicité. Enfin, au vu des résultats obtenus concernant l'éventuelle inhibition du transport membranaire par différents nutriments, on pourra tester si elle se traduit par un effet inhibiteur sur la bioaccumulation.

1.2. Synthèse bibliographique

1.2.1. Le sélénium dans l'environnement aquatique

1.2.1.1. Sources, concentrations et impacts

Sources et concentrations

Des problèmes de toxicité liés au sélénium concernent de nombreux habitats aquatiques, avec des sources aussi bien naturelles qu'anthropiques. Les eaux de drainage de certaines régions (zones volcaniques, moraines et schistes) peuvent concentrer des quantités importantes de sélénium. C'est le cas par exemple en Californie, dans la vallée de San Joaquin, où le sélénium est naturellement présent à de fortes concentrations dans les sols et a fait l'objet de nombreuses recherches, en particulier à des fins de biorémediation (Amweg *et al.*, 2003). Une large gamme d'activités humaines est à l'origine de rejets de sélénium : production et combustion du charbon ; exploitation des mines de phosphate, or, argent, nickel, cuivre, zinc ; décharges municipales ; eaux usées ; transport, raffinage et utilisation de l'huile ; fertilisation et irrigation à des fins agricoles ; processus industriels. Ces sources et leur importance relative sont détaillées dans une récente synthèse bibliographique (Lemly, 2004). Un inventaire des concentrations pouvant être trouvées dans l'environnement est également disponible (Conde et Sanz Alaejos, 1997). Les

concentrations typiques dans les eaux de surface non contaminées vont de 0,13 à 2,5 nM¹ mais elles peuvent largement dépasser ces valeurs dans les zones contaminées, avec des niveaux pouvant atteindre des concentrations de l'ordre du µM. En France, la valeur limite de potabilité est de 10 µg.L⁻¹. Le seuil de toxicité fixé par l'USEPA en 1987 est de 5 µg.L⁻¹ pour les eaux de surface. Cependant, des effets toxiques sur des populations de poissons sont observés à des concentrations inférieures à ce seuil ; des valeurs plus basses (par exemple 1 µg.L⁻¹) sont proposées afin de préserver les oiseaux et mammifères aquatiques (Peterson et Nebeker, 1992). Plusieurs cas montrent que des concentrations dans l'eau inférieures à 5 µg.L⁻¹ peuvent se traduire au niveau des tissus par des concentrations critiques (Hamilton *et al.*, 2000b). A l'issue d'un congrès organisé par l'USEPA (1998), il ressort que l'utilisation d'un critère basé sur les concentrations dans les tissus plutôt que sur les concentrations dans l'eau doit être préconisée. Une valeur de 4 µg.g⁻¹ (poids sec) est suggérée (Hamilton, 2002).

Impacts

Des perturbations physiologiques peuvent être induites aussi bien par une déficience que par un excès de Se. Ainsi, des concentrations inférieures à 0,1 µg Se.g⁻¹ (~1,27 nmol.g⁻¹) (poids sec) dans la nourriture de la truite arc-en-ciel peuvent conduire à des symptômes de déficience sévère, tandis qu'au dessus de 10 µg Se.g⁻¹ (127 nmol.g⁻¹), des effets toxiques commencent à se manifester (Hodson et Hilton, 1983). Le danger vient de l'étroite marge entre concentrations essentielles et concentrations toxiques. Dans les écosystèmes aquatiques, la toxicité du Se a été observée suite à des expositions chroniques à des concentrations dans l'eau inférieures à 5 µg.L⁻¹. Elle se manifeste par des effets teratogènes et sur la reproduction, allant jusqu'à l'extinction d'espèces de poissons (Lemly, 1999). Alors que dans l'environnement, le sélénium devient toxique à des niveaux à peine supérieurs aux niveaux essentiels, dans des cultures monospécifiques d'algues, la gamme de concentrations séparant carence et toxicité est en général beaucoup plus large (Baines et Fisher, 2001). Cette différence est probablement liée, dans l'environnement, à la multiplicité des sources d'exposition possibles pour les organismes selon leur mode de vie et position dans les réseaux trophiques, mais aussi au phénomène bien connu de bioamplification du sélénium dans la chaîne alimentaire (Zhang *et al.*, 1990; Sanders et Gilmour, 1994; Stewart *et al.*, 2004). Les processus de biotransformation et bioamplification qui interviennent ne sont pas entièrement élucidés mais sont tenus pour responsables des problèmes écotoxicologiques rencontrés. Plusieurs incidents à grande échelle liés au sélénium ont été rapportés (USEPA, 1998; Fan *et al.*, 2002), et selon Lemly (2004), l'accumulation de cet élément pourrait être problématique dans le futur étant

¹ La masse molaire du sélénium est de 78,96 g.mol⁻¹. 1 nM ~ 0,079 µg.L⁻¹. 1 µg.L⁻¹ ~ 12,7 nM.

données les nombreuses sources émergentes dans le monde liées à son utilisation variée. Une synthèse des problèmes liés à la toxicité du sélénium dans l'environnement aquatique a été réalisée par Hamilton en 2004. La toxicité se manifeste principalement chez les poissons et chez les oiseaux aquatiques avec des effets néfastes pouvant aller jusqu'à la mortalité.

1.2.1.2. Formes chimiques

Le sélénium est un métalloïde ayant des propriétés très proches de celles du soufre. Il existe sous quatre états de valence dans les écosystèmes aquatiques : le séléniate $\text{Se}(+VI)$, le sélénite $\text{Se}(+IV)$, le sélénium élémentaire $\text{Se}(0)$ et le séléniure $\text{Se}(-II)$. Le sélénium à l'état $(-II)$ est présent sous forme de nombreux complexes organiques.

Formes inorganiques

En milieu aqueux, à l'équilibre, l'état d'oxydation du sélénium inorganique dépend des conditions rédox et du pH. Il est donné par le diagramme de la figure 1.1.

Le séléniate $(+VI)$ et le sélénite $(+IV)$ sont les formes les plus communes des eaux de surface en conditions oxydante à modérément oxydante. On s'attend à ce que le séléniate soit la forme prédominante dans les environnements neutres ou alcalins, ou fortement oxydés, tandis que le sélénite est prédominant dans les environnements plutôt acides, ou réduits. Cependant, le domaine d'oxydo-réduction des eaux douces correspond à la zone de transition entre les deux formes ; la transformation d'un état à l'autre est lente, et donc l'équilibre thermodynamique n'est pas forcément atteint dans l'environnement. En particulier, l'oxydation du sélénite en séléniate est un processus lent, ce qui permet au sélénite thermodynamiquement instable de persister même dans des eaux bien oxygénées. L'activité biologique peut également être un élément déterminant dans la répartition des formes rédox, comme démontré par une étude de terrain de Wrench montrant que les variations temporelles des rapports de concentrations entre ces formes sont liées aux « blooms » phytoplanctoniques (Wrench, 1982). Finalement, dans l'environnement, on trouve aussi bien des systèmes dominés par le sélénite que des systèmes dominés par le séléniate (Conde et Sanz Alaejos, 1997).

Formes organiques

Les formes organiques contenant du Se à la valence $(-II)$ sont produites par réduction biologique et sont en général présentes dans les eaux de surface à de plus faibles concentrations que les formes inorganiques (Fan *et al.*, 2002). Elles sont en revanche en général plus facilement assimilées par les organismes. Ces formes organiques sont

analogues à celles du soufre et incluent (cf. Tableau 1.1) : *i*) les acides aminés sélénés : la sélénocystéine (21^e acide aminé) et la sélénométhionine (méthionine dans laquelle le sélénium est substitué au soufre) ; *ii*) leurs dérivés : des protéines contenant de la sélénocystéine ou de la sélénométhionine. On les classe en deux groupes selon le caractère essentiel ou non du sélénium : les « sélénoprotéines » sont des protéines dont le bon fonctionnement dépend de la présence de sélénium (par exemple la glutathion peroxydase) tandis que les « protéines contenant du sélénium » sont des protéines dans lesquelles la méthionine a été remplacée par la sélénométhionine par mimétisme chimique ; *iii*) les formes méthylées de sélénium, par exemple : le diméthylséléniure, le diméthyldiséléniure, le diméthylsélénone, la Se-méthylsélénocystéine, la Se-méthylsélénométhionine,...

Les principales formes chimiques inorganiques et organiques que peut prendre le sélénium aux différents états de valence sont présentées dans le tableau 1.1.

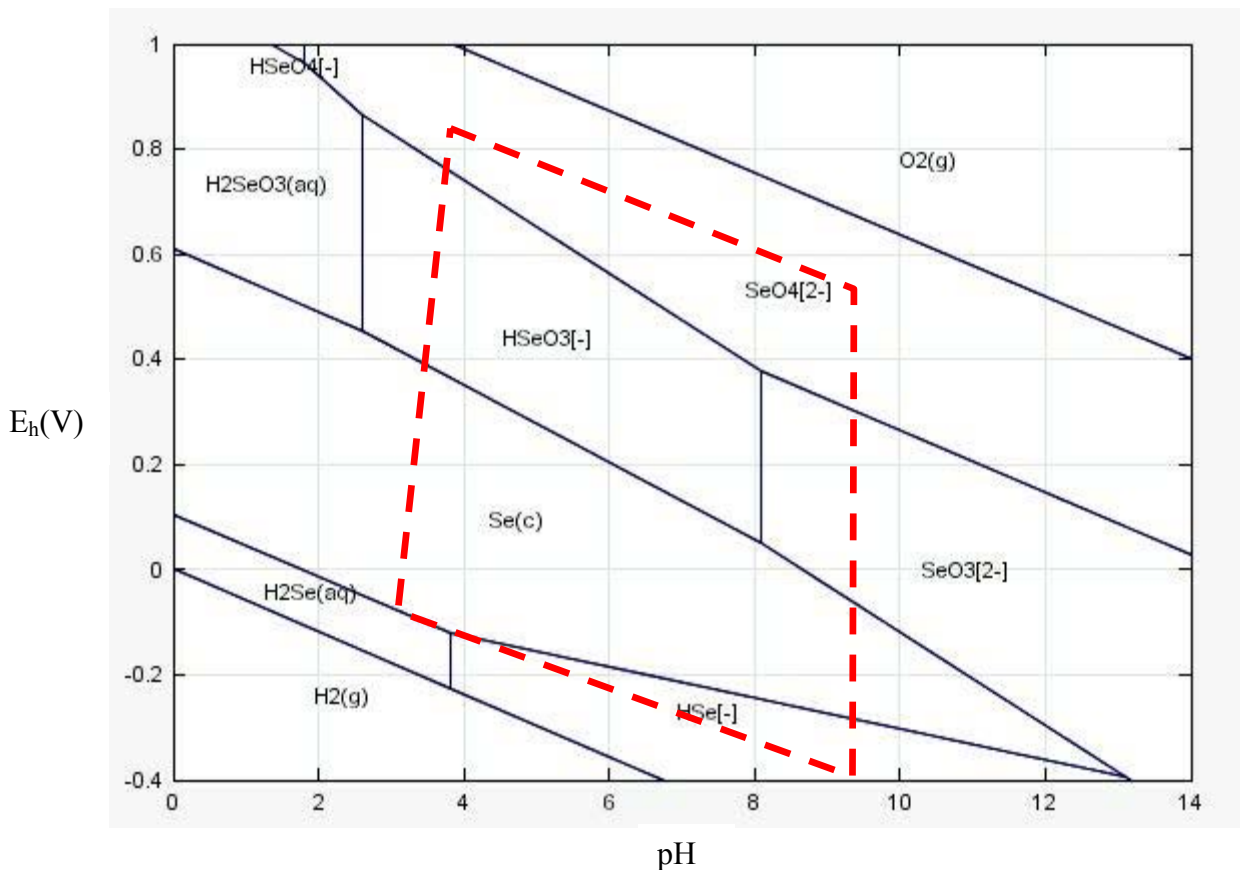


Figure 1.1 Diagramme Eh-pH du sélénium obtenu avec le logiciel JChess et la base de donnée thermodynamique décrite au chapitre 2.2.3. $[Se]=50$ nM. La zone en rouge représente la zone d'oxydo-réduction susceptible d'être rencontrée dans l'environnement.

Tableau 1.1 Principales formes chimiques des composés naturels du sélénium.

Nom	Etat de valence	Formes chimiques
Formes inorganiques		
Sélénure	Se(-II)	H_2Se ; HSe^- ; Se^{2-}
Sélénium élémentaire	Se(0)	
Sélénite	Se(+IV)	H_2SeO_3 ; $HSeO_3^-$; SeO_3^{2-}
Séléniate	Se(+VI)	H_2SeO_4 ; $HSeO_4^-$; SeO_4^{2-}
Formes organiques		
Acides aminés		
Sélénocystéine		Se-CH ₂ CHNH ₂ COOH
Séénométhionine		CH ₃ CH ₂ Se(CH ₂) ₂ CHNH ₂ COOH
Formes méthylées		
Diméthylsélénure		(CH ₃) ₂ Se
Diméthyldisélénure		(CH ₃) ₂ Se ₂
Diméthylsélénone		(CH ₃) ₂ SeO ₂
Se-méthylsélénocystéine		MeSeCH ₂ CHNH ₂ COOH
Se-méthylséénométhionine		(CH ₃) ₂ Se(CH ₂) ₂ CHNH ₂ COOH
Composés contenant du glutathion		
Glutathion		γ-Glu-Cys-Gly
Diglutathion		(γ-Glu-Cys-Gly) ₂
Glutathion peroxydase		$\begin{array}{c} \gamma\text{-Glu-Cys-Gly} \\ \\ \text{Se} \\ \\ \text{S} \\ \\ \gamma\text{-Glu-Cys-Gly} \end{array}$

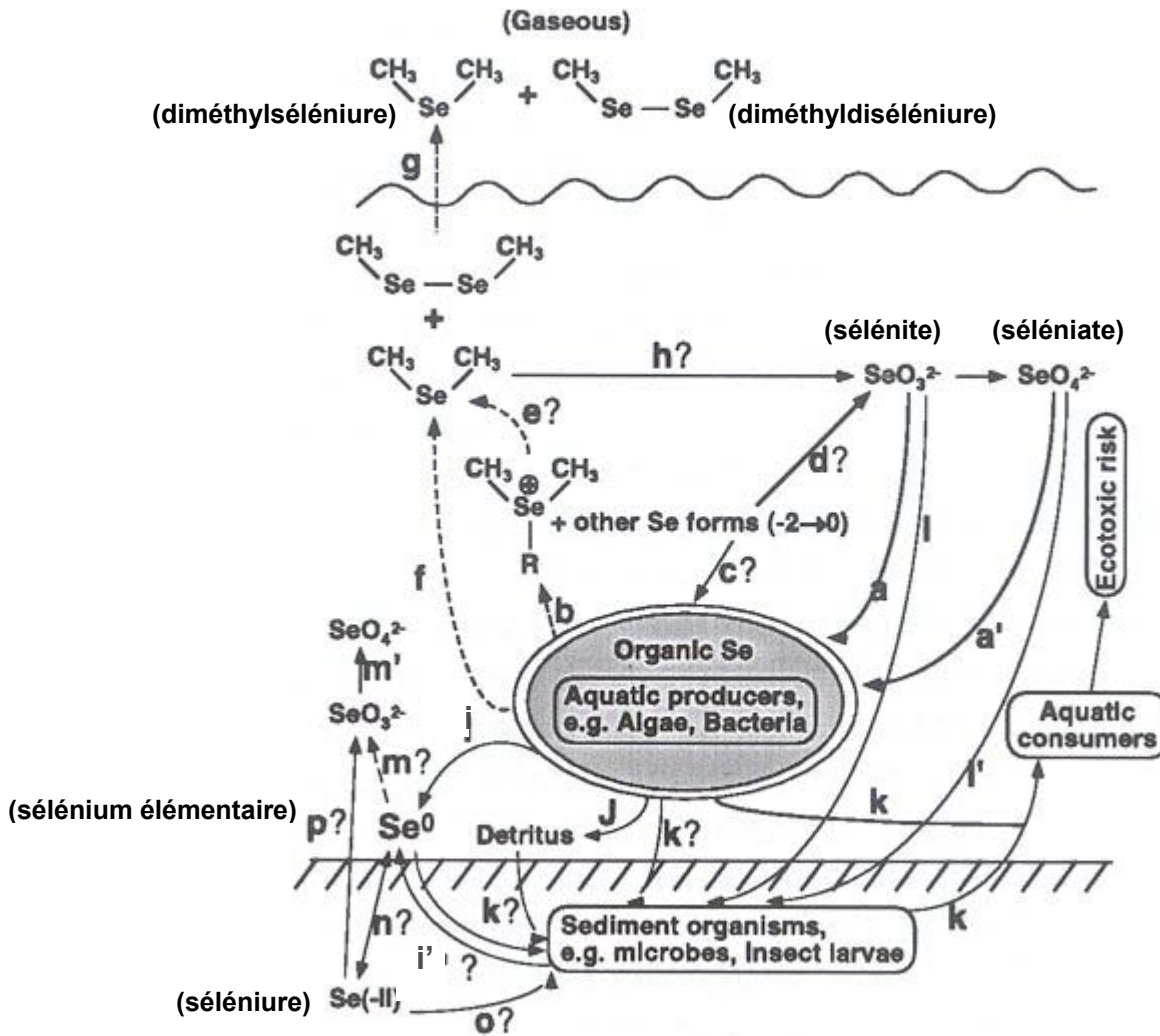


Figure 1.2 Cycle biogéochimique du sélénium dans les écosystèmes aquatiques (Fan et al., 2002). Les flèches pleines indiquent les processus qui peuvent mener à des risques écotoxicologiques tandis que les flèches en pointillé indiquent les processus de volatilisation du sélénium à l'origine d'une perte nette de sélénium de la part du système aquatique. Les flèches avec des points d'interrogation représentent des processus supposés. (a, a') prise en charge et transformation des espèces inorganiques par les producteurs primaires aquatiques (b) relargage de composés organiques par les producteurs primaires aquatiques (c) prise en charge de composés organiques par les producteurs primaires aquatiques (d) oxydation abiotique de composés organiques en oxyanions (e) relargage d'alkylsélénides par réaction abiotique (f) relargage d'alkylsélénides par les producteurs primaires aquatiques (g) volatilisation des alkylsélénides dans l'atmosphère (h) oxydation des alkylsélénides en formes inorganiques (i) formation de sélénium élémentaire par les organismes aquatiques et benthiques (j) formation de détritus par les producteurs aquatiques (k) bioaccumulation dans la chaîne trophique et conséquences potentielles en termes d'écotoxicité (l, l') assimilation des oxyanions de sélénium aux sédiments depuis la colonne d'eau (m, m') oxydation du sélénium élémentaire en oxyanions de sélénium (n) inter conversion du $Se(0)$ en $Se(-II)$ (o) assimilation du $Se(-II)$ depuis le sédiment vers les organismes benthiques (p) oxydation du $Se(-II)$ du sédiment en sélénite.

1.2.1.3. Cycle biogéochimique du sélénium et rôle du phytoplancton

Cycle biogéochimique du sélénium

Notre connaissance actuelle du cycle biogéochimique du sélénium est résumée dans la figure 1.2 (Fan *et al.*, 2002). Il est relativement proche de celui du soufre, le métabolisme du sélénium empruntant des voies similaires à celles de cet élément.

Il apparaît que les producteurs primaires aquatiques, et donc en particulier les organismes phytoplanctoniques, jouent un rôle central dans ce cycle:

- ils fixent et transforment de façon sélective les différentes espèces de sélénium présentes dans la colonne d'eau (a, c) (Vandermeulen et Foda, 1988; Fan *et al.*, 1997).
- ils transfèrent le sélénium fixé à partir de la colonne d'eau aux organismes de niveau trophique supérieur (k) (Baines et Fisher, 2001).
- ils relarguent des composés organiques ou du sélénium élémentaire formés par réduction biologique (b, f, i) (Vandermeulen et Foda, 1988; Hu *et al.*, 1996).
- ils forment, à leur mort, des détritiques contenant du sélénium (j).

En modifiant à la fois directement la biomasse et indirectement la capacité d'accumulation algales, l'eutrophisation des systèmes aquatiques continentaux et marins côtiers pourrait largement influencer le cycle biogéochimique du sélénium. Etudier l'influence des nutriments sur l'interaction sélénium/phytoplancton a donc un intérêt environnemental évident.

Importance de la voie trophique dans le cycle biogéochimique du sélénium

Le risque écotoxicologique d'un élément est souvent lié à sa bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du sélénium, puisqu'il a été montré chez différentes catégories d'organismes aquatiques que le sélénium organique est mieux assimilé que le sélénium inorganique, soulignant l'importance de la voie trophique (i.e. *via* la nourriture). L'incorporation d'un acide aminé sélénié comme c'est le cas de la sélélocystéine ou de la sélénométhionine facilite l'assimilation du sélénium organique

dans les tissus animaux (Wang et Lovell, 1997). Ainsi, Kiffney et Knight (1990) ont rapporté chez *Anabaena flos-aquae* des BCFs pour la sélénométhionine variant entre 1520 et 12 193, tandis que pour le sélénite ils varient entre 267 et 1004, et pour le séléniat entre 30 et 115. Dans une étude sur trois niveaux trophiques; Besser (1993) a trouvé des BCFs pour la séléométhionine, le sélénite et le séléniat de 16 000, 220 et 65 respectivement chez *Chlamydomonas reinhardtii* et de 200 000, 3 600 et 500 chez *Daphnia magna*; enfin, chez le poisson *Lepomis macrochirus*, le BCF est de 5 000 pour la sélénométhionine, tandis qu'il varie entre 13 et 106 pour les espèces inorganiques. Wang et Lovell (1997) ont montré la même tendance chez une autre espèce de poisson : *Ictalurus punctatus*. Du fait de cette biodisponibilité supérieure, même si dans les eaux de surface les concentrations en sélénium organique sont en général plus faibles que les concentrations en sélénium inorganique (Conde et Sanz Alaejos, 1997), les formes organiques peuvent jouer un rôle majeur en termes d'effet écotoxicologique (Fan *et al.*, 2002; Lemly, 2004). Ainsi, la bioaccumulation du sélénium par voie trophique est habituellement plus importante que l'accumulation par voie directe, et l'une des voies principales de transfert vers les organismes supérieurs repose sur la bioaccumulation par le phytoplancton à la base des chaînes alimentaires (Zhang *et al.*, 1990; Besser *et al.*, 1993).

Notons que les organismes de niveaux trophiques supérieurs ne peuvent synthétiser la sélénométhionine. Ils dépendent d'organismes de bas niveau trophique tels que les algues pour leur apport en cet acide aminé (Williams *et al.*, 1994), ce qui ajoute encore à l'importance de la biotransformation et du transfert de l'élément par le phytoplancton.

Comparaison des états de valence

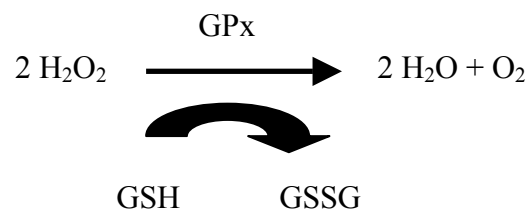
De manière générale, la prise en charge du Se et sa biotransformation en espèces organiques est plus importante pour le sélénite que pour le séléniat (Wrench, 1982; Vandermeulen et Foda, 1988; Kiffney et Knight, 1990; Riedel *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1996; Hamilton, 2004). Par exemple, Riedel et Sanders (1996) ont montré chez *Chlamydomonas reinhardtii* une prise en charge du sélénite 4 à 5 fois plus rapide que celle du séléniat. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le sélénium est réduit avant d'être incorporé au sein d'une molécule organique (par exemple au sein des acides aminés), et que la réduction du séléniat nécessite une étape supplémentaire, consommatrice d'énergie. Une autre explication est le probable effet inhibiteur du sulfate sur l'incorporation du séléniat.

Ainsi, il a été proposé que le sélénite soit la forme inorganique responsable *in fine* des concentrations en sélénium au sein des composantes biologiques et de ses effets dans l'environnement aquatique (Skorupa, 1998).

1.2.2. Rôle et métabolisme du sélénium chez les organismes

1.2.2.1. Rôle du sélénium

Le sélénium est un élément essentiel pour la plupart des espèces, dont l'homme. Sa fonction biologique majeure viendrait de son activité rédox lorsqu'il est présent sous forme de sélénocystéine, au niveau des sites actifs sur certaines protéines. L'analogue soufré (la cystéine) ne peut se substituer à la sélénocystéine sans s'accompagner de dysfonctionnements de ces sélénoprotéines (Pyrzynska, 2002). La déficience en sélénium serait ainsi liée à une diminution de l'activité des sélénoenzymes (Stolz et Oremland, 1999). Par exemple, la sélénoenzyme glutathion peroxydase (GPx) possède au niveau de son site actif quatre atomes de Se sous forme de sélénocystéines. Cette enzyme agit contre le stress oxydant en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène (ou des peroxydes organiques) en eau (ou alcools), avec une oxydation concomitante de GSH (glutathion), selon la réaction:



La GPx pourrait en grande partie être responsable du caractère essentiel du sélénium (Price et Harrison, 1988).

Sous forme de groupement séléniol (-SeH), le sélénium est également présent au niveau du site actif de la thiorédoxine réductase. Ainsi, le sélénium joue un rôle fondamental dans la protection contre les radicaux libres (Tapiero *et al.*, 2003). Sous forme de sélénométhionine, le sélénium pourrait également catalyser la réduction du peroxyde d'azote à la place du glutathion, intervenant ainsi contre le stress nitrifiant (Klotz *et al.*, 2003). Des composés organiques de faible poids moléculaire contenant du sélénium peuvent également catalyser la réduction d'hydroperoxydes ou de peroxyde d'azote (Leisinger *et al.*, 1999). Le sélénium contribue également à la prévention du cancer (Shamberger, 1985; El-Bayoumy, 2001) et à la protection contre les rayonnements ionisants (Weiss *et al.*, 1992). Chez les organismes aquatiques, il peut exercer un effet antagoniste sur la toxicité du mercure (Lee *et al.*, 2002).

Le sélénium est nécessaire à la majorité des espèces d'algues (Lindström, 1983; Harrison *et al.*, 1988; Doblin *et al.*, 1999), incluant *Chlamydomonas reinhardtii* (Fu *et al.*, 2002). Il

a été démontré récemment que l'ajout de sélénite provoque chez cette algue une induction de GPx (Novoselov *et al.*, 2002). Dans cette étude, les auteurs montrent pour la première fois l'existence de sélénoprotéines dans le règne végétal, alors que ces dernières ont été identifiées depuis longtemps dans le règne animal.

1.2.2.2. Métabolisme du sélénium

Une étude de Wrench (1978) sur deux espèces phytoplanctoniques montre que le sélénium internalisé se trouve principalement lié à des protéines, qu'il existe des acides aminés où le soufre est remplacé par le sélénium, et que ces acides aminés sont également présents dans des extraits sub-cellulaires non protéiques. Une autre étude confirme chez cinq espèces phytoplanctoniques marines que le sélénium est associé aux acides aminés et aux protéines, avec seulement 4% du sélénium total contenu dans la fraction lipidique (Vandermeulen et Foda, 1988).

Les voies métaboliques supposées du sélénium sont proches de celles du soufre et sont représentées dans la figure 1.3. Les formes inorganiques et organiques sont toutes deux assimilables. Le sélénite et le séléniate sont d'abord réduits en séléniure par l'intermédiaire du glutathion, puis incorporés sous forme de sélélocystéine dans les sélénoprotéines. Rappelons que le sélénite est en général assimilé plus facilement que le séléniate, en relation avec l'étape de réduction supplémentaire nécessaire à la réduction du séléniate. Rappelons également que les sélénoprotéines, bien qu'identifiées depuis longtemps dans le règne animal, ne l'ont été dans le règne végétal que très récemment, chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Novoselov *et al.*, 2002). Une des sélénoprotéines identifiées chez cette algue est la glutathion peroxidase sélénium dépendante. Il existe également une autre voie spécifique à la sélénométhionine. Cette dernière peut en effet être directement incorporée dans les protéines par analogie avec la méthionine, pour former des protéines contenant du sélénium. Enfin, des composés méthylés peuvent être formés et excrétés par l'organisme.

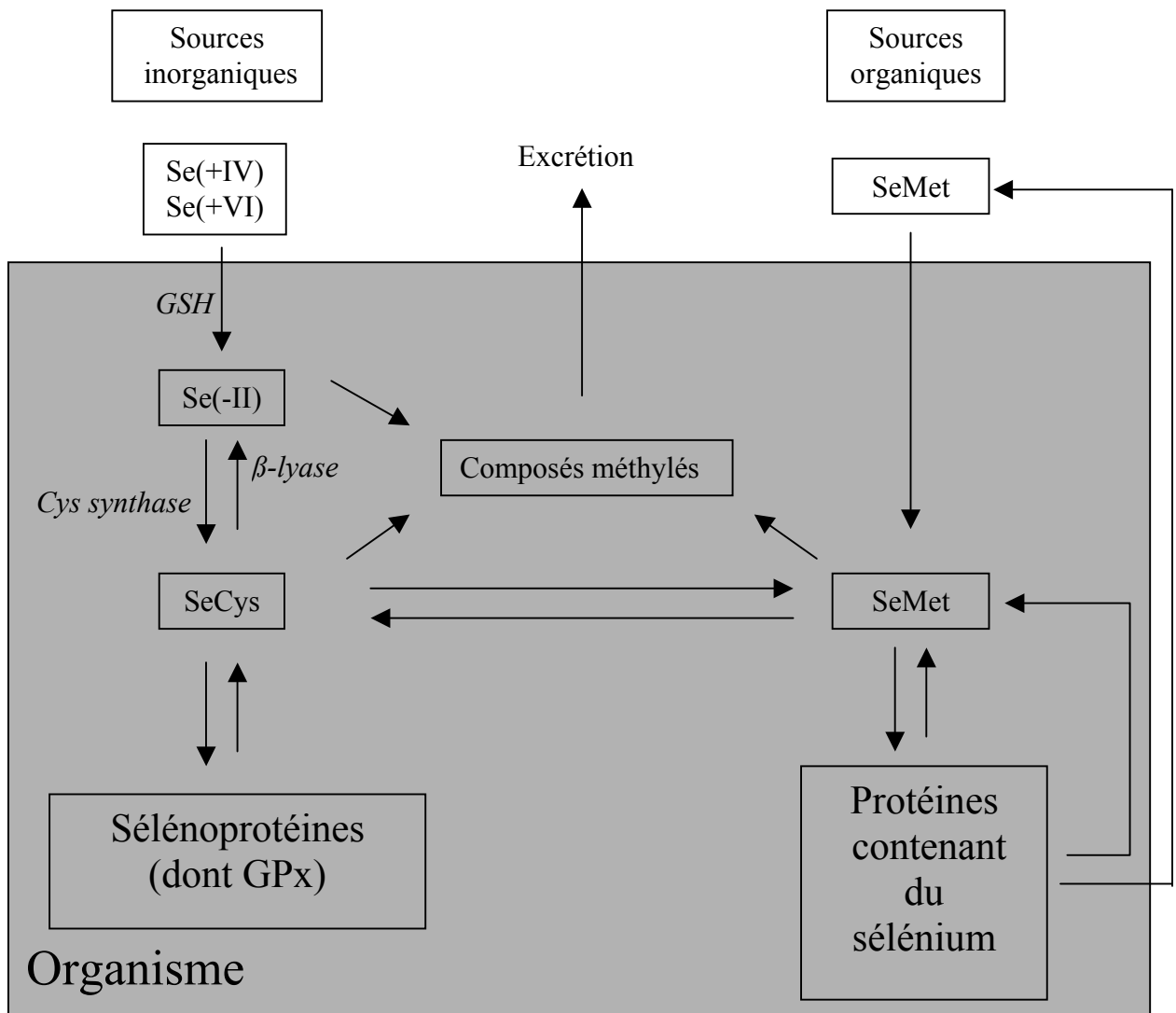


Figure 1.3 Représentation du cycle métabolique du sélénium (Se) dans les organismes. D'après Pyrzyńska (2002) et Montes-Bayon (2002), modifié. GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion ; SeCys : selenocystéine ; SeMet : sélénométhionine.

1.2.3. Mécanismes de prise en charge

L'interaction d'un métal/métalloïde avec une membrane biologique est le processus initiant toute réponse de l'organisme (accumulation, éventuelle toxicité,...). La structure de l'interface biologique ainsi que les processus contrôlant le transport à travers la membrane sont décrits dans les chapitres suivants.

1.2.3.1. Structure de l'interface biologique

Les cellules vivantes sont séparées de leur environnement par une membrane plasmique à perméabilité sélective (Simkiss et Taylor, 1995). Cette membrane est constituée d'une bicouche phospholipidique de 4 à 10 nm d'épaisseur. La partie hydrophobe des phospholipides est orientée vers l'intérieur de la membrane tandis que la partie hydrophile est orientée vers l'extérieur. Cette dernière possède à son extrémité des groupes qui se dissocient pour former une charge nette négative à la surface membranaire. La membrane est asymétrique avec une charge nette négative plus importante sur la face cytoplasmique, ce qui génère une différence de potentiel trans-membranaire. Les concentrations ioniques à l'interface de la membrane sont influencées par la charge de surface négative, avec une concentration légèrement plus élevée pour les cations, et une concentration légèrement plus faible pour les anions.

La membrane intègre différentes protéines, pour une contribution massique (par rapport à la contribution lipidique) allant de 1 :4 à 4 :1. Certaines d'entre elles (les protéines périphériques) sont faiblement liées à la surface de la membrane, tandis que d'autres (les protéines trans-membranaires), sont complètement intégrées à la membrane. Ces dernières sont en général tenues pour responsables de la sélectivité de la membrane vis-à-vis des différents ions en solution. Il existe une importante variété de protéines trans-membranaires. Certaines « transportent » les éléments d'un côté à l'autre de la membrane : l'élément est fixé à un site de transport spécifique, il migre à travers la membrane puis est relâché dans le milieu intra-cellulaire; d'autres forment des « canaux » ioniques à travers lesquels les ions peuvent diffuser.

Chez les algues, la membrane plasmique est parfois doublée d'une paroi cellulaire. Celle-ci est constituée de polysaccharides, possédant à leurs extrémités des groupements carboxyles, amino et sulfates.

1.2.3.2. Mécanismes généraux et cas des éléments anioniques

Dans la problématique générale de l'accumulation des métaux/métalloïdes chez le phytoplancton, beaucoup d'études examinent l'influence de divers facteurs physico-chimiques sur l'accumulation d'éléments dont l'espèce libre en solution est un cation (Ag, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Zn). Il existe en revanche peu d'études concernant l'accumulation des éléments présents principalement sous forme anionique (Mo, V, Cr, As, Tc, Se) (Simkiss et Taylor, 1995).

Sunda et Huntsman (1998) ont réalisé une synthèse des connaissances sur les processus d'accumulation des métaux chez les organismes phytoplanctoniques. De manière générale, deux processus principaux interviennent lors de l'internalisation d'un métal/métalloïde dans le milieu intracellulaire: *i*) la diffusion, depuis la source d'exposition vers la surface cellulaire et l'adsorption sur cette surface; *ii*) le transport à travers la membrane plasmique, qui dépend notamment des concentrations extra- et intra- cellulaires ainsi que de la spéciation de l'élément.

Diffusion et adsorption à la surface cellulaire

Chez les algues, deux types de liaisons entraînent l'adsorption des éléments: *i*) des liaisons ioniques générées par une charge de surface négative; *ii*) des liaisons covalentes avec les groupements fonctionnels des protéines membranaires (principalement des groupes carbonyle et amine) (Crist *et al.*, 1981).

La tendance à la neutralité des charges implique que les cations sont attirés tandis que les anions sont repoussés, ce qui induit une adsorption en général faible pour les anions. La charge de surface comme le degré de protonation des groupes anioniques sont dépendants du pH et de la composition ionique du milieu. L'attraction des cations est d'autant plus importante que le pH est élevé et la force ionique faible. Au contraire, les polluants anioniques ont plus tendance à être adsorbés dans les eaux à faible pH et forte force ionique. Il a ainsi été montré que des concentrations croissantes en ions Na^+ ont tendance à accroître l'adsorption de complexes métalliques chargés négativement, tout comme des concentrations croissantes en ions H^+ (Crist *et al.*, 1981).

Transport à travers la membrane plasmique

Mécanismes généraux

Le transport des éléments à travers la membrane plasmique est souvent considéré comme l'étape limitante, les phases de diffusion et de complexation à la surface cellulaire étant beaucoup plus rapides. Il existe plusieurs types de transport : *i*) le transport passif : par simple diffusion en fonction du gradient électrochimique à travers des canaux ioniques ou

à travers la bi-couche phospholipidique, sans dépense d'énergie de la part de la cellule *ii*) le transport facilité : la prise en charge se fait par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire, sans dépense d'énergie *iii*) le transport actif : la prise en charge se fait par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire, contre le gradient de concentration, avec dépense d'énergie. Les prises en charge faisant intervenir des transporteurs membranaires suivent en général le modèle enzymatique classique de Michaelis-Menten. Le flux d'internalisation, ϕ (exprimé en $\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$), est alors donné par l'équation de saturation 1.1 :

$$\phi = \frac{V_m [I]}{K_m + [I]} \quad (1.1)$$

où $[I]$ (mol.L^{-1}) est la concentration de l'ion en solution, V_m ($\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$) est le flux d'internalisation maximal et K_m (mol.L^{-1}) est la constante de demi-saturation (Sunda et Huntsman, 1998).

Cas des éléments anioniques

Dans le cas des anions, le potentiel trans-membranaire étant négatif (de -100 à -200 mV), il est peu probable que la diffusion passive intervienne dans le transport ; les canaux anioniques sont plutôt responsables d'un efflux d'anions (vers l'extérieur de la cellule). Pour expliquer les concentrations anioniques intra-cellulaires, les anions doivent être pris en charge dans le cytoplasme de façon active par des systèmes de symport anions/protons au niveau de la membrane plasmique (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000). Par exemple, la prise en charge du phosphate et du sulfate se fait *via* un mécanisme de symport du sodium (Na^+) (Weiss *et al.*, 2001).

Les principaux anions dans les tissus cellulaires sont le nitrate, le chlorure, le sulfate et le phosphate. Les canaux assurant le transfert des ions Cl^- sont en général perméables à plusieurs autres anions, mais pas à ceux de la taille des oxyanions (Simkiss et Taylor, 1995). Sulfate, phosphate, nitrate et carbonate sont pris en charge par d'autres transporteurs peu sélectifs. De façon plus précise, en tout cas pour ce qui est du sulfate et du nitrate, il semble qu'au moins deux familles de transporteurs interviennent, avec une forte et une faible affinité. Le transport membranaire des éléments sous forme d'oxyanions (molybdène, vanadium, chrome, arsenic, antimoine, sélénium, technétium,...) pourrait faire intervenir les systèmes de transport de faible affinité de ces nutriments anioniques. Par exemple, il a été proposé que l'ion pertechnétate soit transporté par le système de faible affinité du nitrate (Krijger *et al.*, 2000). Des interactions antagonistes ont également été montrées entre CrO_4^{2-} et SO_4^{2-} ou encore entre SeO_3^{2-} ou AsO_3^{2-} et PO_4^{3-} (Wang et Dei, 2001a). Ainsi, les nutriments en solution pourraient directement influencer l'accumulation d'oxyanions par compétition pour les mêmes voies d'assimilation. Rappelons que l'eutrophisation des milieux aquatiques peut avoir des conséquences à la fois sur la

biomasse algale et sur l'accumulation des éléments, modifiant ainsi le « pool » global des contaminants fixés par le phytoplancton. Alors que dans le cas d'éléments cationiques, les nutriments ont plutôt tendance à stimuler la prise en charge, dans le cas d'éléments anioniques, ils ont plutôt tendance à l'inhiber par compétition pour les sites de transport (Wang et Dei, 2001a).

Impact de la spéciation chimique

De nombreuses recherches sur différents contaminants cationiques ont montré que la concentration totale d'un élément prédit mal sa bio-disponibilité. La prise en charge dépend fortement de la spéciation, qui dépend elle-même de paramètres physico-chimiques, en particulier de la présence de ligands organiques et inorganiques pouvant former des complexes neutres, ou de charges négatives ou positives. Un gros effort de recherche a été mené ces dernières années pour prédire la spéciation de métaux cationiques et pour établir un lien entre la spéciation et la disponibilité à divers organismes aquatiques (Campbell, 1995; Sunda et Huntsman, 1998; Fortin, 2000; Twiss *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2002; Denison, 2002; Fortin *et al.*, 2004).

Des modèles ont été développés afin de formaliser ces concepts. Le premier modèle énoncé, formulé par Morel (1983), est le FIAM (Free-Ion Activity Model). Ce modèle stipule que la toxicité ou la bioaccumulation d'un métal varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre. Dans ce cadre, l'interaction d'un métal avec une surface cellulaire peut impliquer le métal sous sa forme libre (M^{z+}), autant que sous une forme complexée (ML), à condition qu'il y ait échange du ligand L au niveau du site de transport. Des exceptions au FIAM sont rencontrées par exemple lorsque le ligand n'est pas échangé et que la forme complexée (ML) est transportée. C'est le cas lorsque le transport du métal se fait en même temps que celui d'un ligand facilement assimilable (citrate, thiosulfate, phosphate...). On parle alors de prise en charge « accidentelle » (Fortin et Campbell, 2001). Ces dernières années, dans un souci d'intégrer ces concepts pour définir des critères de qualité de l'eau, le BLM (Biotic Ligand Model) a été développé. Les bases conceptuelles de ce modèle sont les mêmes que celles du FIAM. Le modèle intègre la spéciation de l'élément en solution, la formation du complexe métal/ligand biotique, et la réponse toxique induite par le complexe (De Schampelaere et Janssen, 2002; Paquin, 2002 ; Niyogi et Wood, 2003; Denison, 2004).

1.2.3.3. Prise en charge du sélénite et comparaison avec les autres états de valence

Les mécanismes de transport du sélénite dans les organismes phytoplanctoniques sont peu connus. Compte tenu des propriétés générales concernant le transport d'éléments

anioniques évoquées dans le chapitre précédent (en particulier la différence de potentiel membranaire, négative), il est théoriquement plus probable que la prise en charge se fasse par l'intermédiaire de transporteurs membranaires plutôt que par diffusion passive. On devrait alors observer une saturation du transport, avec des cinétiques de type Michaelis-Menten. Cependant, en s'intéressant à la prise en charge du séléniate, du sélénite et de la sélénométhionine par trois espèces d'algues d'eau douce -*Anabaena flos-aquae*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Cyclotella meneghiniana*-, Riedel *et al.* (1991) ont proposé une fixation du sélénite principalement par sorption passive, tandis que celle du séléniate et de la sélénométhionine impliquerait plutôt un processus biologique. En effet, ces auteurs ont trouvé pour le sélénite une prise en charge rapide (atteignant une valeur maximale au bout de 6 heures), aussi importante pour des cellules mortes que pour des cellules vivantes, et dépendant linéairement de la concentration ambiante, sans phénomène de saturation (pour une gamme allant de 12,7 à 633 nM). Une dépendance linéaire avec la même gamme de concentrations a également été montrée chez une communauté naturelle de phytoplancton (Riedel *et al.*, 1996). Au contraire, dans une étude comparative sur 14 espèces phytoplanctoniques marines côtières, Baines et Fisher (2001) ont montré une importante variation des concentrations intracellulaires pour une gamme de concentration dans le milieu d'exposition allant de 0,01 à 0,1 nM et une stabilisation au-delà de 0,15 nM, chez 13 des 14 espèces testées, ce qui semble indiquer la saturation d'un transport. Ces auteurs proposent qu'un processus enzymatique intervienne. Des études contradictoires suggèrent donc une accumulation passive ou impliquant des processus biologiques.

Etant données les faibles concentrations de sélénium présentes dans l'environnement à l'état naturel (~nM), le mécanisme de prise en charge fonctionne normalement à de très faibles niveaux d'exposition. Une étude de Brown et Shrift (1982) sur *Escherichia Coli* montre l'existence d'un transport spécifique qui permet une prise en charge à faibles concentrations. Chez *Rhodobacter sphaeroides*, Van Fleet-Stalder *et al.* (2000) ne concluent pas quant à la spécificité du transport, mais ils montrent une prise en charge de faible affinité compensée par un mécanisme très efficace de réduction qui capte rapidement tout sélénium entrant dans la cellule. Chez les organismes phytoplanctoniques, on ne sait pas s'il existe un transport spécifique au sélénite. Tandis qu'un système rapide de haute affinité semble intervenir dans la prise en charge de la sélénométhionine, celle du sélénite semble être de faible affinité, et celle du séléniate d'affinité encore plus réduite (Riedel *et al.*, 1991).

1.2.3.4. Inhibition du transport membranaire du sélénite par des anions chez les organismes phytoplanctoniques et comparaison avec les autres états de valence

Effet des phosphates

Un antagonisme entre sélénite et phosphate a été montré chez plusieurs algues d'eau douce (Riedel et Sanders, 1996; Yu et Wang, 2004a; Yu et Wang, 2004b) et marines (Wang et Dei, 2001b). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, Riedel et Sanders (1996) ont montré une accumulation 2 à 4 fois supérieure dans un milieu à 5 μM PO_4 par rapport à un milieu renfermant 20 μM PO_4 ou plus. Yu et Wang (2004b) ont montré une accumulation de 7 à 44 fois supérieure dans un milieu à 0,1 μM PO_4 comparativement à un milieu à 10 μM PO_4 chez cette même algue, et une accumulation 126 fois supérieure dans un milieu à 0,5 μM PO_4 comparativement à un milieu à 50 μM PO_4 chez *Scenedesmus obliquus*, qui se traduit par une augmentation considérable du transfert trophique de sélénium vers *Daphnia magna* (Yu et Wang, 2004a). De leur côté, Wang et Dei (2001b) ont montré une inhibition presque complète par le phosphate à partir de concentrations de l'ordre du μM chez des diatomées et une algue verte marine, avec une dépendance importante pour l'espèce considérée. Ces études suggèrent que le sélénite puisse être transporté comme analogue du phosphate quand les concentrations de ce macro-nutriment sont suffisamment faibles.

Effet des sulfates

Comme éléments du groupe VI.A, le sélénium et le soufre partagent de nombreuses propriétés, le métabolisme du sélénium chez les organismes étant étroitement lié à celui du soufre. Par exemple, la sélénocystéine serait produite par la voie métabolique du sulfate (Pilon-Smits *et al.*, 1999). Une étude de Wrench (1978) montre chez deux espèces phytoplanctoniques marines -*Tetraselmis tetrathele* et *Dunaliella minuta*-, une assimilation du sélénite comme analogue du soufre dans les acides aminés. Pour ce qui est de la compétition pour les sites de transport, celle entre séléniate et sulfate est un phénomène admis. En utilisant deux niveaux différents de sulfate et deux niveaux différents de séléniate, Williams *et al.* (1994) ont montré chez *Selenastrum capricornutum* un antagonisme entre les deux éléments. De même, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, Riedel et Sanders (1996) ont montré une inhibition du transport du séléniate d'un facteur 2 pour des concentrations en sulfate passant de 50 μM à 100 μM , et d'encore un facteur 2 entre 100 μM et 1 000 μM . Par contre, dans leur étude, l'accumulation du sélénite est aussi importante dans un milieu à 1 000 μM SO_4 que dans un milieu sans sulfate. Chez la bactérie *Pseudomonas stutzeri*, la réduction du sélénite et du séléniate en sélénium élémentaire est affectée par l'ajout de sulfite, mais pas par celui de sulfate (Lortie *et al.*, 1992). Il n'existe pas d'étude, à notre connaissance, montrant une compétition directe pour le transport entre sélénite et sulfate.

Effet des nitrates

Pour ce qui est de l'influence du nitrate, des études contradictoires indiquent une absence d'effet, une stimulation ou encore une inhibition de la prise en charge du sélénite par le nitrate. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, Riedel et Sanders (1996) trouvent une prise en charge équivalente dans un milieu contenant 1 mM de nitrate et dans un milieu sans nitrate. De leur côté, Wang et Dei (2001a) montrent chez 4 espèces phytoplanctoniques marines une augmentation significative du facteur de concentration. Ce dernier est en effet multiplié d'un facteur 1,1 pour un ajout de nitrate à des concentrations de 88 μM , et d'un facteur 4 pour un ajout à 176 μM . Cette augmentation est corrélée à une augmentation du taux de croissance suite à l'ajout de nitrate. Enfin, deux études de Yu et Wang, l'une sur *Scenedesmus obliquus* (Yu et Wang, 2004a), et l'autre sur *Chlamydomonas reinhardtii* (Yu et Wang, 2004b), montrent une inhibition de la prise en charge du sélénium, ainsi qu'une diminution de la fraction intracellulaire de sélénium pour des concentrations en nitrate de 200 μM .

Effet du carbone inorganique dissous

Nous n'avons trouvé aucune référence traitant de l'influence des carbonates sur l'accumulation du sélénite chez les organismes phytoplanctoniques, ce qui est probablement lié aux difficultés expérimentales rencontrées dans ce type d'études.

Influence de la spéciation chimique du sélénite sur le transport

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de recherches concernant l'influence de la spéciation du sélénite sur sa prise en charge. Seule une étude de Riedel et Sanders (1996) montre chez *Chlamydomonas reinhardtii* une accumulation accrue à faible pH, ce qui amène les auteurs à suggérer que l'espèce HSeO_3^- est plus biodisponible que l'espèce SeO_3^{2-} .

Il ressort de cette synthèse bibliographique concernant le transport membranaire du sélénite à la fois des lacunes et des résultats contradictoires, probablement liés aux différentes espèces étudiées et aux différents modes opératoires utilisés. L'originalité des études menées dans le cadre de cette thèse est d'englober de façon méthodique des résultats concernant de nombreux aspects du transport, tous obtenus dans les mêmes conditions expérimentales et sur le même organisme.

1.2.4. Bioaccumulation et toxicité

1.2.4.1. Généralités et cas des éléments anioniques

Un métal peut être toxique en remplaçant un élément essentiel de son site métabolique, la substitution étant à l'origine d'un dysfonctionnement ; par exemple, le métal compétiteur fixé n'a pas la géométrie de coordination adaptée, ou pas le comportement rédox approprié, ou encore pas les bonnes cinétiques d'échange avec les ligands. Ceci se traduit par une perte de la fonction métabolique du site et par une inhibition du métabolisme cellulaire. La toxicité peut également être liée au caractère oxydant de l'élément, qui induit un stress, dit oxydatif, à l'origine par exemple de peroxydations lipidiques endommageant les structures membranaires. Les dysfonctionnements ont lieu quand la concentration intracellulaire du métal toxique devient trop importante. La toxicité est en effet généralement fortement corrélée à la quantité d'élément bioaccumulée.

Pour faire face à cette situation, les cellules ont développé des mécanismes de détoxification des métaux, par exemple par fixation à des métallothionéines ou à des phytochélatines, éventuellement ensuite expulsées à l'extérieur de la cellule (Sunda et Huntsman, 1998). D'autres mécanismes de détoxification impliquent la précipitation des métaux en excès sous forme de granules pluri-élémentaires. Ces inclusions riches en métaux contiennent une importante fraction inorganique. On les trouve dans la plupart des espèces, surtout chez les invertébrés; elles peuvent varier largement en forme, composition, et localisation. On les catégorise en fonction de leur composition inorganique en trois grands groupes, selon qu'elles contiennent du cuivre, du fer, ou du calcium et magnésium. Ces dernières sont elles mêmes divisées selon leur composition anionique en variétés riches en phosphate ou carbonate. Les granules de phosphate sont connus pour séquestrer de nombreux métaux de façon peu spécifique, étant donnée l'importante capacité du phosphate à former des complexes avec les cations et la faible solubilité de ces complexes. De telles structures de stockage ont été observées suite à différentes contaminations chez les micro-algues (Irmer *et al.*, 1986; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991; Nishikawa *et al.*, 2003; Yu et Wang, 2004b). Cependant, les stratégies de détoxification évoquées ici n'ont été observées que pour les métaux cationiques. Dans le cas de formes anioniques, la détoxification pourrait se faire par précipitation après réduction, ou encore par volatilisation des formes méthylées.

1.2.4.2. Cas du sélénium

Mécanismes de toxicité

La toxicité du sélénium repose principalement sur la substitution du soufre dans des protéines contenant des groupements thiols. De façon plus précise, elle est attribuée à la perturbation d'évènements biochimiques à l'intérieur de la cellule par la sélénométhionine, analogue de la méthionine, acide aminé soufré essentiel. Les enzymes formées à partir de ces acides aminés pourraient en effet présenter des dysfonctionnements (Stadtman, 1980; Brown et Shrift, 1982b; Kiffney et Knight, 1990; Pilon *et al.*, 2003). Chez les animaux, la toxicité viendrait principalement d'ingestion par la nourriture d'éléments riches en sélénium organique, en particulier de sélénométhionine (Stolz et Oremland, 1999). La sélénométhionine est par exemple tenue pour responsable des problèmes liés à la reproduction. Chez les plantes supérieures, le sélénite provoque une rapide inhibition de la photosynthèse (Sielicki et Burnham, 1973; Padmaja *et al.*, 1989). Les chloroplastes sont le site principal de formation de la sélénocystéine (Pilon-Smits, 2002; Pilon *et al.*, 2003) ; le sélénite pourrait être réduit dans les chloroplastes et interférer avec les réactions enzymatiques intervenant pendant la photosynthèse. A forte concentration, l'effet toxique pourrait également venir des propriétés oxydantes de l'ion sélénite (Sielicki et Burnham, 1973; Bebien *et al.*, 2001). Par exemple, chez la bactérie *Rhodobacter sphaeroides*, le sélénite présent à 1 mM induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'apparition de granules blancs de polyhydroxybutyrate (Bebien *et al.*, 2001).

Mécanismes de tolérance

Plusieurs mécanismes de tolérance au sélénium ont été proposés : Pilon *et al.* (2003) suggèrent que la plupart d'entre eux soient basés sur la prévention de l'incorporation de la Se-Cys dans les protéines, par formation de séléno-composés organiques qui ne perturbent pas les fonctions métaboliques. Ceci pourrait par exemple être réalisé par la combinaison des activités de la SL (Sélénocystéine Lyase) et de la SPS (SelenoPhosphate Synthétase), ces réactions aboutissant à la dégradation de la sélénocystéine et à la formation de sélénophosphate (HSePO_4) (Müller *et al.*, 1997; Lacourciere *et al.*, 2000; Lacourciere et Stadtman, 2001). La volatilisation d'espèces méthylées pourrait également être utilisée comme mécanisme efficace de détoxification (Kiffney et Knight, 1990; Fan *et al.*, 1997; Chasteen et Bentley, 2003).

Un mécanisme particulièrement efficace consiste en la réduction et la précipitation du sélénium sous forme élémentaire ; celle-ci est inerte, peu soluble, et forme donc des granules non toxiques (Stolz et Oremland, 1999). Ainsi, certaines bactéries ont des capacités d'accumulation de sélénium très importantes, tout en étant tolérantes à une concentration intracellulaire élevée. Par exemple, le taux de croissance de *Ralstonia metallidurans* n'est pas affecté par des concentrations de sélénite dans le milieu de culture allant jusqu'à 6 mM (Roux *et al.*, 2001). Le sélénium serait en premier lieu intégré dans les

acides aminés, puis l'excès serait stocké sous une forme proche de la sélénométhionine, puis enfin en forme élémentaire inerte (Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000). Des particules de sélénium denses aux électrons ont été trouvées chez *Ralstonia metallidurans* CH34 (Roux *et al.*, 2001), chez les bactéries photosynthétiques *Rhodospirillum rubrum* (Kessi *et al.*, 1999) et *Rhodobacter sphaeroides* (Bebien *et al.*, 2001) et chez trois bactéries connues pour réduire le sélénium (Oremland *et al.*, 2004). Les dépôts de sélénium élémentaire sont en général observés dans le cytoplasme et dans le périplasme. Dans le cas de *Ralstonia metallidurans* CH34, le sélénite s'accumule surtout en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Il forme souvent une seule ou quelques particules denses par cellule et est alors sous forme élémentaire rouge. Il n'est pas associé à des molécules organiques. Dans certains cas, comme par exemple chez *Rhodospirillum rubrum*, ces granules de sélénium réduit peuvent être excrétés à travers la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Kessi *et al.*, 1999).

1.2.4.3. Bioaccumulation et toxicité du sélénite chez les organismes phytoplanctoniques

Bioaccumulation

Chez les algues, la bioaccumulation est fortement dépendante de l'espèce considérée (Baines et Fisher, 2001). Les facteurs de concentration (poids sec) que nous avons pu trouver dans la littérature sont très variables: entre 267 et 1004 pour *Anabaena flos-aquae* (Kiffney et Knight, 1990), entre 440 et 1600 pour *Chlamydomonas reinhardtii* (Besser *et al.*, 1993), entre 8 000 et 18 000 pour *Skeletonema costatum*, entre 5 000 et 337 000 pour *Chaetoceros muelleri*, et enfin entre 3 000 et 45 000 pour *Phaedodactylum tricornerutum* (Zhang *et al.*, 1990). Chez quatre espèces marines, Wang et Dei (2001) ont trouvé des facteurs de concentration variant entre 2 000 et 20 000 selon l'espèce considérée et les concentrations en phosphate utilisées. Il s'agit de facteurs de concentration importants, comparables à ceux trouvés par les mêmes auteurs pour le cadmium. La capacité de stockage du sélénium par les algues pourrait être liée à son association à des protéines (Boisson *et al.*, 1995). Certaines algues pourraient également être capables de précipiter le sélénium (Gharieb *et al.*, 1995). C'est le cas de *Spirulina platensis* (Li *et al.*, 2003), ainsi que de *Phormidium luridum*, *Anacystis nidulans* et *Anabaena variabilis*, chez lesquelles des granules denses, certainement de sélénium réduit, ont été observés (Sielicki et Burnham, 1973).

Toxicité

En comparaison avec l'importante littérature relative à nombre d'espèces de vertébrés (poissons, oiseaux,...), peu d'études concernent la toxicité du sélénium vis-à-vis des micro-algues. En règle générale, les algues sont relativement tolérantes au sélénium inorganique, l'ajout modéré de séléniat ou de sélénite pouvant même avoir des effets positifs sur la croissance. Ainsi, Wheeler *et al.* (1982) ont montré que le séléniat à 0,13 μM pouvait rétablir le taux de croissance au préalable réduit par une carence en sulfate chez six algues marines unicellulaires. Dans cette étude, tandis que le séléniat à 130 μM se montre létal, le sélénite à la même concentration a plutôt tendance à améliorer la croissance, et des concentrations allant jusqu'à 1,3 mM n'ont pas d'effet. Il existe au contraire des études montrant une toxicité du sélénite supérieure à celle du séléniat, comme par exemple chez *Cricosphaera elongata* (Boisson *et al.*, 1995). Il a par ailleurs été montré que les cellules pouvaient s'adapter à d'importantes concentrations de sélénite (Bennet, 1988; Wong et Oliveira, 1991a). Le mécanisme de détoxification par volatilisation d'espèces méthylées peut également expliquer la tolérance des algues à d'importantes quantités de sélénium (Kiffney et Knight, 1990; Fan *et al.*, 1997).

La sensibilité des algues au sélénium dépend fortement de l'espèce considérée. Par exemple, dans l'étude de Wheeler (1982), les concentrations de séléniat inhibant la croissance peuvent varier de trois ordres de grandeur (de 130 nM à 130 μM). Chez *Chlorella pyrenoidosa*, maintenue en culture continue à l'aide d'un turbidostat, Bennet (1988) trouve des EC_{50} , calculées à partir de l'effet sur les taux de croissance, similaires pour le sélénite et le séléniat, de l'ordre de 10 μM . Chez l'algue marine *Cricosphaera elongata*, Boisson *et al.* (1995) trouvent une inhibition de croissance pour des concentrations de sélénite d'environ 130 μM , et de séléniat d'environ 1,3 mM. Wong et Oliveira (1991a) mentionnent que le sélénite à 1 mM inhibe significativement la croissance de 7 espèces de micro-algues marines tandis que pour des concentrations similaires, Price *et al.* (1987) montrent seulement une faible inhibition de croissance sur la diatomée *Thalassiosira pseudonana* et Wheeler *et al.* (1982) une absence d'inhibition sur 6 autres espèces de micro-algues marines. Enfin, pour des communautés naturelles d'eau douce, une inhibition a été notée pour une concentration de 127 nM, ce qui suggère une sensibilité plus importante des communautés naturelles par rapport aux cultures d'algues mono spécifiques (Riedel *et al.*, 1996).

En dehors des effets classiques sur la croissance, les effets sub-létaux qui ont pu être observés concernent principalement des impacts sur la chlorophylle et sur la photosynthèse. Chez *Phormidium luridum*, le sélénite à 100 μM induit une perte de la coloration verte, les cultures devenant alors transparentes, ainsi qu'une diminution d'un facteur 3 de la teneur en chlorophylle, accompagnée d'une inhibition complète de l'activité

photosynthétique (Sielicki et Burnham, 1973). Ces auteurs proposent que l'inhibition soit liée aux propriétés oxydantes de l'ion sélénite. Chez la cyanobactérie *Anabaena flos-aquae*, une décroissance des concentrations en chlorophylle *a* est observée pour des concentrations voisines de 1 μM de sélénométhionine, 40 μM de sélénite, ou 400 μM de séléniate (Kiffney et Knight, 1990). Enfin, Wong et Oliveira (1991b) ont montré chez trois espèces de microalgues marines une réduction des chloroplastes et du pyrénioïde, ainsi qu'un éclaircissement du stroma, en parallèle avec une réduction du contenu chlorophyllien et de l'activité photosynthétique.

1.2.5. Synthèse bibliographique

Le tableau 1.2 récapitule les études bibliographiques concernant la prise en charge, la bioaccumulation et/ou la toxicité du sélénite chez les organismes phytoplanctoniques en rappelant les principales caractéristiques des conditions expérimentales ainsi que des variables étudiées. Les résultats rapportés dans le cadre de ses études sont décrits dans les chapitres s'y rapportant (en particulier, les chapitres 1.2.3.3, 1.2.3.4 et 1.2.4.3).

Tableau 1.2 : Aspects de la prise en charge, de la bioaccumulation et de la toxicité abordés dans les différentes études bibliographiques se rapportant à l'interaction du sélénite avec des organismes phytoplanctoniques.

Espèces étudiées	Concentrations de sélénite utilisées ²	Aspects de la prise en charge ou de la bioaccumulation	Effets mesurés	Références
Espèces d'eau douce				
<i>Phormidium luridum</i>	10 ⁻⁶ M→10 ⁻² M		Croissance (fluorescence, poids sec, chlorophylle) Activité photosynthétique Contenu protéique Ultrastructure	(Sielicki et Burnham, 1973)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,53→1,37 mg.L ⁻¹		Croissance (culture en turbidostat) EC ₅₀ =0,8 mg.L ⁻¹ Adaptation	(Bennet, 1988)
<i>Anabaena flos-aquae</i>	1→10 mg.L ⁻¹	BCF (poids sec): 267-1004	Chlorophylle a	(Kiffney et Knight, 1990)

² Rappelons que la masse molaire du sélénium est de 78, 96 g.mol⁻¹. 1 nM ~ 0,079 µg.L⁻¹. 1 µg.L⁻¹ ~ 12,7 nM.

Espèces étudiées	Concentrations de sélénite utilisées	Aspects de la prise en charge ou de la bioaccumulation	Effets mesurés	Références
<i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Cyclotella meneghiana</i>	1→50 µg.L ⁻¹	Comparaison sélénite/séléniate/sélénométhionine Dépendance vis-à-vis du temps Dépendance vis-à-vis de la concentration en sélénite Prise en charge par des cellules mortes		(Riedel <i>et al.</i> , 1991)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1 µg.L ⁻¹	BCF (poids sec): 440-1600		(Besser <i>et al.</i> , 1993)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3→10 µg.L ⁻¹	Effet du pH Effet de la composition du milieu		(Riedel et Sanders, 1996)
<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25 nM	Dépendance vis-à-vis du temps Effet des concentrations en phosphate et nitrate		(Yu et Wang, 2004a) (Yu et Wang, 2004b)
Communauté phytoplanctonique naturelle	127 nM	Dépendance vis-à-vis du temps Dépendance vis-à-vis de la concentration en sélénite	Biomasse (fluorescence) Croissance (poids sec)	(Riedel <i>et al.</i> , 1996)

Espèces étudiées	Concentrations de sélénite utilisées	Aspects de la prise en charge ou de la bioaccumulation	Effets mesurés	Références
Espèces marines				
Six espèces marines	0,01→100 mg.L ⁻¹		Croissance (fluorescence)	(Wheeler <i>et al.</i> , 1982)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	10 ⁻¹⁰ →10 ⁻² M		Croissance (fluorescence, densité cellulaire) Volume cellulaire	(Price <i>et al.</i> , 1987)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	10 ⁻⁶ →10 ⁻⁵ M	Comparaison sélénite/séléniate Partition intra-cellulaire		(Vandermeulen et Foda, 1988)
<i>Skeletonema costatum</i> <i>Phaeodactylum tricorutum</i> <i>Chaetoceros muelleri</i>	0,8→46 nM	BCF (poids sec) : 3 000-337 000		(Zhang <i>et al.</i> , 1990)
Sept espèces marines	10 ⁻⁷ →10 ⁻³ M		Croissance (densité optique) Motilité Etudes morphologiques Adaptation	(Wong et Oliveira, 1991a)

Espèces étudiées	Concentrations de sélénite utilisées	Aspects de la prise en charge ou de la bioaccumulation	Effets mesurés	Références
<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Amphidinium carterae</i>	$10^{-7} \rightarrow 10^{-3}$ M		Ultrastructure Plusieurs paramètres physiologiques	(Wong et Oliveira, 1991b)
<i>Cricosphaera elongata</i>	0,1 \rightarrow 1 mg.L ⁻¹	Dépendance vis-à-vis du temps Dépendance vis-à-vis de la concentration en sélénite Partition intracellulaire	Croissance (densité cellulaire)	(Boisson <i>et al.</i> , 1995)
<i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	0,6 \rightarrow 3,2 nM	Comparaison sélénite/séléniate Production de Se organique		(Hu <i>et al.</i> , 1996)
<i>Chlorella sp.</i>	1 \rightarrow 100 mg.L ⁻¹	Biotransformation		(Fan <i>et al.</i> , 1997)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Prorocentrum minimum</i> <i>Tetraselmis levis</i> <i>Chlorella autotrophica</i>	0,2 nM	BCF (poids sec): 2000-20 000 Dépendance vis-à-vis du temps Effet des concentrations en nitrate, phosphate et silicate Comparaison avec Cd et Zn		(Wang et Dei, 2001a)

Espèces étudiées	Concentrations de sélénite utilisées	Aspects de la prise en charge ou de la bioaccumulation	Effets mesurés	Références
<i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Chlorella autotrophica</i>	0,3→1,1 nM	BCF Dépendance vis-à-vis du temps Effet des concentrations en nitrate, phosphate et silicate Comparaison avec Cr(VI)		(Wang et Dei, 2001b)
14 espèces marines	0,15 et 4,5 nM	Dépendance vis-à-vis du temps Comparaison inter-espèces		(Baines et Fisher, 2001)
<i>Spirulina platensis</i>	0→500 mg.L ⁻¹	Partition intracellulaire	Croissance (poids sec)	(Li <i>et al.</i> , 2003)

1.3. Modèle biologique et démarche expérimentale

1.3.1. Modèle biologique sélectionné: *Chlamydomonas reinhardtii*

Afin de privilégier les processus se déroulant aux interfaces « organisme/milieu environnant », nous avons choisi comme modèle biologique un organisme unicellulaire. Ceci permet également de disposer de grandes populations et d'un rapport {surface :volume} élevé. Les algues unicellulaires sont des modèles biologiques simples, appropriés à l'étude des mécanismes de prise en charge des éléments au niveau cellulaire (Sunda et Huntsman, 1998).

Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae) est une algue verte unicellulaire, qui a fait l'objet de recherches dans de nombreux domaines (Harris, 1988). Elle est présente de façon ubiquiste dans l'environnement aquatique, et se trouve également dans les sols. Elle peut être cultivée dans un milieu inorganique simple, ce qui permet de minimiser la complexité des réactions de spéciation chimique pour les éléments étudiés. Elle est également tolérante sur le plan physiologique à une large gamme de pH. Elle a un taux de croissance rapide, permettant d'analyser des effets sur plusieurs générations. Enfin, elle est utilisée en écotoxicologie pour comprendre les interactions de différents éléments avec les membranes biologiques. En particulier, son interaction avec le sélénium a déjà été abordée à plusieurs reprises (cf Tableau 1.2). Il a été montré que le sélénium est un élément essentiel pour *C. reinhardtii* (Fu *et al.*, 2002). En induisant la synthèse d'une glutathion peroxidase qui contient un résidu séléno-cystéique, le sélénite peut agir chez cette algue dans la défense contre le stress oxydant (Yokota *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 2002; Novoselov *et al.*, 2002).

Une description détaillée de l'ultrastructure de *C. reinhardtii* a été donnée par Harris (1988) (cf Fig 1.4).

D'un diamètre oscillant entre 4 et 6 μm , la cellule algale, ovale et bi-flagellée, est entourée d'une paroi cellulaire rigide, principalement formée de glycoprotéines, qui double la membrane plasmique. Environ 40% du volume cellulaire est occupé par le chloroplaste, en forme de U, qui entoure le noyau. Cet organite est composé du stroma, des thylakoïdes et du pyrénioïde. Ce dernier contient principalement de la RUBISCO (RibUlose 1,5 BisPhosphate Carboxylase/Oxygenase) et est entouré de grains d'amidon. Des grains d'amidon sont également présents dans le stroma. Enfin, le noyau est entouré de l'enveloppe nucléaire et contient le nucléole. Des vacuoles peuvent être trouvées dans le cytoplasme et le chloroplaste.

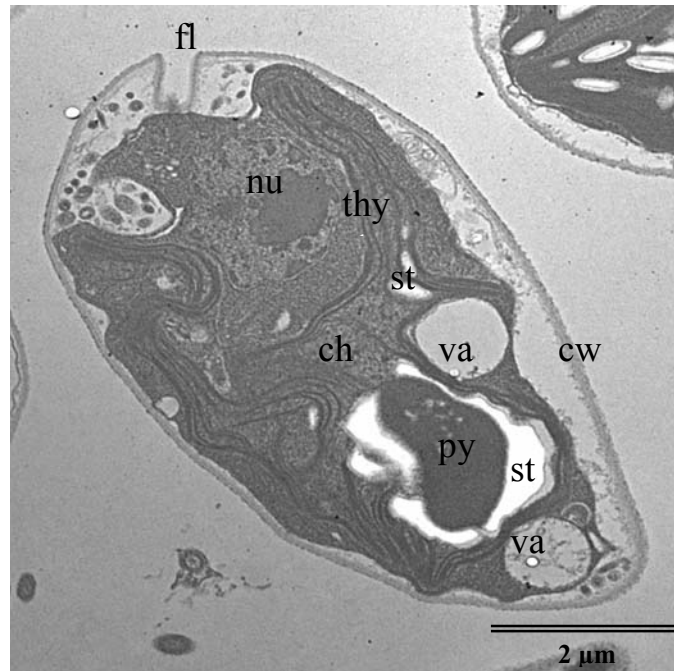


Figure 1.4 Cellule typique de *Chlamydomonas reinhardtii* obtenue par microscopie électronique à transmission. fl : flagelles ; cw : paroi cellulaire ; ch : chloroplaste ; nu : noyau ; thy : thylakoides ; py : pyrénolide ; st : amidon ; va : vacuoles.

1.3.2. Démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier la prise en charge du sélénite

Le transport a été étudié à l'aide d'expositions de courte durée, ne dépassant pas 1 heure. Ceci permet de négliger la croissance algale et de limiter au maximum le possible efflux du sélénite ainsi que l'impact des organismes sur leur milieu, par exemple par la consommation de nutriments et/ou par le relargage d'exsudats. Pour cette même dernière raison, les expériences ont été réalisées avec des densités cellulaires faibles, de l'ordre de 100 000 cellules par mL. Dans le milieu naturel, les densités algales sont très variables, mais peuvent atteindre jusqu'à 10^8 cell.mL⁻¹ pendant les périodes de « blooms » (Lair et Reyes-Marchant, 1997).

L'exposition des cellules à du sélénite marqué (⁷⁵Se, émetteur β) dans des milieux inorganiques de physico-chimie contrôlée, permet d'estimer la fraction de l'élément adsorbée à la surface cellulaire ainsi que le flux d'internalisation, de caractériser le transport par une approche de type Michaelis-Menten ainsi que d'identifier les facteurs qui ont un effet sur l'accumulation (concentrations en nutriments, pH). L'interprétation des résultats s'appuiera sur l'utilisation du logiciel de modélisation thermodynamique JChess, afin d'étudier le possible lien entre la spéciation du sélénite et son internalisation.

1.3.3. Démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier la toxicité et la bioaccumulation du sélénite

L'exposition des cellules algales à du sélénite stable pendant une durée significative à l'égard de la croissance algale (96 h) a permis d'évaluer la bioaccumulation sur des échelles de temps plus réalistes d'un point de vue environnemental, représentatives d'une exposition chronique pour ce type d'organismes. Elle a également permis d'étudier la toxicité de l'élément sur la croissance et l'ultrastructure algales. Un effort particulier a été mené pour comparer les effets au niveau des populations (effets sur la croissance) et au niveau cellulaire (effets sur l'ultrastructure). Les effets sur la croissance permettent de dériver des $EC_{x\%}$ (« Effect Concentration » ou concentration d'élément responsable d'un changement de x% d'un paramètre biologique). Les observations en microscopie électronique à transmission permettent d'identifier les structures cibles du sélénium. Complétées par l'analyse de microlocalisation à l'aide des rayons X, elles permettent de rechercher d'éventuelles structures de stockage de l'élément. Le lien entre bioaccumulation et toxicité a été également abordé, ainsi que celui entre l'effet du sulfate sur le transport du sélénium à court terme et sur sa bioaccumulation à long terme.

1.4. Vue d'ensemble du contenu du mémoire

Après une description des principales bases méthodologiques utilisées, les résultats seront présentés et discutés sous forme de trois articles, qui correspondent aux trois axes de recherche développés dans ce mémoire. Chaque article est encadré par une introduction et un résumé en français.

- Concernant le transport du sélénite:

“Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*” (soumis à *Environmental Toxicology and Chemistry*).

Hélène Morlon¹, Claude Fortin², Christelle Adam¹, Jacqueline Garnier-Laplace¹.

¹ Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sécurité Nucléaire, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, cedex, France.

² INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9.

- Concernant la toxicité du sélénite:

“Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: comparison between effects at the population and sub-cellular levels” (*Aquatic Toxicology*, sous presse).

Hélène Morlon¹, Claude Fortin², Magali Floriani¹, Christelle Adam¹, Jacqueline Garnier-Laplace¹, Alain Boudou³.

¹ Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, cedex, France.

² INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9.

³ Laboratoire d’Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, Université Bordeaux 1, 33120 Arcachon, France.

- Concernant la bioaccumulation du sélénite:

“Cellular burdens and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*” (*Radioprotection*, sous presse)

H. Morlon¹, C. Fortin², C. Adam¹ and J. Garnier-Laplace¹

¹ Laboratoire de Radioécologie et d’Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. DEI/SECRE/LRE, Cadarache, Bât. 186, BP 3, 13115 St-Paul-lez-Durance Cedex, France.

² INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9.

Cette partie est complétée par des résultats concernant l’effet du sulfate sur la bioaccumulation du sélénite et par une estimation du facteur de concentration.

Les principaux résultats issus des différentes approches expérimentales que nous avons réalisées sur le modèle *C. reinhardtii* seront résumés dans une conclusion générale, placée à la fin du mémoire. Nous préciserons également dans cette conclusion les principales perspectives de recherche qui découlent de notre travail, à des fins mécanistiques mais

également dans un but d'élargissement de notre champ d'investigation, le but final étant de mettre en œuvre des approches à l'échelle systémique et intégrée.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Généralités

2.1.1. Algues

Les cultures axéniques de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae), souche 11/32B, ont été obtenues auprès du « Culture Collection of Algae and Protozoa » (CCAP; Cumbria, United Kingdom). Les cellules ont été cultivées de façon axénique en lots de 100 mL dans des erlenmeyers en polycarbonate de 250 mL sous une luminosité de $100 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une température de $25^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Les flacons de culture ont été fermés par des bouchons autoclavables munis d'un filtre (BugStopper, Merck eurolab, France) assurant la stérilité des milieux, tout en permettant les échanges gazeux. Ils ont été placés sur une table d'agitation, afin de conserver les cellules en suspension (~ 120 rpm). Un milieu frais et stérile (pH=7) a été inoculé de façon hebdomadaire, afin de conserver les cellules dans un bon état physiologique. Les manipulations axéniques des cultures d'algues ont été réalisées sous hotte à flux laminaire, en utilisant des solutions et du matériel stérilisés par autoclave, à l'éthanol ou par filtration à 0,2 μm . L'absence de contamination bactérienne a été vérifiée régulièrement par ensemencement sur agar et visuellement au microscope.

2.1.2. Milieux de culture et d'exposition

2.1.2.1. Choix des milieux

Le milieu de culture des algues était un milieu modifié à partir d'un milieu classique utilisé en recherche expérimentale : le milieu HSM « High Salt Medium » (Harris, 1988) (Tableau 2.1). Il s'agit d'un milieu inorganique, ce qui simplifie la spéciation chimique des éléments.

Les milieux d'exposition des cellules algales avaient globalement la même composition ionique que les milieux de culture (Tableau 2.1). Cependant, pour les expériences à court terme (<1 h) visant à étudier le transport du sélénium, les métaux-traces ont été éliminés afin de simplifier le milieu. Pour les expériences à long terme (96 h), ils ont été conservés afin de ne pas créer des carences pouvant avoir un impact sur la physiologie et la croissance algales. Dans les milieux d'exposition, le pH et les concentrations en sulfate, phosphate, nitrate et carbonate ont été modifiés selon l'expérience menée. Les conditions d'exposition sont décrites séparément pour chaque expérience.

Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et anions composant le milieu HSM, le milieu de culture et le milieu d'exposition.

Ions	Milieu HSM	Milieu de culture (M)	Milieu d'exposition (M)
NH ₄	9,35.10 ⁻³	9,36.10 ⁻³	9,36.10 ⁻³
Cl	9,49.10 ⁻³	13,5.10 ⁻³	13,5.10 ⁻³
K	2,2.10 ⁻²	1,22.10 ⁻³	1,22.10 ⁻³
PO ₄	1,37.10 ⁻²	0,14.10 ⁻³	0 - 137.10 ⁻⁶
C _{inorg} *	~ 50.10 ⁻⁶ (pCO ₂ = 3,16.10 ⁻⁴ atm)	~ 50.10 ⁻⁶ (pCO ₂ = 3,16.10 ⁻⁴ atm)	50.10 ⁻⁶ – 5 000.10 ⁻⁶
NO ₃	-	2,92.10 ⁻³	0 - 30.10 ⁻³
SO ₄	81,2.10 ⁻⁶	81,2.10 ⁻⁶	0 - 800.10 ⁻⁶
Mg	81,2.10 ⁻⁶	1,04.10 ⁻³	1,04.10 ⁻³
Ca	6,8.10 ⁻⁵	2,00.10 ⁻³	2,00.10 ⁻³
Na	0,10.10 ⁻³	0,10.10 ⁻³	0,10.10 ⁻³
BO ₃	3,01.10 ⁻⁶	3,01.10 ⁻⁶	—
Mn	2,09.10 ⁻⁶	2,09.10 ⁻⁶	—
EDTA	8,06.10 ⁻⁷	8,06.10 ⁻⁷	—
Fe	5,92.10 ⁻⁷	5,92.10 ⁻⁷	—
MoO ₄	3,00.10 ⁻⁸	3,00.10 ⁻⁸	—
Zn	2,43.10 ⁻⁸	2,43.10 ⁻⁸	—
Co	1,09.10 ⁻⁸	1,09.10 ⁻⁸	—
Cu	7,04.10 ⁻¹¹	7,04.10 ⁻¹¹	—

*Aucun ajout de carbonates. La concentration de ces derniers s'ajuste par équilibre gazeux avec l'atmosphère, sauf pour l'expérience concernant l'effet du carbone inorganique dissous.

2.1.2.2. Préparation des milieux

Les milieux ont été préparés à partir de solutions stock (Tableau 2.2), conservées dans l'obscurité à 4°C. Toutes ces solutions ont été filtrées (0,2 µm; membrane PES, Nalgene, USA) afin d'enlever les bactéries, pouvant modifier la composition des solutions, ainsi que les particules abiotiques, pouvant induire un biais lors du comptage des algues ou encore adsorber les métaux en solution. Les milieux sans oligo-éléments (mélange AAP) ont été répartis dans des erlenmeyers, bouchés par des BugStoppers, puis stérilisés par autoclave

(120°C, 20 min). Les oligo-éléments n'ont été ajoutés qu'ensuite (au moins 24 heures après autoclave), comme préconisé dans le protocole de préparation de Price (Price *et al.*, 1990). Le pH a été ensuite ajusté à 7 avec une solution de KOH (0,10 M).

Les cristaux de sel utilisés étaient de grade analytique ou ultrapur.

Tableau 2.2 : Composition et proportion des solutions stocks utilisées dans la préparation des milieux de culture et d'exposition.

Solutions	Volume	Solution (filtrée 0,2 µm)	Cristaux**	Quantité
Ammonium #5	20 mL.L ⁻¹	Ammonium #5	NH ₄ Cl	25 g.L ⁻¹
Phosphates #2	250 µL.L ⁻¹		MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g.L ⁻¹
KNO ₃ (1,0M)	1 mL.L ⁻¹		Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	12,31 g.L ⁻¹
NaCl (0,1M)	1 mL.L ⁻¹		CaCl ₂ .2H ₂ O	14,68 g.L ⁻¹
AAP*	1 mL.L ⁻¹	Phosphates #2	KH ₂ PO ₄	29,6 g.L ⁻¹
KOH (0,1M)*	1,3 mL.L ⁻¹			
*24 heures après autoclavage		AAP	H ₃ BO ₃	186 mg.L ⁻¹
**de grade analytique ou ultrapur			Mn (10 g.L ⁻¹)	115 mg.L ⁻¹
			FeCl ₃ .6H ₂ O	160 mg.L ⁻¹
			Na ₂ EDTA.2H ₂ O	300 mg.L ⁻¹
			ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,00 mg.L ⁻¹
			Co (1 g.L ⁻¹)	0,64 mg.L ⁻¹
			Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,26 mg.L ⁻¹
			CuSO ₄ .5H ₂ O	17,58 µg.L ⁻¹

2.1.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Les tests de significativité de l'effet de différents traitements (niveaux de sélénite en solution, concentrations en différents nutriments, pH,...) sur les paramètres mesurés (bioaccumulation du sélénite, densités cellulaires, taux de croissance,...) ont été réalisés avec des analyses de variance classiques. Dans le cas où les hypothèses étaient vérifiées (en particulier normalité et homoscedasticité), nous avons utilisé des analyses de variance à

un facteur (ANOVA), complétées par des tests post-hoc, en particulier le test LSD (Least Square Difference). Dans le cas contraire, nous avons utilisé des tests non paramétriques, en particulier le test de Kruskal Wallis.

L'ajustement de relations linéaires a été réalisé par régression linéaire classique.

L'ajustement de modèles non linéaires - modèle de Michaelis-Menten pour la saturation du transport (équation 1.1) ; modèle de Delignette-Muller pour la croissance algale (équation 2.2) ; modèle de Hill pour les relations dose-effet (équation 2.3)- a été réalisé par régression non linéaire avec l'algorithme classique de Levenberg-Marquardt, basé sur la méthode des moindres carrés.

2.2. Etude de la prise en charge: expositions de courte durée

2.2.1. Protocole expérimental

La méthode expérimentale qui a été utilisée est largement inspirée de celle mise au point par Fortin pour étudier les mécanismes de prise en charge et de toxicité de l'argent (Fortin, 2000; Fortin et Campbell, 2000; Fortin *et al.*, 2004) ou de l'uranium (Fortin *et al.*, 2004).

Des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été mises en culture par inoculation à une densité initiale de $2\ 500\ \text{cell.mL}^{-1}$ dans le milieu de culture décrit précédemment. L'état physiologique des algues pouvant largement influencer la prise en charge des éléments, les cellules ont toujours été exposées au même stade de croissance: la fin de la phase exponentielle, atteinte environ 48 heures après inoculation.

Les milieux d'exposition ont été préparés le matin précédant l'exposition des cellules, afin d'éviter toute évolution du milieu ainsi qu'une éventuelle oxydation du sélénite en séléniate. Ils ont été répartis dans des Erlenmeyers en polycarbonate de 250 mL, à raison de 200 mL de milieu par flacon. Les niveaux de sélénite requis ont été obtenus par addition des volumes nécessaires de solution « stock » du radioisotope ^{75}Se . Les sources de ^{75}Se ont été obtenues auprès de Riso (Danemark); le sélénite était sous forme de H_2SeO_3 , maintenu dans une solution de HCl (0,01M). Le pH a été ajusté par ajout de HNO_3 ou KOH. L'ajout de sélénite ainsi que l'ajustement du pH n'ont pas modifié la force ionique de façon significative.

48 heures après inoculation, les cellules ont été récupérées par filtration sur un filtre en polycarbonate de $2,0\ \mu\text{m}$ (Poretics, Minnetonka, MN, USA). La filtration a été privilégiée par rapport à la centrifugation, permettant d'éviter la formation d'un culot dans lequel des conditions anoxiques auraient pu s'installer. Un vide maximal de 10 cm Hg a été utilisé afin de ne pas abîmer les cellules. Ces dernières ont été rincées cinq fois avec 5 mL de milieu d'exposition sans sélénium. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans 3 mL du même milieu. Cette étape a permis d'éliminer la présence d'exsudats et de métaux

pouvant modifier la spéciation et la prise en charge des éléments ainsi que de concentrer les algues. Elle a été effectuée le plus rapidement possible afin de minimiser les impacts du confinement sur la physiologie des algues. Un prélèvement de 1ml de solution a été effectué dans chaque flacon juste avant l'exposition des cellules, afin de contrôler les concentrations en sélénium. Les cellules ont ensuite été distribuées dans les milieux d'exposition. Les densités algales et le diamètre moyen des cellules ont été mesurés à l'aide d'un compteur de particules (Coulter Z2, Beckman Coulter, Roissy, France) après dilution de 1 mL de milieu dans 9 mL de solution isotonique (Isoton II). Les densités algales ainsi obtenues étaient d'environ $100\,000\text{ cell.mL}^{-1}$ et le diamètre oscillait entre 4,5 et 5 μM . Les cellules ont été exposées pendant un temps court ($< 60\text{ min}$). Ces conditions d'exposition (faibles densités algales et temps courts) ont permis de minimiser la croissance algale, la diminution de la concentration du sélénium en solution, l'oxydation du sélénite en séléniate, l'efflux du sélénium, ainsi que l'influence des algues sur le milieu (par consommation des nutriments, relargage d'exsudats,...). Les expositions ont été réalisées à température ambiante, sans utiliser de tampon et avec un minimum de trois réplicats.

A la fin du temps d'exposition, les cellules ont été récupérées sur deux filtres en polycarbonate de 2 μm superposés. La membrane du dessous a permis d'évaluer la quantité de sélénite attribuable à la fixation sur le filtre. La différence de radioactivité entre les deux filtres a ainsi été attribuée à la quantité de sélénite fixée par les algues. La moitié (100 mL) des cellules exposées a été rincée (5 fois avec 5 mL de milieu d'exposition sans sélénium) afin d'éliminer le sélénite adsorbé sur la membrane cellulaire. La radioactivité ainsi obtenue représentait donc la fraction intracellulaire ou absorbée. L'autre moitié des cellules n'a pas été rincée, représentant donc la totalité du métalloïde fixé, c'est-à-dire la somme des quantités adsorbées et absorbées. Ainsi, la quantité adsorbée a été estimée par différence entre le sélénium contenu dans les algues non rincées et rincées. Les résultats d'accumulation ont été normalisés en fonction de la surface totale des algues (la surface d'une cellule est d'environ $70\ \mu\text{m}^2$).

2.2.2. Dosage du ^{75}Se

Les échantillons à doser ont été transférés dans des flacons en borosilicate, puis dissous dans du liquide à scintillation (Instagel®, Packard Instrument, Rungis, France) à raison de 1 mL d'échantillon pour 19 mL de liquide.

Les activités en ^{75}Se ont été mesurées par comptage en scintillation liquide β , dont le principe est décrit dans la figure 2.1.

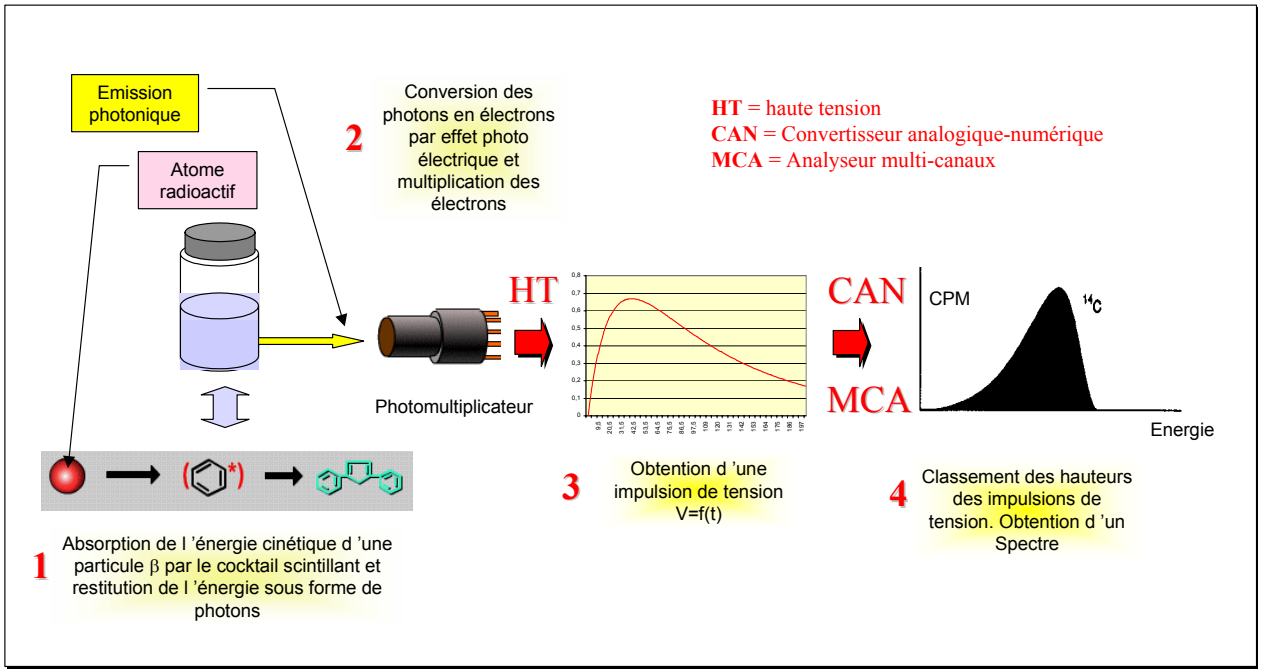


Figure 2.1 Principe du dosage de la radioactivité β par scintillation liquide.

L'énergie cinétique de la particule radioactive est convertie par le liquide scintillant en une émission de lumière (photons) susceptible d'être détectée par le photomultiplicateur de l'appareil. Les photons sont ensuite convertis en électrons par le photomultiplicateur. Le nombre de ces électrons primaires est amplifié pour former un flux d'électrons recueilli sur une électrode polarisée par application d'une haute tension (THT). La variation de la tension consécutive à la collection de ce flux d'électrons est proportionnelle à l'énergie de la particule β à l'origine du phénomène. Le cumul de ces événements permet de former un spectre représentatif de l'énergie des particules détectées.

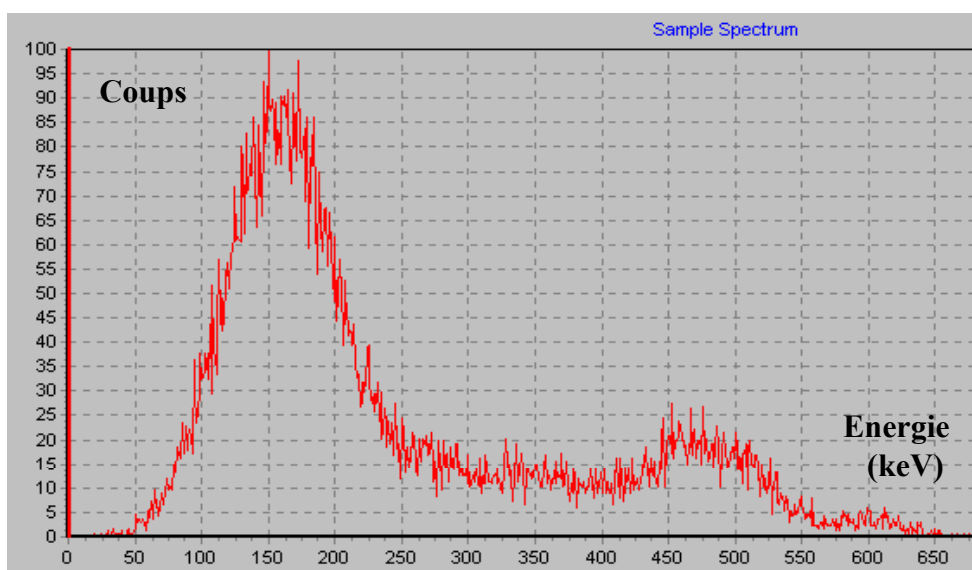


Figure 2.2 Exemple de spectre obtenu dans le cas du ^{75}Se .

La fenêtre utilisée allait de 5 à 660 keV, englobant ainsi l'ensemble des énergies liées à l'émission des électrons Auger pour le radio-isotope ^{75}Se (Fig 2.2.). Le temps de comptage était habituellement de 15 minutes, ce qui permettait d'obtenir une erreur inférieure à 1% sur l'activité totale des l'échantillons. Cependant, nous avons été amenés à doser des échantillons de faible activité (<1 Bq). Dans ce cas, le temps de comptage a été augmenté (jusqu'à 6 heures de comptage par échantillon) afin de limiter l'erreur à moins de 10%.

La conversion de coups par minute (CPM) en désintégrations par minute (DPM) a été faite en divisant les CPM par l'efficacité E (%) du détecteur. Celle-ci variait avec le niveau de quenching (Q), mesuré par l'appareil pour chaque échantillon. La relation $E = f(Q)$ avait été établie au préalable et elle a été ré-étalonnée périodiquement à l'aide de sources certifiées. Les DPM ont ensuite été transformées en Becquerel (1 DPM = 60 Bq), puis corrigées pour les pertes par désintégration selon l'équation 2.1 :

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{\ln 2t}{t_{1/2}}} \quad (2.1)$$

où $N(t)$ est l'activité au temps t , N_0 est l'activité initiale, et $t_{1/2}$ est la demi-vie du radio-isotope (^{75}Se : 119, 64 jours). La quantité de l'élément (mole) a enfin été calculée à l'aide de l'activité spécifique donnée par le certificat d'étalonnage.

Nous avons, dans nos expériences, utilisé deux sources de ^{75}Se différentes. Dans les deux cas, nous avons pu vérifier que les activités trouvées étaient conformes aux certificats d'étalonnage fournis avec les sources. Ceux-ci sont reproduits en annexe.

Pour la détermination de l'activité de l'ensemble « filtre + cellules » obtenu à la fin de chaque expérience (cf chapitre 2.2.1), le dosage a été précédé d'une étape de digestion acide à température ambiante pendant au moins 12 heures, dans 1 mL d'acide nitrique concentré (65 %). 800 µL ont ensuite été transférés dans des flacons à scintillation en borosilicate, puis lentement évaporés sur un bain de sable. Les résidus minéralisés ont ensuite été de nouveau dissous dans 1 mL de HNO₃ à 1% v/v, complétés à 20 mL par le liquide à scintillation. L'étape de volatilisation/dissolution avait pour but d'éliminer l'acide nitrique concentré, qui aurait pu induire un quenching élevé ainsi que des artéfacts liés à la chimiluminescence. Il a été au préalable vérifié que l'évaporation n'induisait pas de perte de sélénium par volatilisation.

Au final, la limite de détection du dosage était d'environ 40 mBq par échantillon.

2.2.3. Modélisation thermodynamique

La spéciation du sélénite dans les solutions d'exposition a été appréhendée de manière théorique par calcul à l'aide du programme de spéciation chimique J-Chess. Les constantes thermodynamiques utilisées étaient issues d'une compilation de Denison (Denison, 2002) réalisée principalement à partir des bases de données de l'OCDE-NEA (OECD-NEA, 1996), de la NIST (Martell *et al.*, 2001) et de l'IUPAC (Pettit et Powell, 2001). Cette base de donnée a été complétée par des valeurs obtenues dans la littérature. Les constantes de formation pour le sélénium sont données à force ionique nulle et à 25°C dans le tableau 2.3. La correction des constantes thermodynamiques vis-à-vis de la température a été réalisée avec l'équation de Van't Hoff et la correction vis à vis de la force ionique avec celle de Davies.

Les calculs ont été effectués pour chaque condition d'exposition à pH fixe et en équilibre avec l'atmosphère ($p\text{CO}_2=3,5 \cdot 10^{-4}$ atm).

Il est important de noter qu'il existe une forte incertitude sur les valeurs des constantes de formation, puisqu'elles sont obtenues en moyennant les valeurs trouvées dans la littérature, rares et parfois fortement variables d'une publication à l'autre. Il s'agit donc d'être vigilant quand à l'interprétation du diagramme de spéciation obtenu.

Tableau 2.3 : Constantes de formation des espèces aqueuses et solides du sélénite utilisées dans notre base de données thermodynamiques (force ionique nulle, 25°C).

Espèces aqueuses	Log K	Références	Espèces solides	Log K _{sp}	Références
HSeO ₃ ⁻	8,1	Moyenne de 4 valeurs Elrashidi et al., 1987 Martell et al., 2001 Pettit et Powel, 2001	CaSeO ₃ .H ₂ O	7,76	Sharmasarkar <i>et al.</i> , 1996
H ₂ SeO ₃	10,71	Moyenne de 4 valeurs Elrashidi et al., 1987 Martell et al., 2001 Pettit et Powel, 2001	CaSeO ₃ .2H ₂ O	5,44	Elrashidi <i>et al.</i> , 1987
CaSeO ₃	3,17	Seby et al., 2001	K ₂ SeO ₃	1,48	Essington, 1988
K ₂ SeO ₃	0,28	Elrashidi et al., 1987	MgSeO ₃	7,15	Moyenne de 3 valeurs Essington, 1988 Sharmasarkar <i>et al.</i> , 1996 Seby <i>et al.</i> , 2001
MgSeO ₃	2,87	Seby et al., 2001	MgSeO ₃ .6H ₂ O	5,36	Martell <i>et al.</i> , 2001
Na ₂ SeO ₃	0,02	Elrashidi et al., 1987	Na ₂ SeO ₃	3,51	Essington, 1988
NaHSeO ₃	8,1	Elrashidi et al., 1987	Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	-1,9	Martell <i>et al.</i> , 2001

2.3. Etude de la bioaccumulation et de la toxicité: expositions de longue durée

2.3.1. Protocole expérimental

La semaine précédant l'exposition, les milieux d'exposition ont été préparés, répartis dans des Erlenmeyers en polycarbonate de 250 mL, à raison de 100 mL de milieu par flacon et autoclavés comme décrit au chapitre 2.1.2.2. Ils ont été conservés à l'obscurité à 4°C en chambre froide. L'ajout des métaux traces et du sélénite ainsi que l'ajustement du pH ont été réalisés le matin précédant l'exposition, sous hotte à flux laminaire. Les concentrations désirées de sélénite ont été obtenues par addition du volume requis de solutions mères préparées à partir de cristaux de Na₂SeO₃ (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne). Ces solutions ont été confectionnées le matin précédant l'exposition. Pendant la durée de l'expérience, les manipulations nécessitant l'ouverture des Erlenmeyers ont été réalisées sous hotte à flux laminaire, afin de conserver la stérilité des milieux.

L'inoculation des milieux a été faite à partir de cultures algales en fin de phase exponentielle de croissance, par addition du volume nécessaire à l'obtention d'une densité initiale de $2500 \text{ cell.mL}^{-1}$. L'effet du sélénite a été examiné sur une période de quatre jours correspondant à la totalité du cycle de croissance algale (de l'inoculation à la phase stationnaire).

Le pH, qui avait tendance à diminuer, a été ajusté de façon quotidienne avec une solution de KOH. La diminution du pH est liée à la production par les algues d'ions H^+ . En effet, *Chlamydomonas reinhardtii* assimile l'azote sous forme d'ammonium de façon préférentielle à l'azote sous forme de nitrate et cette assimilation se fait par un échangeur $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{H}^+$. Quand la densité cellulaire devient suffisamment importante (après 3 à 4 jours de croissance), la production d'ions H^+ excède la capacité tampon du milieu et le pH baisse.

Des échantillons d'eau ont été prélevés et filtrés de façon quotidienne ($0,2 \mu\text{m}$; membrane PES, Nalgene, USA) afin de suivre l'évolution dans le milieu des concentrations en anions, cations et sélénium.

Les densités algales et le diamètre moyen des cellules ont été mesurés de façon quotidienne à l'aide du compteur de particules. Les croissances algales ont ainsi été déterminées en fonction des conditions d'exposition, avec un minimum de trois réplicats par condition. Ceci nous a permis d'estimer les paramètres de la croissance algale (taux de croissance et densité cellulaire maximale atteinte) ainsi que des EC_x ³.

Enfin, des algues ont été récoltées en fin de phase exponentielle de croissance (48 h après inoculation) ou en phase stationnaire de croissance (96 h après inoculation) pour mesurer la quantité de sélénium bioaccumulée (cf. chapitre 2.3.3) ou réaliser des analyses EDAX-TEM (chapitre 2.3.5). La récupération a été faite par centrifugation à $100\,000 \text{ g}$ pendant 10 minutes, ce qui a permis de récupérer un maximum d'algues sans abîmer les cellules.

2.3.2. Dosage des ions majeurs

Les anions présents dans les milieux d'exposition ont été dosés par chromatographie ionique (DIONEX-120, Sunnyvale, CA, USA; limites de détection: Cl^- : $50 \mu\text{g.L}^{-1}$; NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} : $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) et les cations par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, Optima 4300 DV, Perkin Elmer Norwalk, CP, USA; limites de détection: Mg^{2+} : $1 \mu\text{g.L}^{-1}$; Na^+ and Ca^{2+} : $5 \mu\text{g.L}^{-1}$; K^+ : $10 \mu\text{g.L}^{-1}$).

2.3.3. Dosage du sélénium stable

³ EC_x : Effect Concentration : concentration d'élément responsable d'un changement de x% d'un paramètre biologique.

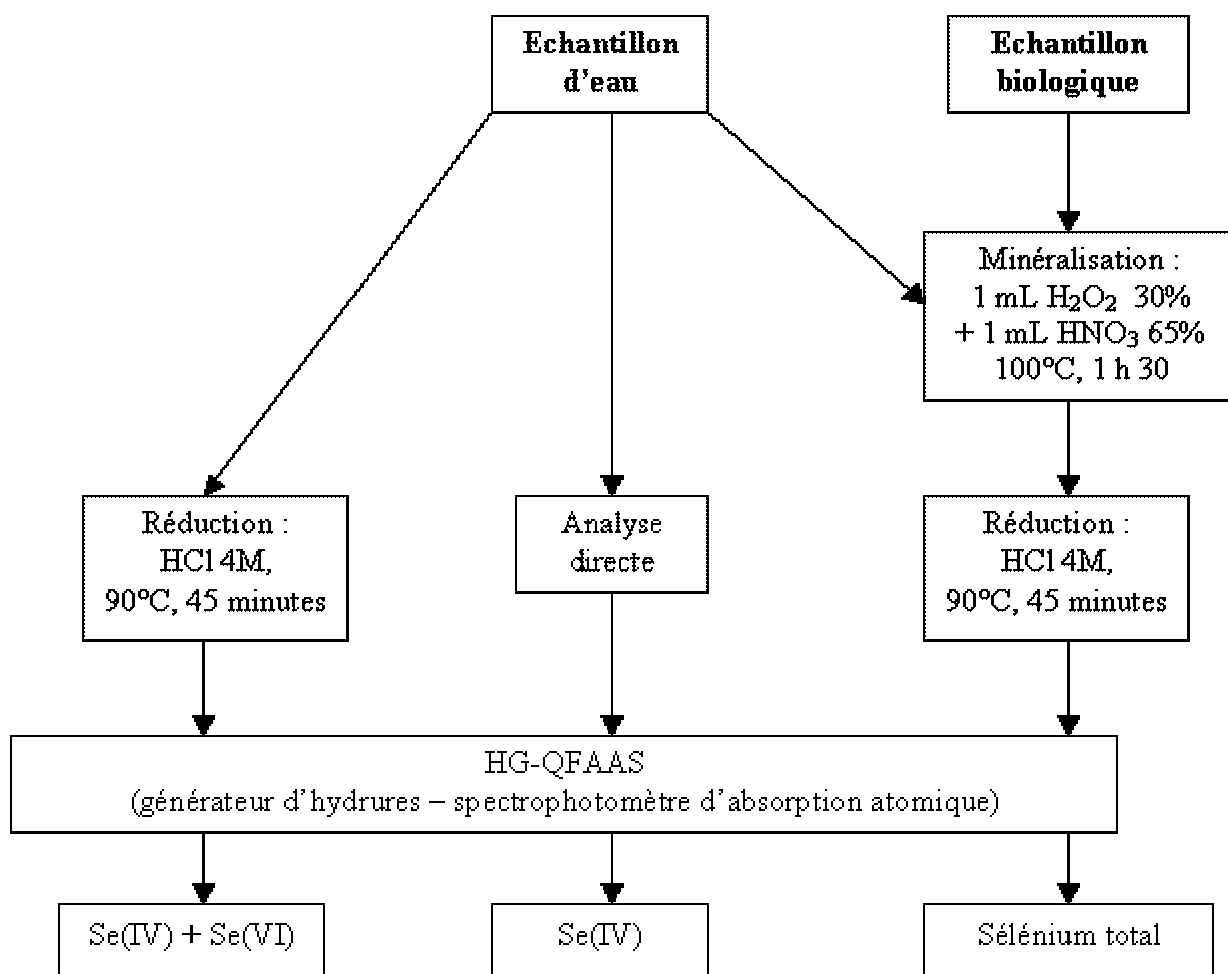


Figure 2.3 Schéma récapitulatif des différentes étapes utilisées pour déterminer les concentrations en sélénite, sélénium inorganique total (sélénite + séléniate), et sélénium total (organique + inorganique).

Le sélénium a été dosé avec un spectromètre d'absorption atomique couplé à un générateur d'hydrures (FIAS-100 / AAS 4110-ZL Perkin, CT USA). Cette méthode est spécifique au dosage du sélénite, seule forme de Se capable de générer quantitativement des hydrures. Le dosage du sélénium organique et du séléniate a donc nécessité des étapes préliminaires de minéralisation et/ou réduction, qui ont permis de transformer les différentes formes de sélénium en sélénite (Séby, 1994). Celles-ci sont récapitulées dans la figure 2.3.

Pour les échantillons d'eau, l'analyse directe a permis le dosage de Se(IV). Les formes oxydées de sélénium inorganique (Se(IV)+Se(VI)) ont été mesurées après réduction du Se(VI) présent en Se(IV). Ceci a été fait par réduction dans de l'acide chlorhydrique (concentration finale 4 mol.L^{-1} HCl) pendant 45 min à 90°C en système fermé (SELECTA, bloc digest 12). Se(VI) a enfin été obtenu par différence entre Se(IV)+Se(VI) et Se (IV). Ce dosage a été réalisé pour vérifier la stabilité de Se (IV) lors d'expositions à long terme.

Pour les échantillons biologiques, une première étape de minéralisation en milieu fermé à 100°C pendant 90 min dans un mélange 1 :1 d'acide nitrique (65%) et de peroxyde d'hydrogène (30%), a permis la transformation des formes organiques de sélénium en formes inorganiques. Une deuxième étape de réduction (45 min, 90°C , HCl 4M, système fermé) a permis la transformation du Se(VI) présent en Se(IV). Toutes les formes de sélénium ont ainsi été transformées en Se(IV). Les deux étapes (minéralisation + réduction) ont également été réalisées pour les échantillons d'eau, afin de déterminer la somme des formes de sélénium organiques et inorganiques.

Le principe de la technique de dosage de Se(IV) est de générer des hydrures de sélénium volatils, qui sont atomisés avant d'être mesurés par absorbance. Les étapes de la technique de dosage sont les suivantes :

- L'échantillon à doser est acheminé dans le générateur d'hydrures (FIAS-100, Perkin Elmer Shelton, CT USA), avec comme solution de transport de l'acide chlorhydrique à $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Au niveau du bloc mélange, l'échantillon réagit avec le borohydrure de sodium, qui est l'agent réducteur ($\text{NaBH}_4 - 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ dans $\text{NaOH} - 12,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), pour donner de l'hydrure de sélénium (H_2Se) volatil.
- Les produits de la réaction gazeuse sont acheminés au moyen d'argon ($\text{Ar} - 100 \text{ mL.min}^{-1}$) dans une cellule d'atomisation en quartz (III) chauffée à 1000°C

afin de provoquer l'atomisation du sélénium. La cellule est placée dans un four sur le trajet optique du spectromètre.

- Le spectromètre d'absorption atomique (4110 ZL, Perkin Elmer Shelton, CT USA) est équipé d'une lampe à décharge sans électrode (EDL), préchauffée au moins 120 minutes avant utilisation. L'absorbance est mesurée à 196,0 nm, avec une fente de 0,2 nm.

La boucle d'échantillonnage est de 500 μL . La limite de détection de cette méthode de dosage est de 0,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$. L'appareil a été étalonné à l'aide de solutions standards de sélénite préparées à partir de sels de Na_2SeO_3 (Sigma – Aldrich).

2.3.4. Modélisation de la croissance algale et estimation des $\text{EC}_{x,s}$

La croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* est caractérisée, comme de nombreux microorganismes, par une phase de latence, une phase exponentielle rapide ($\mu \approx 2 \text{ div.j}^{-1}$) et une phase stationnaire (cf. Figure 2.4.).

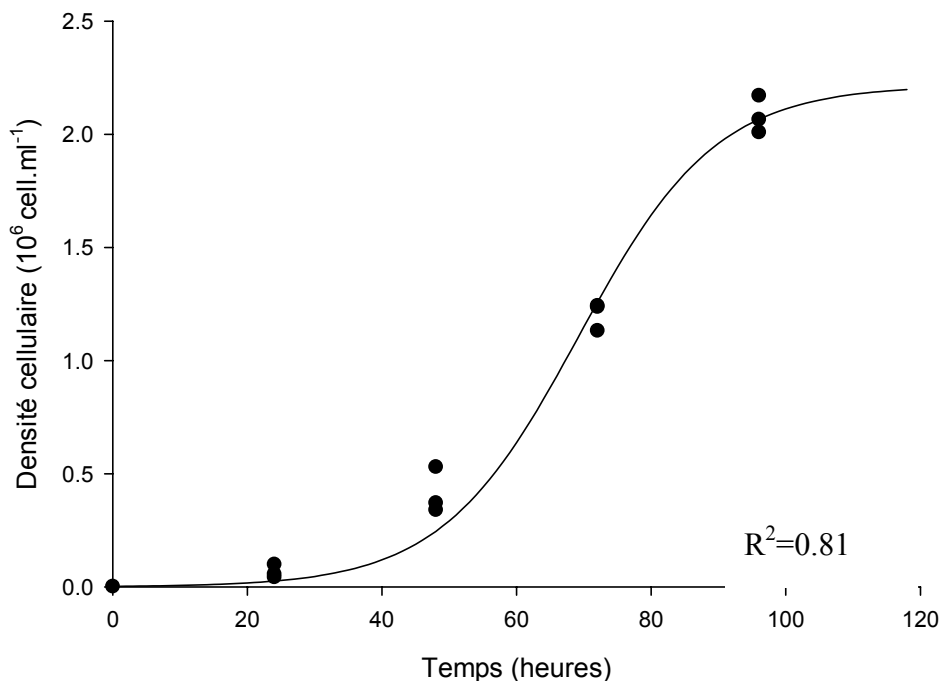


Figure 2.4 Croissance de *C. reinhardtii* dans notre milieu de culture. Les points représentent les données expérimentales ($n=3$) et la courbe représente l'ajustement de ces données au modèle de Delignette-Muller.

Afin de décrire ces trois phases, nous avons utilisé un modèle faisant intervenir trois paramètres clefs (Delignette-Muller, 1995): la densité initiale de la population $N(0)$ (exprimée en cellules par mL), la densité maximale de population atteinte $N(\infty)$ (exprimée en cellules par mL) et le taux de croissance μ (exprimé en jours⁻¹). La densité de la population au temps t , $N(t)$, est alors donnée par l'équation 2.2:

$$N(t) = \frac{N(\infty)}{1 + \left(\frac{N(\infty)}{N(0)} - 1\right) \exp(-\mu t)} \quad (2.2)$$

$N(0)$ est fixé à 2 500 cell.mL⁻¹, densité à laquelle les milieux sont inoculés.

Des régressions non linéaires selon la méthode des moindres carrés (algorithme de Levenberg-Marquardt) permettent d'estimer les deux paramètres d'intérêt de la croissance algale : $N(\infty)$ et μ .

Nous avons choisi de travailler sur l'inhibition de la croissance algale afin d'établir des relations classiques de type dose-effet et d'estimer des EC_{xS} (EC_x est défini comme la dose de polluant responsable d'un pourcentage de changement x d'un paramètre donné par rapport à un niveau de référence $x\% = 100 \left(\frac{y(EC_x)}{y(0)} - 1 \right) \%$). Les tests d'inhibition de croissance permettent d'appréhender la toxicité d'un élément au niveau de la population, et sont considérés comme étant relativement sensibles. Ils sont utilisés de façon routinière en études de risques environnementaux et sont standardisés (cf AFNOR, USEPA, ISO, OCDE). Pour le traitement statistique des données, nous nous sommes appuyés sur le guide pour analyses statistiques de données écotoxicologiques de l'OCDE (OECD, 2003). Les données fournies par ces tests (les densités cellulaires) sont des données continues qui dépendent du niveau de contamination et de la durée d'exposition. Elles ne peuvent pas être traitées comme des observations indépendantes dans le temps car elles proviennent de mêmes unités expérimentales. L'approche recommandée consiste alors à ajuster séparément une courbe de croissance à chaque unité expérimentale, puis à soumettre les paramètres estimés à une analyse dose-effet. A ce stade, le guide de l'OCDE utilise pour la modélisation de la croissance algale le modèle simple de croissance exponentiel, ne faisant intervenir qu'un seul paramètre (le taux de croissance). Classiquement, les deux paramètres pouvant être retenus pour estimer les EC_{xS} sont le taux de croissance algal ou la densité cellulaire maximale atteinte ; le choix de l'un ou l'autre des paramètres fait l'objet d'un débat qui reste ouvert (Dorgerloh, 2004; Ratte, 2004). La modélisation de la croissance algale que nous avons choisie nous permet d'estimer les deux paramètres et de déterminer celui qui est le plus sensible avant de calculer les EC_{xS} .

Afin d'estimer ces doses, nous avons utilisé l'équation de Hill. Il s'agit d'une équation adaptée pour décrire les relations dose-effet ; elle est utilisée en routine dans les tests en écotoxicologie. Elle est caractérisée par deux paramètres : le nombre de Hill nH et la dose responsable d'une inhibition de 50% (EC_{50}), avec la fonction de probabilité écrite comme suit (équation 2.3):

$$f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + EC_{50}^{nH}} \quad (2.3)$$

Cette équation a été ajustée aux données obtenues à l'issue de la phase précédente (c'est à dire pour chaque unité expérimentale les deux paramètres de la croissance algale estimés à partir du modèle de Delignette-Muller). Ceci a été fait grâce à l'utilisation de la macro Excel REGTOX (Vindimian, 2003). La méthode utilisée est adaptée à partir de l'algorithme de Levenberg-Marquardt et permet également de calculer les $EC_{x\%}$. Les intervalles de confiance sur les paramètres sont estimés par des simulations non paramétriques de type « bootstrap ».

2.3.5. Microscopie Electronique à Transmission (MET) et Spectrométrie par Dispersion en Energie (EDS)

Le principe de la microscopie électronique est de remplacer le faisceau lumineux (photons) du microscope optique par un faisceau convergent d'électrons. Cette technique permet de visualiser des structures avec une résolution bien meilleure que dans le cas de la microscopie optique traditionnelle. De plus, l'interaction électrons/matière peut être mise à partie pour réaliser des analyses chimiques locales non destructives de la zone observée, par couplage du microscope avec une sonde EDS (Energy Dispersive Spectrometry). On parle alors de microscopie électronique analytique (Pottu-Boumendil, 1989; Floriani, 2001).

Au sommet de la colonne, un canon émet par effet thermo-ionique des électrons sans trajectoire préférentielle. Ces électrons sont ensuite soumis à une différence de potentiel (haute tension), et concentrés par des condenseurs successifs pour constituer un faisceau électronique convergent sur l'échantillon (cf. Figure 2.5). Plus la haute tension est élevée, plus le faisceau d'électrons peut être fin et cohérent, et meilleure est la résolution. Toute la colonne du microscope est sous un vide poussé (10^{-8} Torr) afin d'éviter la déviation des électrons par les molécules gazeuses. En traversant l'échantillon à analyser, les électrons incidents sont soit arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis, comme schématisé sur la figure 2.6.

Les électrons arrêtés se traduisent à l'observation au Microscope Electronique à Transmission par des zones sombres, tandis que les électrons transmis correspondent à des zones claires (cf. Figure 1.4 ou Figure 2.7).

Le microscope qui a été utilisé est le microscope Tecnai 12 G₂ Biotwin (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), avec une tension d'accélération maximale de 120 kV, une résolution de 0,2 nm, et un grossissement possible de 300 000 x. Le logiciel dont nous nous sommes servis pour effectuer des analyses morphométriques est le programme NIH image.

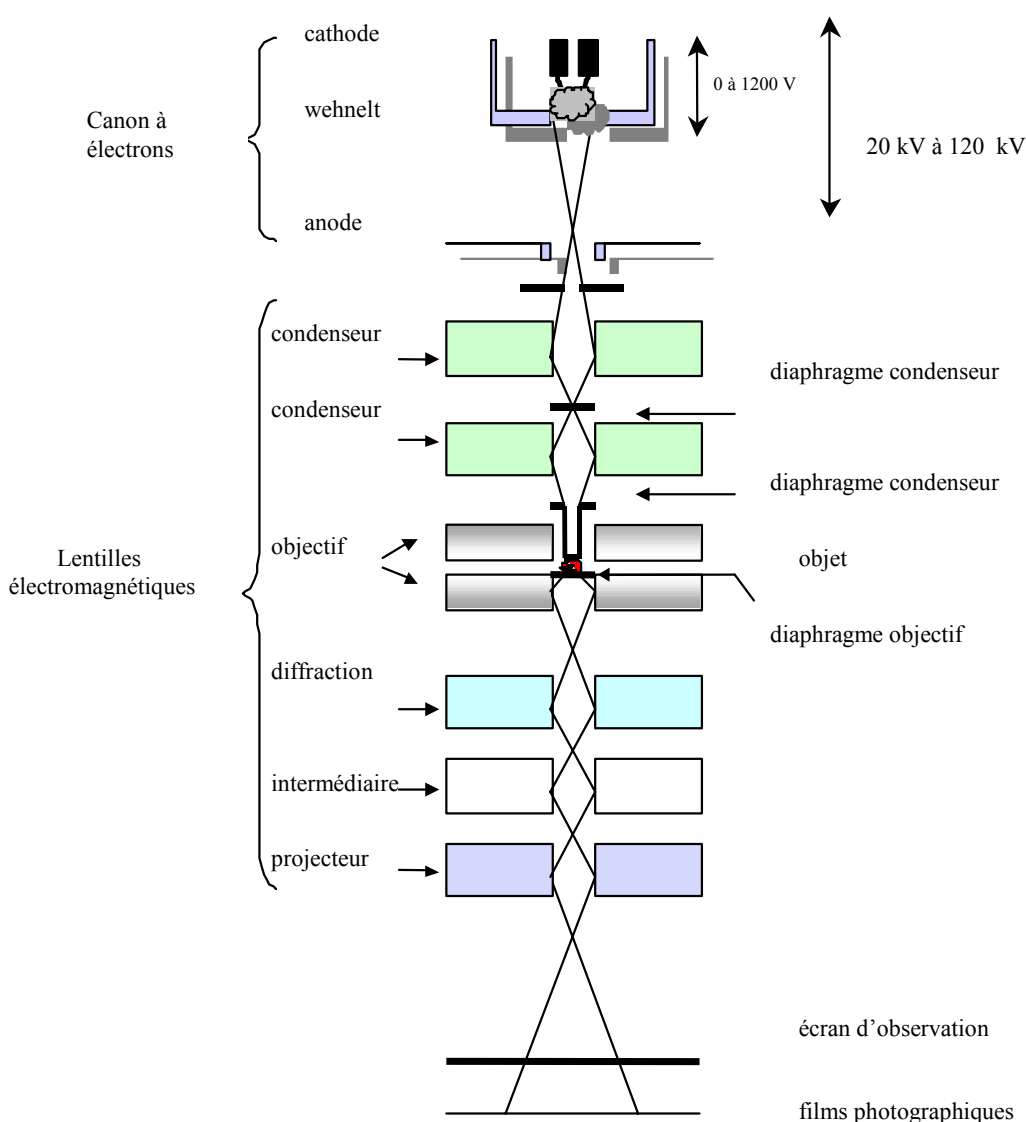


Figure.2.5 Schéma simplifié d'un microscope électronique à transmission (d'après Pottu-Boumendil, 1989).

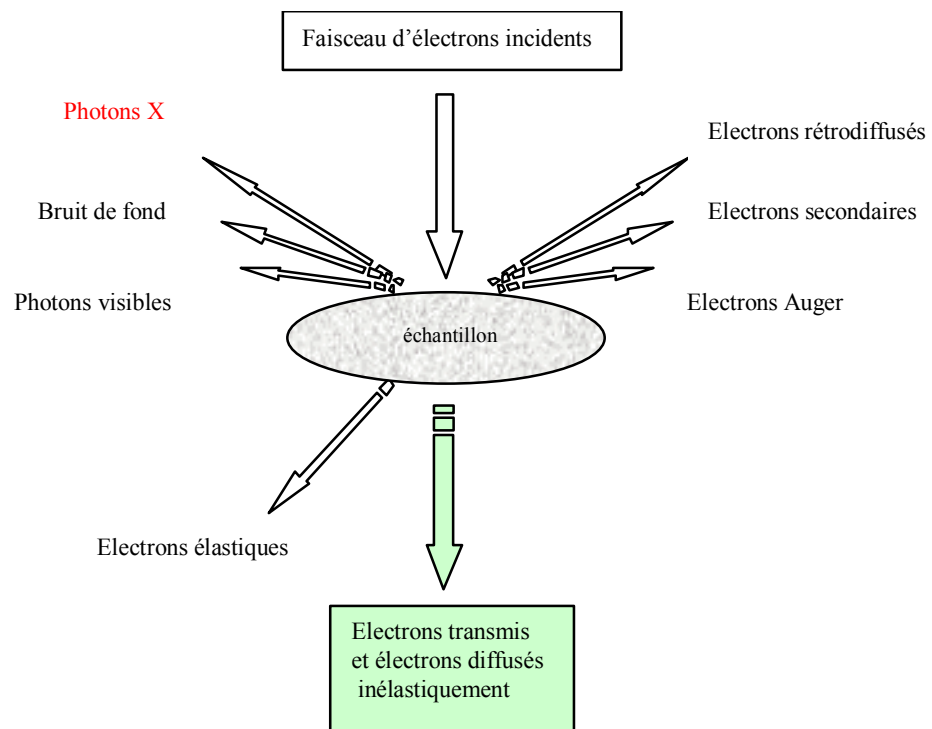


Figure 2.6 Signaux générés par le passage du faisceau d'électrons à travers l'échantillon.

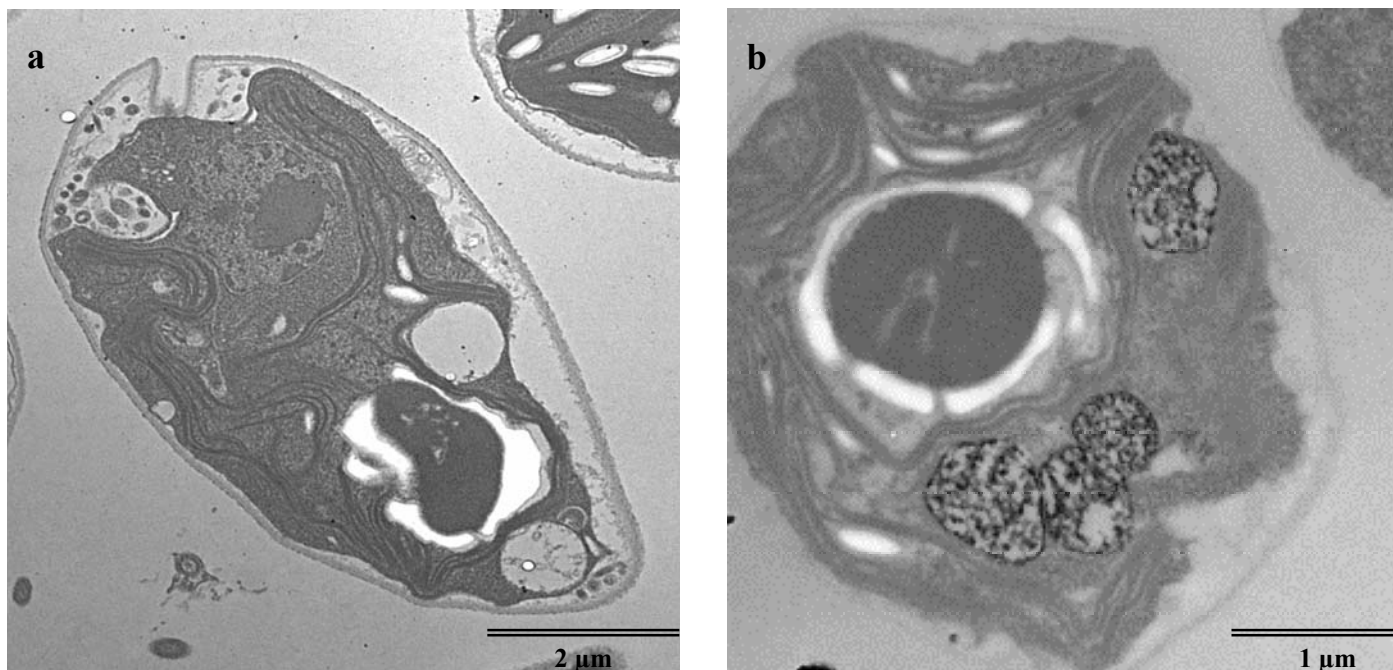


Figure 2.7 Exemple d'images obtenues au Microscope Electronique à Transmission. a. algue contrôle b. algue exposée au sélénium ayant formé des granules (cf chapitre 3.2).

Suite à l'excitation des atomes présents dans le matériau par interaction avec les électrons incidents, des photons X sont émis (processus de désexcitation). L'analyse par EDS consiste en une détection de ces photons par un détecteur solide, dans notre cas une diode Si-Li. L'énergie des photons X étant caractéristique des atomes dont ils sont issus, cette technique permet de réaliser une analyse élémentaire. La zone analysée est celle qui est parcourue par le faisceau d'électrons primaires, d'un diamètre variant entre 20 et 50 nm. On obtient ainsi le spectre d'une zone ou d'un point sélectionné. Ceci nous a en particulier permis de localiser des structures contenant du sélénium. L'appareil couplé au microscope était un détecteur EDS, équipé d'une fenêtre super ultra fine (SUTW, modèle SAPPHIR).

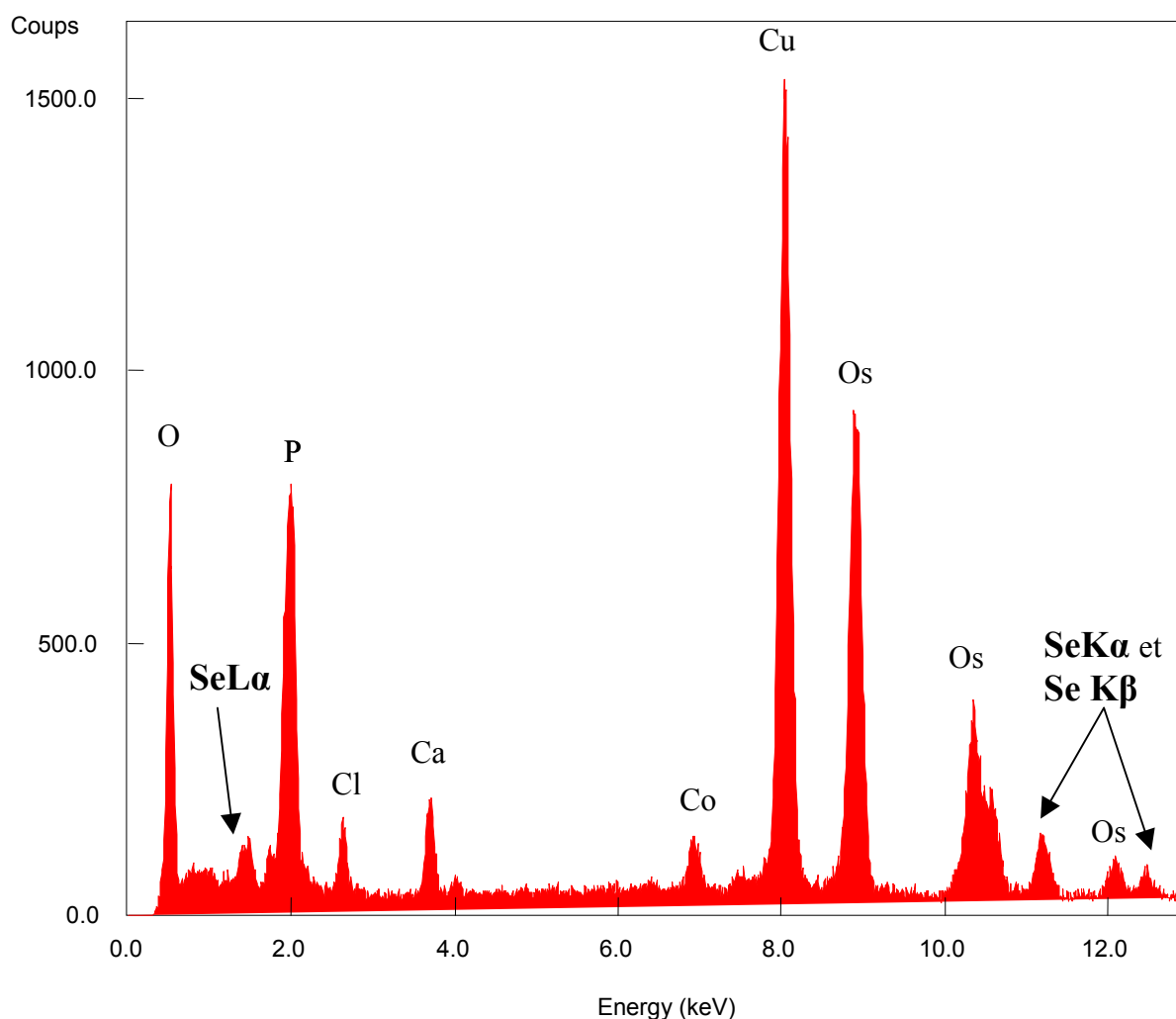


Figure 2.8 Exemple de spectre obtenu par EDS. La zone analysée est localisée sur un granule observé à l'intérieur d'une cellule algale (cf Figure 2.7), après exposition au sélénite à 500 μ M pendant 96 h. Tension d'accélération : 100 keV. Temps d'acquisition : 24 s.

Les contraintes de la technique (colonne sous vide, transmission du faisceau) ont imposé des étapes de préparation des échantillons spécialisées. Tous les produits chimiques nécessaires ont été obtenus auprès de Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, USA). Les culots d'algues récupérés à l'issue du protocole expérimental (cf chapitre 2.3.1) ont subi plusieurs étapes de préparation pour aboutir à des coupes fines (<500 nm) ou ultra-fines (< 140 nm) :

- La fixation chimique : Son but est de conserver, sans modification, les structures correspondant à l'état vivant. Elle bloque les systèmes enzymatiques et lie les molécules organiques de façon à les rendre insolubles, permettant ainsi la déshydratation ultérieure. La fixation du culot algal a été faite immédiatement après la centrifugation avec du glutaraldéhyde à 4% dans du tampon cacodylate à pH 7,4, pendant une durée de deux jours, à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées par trois resuspensions de 5 minutes dans le même tampon. Afin de conserver le maximum d'algues possible pendant les bains suivants, les cellules ont été incluses dans un culot d'agar inerte. A ce stade, les échantillons destinés à l'observation au MET ont été osmiés par trempage (d'une durée de 1 heure) dans de l'osmium tétroxyde (à 1% dans du tampon cacodylate à pH 7,4) afin d'augmenter le contraste.
- La déshydratation : Cette étape permet de préparer l'inclusion des échantillons biologiques dans des résines non hydrosolubles. Elle a été réalisée à l'aide de bains successifs d'alcool éthylique : 2 * 5 min de trempage dans de l'éthanol à 50%, 2 * 5 min de trempage dans de l'éthanol à 70%, 2 * 5 min de trempage dans de l'éthanol à 95% et enfin 2 * 30 min de trempage dans de l'éthanol à 100 %.
- L'inclusion dans des supports résine : Les milieux d'inclusion sont des mélanges de résines fluides qui durcissent après polymérisation à 60°C. Après un trempage de 2 * 30 min dans de l'oxyde de propylène qui a permis d'éliminer l'alcool non miscible, les échantillons ont été inclus dans de l'Epon 812. Ces résines sont suffisamment dures pour permettre des coupes ultra-fines et sont non hydrosolubles afin d'assurer la stabilité de la coupe sous le faisceau d'électrons.
- L'ultramicrotomie : Les coupes ont été réalisées avec un ultramicrotome (LEICA) équipé de couteaux de diamant pour obtenir des coupes ultra-fines.

Pour les observations au MET, des coupes de 110 nm ont été réalisées, déposées sur des grilles de cuivre et colorées à l'acétate d'uranyl. Pour les analyses X, les coupes réalisées étaient de 500 nm; elles ont été déposées sur des grilles de cuivre au préalable recouvertes d'un film formvar/carbone et elles n'ont pas été colorées afin d'éviter les pics d'uranium dans le spectre qui auraient pu masquer les autres pics.

3. RESULTATS

3.1. Prise en charge du sélénite chez *Chlamydomonas reinhardtii*

3.1.1. Introduction

Les mécanismes de prise en charge du sélénite chez les organismes vivants, et en particulier chez les organismes phytoplanctoniques, sont peu connus (cf. chapitre 1.2.3.3). Dans ces conditions, il est difficile d'estimer la contribution de la biomasse algale au cycle biogéochimique de l'élément ainsi que les conditions physico-chimiques susceptibles de l'influencer. Le premier but des recherches présentées dans ce chapitre est d'acquérir des connaissances relatives au transport du sélénite chez *Chlamydomonas reinhardtii*, pour des conditions physico-chimiques proches de celles rencontrées dans les eaux de surface oxiques. Le second but est de tester sur le sélénite des propriétés générales pouvant être attendues comme caractérisant le transport membranaire d'oxyanions. Cet aspect est en effet relativement peu étudié, malgré la potentielle écotoxicité des éléments anioniques (Mo, V, Cr, As, Tc, Se) (Simkiss et Taylor, 1995).

Sur la base des différents phénomènes susceptibles d'intervenir lors du transport d'un métal/métalloïde - et particulièrement lors du transfert d'un oxyanion - à travers une membrane biologique (cf. chapitre 1.2.3.2), les aspects de la prise en charge que nous avons abordés sont les suivants :

1. Distinction entre fraction adsorbée à la surface cellulaire et fraction absorbée dans le milieu intra-cellulaire :

Pour de nombreux métaux, l'adsorption représente une fraction significative de l'élément associé à l'organisme. La quantité adsorbée participe dans une moindre mesure à la toxicité sur l'organisme et elle a peu de chance d'être biotransformée. Le devenir et l'impact de cette fraction diffèrent donc de ceux de la fraction internalisée. De plus, afin d'étudier le transport à travers la membrane plasmique, la fraction présente dans le milieu intracellulaire doit être quantifiée. Enfin, d'après la théorie du BLM (Biotic Ligand Model), l'adsorption est un préalable à toute réponse biologique. Il est donc particulièrement important d'être capable de distinguer les deux fractions.

Peu d'études s'attachent à faire cette distinction. Concernant le sélénite, les travaux réalisés par Riedel (1991) indiquent que la fixation est principalement une sorption abiotique (i.e. ne faisant intervenir aucun processus biologique). Cependant, dans le cas d'oxyanions, on

pourrait plutôt s'attendre à ce que la charge nette négative de la surface biologique, qui a tendance à repousser les anions, limite l'adsorption.

2. Dépendance de l'accumulation vis-à-vis du temps :

L'adsorption est généralement un phénomène rapide, alors que l'absorption est beaucoup plus lente. Sur de courtes échelles de temps, on s'attend à ce que la quantité d'élément adsorbée atteigne rapidement un plateau, tandis que l'absorption croît de façon linéaire avec le temps. La pente de la droite permet d'estimer le flux d'internalisation. Une dépendance linéaire de l'accumulation du sélénite avec le temps a déjà été montrée chez l'algue marine unicellulaire *Cricosphaera elongata* (Boisson *et al.*, 1995).

3. Dépendance de l'accumulation vis-à-vis de la concentration en solution :

Cette étude a pour but de rechercher une éventuelle saturation du (ou des) système(s) de transport mis en œuvre. Si la prise en charge est assurée par des transporteurs membranaires, ils sont saturés à partir d'une certaine concentration. Un transport qui ne sature pas est donc au contraire généralement considéré comme un transport passif. Dans le cas où un phénomène de saturation de type Michaelien est mis en évidence, les vitesses maximales d'absorption et les constantes de demi-saturation peuvent être estimées, traduisant l'affinité et le nombre des transporteurs impliqués.

De façon surprenante, la plupart des études sur le sujet suggèrent une dépendance linéaire de l'accumulation avec la concentration ambiante (Riedel *et al.*, 1991; Boisson *et al.*, 1995; Riedel et Sanders, 1996). Seule une étude de Baines et Fisher sur 14 espèces d'algues marines (2001) semble indiquer un flux d'internalisation supérieur à très faibles concentrations.

4. Dépendance de l'accumulation vis-à-vis des concentrations en nutriments :

En tant qu'oxyanion, le sélénite est susceptible d'entrer en compétition pour les sites de transport avec SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- et HCO_3^- , d'autant plus que les transporteurs de macronutriments anioniques sont connus pour être peu spécifiques. Ces nutriments ont ainsi potentiellement une influence sur la prise en charge de l'élément, et peuvent avoir d'importantes conséquences sur son cycle biogéochimique. Cet aspect est d'autant plus important d'un point de vue environnemental que l'on se trouve dans un contexte d'eutrophisation croissante des hydrosystèmes, *via* les apports anthropiques (engrais, rejets urbains et industriels).

Des antagonismes entre sélénite et phosphate ont été montrés à plusieurs reprises (Riedel et Sanders, 1996; Wang et Dei, 2001b; Yu et Wang, 2004a; Yu et Wang, 2004b). Par contre, bien que l'analogie chimique entre sélénium et soufre soit admise, nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude montrant une inhibition directe de l'accumulation du sélénite par le sulfate. Certaines études décrivent même une absence d'inhibition (Lortie *et al.*, 1992; Riedel et Sanders, 1996). Dans le cas du nitrate, des études contradictoires montrent une stimulation (Wang et Dei, 2001a), une inhibition (Yu et Wang, 2004a; Yu et Wang, 2004b) ou une absence d'effet (Riedel et Sanders, 1996).

5. Dépendance de l'accumulation vis-à-vis du pH :

Le pH est un facteur physico-chimique clé, qui peut largement influencer l'accumulation et la toxicité des éléments. Il induit des effets directs et indirects sur plusieurs facteurs : spéciation chimique de l'élément, efficacité des transporteurs, physiologie des organismes. Concernant ce dernier aspect, le pH peut en particulier modifier la charge de surface et le potentiel membranaire : la présence d'ions hydronium à faible pH a alors tendance à diminuer la répulsion des oxyanions, conduisant à une accumulation plus importante. Une étude de Riedel (1996) montre une accumulation accrue à faible pH, mais les auteurs attribuent plutôt ceci à un effet de la spéciation, avec une disponibilité plus importante de l'espèce HSeO_3^- par rapport à l'espèce SeO_3^{2-} .

3.1.2. Article 1 : "Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*"

Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Hélène Morlon[†], Claude Fortin[‡], Christelle Adam[†], Jacqueline Garnier-Laplace[†].

[†] Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, cedex, France.

[‡] INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9.

Tel : +33-4-42-25-37-33

Fax : +33-4-42-25-64-44

e-mail: jacqueline.garnier-laplace@irsn.fr

Abstract

We examined the influence of time, ambient concentration and medium composition on selenite uptake by the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Cells were exposed to selenite labelled with Se^{75} in well known simple inorganic media. After a short exposure period (<1 hour), quantities of adsorbed and absorbed selenite were measured using β liquid scintillation. The aims of the performed experiments were: (i) to describe the kinetics of accumulation (ii) to characterise transport capacities (iii) to identify key nutrients influencing absorption (iv) to establish links between speciation and bioavailability.

Our results suggested that the adsorbed fraction was negligible compared to the absorbed one. On the short time scale considered, the absorption was linear with time, with an estimated flux of about $0.2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{nM}^{-1}$. The uptake was proportional to ambient levels in a broad range of intermediate concentrations (from nM to μM). However, fluxes were higher at low concentrations (< nM), and then decreased with increasing concentrations (> μM). These results suggest that a specific but rapidly saturated transport could be used at low concentrations, doubled by a non specific one that would only saturate at high ambient concentrations ($\sim\text{mM}$). The latter could involve transporters used by anionic macronutrients, which is supported by the fact that increasing sulphate and nitrate concentrations induced significant inhibition of selenite uptake. At end, $\text{Se}(+\text{IV})$ speciation changes with pH did not induce significant effect on bioavailability.

Keywords : oxyanions - selenium - phytoplankton - transport - inhibition

INTRODUCTION

Selenium is an essential micro-nutrient, characterised by a very narrow nutritional concentration range before becoming toxic. Among other roles, it is required for optimal growth of many plants and algae, including *Chlamydomonas reinhardtii* [1]. In this unicellular green alga, a glutathione peroxidase (GSH-Px) containing a selenocysteine residue at the active site is induced by selenite and acts against oxidative stress, inhibiting the damage caused by hydroperoxides [1, 2]. Selenium is released into freshwaters primarily as inorganic forms (selenite Se(+IV) and selenate Se(+VI)) from both natural and anthropogenic sources and is distributed unevenly in the environment. Its typical concentration in unpolluted freshwaters is ~nM. It can become highly toxic to aquatic life, inducing severe environmental consequences [3]. Selenium pollution is now considered as a global environmental issue [4]. Based on the literature for algae [5-7], and on our own experiments [8, 9], it is not expected that direct effects of selenium on the phytoplankton biomass occur in the environment, as growth inhibition appears at high dissolved Se(+IV) concentrations (~ μ M). However, algae can accumulate, transform and transfer a large amount of selenium [6, 7]. Recent field studies have shown that processes that control inorganic selenium uptake at the base of the food web determine how selenium affects aquatic ecosystems [10]. It is known that dietary proteinaceous forms of selenium are more available and more toxic to higher organisms than waterborne inorganic ones [3, 11, 12]. Hence, it is believed the poisoning of the upper trophic levels in selenium contaminated systems is due to the bioconcentration of selenium by primary producers and the subsequent biomagnification of the toxic organic forms up the aquatic food chain [4]. Selenium uptake in algal cells is thus critical in its transfer and effects in aquatic ecosystems. The more relevant oxidation states of inorganic Se within the natural oxic freshwater pH-Eh domain are selenite (Se(+IV)) and selenate (Se(+VI)); the dominance of one or the other form is explained by the initial form released in the environment, pH, Eh, and the redox reaction kinetics. It is however believed that selenium contents in organisms and its toxicity are principally linked to the concentration of selenite in water, since this form is scavenged from water and transformed in organo-selenium to a greater extent than selenate [13]. In particular, both selenite and selenate are accumulated by algae, but Se(+IV) has been shown to be accumulated more readily into phytoplankton than Se(+VI) [6, 11, 14, 15], particularly at the low ambient concentrations of selenium normally found in the environment (~nM) [13]. We thus focused our investigations on selenite uptake. One of the selenium particularities is to form oxyanions in oxic environments. While many studies concern the biological uptake and toxicity of metals characterised by a tendency to form cationic species, few deal with the uptake of those mainly forming oxyanions [16].

The latter are yet often very mobile, bioavailable and potentially toxic. Little is known about general properties concerning their transfer through biological membranes but they are expected to be very different from those generally known for cations. First, the adsorption on the cell wall is expected to be lower for anions than for cations because negatively charged groups at the cell surface tend to attract cations, while anions are repulsed - negatively charged groups mainly are amino and carbonyl groups from structural protein and carboxyl and sulfate groups from polysaccharide-. This repulsion is expected to be lower in waters with low pH values because the presence of hydronium ions reduces the potential at the biological surface, facilitating adsorption. The Cl⁻ channels are generally permeable to several other anions, but expectedly not those the size of oxyanions. Sulphate, phosphate, nitrate and carbonate are transported through other poorly selective carriers. Because of their similarity in chemical nature, membrane transport of contaminants forming oxyanions (molybdenum, vanadium, chromium, arsenic, antimony, selenium) may involve those anionic transport systems [16]. Hence, nutrients in solution could directly affect oxyanions accumulation through competition for same assimilation pathways [17]. The widespread eutrophication can thus have consequences both on the phytoplankton biomass and on its accumulation of trace metals, hence modifying the pool of contaminant taken up by the phytoplankton compartment. There is clearly a need to study trace metal-macronutrient interactions, which may have substantial implications for our understanding of trace element biogeochemical cycling in freshwater systems [18, 19]. Many researches on various cationic contaminants led to the conclusion that the total aqueous concentration of a metal is not a good predictor of its bioavailability. Uptake generally greatly depends on speciation, that itself depends on physicochemical parameters [20, 21]. A strong research effort has thus been made in the past decades to predict the speciation of cationic metals and to establish links between speciation and availability to aquatic organisms; predictive models such as the Free Ion Activity Model or the Biotic Ligand Model have been derived. However, there are few studies concerning the link between speciation of an anionic contaminant and its bioavailability, and to our knowledge, such models have not yet been tested for anions.

Keeping in mind the environmental interest of predicting selenite fluxes in freshwater ecosystems depending on physicochemical characteristics of the medium, and using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as a test organism, we studied the dependence of selenite accumulation (both adsorption and absorption) on time, ambient concentration, different nutrient concentrations and pH. Links between selenite speciation and bioavailability as well as possible mechanisms for the transport of selenite were also investigated.

MATERIAL AND METHODS

Algal cultures and experimental protocol

Chlamydomonas reinhardtii cultures were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP; Cumbria, United Kingdom; culture 11/32B). Maintenance and experimental culturing were carried out axenically in a modified high salt medium with an ionic strength of $\sim 20 \text{ meq.L}^{-1}$ (Table 1) under constant illumination at $100 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of photosynthetically available radiation, with an ambient temperature of $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, and with rotary agitation ($\sim 120 \text{ rpm}$). Cells in end-exponential growth phase were inoculated in the culture media, by addition of the volume needed to obtain an initial density of $2,500 \text{ cells.mL}^{-1}$. They were collected 48 hours later (which corresponds to the end of their exponential growth phase) by filtration on a $2\text{-}\mu\text{m}$ polycarbonate filter membrane (Poretics, Minnetonka, MN, USA). They were rinsed five times with 5 ml of selenium-free exposure medium (see below) and re-suspended in 3 ml of the same medium. They were then transferred to polycarbonate Erlenmeyer flasks containing 200 ml of exposure medium for a short period of time ($\leq 60 \text{ min}$) to fixed levels of the radioisotope ^{75}Se (as Se(+IV) , H_2SeO_3 , in $\text{HCl } 0.01\text{M}$, Riso, Denmark), obtained by addition of the volume of the stock solution needed. 1ml of solution was taken in each medium prior to exposure to check for selenium concentration. The exposure medium consisted of a simplified culture medium without trace metals and for whose pH and composition in sulphate, phosphate, nitrate and carbonate were manipulated depending on the experiment. We used short time scale experiments to minimize the effects of efflux and the influence of algae on the exposure medium through nutrient consumption, exudates release, For the same reasons, experiments were conducted with low cell densities.

Cell density and average cell diameter were measured in each medium using a Coulter Z2 particle counter (Beckman Coulter, Roissy, France). Cell density was usually about $100,000 \text{ cell.mL}^{-1}$ and cell diameter oscillated between 4.5 and $5 \mu\text{m}$. Variations in cell size and biomass were negligible on the short exposure period used. After exposure, cells were collected by filtration on two superimposed $2\text{-}\mu\text{m}$ filter membranes (the role of the lower membrane is to estimate the quantity of selenite adsorbed on membrane filters). Half of the exposed cells were rinsed (five times with 5 ml of selenium-free exposure medium) to eliminate selenite adsorbed on the cell membrane thus representing the intracellular or absorbed fraction; the other half were not rinsed thus representing both adsorbed and absorbed Se. The adsorbed fraction was estimated by difference in selenium content between rinsed and non-rinsed cells.

Table 1 Nominal concentrations of the components of the algal culture media (modified high salt medium adapted from Harris), and of the simplified media used for the exposure experiments and to rinse the harvested cells.

Components (M)	Culture medium (M)	
	Algal	Simplified
NH ₄	9.36 10 ⁻³	9.36 10 ⁻³
Cl	13.5 10 ⁻³	13.5 10 ⁻³
K	1.22 10 ⁻³	1.22 10 ⁻³
PO ₄	0.14 10 ⁻³	variable
C _{inorg}	~ 50 10 ⁻⁶ (pCO ₂ = 3.5 10 ⁻⁴ atm)	variable
NO ₃	2.92 10 ⁻³	variable
SO ₄	81.2 10 ⁻⁶	variable
Mg	1.04 10 ⁻³	1.04 10 ⁻³
Ca	2.00 10 ⁻³	2.00 10 ⁻³
Na	0.10 10 ⁻³	0.10 10 ⁻³
BO ₃	3.01 10 ⁻⁶	—
Mn	2.09 10 ⁻⁶	—
EDTA	8.06 10 ⁻⁷	—
Fe	5.92 10 ⁻⁷	—
MoO ₄	3.00 10 ⁻⁸	—
Zn	2.43 10 ⁻⁸	—
Co	1.09 10 ⁻⁸	—
Cu	7.04 10 ⁻¹¹	—

Harvested cells were acid-digested at room temperature for at least 12 hours in 1 ml of concentrated (65%) HNO₃ in borosilicate scintillation vials. Samples were then slowly evaporated to dryness on a sand bed. The mineralised residues were re-dissolved with 1ml of 1% v/v HNO₃ and 19 ml of scintillation cocktail were added (Instagel®, Packard Instrument, Rungis, France). ⁷⁵Se activities were measured by β-liquid scintillation counting (Quantulus 1220, Wallac Oy, Turku, Finland; detection limit: ~40 mBq). The activity of the lower membrane was subtracted from the activity of the upper one to account for selenite adsorption on filter membranes.

All experiments were performed without any pH buffers. A minimum of three replicates by condition was used. Uptake results were normalised for the total algal surface area (the surface area of a single cell in exponential phase is about 70 μm²). The STATISTICA 6.1 software package was used to perform all statistical analyses (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Speciation modeling

Selenite speciation in the exposure solutions was calculated with the J-Chess speciation program. The thermodynamic data were based on a compilation by Denison [23] mainly from the databases from the OCDE-NEA [24], NIST [25] and IUPAC [26], but also from a number of other published values. The used database was completed with selenium values critically selected from the literature. The selenium formation and solubility product constants used, given at zero ionic strength and 25°C involved:

Aqueous species: (i) HSeO₃⁻, with log K = 8.1 (mean of 4 values [25-27]); (ii) H₂SeO₃, with log K = 10.71 (mean of 4 values [25-27]); (iii) CaSeO₃, with log K = 3.17 [28]; (iv) K₂SeO₃, with log K = 0.28 [27]; (v) MgSeO₃, with log K = 2.87 [28]; (vi) Na₂SeO₃, with log K = 0.02 [27]; and (vii) NaHSeO₃, with log K = 8.1 [27].

Solid species: (i) CaSeO₃.H₂O, with log K_{sp} = 7.76 [29]; (ii) CaSeO₃.2H₂O, with log K_{sp} = 5.44 [27]; (iii) K₂SeO₃, with log K_{sp} = 1.48 [30]; (iv) MgSeO₃, with log K_{sp} = 7.15 (mean of 3 values [28-30]); (v) MgSeO₃.6H₂O, with log K_{sp} = 5.36 [25]; (vi) Na₂SeO₃, with log K_{sp} = 3.51 [30]; (vii) Na₂SeO₃.5H₂O, with log K_{sp} = -1.9 [25].

All calculations were constrained to a fixed input pH for each exposure medium at equilibrium with the atmosphere (pCO₂=3.5x10⁻⁴ atm).

Characterisation of transport

Our first series of experiments consisted in the study of the dependency of both adsorption and absorption on time and ambient selenite concentration. As a starting point we wanted

to estimate the uptake rate in conditions where it was expected to be the highest. As it had been previously reported that selenium absorption could be inhibited by sulphate [5, 15, 31] or phosphate [15, 17-19, 32], we decided to carry out the exposures in absence of those macronutrients. The exposure medium used in the following experiments thus consisted in a simplified culture medium without sulphate nor phosphate and without trace metals. The corresponding medium ionic strength was $\sim 19.4 \text{ meq.L}^{-1}$, thus similar to the ionic strength of the complete culture medium ($\sim 20 \text{ meq.L}^{-1}$). It was not significantly affected by the addition of ^{75}Se stock solutions. Experiments were performed at a pH of 7.

Uptake kinetics

The objective of this first experiment was to determine selenite adsorption levels and initial absorption kinetics. Adsorption is usually a rapid phenomenon whereas absorption is much slower. Hence, on a short time scale, it is expected that adsorption reaches a rapid steady state whereas absorption increases linearly with time.

Algae were exposed in the exposure medium described earlier to a total Se concentration of 50 nM, which is close to the current waterborne USEPA national criterion for selenium ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$). Selenium adsorption and absorption were measured after 0, 15, 30, 45 and 60 min of exposure. Results were normalised for the measured selenium ambient concentration and the slope of the linear regression between absorption and time was used to give an estimation (with a confidence interval) of the initial inner flux (expressed in $\text{nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Concentration dependency of selenite uptake

In a steady-state approach and saturable uptake of a given trace element, membrane transport of an ion I is commonly described by the classical Michaelis-Menten enzymatic model. The uptake flux, ϕ (expressed in $\text{nmol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$), is given by the equation $\phi = \frac{V_m[I]}{K_m + [I]}$ where $[I]$ (M) is the concentration of the ion in solution, V_m ($\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$) is the maximum uptake rate and K_m (M) is the half-saturation constant (concentration of the ion in solution at which the uptake rate is half the maximum uptake rate) [21]. Three different ranges of Se(+IV) were investigated: a range covering very low levels (0.5 to 50 nM), a range covering low levels (0.5 nM to 2.5 μM), and a range covering high levels (50 nM to 5.5 mM). A fixed exposure time of 60 min was used. Fluxes were calculated at each concentration and log-transformed to achieve homogeneity of variance. At end, an analysis of variance completed by lowest significant difference (LSD) post-hoc comparisons was performed to test for significant differences between fluxes at different contamination levels.

Uptake inhibition by macronutrients

As an oxyanion, selenite could potentially compete for transport sites with sulphate, phosphate, nitrate or carbonate, and the nutritional status of the medium could thus directly influence its assimilation by the cells. We hence tested the inhibition of selenite uptake with increasing concentrations of those different hypothetical competitors in solution. Ionic strength was not maintained constant as potential counter ions could have an effect on transport. Addition of nitrate salts increased medium ionic strength notably (more than 3.5-fold). This increase was however reasonable for the sulphate, phosphate and carbonate experiments (maximum increase in ionic strength of <17%, <4% and <13% respectively). The range of ionic strength is given for each experiment. Possible effects induced are discussed further. Nutrient concentrations in the culture medium were not changed. Total selenite concentration was 50 nM and cells were exposed for 60 min at a pH of 7. Non parametric Kruskal-Wallis rank sum tests were performed to test for significant effect of increasing concentrations of macronutrients.

Inhibition by sulphate, phosphate and nitrate

To test the possible competition of selenite with sulphate, cells were exposed in a simplified culture medium without phosphate nor trace metals to increasing concentrations of SO_4^{2-} (0.08, 0.8, 8, 80 and 800 μM), obtained by addition of the volume of stock solutions needed. This experiment was performed once with SO_4^{2-} added as K_2SO_4 and once with SO_4^{2-} added as Na_2SO_4 . The ionic strength varied from ~ 19.4 to ~ 22.6 meq.L^{-1} .

To test the possible competition of selenite with phosphate, cells were exposed in a simplified culture medium without sulphate nor trace metals to increasing concentrations of PO_4^{3-} (0, 1.37, 13.7, 54.8 and 137 μM) added as a mixture of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 (molar ratio $\sim 2/5$ and $3/5$ respectively). The ionic strength varied from ~ 19.4 to ~ 20.15 meq.L^{-1} .

Finally, to test the possible competition of selenite with nitrate, cells were exposed in a simplified culture medium without sulphate, phosphate nor trace metals to increasing concentrations of NO_3^- (0, 0.030, 0.300, 3.0, 10 and 30 mM), added as a mixture of KNO_3 and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (molar ratio $\sim 1/2$ and $1/2$ respectively). The ionic strength varied from ~ 15.5 to ~ 55.5 meq.L^{-1} .

Inhibition by carbonate

At equilibrium with the atmosphere ($p\text{CO}_2 = 3.5 \cdot 10^{-4}$ atm), the concentration of carbonate ions in an aqueous medium is pH-dependant. To test the effect of increasing concentrations

of carbonate with a fixed pH, we thus had to work in a closed system at different $p\text{CO}_2$ values. The solutions were prepared by adding appropriate volumes of standard solutions of NaOH and NaHCO_3 to the Erlenmeyer flasks just before the exposure of algae and then rapidly sealing them to prevent CO_2 outgassing. The final solutions were designed to have the desired pH and total carbonate concentrations in equilibrium with the gas volume of the sealed tubes without the need for additional pH buffers. The exposure medium was a simplified culture medium without sulphate, phosphate nor trace metals but increasing HCO_3^- concentrations of 50, 250, 500, 1000, 2500 and 5000 μM , corresponding to expected $p\text{CO}_2$ values 1, 5, 10, 20, 50 and $100\times$ the normal atmospheric $p\text{CO}_2$ respectively. The ionic strength varied from ~ 19.4 to ~ 21.92 meq.L^{-1} . The pH and DIC were measured in each medium immediately before and after the exposure to control the effectiveness of our approach.

Links between selenite speciation and transport: effects of pH

The objectives of this experiment were both to predict the influence of an environmentally fundamental parameter (pH) on selenite uptake, and to investigate the relationship between the speciation of selenite and its bioavailability. Using J-Chess geochemical speciation modeling, we estimated the theoretical influence of pH on the distribution of the different species of selenite in our exposure medium. As pH had a strong influence on the speciation of selenite, we used this parameter to investigate links between speciation and uptake. We exposed cells in a simplified culture medium without sulphate, phosphate nor trace metals to increasing pH of 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, adjusted either with HNO_3 or KOH. Total selenite concentration was 50 nM and cells were exposed for 60 min. pH was measured both at the beginning and at the end of the experiment. As we did not find any effect of carbonate on selenite uptake (result of the experiment concerning inhibition by carbonate), we did not control nor measured carbonate concentrations in our media. Non parametric Kruskal-Wallis rank sum test was performed to test for significant effect of increasing pH.

Total selenite concentration was 50 nM and cells were exposed for 60 min.

RESULTS AND DISCUSSION

In all experiments, total selenite uptake was not significantly different from intracellular uptake, indicating that the adsorbed fraction was negligible compared to the absorbed one. Thus, only results concerning intracellular uptake are presented.

In the literature, contrasting results on the importance of selenium adsorption to the cell surface can be found. The use of live and dead cells has previously given opposite trends [13, 14]. Based on the fact that specific metabolic inhibitors had little effect on accumulation, Boisson et al. (1995) proposed that adsorption represented an important fraction of fixed selenium while other authors found evidence for the domination of a biologically mediated uptake [33]. We have no explanation for these apparently conflicting results. Our own observations are coherent with the general tenet that negatively charged functional groups at the cell surface are more likely to repulse oxyanions than to attract them, thus limiting adsorption. Moreover, in our experiment, the adsorbed fraction is directly measured while observations from other authors are indirect considerations

Uptake kinetics

Results showed a linear intracellular selenite uptake over the 60-min exposure period (Figure 1). The corresponding estimated flux of absorption, given by an estimation of the slope of the linear regression, was $0.19 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nM}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ with a 95% confidence interval ranging between 0.13 and $0.26 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nM}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. The intercept of the linear regression was not significantly different from zero ($p>0.5$), suggesting the absence of residual surface bound selenite. The inner flux we found ($\sim 0.19 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nM}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) is coherent with the flux estimated by Riedel for the same alga ($\sim 0.27 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nM}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). This value is close to fluxes measured in similar experimental conditions for chloride ($0.33 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nM}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; [22]), and about two order of magnitude higher than the flux we found for pertechnetate, another oxyanion (results not shown). Due to the negative membrane potential, the transport of anions into the cell is unlikely to occur by simple passive diffusion down the electrochemical gradient through ionic channels as can be the case for cations. For instance, anions such as phosphate and sulphate are co-transported into the cell by a sodium symport mechanism. More generally, transport of anions is rather ensured by active anion/proton symport mechanisms or anion/anion antiport mechanisms that are energetically costly. The measured flux of selenite may be explained by the existence of a specific transport system for selenite. As selenium has been demonstrated to be essential to many plants and algae including *Chlamydomonas* [1], Se specific transporters could thus

exist. Another explanation could be the “accidental” transport of selenite through non-specific transporters by ion mimicry.

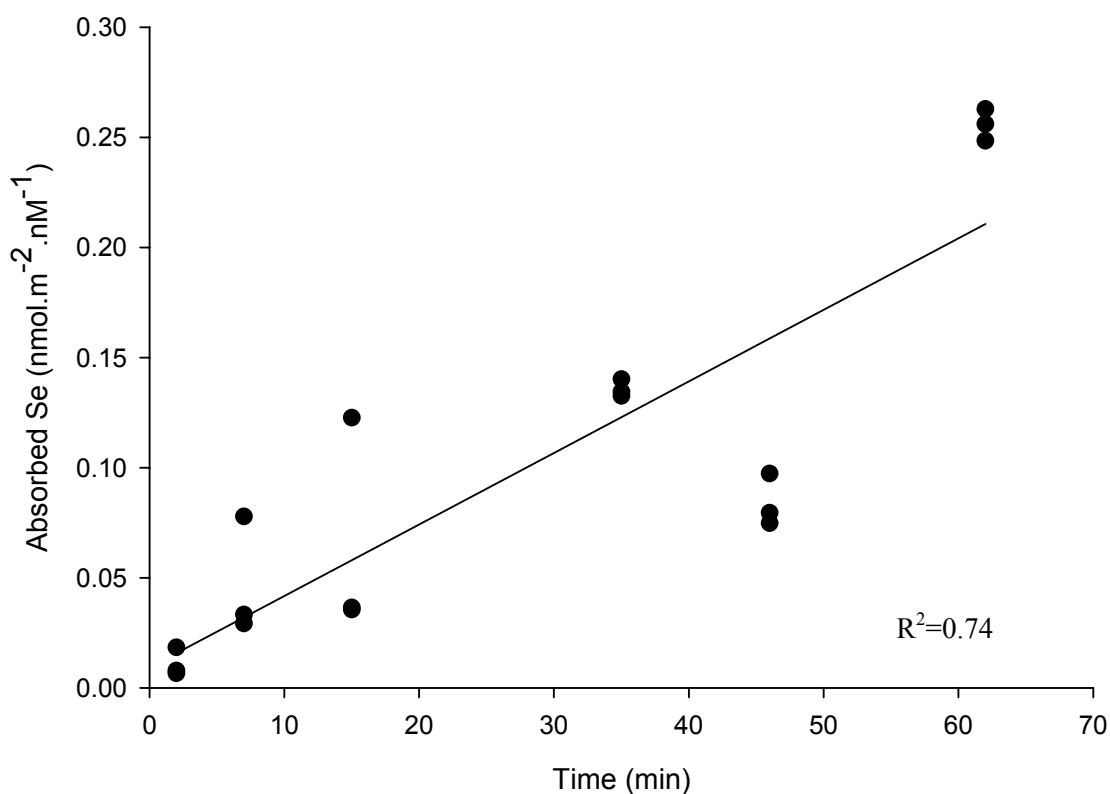


Figure 1. Time-course of selenium uptake at a constant Se(+IV) concentration (50 nM) without sulphate nor phosphate (pH 7). Three replicates per sampling time were used.

The measured fluxes varied from one experiment to the other without affecting uptake trends. For instance, the estimated flux was about 4 fold higher in the experiment on the influence of carbonates (Fig 6 (B)) and in the second experiment on the influence of pH (Fig 7 (C)) than in other experiments, in which the flux was about 0.2 nmol.m⁻².nM⁻¹.h⁻¹. This has already been observed before and may be explained by an intergenerational variability [22].

Concentration dependency of selenite uptake

Transport of selenite was characterised through three successive experiments (Fig. 2 and 3). For low selenite ambient concentrations up to measured 2.4 μM, results showed a linear intracellular uptake, with no saturation pattern (Figure 2 (A)). The corresponding estimated flux (slope of the linear regression between uptake and measured ambient concentration) was 0.18 nmol.m⁻².nM⁻¹.h⁻¹, with a 95% confidence interval ranging between 0.15 and 0.22 nmol.m⁻².nM⁻¹.h⁻¹, which is in agreement with the flux estimated in the uptake

kinetics experiment. Fluxes calculated for each exposure concentration are reported in Table 2 (A). Results of the analysis of variance showed no difference between fluxes in the measured 6.0 nM – 2.4 μ M range (ANOVA; LSD post-hoc test; $p > 0.05$). The flux observed at the lowest concentration (0.5 nM) was significantly higher than all other fluxes (~ one order of magnitude; ANOVA; LSD post-hoc test; $p < 0.0005$), suggesting that a saturation of transport could occur at very low concentrations.

In a second experiment using concentrations ranging from 60 nM to 5.3 mM, absorption saturated in the micromolar range (Figure 2 (B)) and thus fluxes decreased significantly with increasing selenite concentrations (Table 2 (B)). Results of the analysis of variance showed significant differences for each treatment against one another (ANOVA; LSD post-hoc test; $p < 0.0005$), except for the 500 nM treatment against the 60 nM treatment ($p > 0.05$). The fit of a Michaelis-Menten curve to concentration-uptake data (Figure 2 (B)) ($R^2 = 0.84$, $p < 0.0001$) allowed the estimation of Michaelis-Menten constants. The maximum uptake rate V_m was computed to be $55.6 \pm 6.9 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$; data were however too scarce and variable to give an accurate estimation of the K_m value ($500 \pm 240 \mu\text{M}$). Speciation modelling indicates that our experimental medium becomes slightly oversaturated with Ca and Mg selenite mineral phases at the highest concentration tested (measured 5.3 mM total selenite). However, even if the thermodynamic equilibrium is reached, which is equivocal considering the expected slow kinetics of mineral formation, the calculated remaining dissolved concentration of selenite is about 3 mM.

Finally, in an attempt to characterise selenite transport at very low concentrations, from 0.5 to 50 nM, we found that selenite fluxes decreased rapidly with increasing selenite concentrations and then stabilized around a value of $0.2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure 3), which supports our previous observation at 0.5 nM selenite (Table 2A) suggesting the presence of few very high-affinity transporters that become rapidly saturated at subnanomolar concentrations. The flux was significantly higher at 0.5 nM than at any other concentration (Figure 3; ANOVA; post-hoc LSD test; $p < 0.005$).

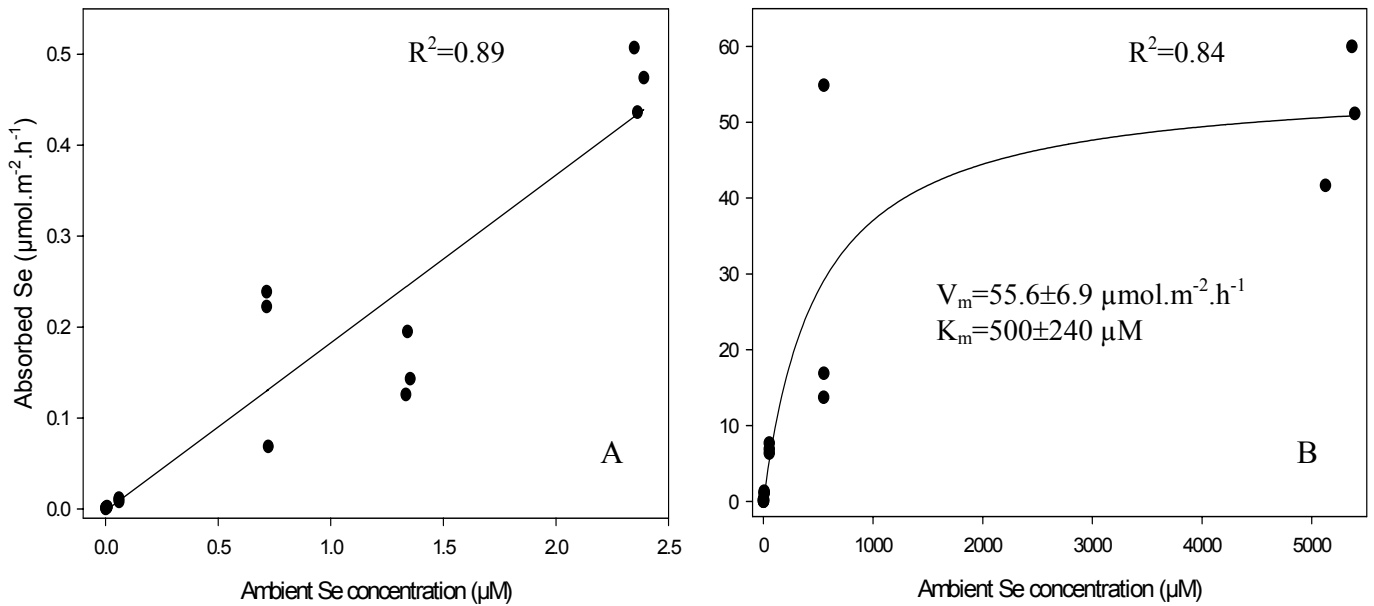


Figure 2. Concentration dependence of selenium uptake after one hour of exposure without sulphate nor phosphate (pH 7). (A) Low Se(+IV) concentrations (B) High Se(+IV) concentrations. Three replicates per concentration were used.

Table 2 Measured ambient selenite concentrations and corresponding calculated inner fluxes (mean \pm 1SE, n=3). Cells were exposed for one hour in a medium without sulphate or phosphate (pH 7). Three replicates per concentration were used.

Low level		High level	
Exposure concentration	Flux (nmol.m ⁻² .nM ⁻¹ .h ⁻¹)	Exposure concentration	Flux (nmol.m ⁻² .nM ⁻¹ .h ⁻¹)
0.5 nM \pm 0.01	2 \pm 0.6	60 nM \pm 0.05	0.43 \pm 0.007
6 nM \pm 0.02	0.3 \pm 0.03	500 nM \pm 3	0.48 \pm 0.04
60 nM \pm 0.4	0.17 \pm 0.02	5 μ M \pm 0.02	0.22 \pm 0.01
700 nM \pm 2	0.25 \pm 0.08	50 μ M \pm 0.2	0.13 \pm 0.007
1.3 μ M \pm 0.006	0.11 \pm 0.01	550 μ M \pm 0.2	0.05 \pm 0.02
2.4 μ M \pm 0.01	0.2 \pm 0.009	5.3 mM \pm 0.08	0.01 \pm 0.001

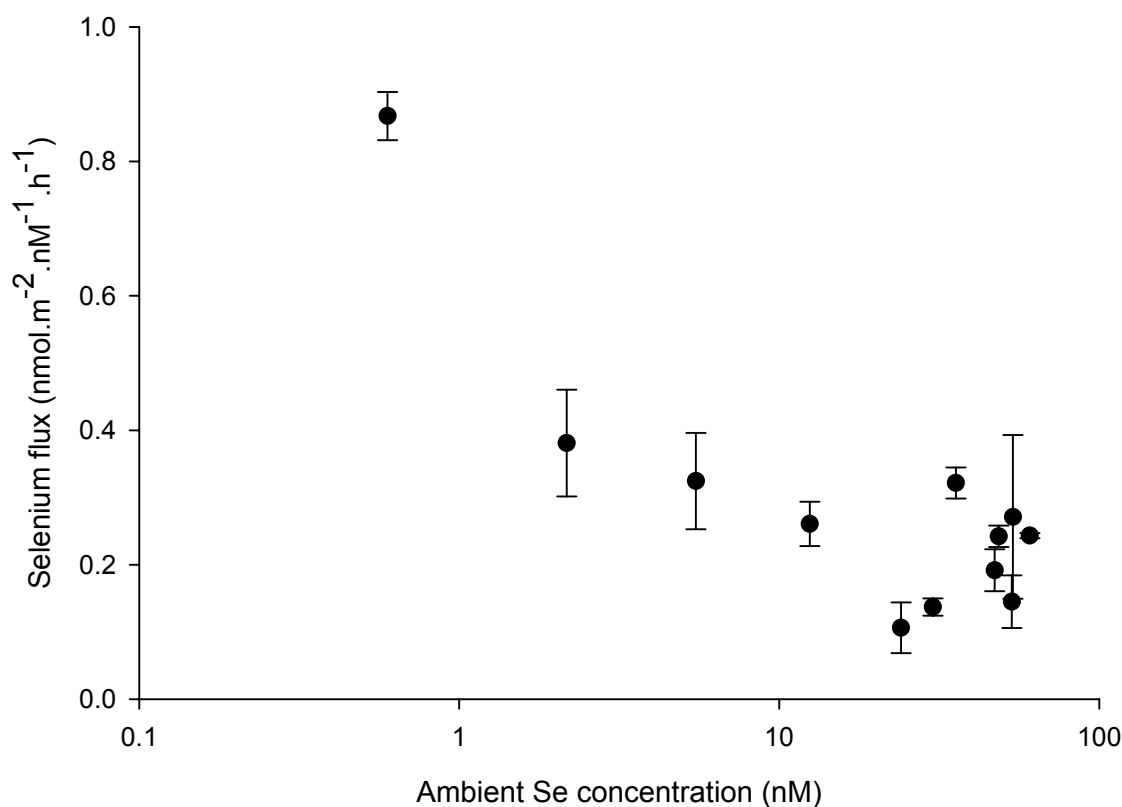


Figure 3. Selenium fluxes estimated for a one hour exposure period to very low Se(+IV) concentrations (pH 7) without sulphate nor phosphate. Error bars represent standard deviations from the average of three measurements.

Many studies relating selenite uptake to selenite concentration have suggested a linear relationship over a given concentration range [14, 22, 53]. Our results suggest that absorption follows two successive Michaelis-Menten kinetics, one with low constants and one with high constants, so that the relation appears linear in a broad range of intermediate concentrations, including ranges used by Boisson et al. (1995) and Riedel et al. (1996).

Based on these results, we suggest that selenite transport is biphasic, i.e. transported by two different mechanisms depending on ambient levels:

i) The higher fluxes found at very low concentrations suggest the presence of a high affinity transport system at low selenite levels that would saturate very rapidly, suggesting that the transporters involved are scarce. The saturation of a high affinity transport system at low concentrations (~nM) is supported by previous results from Baines and Fisher [33] who showed a great variation of cellular Se concentration between 0.01 and 0.1 nM of added selenite and stabilisation above 0.15 nM in 13 of the 14 coastal and estuarine algal species tested. Given the essentiality of selenium for *Chlamydomonas reinhardtii*, the existence of a specific constitutive Se transport system would not be surprising.

ii) At higher concentrations (> 1 nM), selenite uptake is linear up to μ M selenite levels. Increasing further ambient Se concentrations showed that this second mechanism also saturates, strongly suggesting a mediated (facilitated) ion transport. However, concentrations needed to saturate these ion transporters are high (\sim mM), with high K_m and V_m values, suggesting an uptake through numerous and non specific transporters. Previous experiments have shown that Se becomes toxic at such high concentrations [8, 9], modifying algal metabolism and thus probably also uptake rates; however, such toxic effects might not appear in short term experiments where only initial uptake rates are measured.

To sum up, a high affinity transport system rapidly saturated may occur at very low selenite levels and an uptake through numerous, less-specific transporters operates when concentrations increase. These numerous and non-specific transporters could be those used by sulphate, phosphate, nitrate or carbonate. This would be consistent with the idea that contaminants forming oxyanions could be transported through the numerous and poorly selective channels used by those anionic macronutrients [16].

Selenite uptake inhibition by macronutrients

Selenite uptake was significantly inhibited by increasing concentrations of sulphate (whether sulphate is added as K_2SO_4 or Na_2SO_4 ; $p=0.014$ and $p=0.045$ respectively; Figures 5 A and B) and nitrate ($p=0.01$; Figure 6), while independent of phosphate and carbonate levels ($p>0.05$; Figure 4). Based on thermodynamic modelling, selenite speciation remained virtually constant throughout any of these experiments. Hence, effects observed are not expected to be influenced by Se(+IV) speciation changes.

Addition of sulphate, phosphate and carbonate salts increased medium ionic strength slightly, and addition of nitrate salts increased it notably. Among other, the variation of the ionic strength involves modification of the surface charge of the biological membrane. However, it is expected that increasing ionic strength tends to enhance anion uptake due to increased cation adsorption on the negatively charged membrane. The inhibitions observed are thus likely due to competition between selenite and the tested anions.

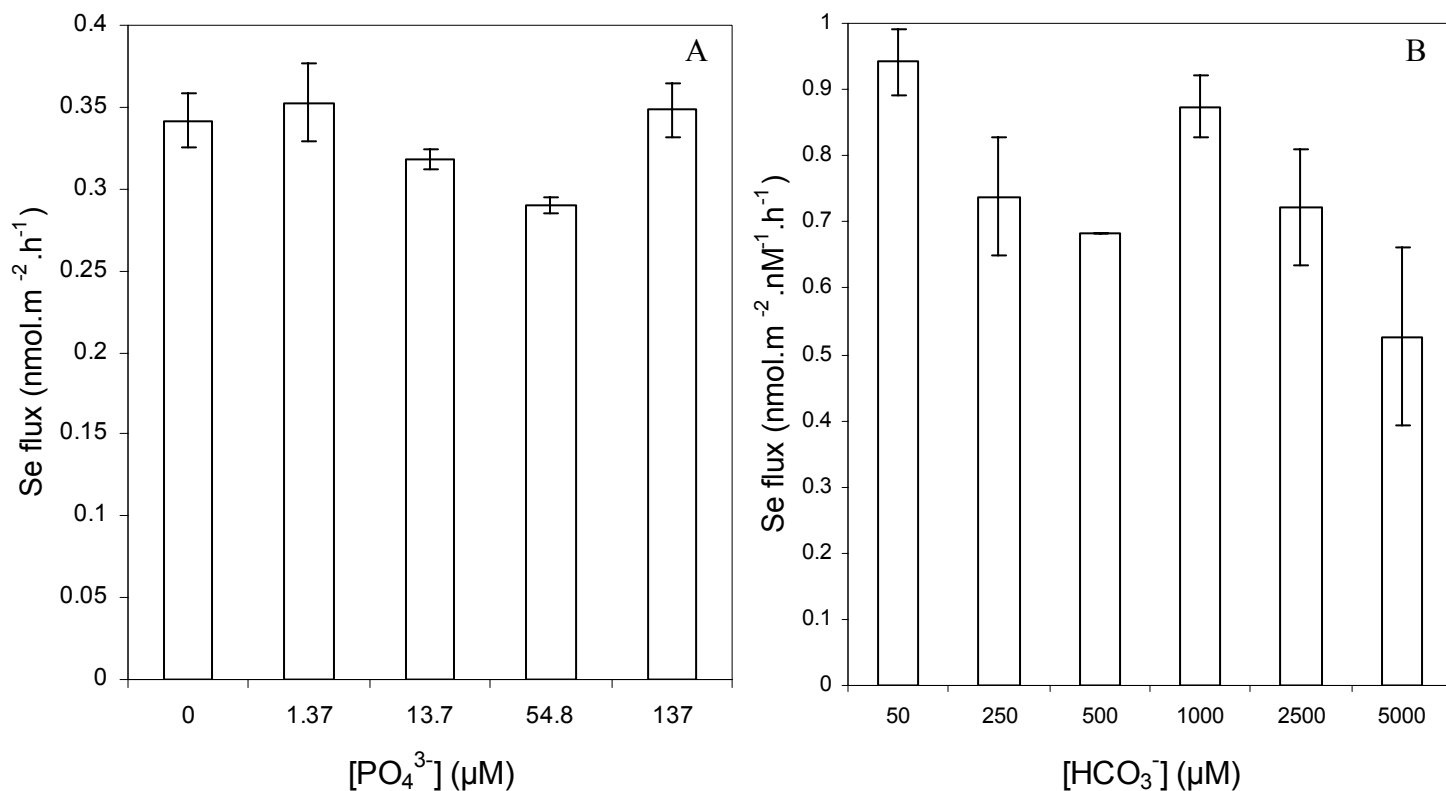


Figure 4. Selenium fluxes estimated for a one hour exposure period to a constant Se concentration (50 nM) (A) without sulphate but with increasing phosphate concentrations added as a mixture of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 (B) without sulphate and phosphate but with increasing carbonate concentrations added as NaHCO_3 in closed Erlenmeyer flasks (pH 7). Error bars represent standard deviations from the average of three measurements.

A number of complex interacting factors influence element accumulation by phytoplankton. Few studies have considered the influence of major nutrients on metal uptake; the nutritional status has effects on assimilatory pathways and can influence uptake through several mechanisms. Under nutrient limitation, weakened algae can be more sensitive to toxic metals [34]. The inhibition of cellular growth rate induced by metal deficiency can also lower the biodilution rate, thus increasing cellular metal concentration [21]. On the contrary, nutrient enrichment can increase metal uptake in correlation with an enhanced metabolism [32]. In the case of anionic contaminants, the effect of nutrients is even more complicated due to the possible direct competition for binding to membrane transport sites if carriers are shared [16]. Studies investigating the effect of carbonates on metal uptake are scarce, probably due to the experimental difficulty of maintaining a constant pH with varying carbonate concentrations and without using buffers. HCO_3^- and CO_3^{2-} were shown to inhibit TcO_4^- uptake by several cyanobacterial species, probably due to a competition for transport sites [35]. Such competition does not occur in the case of selenite. Similarly, an antagonism between selenite and phosphate was shown in several

freshwater algae including *Chlamydomonas reinhardtii* [15, 18, 19] and also in marine species [17]. The authors argued that Se might be transported as a P analog when ambient P concentrations are low. However, selenite absorption was not inhibited by increasing phosphate concentrations in our experiments. The difference observed could be linked to the shorter exposure period used and to the fact that our algae were not acclimated to a P-depleted medium. P-limited cells are usually quite sensitive to metals, phosphate depletion may influence metal exclusion [32]. These processes might occur on longer time-scales than ours, where only the initial transport rates are studied.

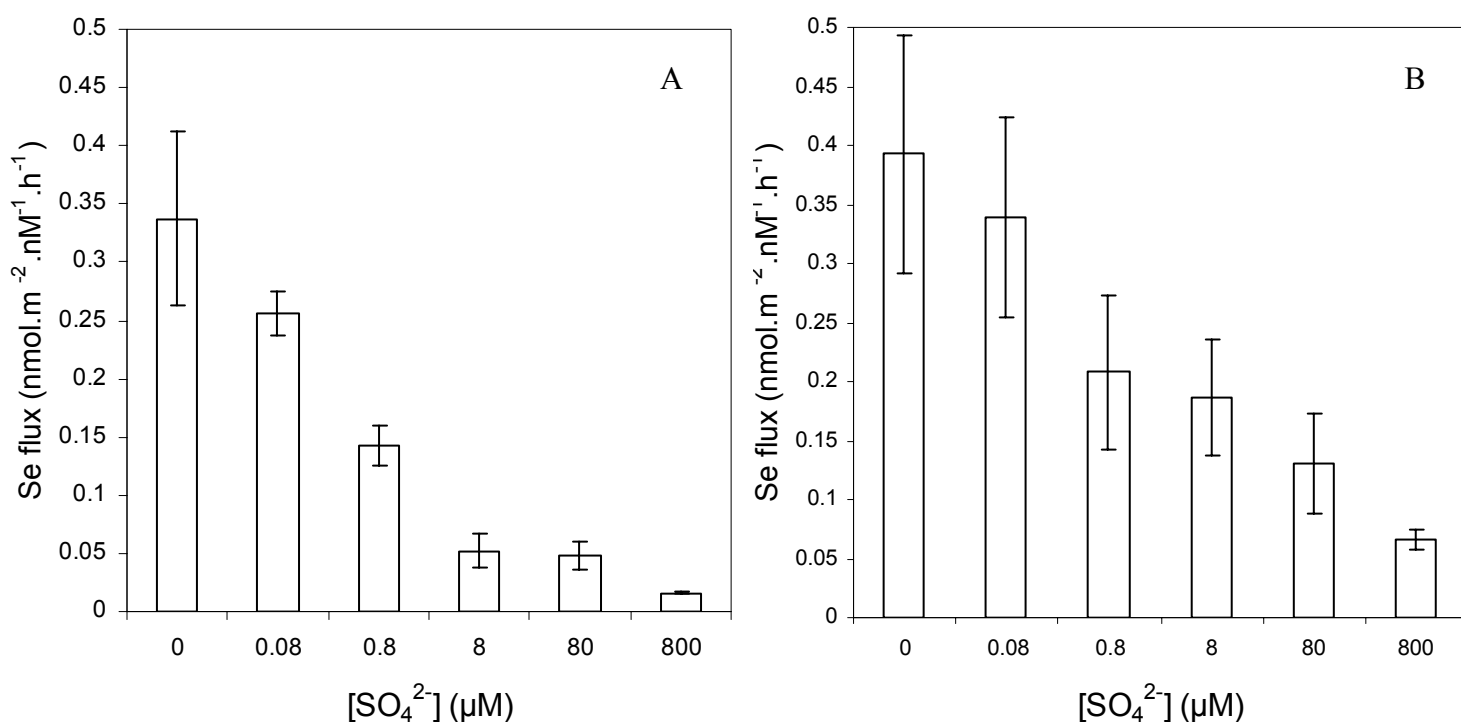


Figure 5. Selenium fluxes estimated for a one hour exposure period to a constant Se(+IV) concentration (50 nM) without phosphate but with increasing sulphate concentrations added either as K₂SO₄ (A) or Na₂SO₄ (B) (pH 7). Error bars represent standard deviations from the average of three measurements.

As group VIA elements, selenium and sulphur share many chemical properties. Selenium was shown to compete with sulphur for assimilation pathways in several organisms [5, 31, 36, 37] while Se-Cys is thought to be produced by the sulphate metabolism pathway [38]. Several studies on algae, bacteria or other organisms have shown an inhibition of selenate uptake by sulphate [15, 31, 36], and one study on bacteria has shown an inhibition of both selenate and selenite by sulphite [39]. To our knowledge, this is the first report of an effect of sulphate on selenite uptake in algae. Moreover, the inhibition occurs at sulphate concentrations in the range of those that can be found in the environment. The antagonism

between selenium and sulphur is usually attributed to the chemical similarity between the two elements. Given this similarity, the inhibition induced by sulphate is likely to be due to a direct competition for transport sites. The low affinity of selenite for the transporters involved is proved by the high K_m value (500 μM). Given the shape of the inhibition by sulphate (less than 2 fold decrease of selenite absorption for a 10 fold increase of sulphate concentrations), and the fact that sulphate only was not sufficient to completely inhibit selenite uptake (a constant influx of selenite - exposure concentration of 50 nM - was observed at sulphate concentrations above 800 μM), the affinity of sulphate for the transporters is not expected to be much higher than that of selenite. Sulphate has been shown to be transported via biphasic transporters: one of high affinity and the other of low affinity. Transporters shared by selenite and sulphate may be the low affinity transporters of sulphate.

A similar antagonism has been shown between sulphate and two other oxyanions: molybdate and chromate. This was related to uptake by the cells' sulphate transport system (Simkiss, 1995). Uptake of oxyanions via the low affinity transport system of sulphate could thus be a general phenomenon.

There are major differences between freshwater and marine algae in their metal accumulation in response to different nitrogen conditions, presumably linked to the fact that N is the limiting nutrient for marine phytoplankton whereas freshwater systems are generally limited by P. The interactions between metal uptake and N enrichment in freshwater green algae are still not clear. Studies dealing with the influence of nitrate on selenite uptake show either an inhibition [18], an enhancement [32], or an absence of effect [15, 17] on selenite accumulation with increasing nitrate concentrations. In our experiments, selenite was significantly inhibited by nitrate. However, concentrations needed to observe an inhibition were high ($\sim\text{mM}$) and thus not environmentally realistic. The inhibition could be either linked to a direct competition for transport sites or to an indirect effect on the activities of transporters. Uptake of the oxyanion pertechnetate *via* a nitrate transport has been shown [40] and uptake of oxyanions *via* the low affinity transport system of nitrate could be a general phenomenon. Further experiments would be necessary to understand which mechanism is responsible for inhibition of selenite transport by nitrate.

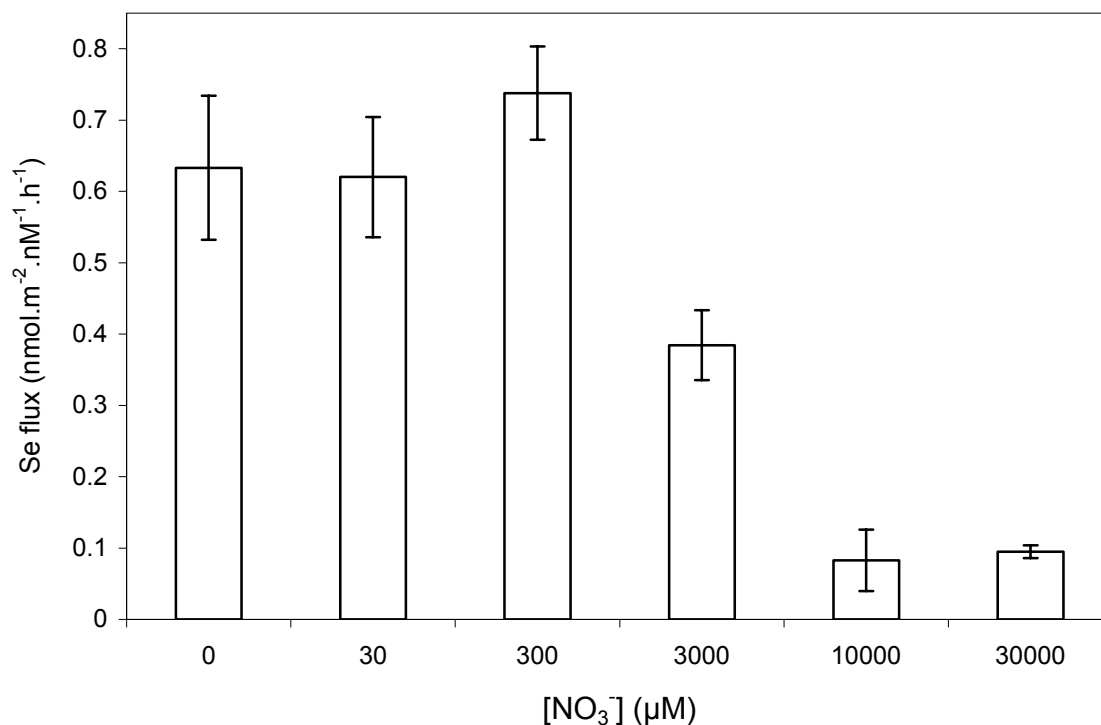


Figure 6. Selenium fluxes estimated for a one hour exposure period to a constant Se concentration (50 nM) in absence without sulphate nor phosphate but with increasing nitrate concentrations added as KNO₃ (pH 7). Error bars represent standard deviations from the average of three measurements.

Links between selenite speciation and transport: effects of pH

Results of expected Se speciation depending on pH are reported in Fig 7A. Major selenite species present in the exposure medium are HSeO₃⁻, SeO₃²⁻, CaSeO₃ and MgSeO₃. At low pH, HSeO₃⁻ is the dominant species but noteworthy concentrations of SeO₃²⁻, CaSeO₃ and MgSeO₃ appear with pH. Selenite uptake was significantly different (p<0.05) across the range of pH tested, but with no clear trend (Fig 7B). This experiment was repeated using pre-acclimated cells to the experimental pH and again varied significantly but with no apparent meaningful pattern (Fig 7C).

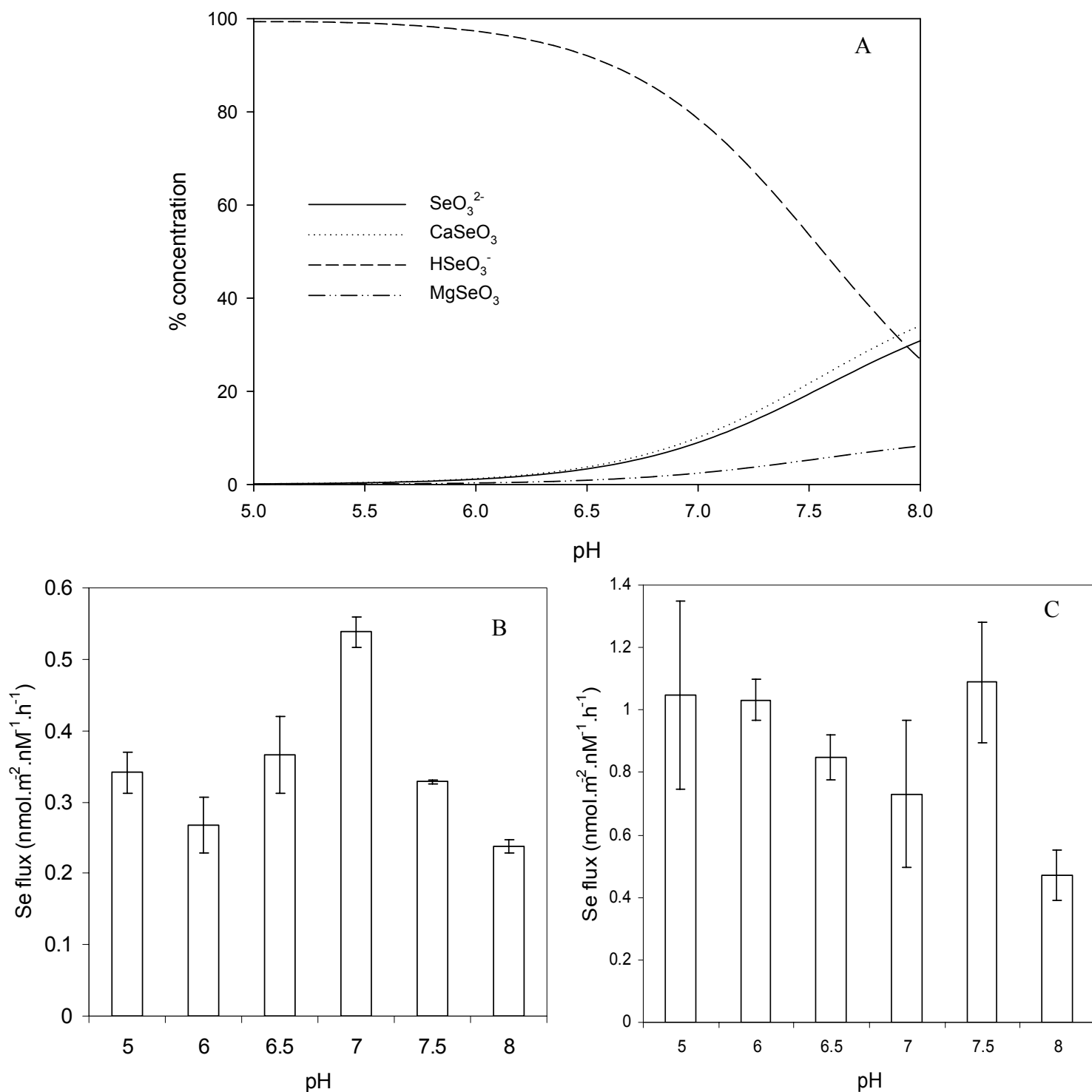


Figure 7. (A) Results of J-Chess geochemical modelling on the influence of pH on selenite speciation. Calculations performed using a total Se concentration of 50 nM and simplified culture medium without sulphate, phosphate nor trace metals. (B) Selenium fluxes estimated for a one hour exposure period to a constant Se concentration (50 nM) without sulphate nor phosphate and for pH ranging from 5 to 8. (C) Selenium fluxes estimated for a one hour exposure period to a constant Se concentration (50 nM) without sulphate nor phosphate and for pH ranging from 5 to 8. Algae were pre-exposed for one hour at the given pH in the exposure medium before Se(+IV) exposure. Error bars represent standard deviations from the average of three measurements.

It is well known that the pH of the medium can influence uptake of ions in several ways including the modification of: (i) the overall algal surface charge; (ii) the speciation of ions in solution; and (iii) the properties of membrane transport mechanisms. The pH also modifies carbonate concentrations in the medium but as we did not find any effect of carbonates on selenite uptake, we did not control nor measure carbonate concentrations in our exposure media. We expected greater uptake of selenite at low pHs as proton binding to the overall negative surface charge increased and as a consequence reduced anionic repulsion, but this was not evidenced.

Selenite speciation varies with increasing pH: concentrations of HSeO_3^- decrease while concentrations of SeO_3^{2-} , CaSeO_3 and MgSeO_3 increase. These monotonous variations did not translate into a clear increase or decrease of accumulation as could have been expected if accumulation was linked to a particular species. We could only find one previous study where the influence of pH on selenite accumulation was examined. It reported an increase of selenite uptake at low pH values (pH 5) [15]. The difference observed may be linked to the fact that the authors used longer exposure periods, higher ambient selenite concentrations and buffers to maintain a constant pH. Our results suggest that the effect of selenite speciation on its bioavailability is lower than other effects of pH on the physiology or metabolism of the alga. The little influence of selenite speciation on its bioavailability could be explained by the poor selectivity of the transporters used, that would not discriminate between the different species of selenite. Results could however be different at lower ambient selenite concentrations at which a specific transport may occur.

Conclusion and environmental implications

Based on our results and those available in the literature, it seems quite plausible that the transport of selenite involves two mechanisms. A high affinity but rapidly saturated transport system, that could be specific, may occur at low concentrations (<nM) and a non-specific one when concentrations increase. The latter would be ensured by the numerous and poorly selective channels used by anionic macronutrients, which is supported by the significant inhibition of selenite uptake by sulphate and nitrate, and the apparent little effect of speciation on bioavailability.

Hence, inhibition effects observed may vary greatly depending on the ambient selenite concentration at which experiments are performed. Fluxes are indeed higher at environmentally relevant levels of selenite (in the subnanomolar range), and uptake may be influenced by other parameters than those we studied. Moreover, the cycling of Se in realistic environmental conditions can be considerably complicated by the interaction with

major nutrients, more particularly sulphate. For example, large concentrations of sulphate usually encountered in mining effluents could mitigate the impact of selenium on phytoplankton. On the other hand, bioconcentration factors determined under laboratory conditions, that typically use high nutrient concentrations, may have underestimated accumulation and potential toxicity of Se to phytoplankton.

Acknowledgements

We thank L. Février for her thorough review of the Se thermodynamic data literature and useful help in geochemical modelling. We are grateful to M. Morello for his technical assistance on liquid scintillation measurements and to F.H. Denison and R. Gilbin for numerous discussions on the subject and useful help, especially in the design of the “carbonate” experiment. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

1. Novoselov, S.V., et al., *EMBO J.* **21**(14) (2002) 3681-3693.
2. Yokota, A., et al., *Plant Physiol.* **86** (1988) 649-651.
3. Fan, T.W.M., et al., *Aquat. Toxicol.* **57** (2002) 65-84.
4. Lemly, A.D., *Ecotox. Environ. Safe.* **59** (2004) 44-56.
5. Wheeler, A.E., et al., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **57** (1982) 181-194.
6. Kiffney, P. and A. Knight, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19** (1990) 488-494.
7. Boisson, F., et al., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28** (1995) 487-493.
8. Morlon, H., et al., *Aquat. Toxicol.* (accepted).
9. Morlon, H., et al., *Radioprotection* (submitted).
10. Stewart, A.R., et al., *Environ. Sci. Technol.* **38**(17) (2004) 4519-4526.
11. Besser, J.M., et al., *Environ. Toxicol. Chem.* **12** (1993) 57-72.
12. Zhang, G.H., et al., *Marine Environ. Res.* **30** (1990) 179-190.
13. Vandermeulen, J.H. and A. Foda, *Mar. Biol.* **98** (1988) 115-123.
14. Riedel, G.F., et al., *Water Air Soil Pollut. (57-58)* (1991) 23-30.
15. Riedel, G.F. and J.G. Sanders, *Environ. Toxicol. Chem.* **15**(9) (1996) 1577-1583.
16. Simkiss, K. and M.G. Taylor, *Transport of Metals Across Membranes*, in *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier and D.R. Turner, Editors. 1995, John Wiley & Sons: New York. p. 1-44.
17. Wang, W. and R.C.H. Dei, *Aquat. Toxicol.* **52** (2001b) 39-47.
18. Yu, R.Q. and W.X. Wang, *Environ. Pollut.* **129** (2004a) 443-456.
19. Yu, R.Q. and W.X. Wang, *Aquat. Microb. Ecol.* **35** (2004b) 163-173.

20. Campbell, G.C., *Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model.*, in *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier and D.R. Turner, Editors. 1995, John Wiley & Sons: New York. p. 45-102.
21. Sunda, W.G. and S.A. Huntsman, *Sci. Total Environ.* **219** (1998) 165-181.
22. Fortin, C. and P.G.C. Campbell, *Environ. Toxicol. Chem.* **19**(11) (2000) 2769-2778.
23. Denison, F., *Application of chemical speciation modelling to uranium toxicity and bioavailability studies: compilation of a coherent database for simple experimental systems and an investigation of the effect of database uncertainty on model predictions.* 2002, IRSN: St-Paul-lez-Durance.
24. OECD-NEA, *Survey of thermodynamic and kinetic databases.* 1996, Organisation for Economic Cooperation and Development, Nuclear Energy Authority.
25. Martell, A.E., et al., *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*, in *NIST Standard Reference Data.* 2001: Gaithersburg, M.D., U.S.A.
26. Pettit, D. and K. Powell, *IUPAC Stability constants database*, in *Academic Software and the Royal Society of Chemistry.* 2001.
27. Elrashidi, M.A., et al., *Soil Sci.* **144**(2) (1987) 141-152.
28. Seby, F., et al., *Chem. Geol.* **171** (2001) 173-194.
29. Sharmasarkar, S., et al., *Chem. Geol.* **132** (1996) 165-170.
30. Essington, M.E., *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52** (1988) 1574-1579.
31. Williams, M.J., et al., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27** (1994) 449-453.
32. Wang, W. and R.C.H. Dei, *Environ. Pollut.* (111) (2001a) 233-240.
33. Baines, S.B. and N.S. Fisher, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **213** (2001) 1-12.
34. Hall, J., et al., *Aquat. Toxicol.* **14**(1) (1989) 1-13.
35. Garnham, G.W., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (37) (1992) 679-684.
36. Ogle, R.S. and A.W. Knight, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **30** (1996) 274-279.
37. Wrench, J.J., *Mar. Biol.* **49** (1978) 231-236.
38. Pilon-Smits, E.A.H., et al., *Plant Physiol.* **119** (1999) 123-132.
39. Lortie, L., et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(12) (1992) 4042-4044.
40. Krijger, G.C., et al., *J. Env. Qual.* (29) (2000) 866-870.

3.1.3. Principales avancées et conclusion

Ces études expérimentales visaient à améliorer les connaissances relatives au transport du sélénite chez *Chlamydomonas reinhardtii* et à tester sur cet élément des propriétés qui pourraient être communes au transport membranaire d'oxyanions. Les avancées suivantes ont été obtenues :

1. Distinction entre fraction adsorbée à la surface cellulaire et fraction absorbée dans le milieu intra-cellulaire :

Nous avons trouvé une quantité de sélénite adsorbée à la surface cellulaire négligeable par rapport à la quantité absorbée dans le milieu intracellulaire. Ceci contredit les résultats de Riedel (1991), mais est en accord avec l'idée selon laquelle la charge nette négative de la surface cellulaire tend à repousser les anions.

2. Dépendance de l'accumulation vis à vis du temps :

Nous avons trouvé comme attendu une internalisation du sélénite dépendant linéairement du temps d'exposition. Le flux ainsi estimé est de $0,2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ce qui correspond à une internalisation rapide. En effet, ce flux est du même ordre de grandeur que le flux estimé dans des conditions similaires pour le Mn, le Cl et le Cd, et de deux ordres de grandeur supérieur au flux estimé pour le Tc. Cette prise en charge rapide pourrait être expliquée soit par l'intervention de transporteurs spécifiques, soit par l'intervention de transporteurs peu spécifiques mais nombreux.

3. Dépendance de l'accumulation vis à vis de la concentration en solution :

Nous avons trouvé une internalisation du sélénite dépendant linéairement de la concentration en solution, pour une large gamme de concentrations intermédiaires ($5 \text{ nM} \rightarrow 2,5 \text{ }\mu\text{M}$), comme cela a déjà été suggéré par de précédentes études (Riedel *et al.*, 1991; Boisson *et al.*, 1995; Riedel et Sanders, 1996). Cependant, nous avons également mis en évidence deux phénomènes de saturation aux concentrations extrêmes (très faibles ($< \text{nM}$) et très fortes ($> \mu\text{M}$) concentrations). Hormis l'étude de Baines et Fisher (2001) montrant un flux d'internalisation supérieur à très faibles concentrations, ces phénomènes n'avaient jamais été rapportés auparavant. Ceci suggère que deux transports distincts interviennent : (i) un transport de forte affinité, qui pourrait être un transport spécifique au sélénite et qui interviendrait pour de faibles concentrations dans le milieu extérieur ;

toutefois, ce transport serait très rapidement saturé (ii) un transport assuré par des transporteurs peu spécifiques mais nombreux, qui doublerait le premier transport à concentrations plus élevées. L'existence d'un double système de transport, de faible et de forte affinité, a été décrit pour le sulfate et le nitrate par exemple, mais n'a jamais été proposé pour le sélénite.

4. Dépendance de l'accumulation vis à vis des concentrations en nutriments :

Nous avons montré une inhibition de la prise en charge du sélénite par le sulfate. Ceci n'est pas surprenant étant donnée l'analogie chimique entre le sélénium et le soufre, mais n'avait jamais été mis en évidence auparavant. Nous avons également montré une inhibition de la prise en charge par le nitrate, mais pour des concentrations en nitrate élevées. Nous n'avons par contre pas trouvé d'inhibition par le phosphate, ce qui est plutôt en contradiction avec les données disponibles dans la littérature (Riedel et Sanders, 1996; Wang et Dei, 2001b; Yu et Wang, 2004a; Yu et Wang, 2004b). Nous n'avons pas non plus trouvé d'inhibition par le carbonate.

On sait par ailleurs que le sulfate et le nitrate sont internalisés *via* deux systèmes de transport : un de forte affinité et un de faible affinité. Il se pourrait donc que le sélénite emprunte au moins en partie les voies d'internalisation de faible affinité de ces nutriments. Un tel système a déjà été proposé pour une accumulation du technétium *via* le système de faible affinité du nitrate (Krijger *et al.*, 2000). Le sulfate seul ou le nitrate seul ne suffisent toutefois pas à inhiber totalement le transport, ce qui montre que le sélénite peut emprunter plusieurs voies de transport distinctes.

5. Dépendance de l'accumulation vis à vis du pH :

Malgré un effet important du pH sur la spéciation du sélénite, nous n'avons pas trouvé de tendance nette (diminution ou augmentation) de l'accumulation avec le pH. De même, nous n'avons pas trouvé d'effet significatif du pH sur l'inhibition de l'accumulation, ni par le sulfate ni par le nitrate. Il semble donc que la spéciation du sélénite ait peu d'effet sur sa prise en charge, ou du moins que les effets du pH sur la physiologie des algues soient plus importants que les effets liés à la spéciation. Ceci est cohérent avec l'idée selon laquelle les transporteurs impliqués sont peu spécifiques et ne font pas de distinction pas entre les différentes espèces de sélénite présentes dans le milieu.

Mentionnons néanmoins que l'accumulation vis à vis du pH présente plutôt un maximum pour des valeurs de pH intermédiaires (aux alentours de pH 7), ce qui fait penser aux courbes obtenues dans le cas d'efficacités enzymatiques. Il se pourrait donc que les

résultats obtenus s'expliquent par une efficacité accrue des transporteurs dans des pH avoisinant un pH neutre.

En résumé, ces expériences nous amènent à proposer que, selon la concentration ambiante du sélénium, deux systèmes de transport distincts interviennent lors du transport du sélénite : à faible concentration, il pourrait être pris en charge « rapidement » par des transporteurs de forte affinité mais peu nombreux ; ce transport, rapidement saturé, serait complété à plus fortes concentrations par des transporteurs de macro-nutriments peu spécifiques mais nombreux, dont les transporteurs de faible affinité du sulfate et du nitrate. La spéciation du sélénite aurait alors peu d'effet sur sa prise en charge.

Le sélénite est transféré dans le milieu intra-cellulaire avec des taux d'internalisation relativement importants. Une fois accumulé à l'intérieur de la cellule, il est susceptible d'interférer avec le métabolisme et de perturber le fonctionnement normal de l'algue. Il est donc potentiellement toxique, ce qui pourrait se traduire par des atteintes structurales et fonctionnelles. Ces atteintes sont analysées dans le chapitre suivant, *via* des mesures de croissance des populations algales et des études ultra-structurales.

3.2. Toxicité du sélénite chez *Chlamydomonas reinhardtii*

3.2.1. Introduction

La contribution du compartiment phytoplanctonique au cycle biogéochimique du sélénite dépend de la disponibilité de l'élément mais également de la biomasse algale. Cette dernière peut éventuellement être influencée par les effets toxiques de l'élément sur la croissance. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la capacité d'internalisation du sélénite était importante. Cependant, le sélénite n'est pas connu pour être hautement toxique à l'égard du phytoplancton. Il semble au contraire que les algues soient capables de stocker d'importantes quantités de sélénium avec peu d'effet sur leurs capacités de division et de croissance (Wheeler *et al.*, 1982; Price *et al.*, 1987; Kiffney et Knight, 1990; Boisson *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003). Ainsi, l'effet direct du sélénite sur la biomasse algale ne serait *a priori* pas un phénomène de toxicité susceptible d'être significatif à l'échelle des écosystèmes et il y a donc peu d'études à ce sujet. Nous avons trouvé un nombre très limité de publications établissant des relations dose-effet pour le sélénite chez le phytoplancton (cf. chapitre 1.2.4.3). Certains auteurs proposent que l'absence de toxicité, malgré une bioaccumulation prouvée, s'expliquerait par une adaptation de nature physiologique (Wrench, 1978; Bennet, 1988; Wong et Oliveira, 1991a). Elle pourrait éventuellement aussi s'expliquer par l'existence de structures de stockage ou de séquestration, comme c'est le cas pour de nombreux métaux chez le phytoplancton.

Le but des recherches menées dans ce chapitre est d'établir des relations dose-effet pour des paramètres de croissance, de rechercher des effets sur l'ultra-structure des cellules algales ainsi que d'éventuelles structures de stockage du sélénium dans le milieu intracellulaire. Les axes développés sont les suivants :

1. Etablir des relations dose-effet sur la croissance algale :

L'inhibition de croissance est généralement considérée comme un paramètre sensible, qui intègre les différents effets d'un polluant au niveau de la population. Les tests d'inhibition de croissance permettant d'estimer notamment des EC_{50} sont largement utilisés en écotoxicologie et ils sont normalisés. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'estimation classique d' EC_{50} pour le sélénite, avec les tests normalisés de croissance en « batch ». Bennet (1988) a déterminé une EC_{50} de 10 μ M pour des cultures en turbidostat chez *Chlorella pyrenoidosa*. Rappelons qu'il est d'autre part reconnu que la sensibilité des algues au sélénite dépend fortement de l'espèce considérée.

2. Analyser les atteintes au niveau sub-cellulaire, en observant les effets au niveau de l'ultrastructure algale :

Nous avons utilisé pour cela la Microscopie Electronique à Transmission (MET). La résolution obtenue grâce à cette technique permet une vision précise des structures sub-cellulaires, en particulier des chloroplastes, thylakoïdes, stroma, pyrénoides, vacuoles, noyaux et grains d'amidon. Nous avons trouvé sur le sujet une seule étude de Wong et Oliveira (1991b), qui montre sous l'effet du sélénite une réduction des chloroplastes et du pyrénoides et un éclaircissement du stroma, ainsi qu'une diminution de la production d'amidon.

3. Rechercher d'éventuelles structures de stockage du sélénium :

Nous avons utilisé pour cela la microscopie analytique (analyse X par dispersion en énergie ou EDS). Cette technique permet d'identifier d'éventuelles structures de stockage du sélénium ainsi que des autres éléments chimiques présents dans ces structures. Des granules de sélénium élémentaire ont été identifiés chez de nombreuses bactéries (Kessi *et al.*, 1999; Bebien *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2001; Oremland *et al.*, 2004) et également chez la cyanophycée *Phormidium luridum* (Sielicki et Burnham, 1973). Dans ce cas, ils sont localisés dans le milieu intra-cellulaire ou attachés à la membrane externe.

Le protocole expérimental (décrit au chapitre 2.3.1) consiste à exposer les cellules algales à des concentrations croissantes en sélénite, pendant toute la durée de la croissance algale (96 h) dans un milieu d'exposition non carencé, maintenu à pH 7. Les concentrations en sélénite et séléniate dans l'eau sont mesurées tout au long de l'expérience, comme décrit au chapitre 2.3.3. Des courbes de croissance dépendant des niveaux de sélénite sont ainsi construites. Des cellules sont récupérées en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance pour les observations au MET et les analyses EDS.

3.2.2. Article 2 : “Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: comparison between effects at the population and sub-cellular level”

Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: comparison between effects at the population and sub-cellular level.

Hélène Morlon¹, Claude Fortin², Magali Floriani¹, Christelle Adam¹, Jacqueline Garnier-Laplace¹, Alain Boudou³.

¹ Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, cedex, France.

² INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9.

³ Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, Université Bordeaux 1, 33120 Arcachon, France.

Tel : +33-4-42-25-37-33

Fax : +33-4-42-25-64-44

e-mail : jacqueline.garnier-laplace@irsn.fr

Abstract

The toxicity of selenium in aquatic ecosystems is mainly linked to its uptake and biotransformation by microorganisms, and its subsequent transfer in the food chain. Thus, organisms of low trophic level such as algae play a crucial role. The aim of our study was to investigate the biological effects of selenite on *Chlamydomonas reinhardtii*, both at the sub-cellular level (effect on ultra-structure) and at the population level (effect on growth). The cells were grown under batch culture conditions in well-defined media and exposed to waterborne selenite at concentrations up to 500 μM i.e. up to lethal conditions.

On the basis of the relationship between Se concentration and cell density achieved after a 96-hour exposure period, an EC_{50} of 80 μM ([64; 98]) was derived. No adaptation mechanisms were evidenced as the same toxicity was quantified for Se-pre-contaminated algae. The inhibition of growth was linked to impairments at the sub-cellular level. Indeed, selenite caused ultrastructural damages that depended on the level and duration of exposure. Observations by TEM suggested chloroplasts as the first target of selenite cytotoxicity, with effects on the stroma, thylakoids and pyrenoids. At higher concentrations, we could observe an increase in the number and volume of starch grains. For cells collected at 96 h, electron-dense deposits were observed. Energy-dispersive X-ray microanalysis revealed that they contained selenium and were also rich in calcium and phosphorus.

Keywords: selenium - phytoplankton - toxicity - growth - TEM analysis – starch – electron-dense granules

INTRODUCTION

Selenium is a naturally occurring trace element that acts either as an essential micro-nutrient or as a toxic compound depending on its concentration. Released to the aquatic environment both from natural and anthropogenic sources, its typical concentration range in pristine freshwaters is 0.01-0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ but may be well over this range in contaminated areas (Conde et Sanz Alaejos, 1997). It has already led to devastation of wildlife populations in several large scale incidents (USEPA, 1998; Fan *et al.*, 2002) and according to Lemly (Lemly, 2004) “the risk of widespread impacts from emerging selenium sources is greater than ever before”. Selenium enters freshwaters primarily as selenite Se(+IV) (SeO_3^{2-}), and as selenate Se(+VI) (SeO_4^{2-}). Organic selenides, Se(-II) (e.g. Se-amino-acids, Se proteins, methyl selenides...) are produced by biological reduction of selenite and usually occur at lower concentrations in water than inorganic Se species (Fan *et al.*, 2002). It is now clear that some waterborne organic species of Se are taken up more readily than inorganic forms (Besser *et al.*, 1993; Wang et Lovell, 1997). Actually Se toxicity is mainly linked to its biotransformation into organo-selenium throughout its food web transfers. Selenomethionine, which is known to be responsible for reproductive impairment in fish and waterfowl, can only be synthesized by low trophic level organisms, which then supply higher organisms with those Se bound amino acids (Williams *et al.*, 1994). Se in micro algae, accumulated from the water column, partially transformed into organo-selenium species and transferred to higher organisms, is thus of major concern (Zhang *et al.*, 1990; Besser *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 2002). In ecosystems, micro algae not only act as a vector for Se from water to filter-feeders and other consumers but can also be subjected to deleterious effects, inducing a potential decrease of primary production. It is thus necessary to investigate the biological effects of waterborne Se on algae. However, while an extensive database on selenium toxicity to a variety of fish and bird species is available, only a small number of studies concern selenium toxicity toward micro algae. Even though inorganic forms of Se are known to exert little toxicity to phytoplankton (Wheeler *et al.*, 1982; Price *et al.*, 1987; Kiffney et Knight, 1990; Boisson *et al.*, 1995; Shabana et El-Attar, 1996; Li *et al.*, 2003), the sensitivity of algae to the metalloid has been shown to be highly species dependent. For instance, Wheeler (Wheeler *et al.*, 1982) found that concentrations of selenate inhibiting growth could vary as much as three orders of magnitude depending on the species tested.

Defense mechanisms such as detoxification through intracellular sequestration and/or assimilative reduction can be triggered within an organism when exposed to a toxicant.

Such contaminant-induced storage structures in micro algae have been observed (Irmer *et al.*, 1986; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991; Nishikawa *et al.*, 2003) but they have so far never been reported for Se, although it was hypothetically suggested in the blue-green algae *Phormidium luridum*, *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* where dark red granules assumed to be reduced selenium were observed (Sielicki et Burnham, 1973). Storage structures induced by Se treatment were observed in bacteria (Kessi *et al.*, 1999; Bebien *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2001; Oremland *et al.*, 2004) and fungi (Gharieb *et al.*, 1995), organisms that are known to have a high capacity to accumulate selenium, suggesting that Se specific detoxification and/or assimilative reduction mechanisms exist. Within the natural oxic freshwater pH-Eh domain, selenite and selenate are the more relevant oxidation states of inorganic Se. The predominance of one or the other form is not well established, hence, both selenite- and selenate- dominated aquatic ecosystems can be found (Conde et Sanz Alaejos, 1997). It has however been shown that selenite (Se(+IV)) is scavenged from water to a greater extent than selenate (Se(+VI)) (Wrench, 1982; Vandermeulen et Foda, 1988; Hamilton, 2004). Selenium contents in organisms and its toxicity are thought to be mainly linked to the concentration of selenite in water. We thus focused our investigations on selenite toxicity.

In the present study, *Chlamydomonas reinhardtii* was chosen as the target organism for which the toxicity of Se has to our knowledge never been assessed. The Se(+IV) toxicity was characterised at the population level (effect on growth) and at the sub-cellular level (effect on ultrastructure). These studies are usually carried out separately, and the comparisons between both effects are scarce. Transmission Electron Microscopy analysis (TEM) coupled with Energy Dispersive-X-ray microanalysis (EDAX) also allowed investigating the local elemental distribution within the cell and storage structures.

The aim of our study was to investigate selenite concentrations – effect relationships on the growth and the ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii*, including the potential formation of Se storage structures.

MATERIAL AND METHODS

Algal cultures and experimental exposure conditions

Chlamydomonas reinhardtii cultures were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP; Cumbria, United Kingdom; culture 11/32B). Maintenance and experimental culturing were carried out axenically in a modified high salt medium (Table 1) under constant illumination at $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and with an ambient temperature of $25^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$.

The inoculation of contaminated media was realised with cells from cultures in end-exponential growth phase, by addition of the volume needed to obtain an initial density of $2,500 \text{ cells.ml}^{-1}$. Controls and media supplemented with four levels of selenite (0, 10, 50, 100 and $500 \mu\text{M}$, obtained by addition of aqueous stock solutions of Na_2SeO_3 , Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and three replicates for each concentration were used. Experiments were carried out at a pH of 7, monitored and adjusted daily (KOH, 0.1M). Water samples were collected and filtered daily ($0.2 \mu\text{m}$ filter PES membrane, Nalgene, USA) to determine major anions / cations and selenite concentrations. These constituents were respectively determined by ion chromatography (DIONEX-120, Sunnyvale, CA, USA; detection limits: Cl^- : $50 \mu\text{g.L}^{-1}$; NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} : $100 \mu\text{g.L}^{-1}$), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Optima 4300 DV, Perkin Elmer Norwalk, CP, USA; detection limits: Mg^{2+} : $1 \mu\text{g.L}^{-1}$; Na^+ and Ca^{2+} : $5 \mu\text{g.L}^{-1}$; K^+ : $10 \mu\text{g.L}^{-1}$), and by flow-through hydride generation atomic absorption spectrometry, a selenite specific method (FIAS-100 / AAS 4110-ZL Perkin Elmer Shelton, CT USA; detection limit: $0.04 \mu\text{g.L}^{-1}$). Samples were analysed directly after filtration. HCl was added at the time of the analyses to avoid any reduction of Se(VI) (final concentration of 1.2 mol.L^{-1} HCl).

The effect of selenite was examined during a four-day exposure period corresponding to the complete algal growth cycle (from inoculation to stationary growth phase).

To investigate a possible adaptation of the cells to selenite, we tested the effect of a second inoculation into metalloid containing media and compared the results to those obtained from a single exposure. Cells exposed to the five selenite concentrations for 48 hours were re-inoculated in fresh media containing the same levels of selenite, in the same conditions (inoculation at $2,500 \text{ cells.ml}^{-1}$; pH 7 adjusted daily).

Table 1 Nominal concentrations of the components of the algal culture media (modified high salt medium adapted from Harris (Harris, 1988)), measured major cations and anions at the beginning of the experiment and maximal percentage of variation along the experiment.

Components	Nominal concentrations (M)	Measured initial concentrations (M, mean±1SE, n=15)	Maximal percentage of variation along the experiment
NH ₄	9.36 10 ⁻³	not measured	not measured
Cl	9.76 10 ⁻³	13.5±0.1 10 ⁻³	1.4%
K	1.22 10 ⁻³	1.28±0.03 10 ⁻³	8%
PO ₄	0.14 10 ⁻³	0.130±0.001 10 ⁻³	13%
C _{inorg}	~ 50 10 ⁻⁶ (pCO ₂ = 3.5 10 ⁻⁴ atm)	not measured	not measured
NO ₃	2.92 10 ⁻³	3.04±0.01 10 ⁻³	1.37%
SO ₄	81.2 10 ⁻⁶	95.0±0.5 10 ⁻⁶	6.2%
Mg	1.04 10 ⁻³	1.02±0.01 10 ⁻³	1.6%
Ca	2.00 10 ⁻³	1.92±0.02 10 ⁻³	3.5%
Na*	0.10 10 ⁻³	0.110±0.002 10 ⁻³	3%
BO ₃	3.01 10 ⁻⁶	not measured	not measured
Mn	2.09 10 ⁻⁶	not measured	not measured
EDTA	8.06 10 ⁻⁷	not measured	not measured
Fe	5.92 10 ⁻⁷	not measured	not measured
MoO ₄	3.00 10 ⁻⁸	not measured	not measured
Zn	2.43 10 ⁻⁸	not measured	not measured
Co	1.09 10 ⁻⁸	not measured	not measured
Cu	7.04 10 ⁻¹¹	not measured	not measured

* Concentration in control media (n=3). Concentrations in contaminated media are higher due to the addition of Na₂SeO₃ but they are stable over time (maximal percentage of variation from initial concentration: 8.6%)

Algal growth measurements and statistical analysis

Cell density and average cell diameter were measured daily in each medium using a Coulter Z2 particle counter (1:10 dilution with ISOTON II isotonic solution, using a 100 μm orifice tube; Beckman Coulter, Roissy, France).

Data were analysed by fitting regression models to concentration-effect relationships. This provides a tool to estimate benchmark doses EC_x s and assess their confidence intervals. EC_x is defined as the concentration resulting in an effect x , where x is the percent change with respect to a reference level of the endpoint considered: $x\% = 100 \left(\frac{y(EC_x)}{y(0)} - 1 \right)\%$. A

particular effort was made to follow the recommended OECD guidelines for statistical analysis of ecotoxicity data (OECD 2003). Our data (cell density) are continuous data that depend both on exposure concentration and duration and that cannot be treated as independent observations in time since they relate to the same experimental units. The recommended approach is then to fit a separate time-response model for each experimental unit (flask), and subsequently to subject the relevant parameter estimates (i.e. the maximum cell density or yield and the exponential growth rate) to a concentration-response analysis. The exponential growth model as proposed by the OECD is solely based on the maximum exponential growth rate (μ) achieved. However, in our experiments, culture yield turned out to be a much more sensitive parameter than growth. We thus used a model proposed by Delignette-Muller (Delignette-Muller, 1995) that describes the entire growth curve with three relevant parameters: initial population density $N(0)$, maximal cell density $N(\infty)$ (expressed in cells.ml^{-1}) and exponential growth rate μ (expressed in d^{-1}). The cell density at time t , $N(t)$, is given then by the equation:

$$N(t) = \frac{N(\infty)}{1 + \left(\frac{N(\infty)}{N(0)} - 1 \right) \exp(-\mu t)} \quad (1)$$

Non-linear least-squares regressions using the Levenberg-Marquardt algorithm were performed to fit growth in each flask according to equation (1), with $N(0)$ fixed at 2500 cell.ml^{-1} , to estimate the two other parameters ($N(\infty)$ and μ).

A Hill model was then fitted to obtain a dose-response relationship between ambient selenite concentrations and maximal cell density. The Hill equation is characterised by two

parameters: the Hill number nH and the 50% Effect Concentration EC_{50} , with the probability function written as follows:

$$f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + EC_{50}^{nH}} \quad (2)$$

The Excel macro REGTOX (based on the Marquardt algorithm; (Vindimian, 2003)) was used to calculate EC_{xS} . The confidence intervals on the parameters are estimated by a bootstrap non parametric simulation. Finally, an analysis of variance completed by lowest significant difference (LSD) post-hoc comparisons was performed to test for significant differences between maximal cell densities at different contamination levels. The STATISTICA software package was used to perform all statistical analyses (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Ultrastructural examination and X-ray analysis

Algae were collected in each replicate after 48h (end of the exponential growth phase) and 96h (stationary growth phase). Se pre-exposed algae were only collected in their stationary growth phase.

The algal cells collected by centrifugation (100,000 g, 10 min) were fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for two days at 4°C. They were then washed by three successive 5 min resuspensions in the same buffer. At end, they were embedded in agar. The samples were post-osmicated with 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer for 1h, dehydrated in ethanol and embedded in Epon 812. Ultrathin sections for TEM and EDAX analysis of 110 nm and 500 nm respectively were stained with uranyl acetate and examined in a Tecnai G₂ Biotwin (FEI) using an accelerating voltage of 120 kV. Several photographs of entire cells and of local detailed structures were taken, analysed and compared. The background was unfortunately quite dark due to an agar inclusion problem. We could not examine pre-exposed algae harvested after their second exposure at 500 μ M SeO₃.

As 500 μ M Se-treated algae contained more starch than control (visual observation), electron microscope morphometric techniques were used to semi-quantitatively assess the over production of starch. Over 30 photographs per sample of control cells and cells exposed to 500 μ M Se were taken, each representing a separate cell. They were analysed (NIH image program) to determine the area of cell sections occupied by starch grains. This was done for non-precontaminated algae harvested after 48h and 96h. Mann-Whitney rank

sum tests were performed to compare the percentage of surface covered by starch in contaminated and non contaminated algae at both 48h and 96h exposure durations.

For EDAX-analysis, the algal cells were prepared as described above for transmission electron microscopy omitting the post-osmication to avoid an Os peak in the spectra. Unstained ultra-thin sections were mounted on copper grids and analysed with a dispersive X-ray microanalyser equipped with a Super Ultra Thin Window (SUTW) model SAPHIR (EDAX), at 100 kV, with an 10.34° take-off angle and a counting time of 90 s. The electron probe was focused on several spots including electron-dense deposits.

All chemicals needed for histological preparation were purchased from Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, USA).

RESULTS

Toxicity on growth

Dissolved Se(IV) exposure concentrations were stable throughout the experiments with initial measured concentrations (mean \pm 1SE, $n=3$, expressed in μM) of 0, 9.44 (\pm 0.05), 48.6 (\pm 0.5), 96.6 (\pm 1.2) and 467 (\pm 8). This shows that the oxidation of Se(IV) into Se(VI), the complexation of Se with organic exudates, and the uptake by algae were not significant compared to the ambient concentrations. Anions and cations concentrations were also stable over time and in good agreement with nominal values (Table 1).

Mean values of cell diameters at the end of the experiment are given in Table 2. No particular trend or correlation between average cell diameters and Se concentrations were observed (Spearman: $r=-0.03$, $p>0.05$).

Experimental data concerning growth inhibition are reported in Fig. 1. Means and standard errors of estimated $N(\infty)$ and μ are reported in Table 2. Surprisingly, the growth rate did not decrease with increasing selenite concentrations while cell yield decreased markedly. The dependence of $N(\infty)$ on selenite concentration is reported in Fig. 2. Estimated benchmark doses and associated 95% confidence intervals at 10, and 50% (i.e. EC_{10} and EC_{50}) based on 5000 bootstrap runs were 12 μM ([7; 21]), and 80 μM ([64; 98]) respectively.

LSD post-hoc comparisons showed that maximal cell density of each treatment including the control against one another was significantly different ($p<0.001$), except when comparing the 10 μM Se treatment against control ($p>0.1$). For precontaminated algae, estimated benchmark doses and associated 95% confidence intervals at 10, and 50% (i.e. EC_{10} and EC_{50}) based on 5000 bootstrap runs were 18 μM ([9; 31]), and 97 μM ([75; 120]) respectively. The inhibition was very similar for each Se treatment between the two groups.

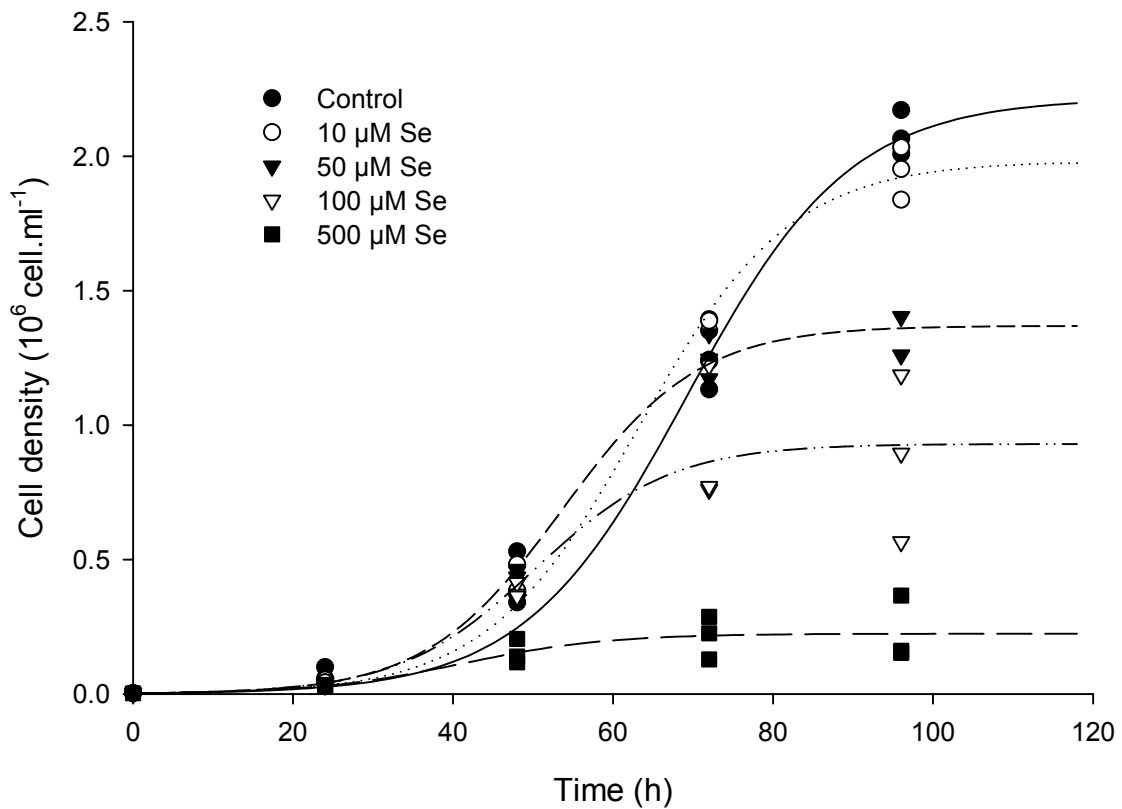


Figure 1 Inhibition of algal growth with increasing concentrations of selenite (0, 10, 50, 100 and 500 μM). Symbols represent experimental data obtained for each experimental unit. Lines represent data fitted curves to the Delignette-Muller (equation (1)).

Table 2 Means and standard errors of measured average cell diameters at 96h and estimated $N(\infty)$ and μ when fitting equation (1) to experimental data sets from controls and from each Se treated experimental units.

Se conc. (μM)	Control	10	50	100	500
Cell diameter (μm) (mean \pm 1SE)	4.54 \pm 0.03	4.87 \pm 0.03	3.85 \pm 0.05	4.01 \pm 0.07	4.78 \pm 0.04
$N(\infty)$ (10^6 cell.ml $^{-1}$)	2.21 \pm 0.06	1.98 \pm 0.05	1.42 \pm 0.08	0.93 \pm 0.02	0.22 \pm 0.06
μ (d $^{-1}$)	2.35 \pm 0.03	2.53 \pm 0.01	2.79 \pm 0.04	2.86 \pm 0.11	2.68 \pm 0.04

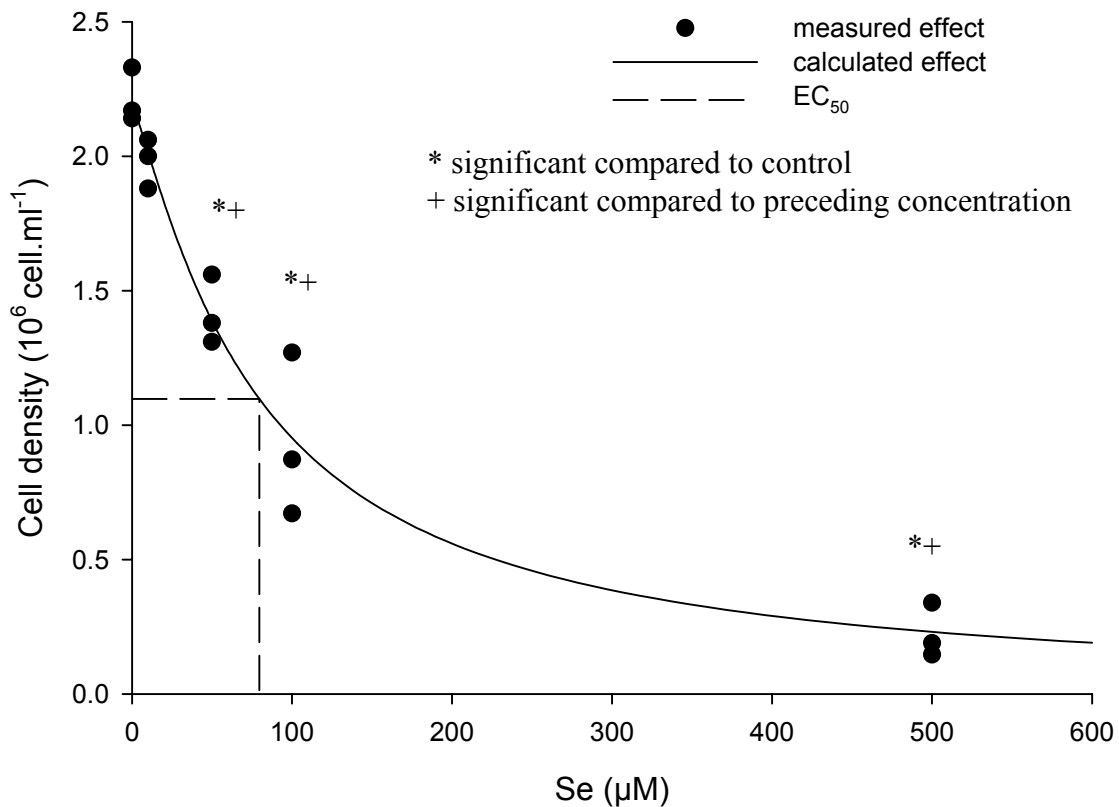


Figure 2 Dose-response relationship between ambient selenite concentration and maximal cell density. Symbols represent the estimated maximal density $N(\infty)$, obtained by fitting the model of Delignette-Muller to each experimental unit. The line represents the fit of the model of Hill (equation (2)) to the data set.

Influence of selenite on the ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii* and microlocalisation

Ultrastructure analysis was performed on the basis of a description of cellular components of *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris, 1988). Figure 3a, 3b and 4a illustrate typical cells from our control cultures. They contained a lot of empty vacuoles and the plasma membrane was quite retracted, which could be due to the dehydration of samples during sample preparation for electron microscopy.

While the ultrastructure of algae observed in all three replicates of a single condition were always quite similar, the structural damages with each Se increments were distinct. The cells were all the more disorganised that selenite levels and exposure duration increased. Photos of control cells, of contaminated algae at intermediate (50 µM) and highest concentrations (500 µM) are presented in Figure 3 for 48h and 96h exposure durations.

After 48h of exposure, no differences between the different Se treatments up to 100 μM could be seen (e.g. Fig. 3a vs. 3c: no noticeable difference between control cells and 50 μM Se exposed cells). Over accumulation of starch as well as the appearance of electron dense aggregates could be observed (Fig. 3e and 3f; and on a finer scale Fig. 5a and 5b) in cells exposed to the highest Se concentration (500 μM). Results of morphometric analyses showed a significant difference in starch build-up between treatments. The percentage of surface covered by starch increased from $5 \pm 1\%$ of total cell cross-section area in controls to $17 \pm 4\%$ in contaminated algae (a more than 3 fold increase, $p < 0.001$) after 48 hours and increased from $5.6 \pm 0.3\%$ to $22.4 \pm 0.4\%$ respectively (a ~4 fold increase, $p < 0.001$) after 96 hours.

After 96h (Fig. 3b, 3d and 3f), the first damages were visually observed at the 50 μM selenite level and mainly involved the chloroplast: the stroma became granulous and less dense, thylakoids were of a fingerprint-like appearance and the pyrenoid showed signs of structural disintegration with partially dissolved protein bodies (Fig. 3d, 4b and 4c). These damages worsened at the 100 μM selenite level (not shown). At the highest concentration (500 μM), starch nodules occupied most of the cell volume, structures were severely disrupted and normal cell organelles were often indistinguishable (Fig. 3f and 4d).

For pre-contaminated algae, damages could be observed at the lowest concentration (10 μM), thylakoids and pyrenoids did not look impaired but the stroma was slightly granulous and less dense, and quite numerous vacuolar deposits could be seen (Fig. 5a). At 50 μM and 100 μM selenite levels, pre-contaminated algae seemed more impaired than non pre-contaminated ones (not shown).

In some treatments, electron dense aggregates of undefined shape were observed. These non-membranous deposits were found in vacuoles and were not localized in a precise part of the cell. Some of them were enclosed in the chloroplast or in the cytoplasm, while others were partly embedded in the plasma membrane (e.g. Fig. 3e, 5a and 5b). Using EDX analyses, we found that these dense granules contained selenium (Fig. 5d). They were also rich in phosphorus, calcium and a set number of trace metals as shown by comparison between typical EDX spectra obtained from a deposit (Fig. 5d) and from any other analytical points in the cell samples (Fig. 5c). No selenium could be detected in other structures of the cell. The conditions triggering the appearance of these deposits are however not clear. In this experiment, they were observed in the three replicates of pre-treated algae at the 10 μM level and in the three replicates of algae harvested after 48h at the 500 μM level, but not in other conditions. We had already observed such grains in other experiments, but with no particular observable trend in their appearance.

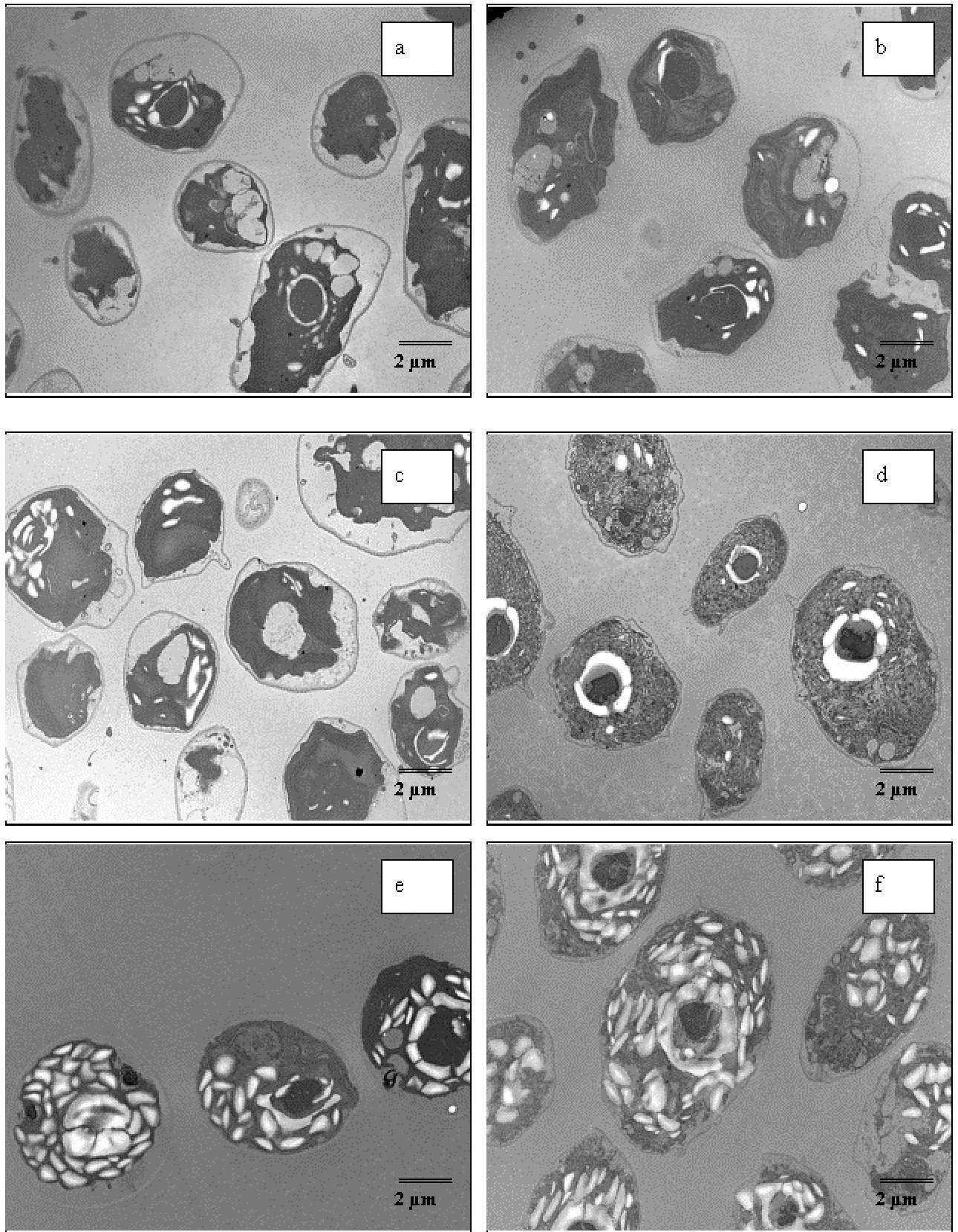


Figure 3 Influence of selenite on the ultrastructure of Chlamydomonas reinhardtii: effect of selenite level and duration of exposure. a, b: control. c, d: 50μM. e, f: 500μM. Left panels: 48 hours after inoculation. Right panels: 96 hours after inoculation.

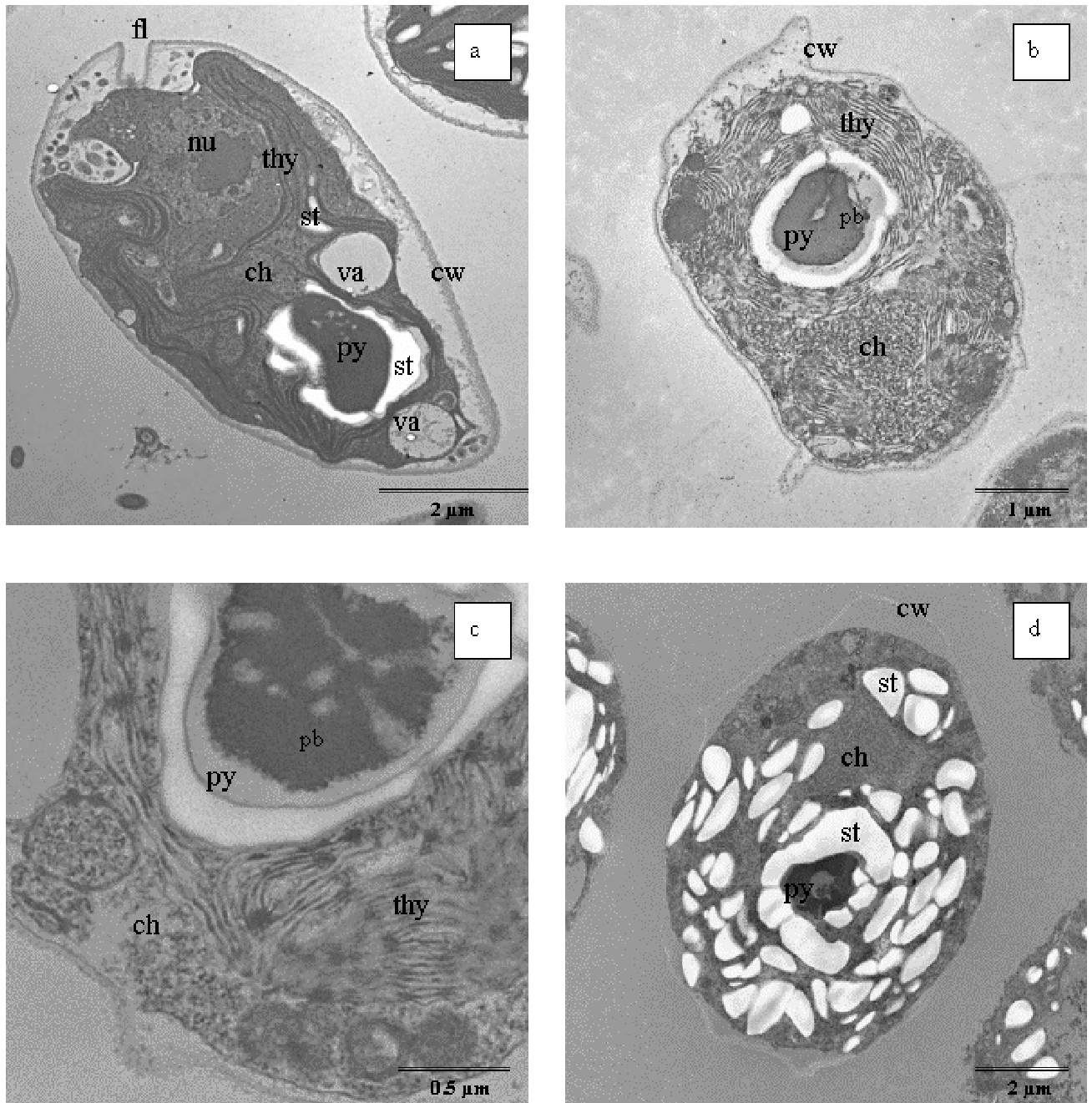


Figure 4 Influence of selenite on the ultrastructure of Chlamydomonas reinhardtii: detailed structures of cells harvested 96 hours after inoculation. a: control. The oval cells are enclosed within a rigid cell wall (cw) principally made of glycoproteins. Two pairs of flagella (fl) emerge from an apical depression. About 40% of the cell volume is taken up by the chloroplast (ch). This organelle consists of a double layered envelope, a stroma and mostly parallel layers of thylakoids (thy). Longitudinal cross sections typically show a U-shaped structure surrounding the nucleus (nu), with a broad basal area containing a prominent pyrenoid (py) (the protein body (pb) consists primarily of RUBISCO). Starch bodies (st) are present all around the pyrenoid and in the stroma. Controls contained a lot of empty vacuoles (va). b and c: 50 μ M. Thylakoids are of a fingerprint-like appearance and the pyrenoid shows signs of structural disintegration with partially dissolved protein bodies d: 500 μ M. Cells accumulate starch to a large extent, structures are severely disrupted and normal cell organelles are often indistinguishable.

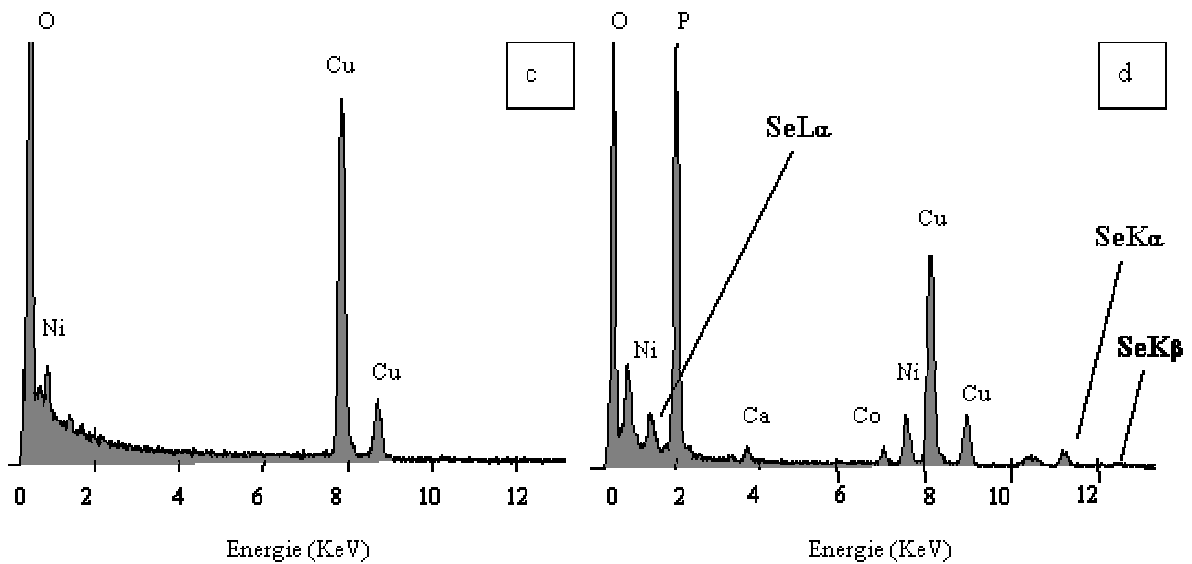
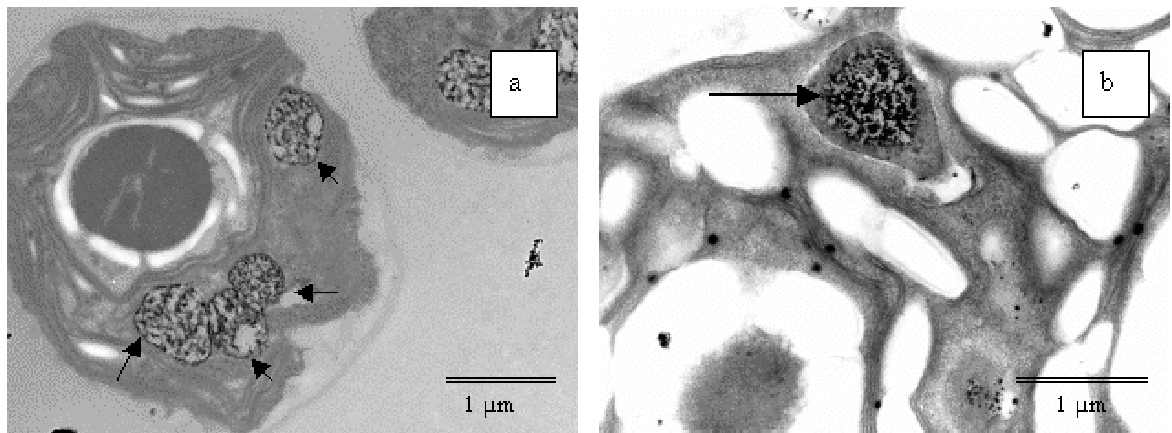


Figure 5 Electron dense aggregates (arrows) in (a) algae pre-exposed to $10 \mu\text{M SeO}_3$ (b) algae exposed to $500 \mu\text{M SeO}_3$, harvested after 96 hours; and X-ray microanalysis typical spectrum of (c) an analytical point in the cell different from an electron-dense granule (d) an analytical point in the dense granule. The emission lines for selenium are at 1.37 keV (peak $\text{SeL}\alpha$), 11.22 keV (peak $\text{SeK}\alpha$), and 12.49 keV (peak $\text{SeK}\beta$). The copper peaks are caused by the supporting grid.

DISCUSSION

Toxicity of selenite at the population level

Several methods can be used to evaluate the toxicity of a contaminant on algae. Standard tests used in environmental risk assessments are often based on growth inhibition. Algal growth tests are considered to be highly sensitive, integrating a toxicant's effect at the population level, and many governmental organisations have developed standardized algal inhibition tests (e.g. AFNOR, USEPA, ISO, OECD). There is however a long and ongoing debate on the most sensitive endpoint to be used: specific growth rate or biomass parameters (Dorgerloh, 2004; Ratte, 2004). In our study, it appeared that the maximal growth rate remained utterly insensitive to increasing selenite concentrations, whereas the maximal cell density was quite a sensitive parameter. The latter was thus used to establish dose-response relationships and to estimate benchmark doses. The estimated EC₅₀ value was 80 µM (95% confidence interval [64; 98]), the LOEC 50 µM and the NOEC 10 µM. Similar order of magnitude values were found for various phytoplankton species on different endpoints. Sub-lethal effects were observed with a decrease in chlorophyll *a* concentrations above ~40 µM in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*, (Kiffney et Knight, 1990), and growth inhibition above ~130 µM in the marine alga *Cricosphaera elongata* (Boisson *et al.*, 1995). Bennett (Bennet, 1988) obtained an EC₅₀ value of 10 µM based on maximum specific growth rates of *Chlorella pyrenoidosa* in a continuous turbidostat culture. Selenite at 1 mM was shown to inhibit the growth of seven species of marine microalgae (Wong et Oliveira, 1991a), while no toxicity could be seen at the same concentration on six other marine species (Wheeler *et al.*, 1982; Price *et al.*, 1987). The toxicity of selenite on phytoplankton appears to be highly dependent on the species considered (although freshwater species seem more sensitive than marine species) and the toxicity we found on *Chlamydomonas reinhardtii* is one of the highest reported in the literature for algae and this oxidation state of Se.

It is usually accepted that toxicity increases with increasing exposure time. Effects usually depend on internal concentration which will increase with exposure time. In standard tests pristine organisms that were not previously exposed to the test compound are used. However, if they are already weakened by a pre-exposure, the effect of the contaminant can be stronger. Alternatively, if an adaptation or acclimation to elevated contaminant concentrations occurs, the effect can be lower. Indeed, it has been previously reported that

cells could adapt to high selenite concentrations (physiological adaptation; Wrench, 1978; Bennett, 1988; Wong and Oliveira, 1991a). In our experiments, we did not notice any differences in growth inhibition between pre-exposed and non pre-exposed algae. Apparently neither an adaptation nor an aggravation occurred. The pre-contamination period may not have been long enough to observe a significant effect on growth or perhaps the toxicity no longer increases appreciably within our experimental timeframe although our visual observations at the sub-cellular level argue against the latter explanation as cellular damage seem to increase with exposure time.

Toxicity of selenite at the sub-cellular level

The effects we observed at the sub-cellular level were damages to the chloroplasts, including granulous and less dense stroma, thylakoids and pyrenoids impairments, modification of starch metabolism and apparition of electron dense deposits.

It has been shown that selenite can inhibit photosynthesis in both phytoplankters and higher plant cells (Sielicki et Burnham, 1973; Padmaja *et al.*, 1989) and that chloroplasts are the main site of selenocysteine formation (Se-Cys is a Se analogue of Cys which can be toxic) (Pilon-Smits, 2002; Pilon *et al.*, 2003). It is thus not surprising to observe the first damages to the cells in the chloroplasts. Similar observations were made by Wong and Oliveira (1991b), who showed that the reduction of the chloroplasts and of the pyrenoid region, as well as the lightening of the stroma, and a dilatation of thylakoids, were paralleled with a reduction in chlorophyll contents and photosynthetic rates. A fingerprint-like appearance of thylakoids and disintegration of the pyrenoid similar to those we observed were found after a contamination by lead in *Chlamydomonas reinhardtii* and was correlated with reductions in photosynthetic oxygen production and chlorophyll biosynthesis (Irmer *et al.*, 1986). Although chlorophyll content was not systematically measured, qualitatively we could observe that cells turned from green to white as selenium concentrations increased. After a 96-hour exposure period, cells cultured in the 50 μM Se media had lost their green colour, and measures of chlorophyll content (data not shown) indicated that it was highly affected by selenite. It is very likely that the structural damages to the chloroplasts induced by selenite in our experiment goes along with a reduction in photosynthetic activities.

A modification of starch abundance in algal cells upon exposure to contaminants, either an underproduction (Irmer *et al.*, 1986; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991) or an overproduction

(Wong *et al.*, 1994; Nishikawa *et al.*, 2003), has often been reported, reflecting important changes in metabolism. To our knowledge, starch overproduction by algae caused by exposure to an anionic metal has never been reported before. Our results are thus in contradiction with those of Wong and Oliveira (1991b) where a significant decrease of starch accumulation was noticed, albeit in marine species, after exposure to selenite. In *Chlamydomonas* species, the synthesis of pyrenoid starch is regulated independently from that of the stroma starch granules and is related to the extracellular CO₂ concentration (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991). CO₂ levels were not measured in our experiment, but they are expected to be low (at equilibrium with ambient air level) and constant throughout. The enrichment of both forms of starch suggests that the level of extracellular CO₂ is not responsible in this extensive starch storage. Starch accumulation has also been reported after nutrient starvation, such as sulphur deprivation (Ball *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 1994). As group VIA elements, selenium and sulphur share many chemical properties (Stadtman, 1980). Selenium was shown to compete with sulphur for assimilation pathways in several organisms (Wrench, 1978; Wheeler *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1994; Wu, 1994; Ogle et Knight, 1996; Chasteen et Bentley, 2003) while Se-Cys is thought to be produced by the sulphate metabolism pathway (Pilon-Smits *et al.*, 1999). We have previously shown that short-term uptake of selenite is inhibited by increasing sulphate concentrations in *Chlamydomonas reinhardtii*, suggesting that selenite and sulphate share common transporters in this alga (Morlon *et al.*, 2003). It is thus plausible that the high level of selenite used in the most contaminated condition could stop - or at least slow down - sulphate uptake, leading to a sulphur deprivation and to the accumulation of starch. Such competition between sulphate and selenite could account for the relative sensitivity of freshwater species relative to marine species (where ambient sulphate concentrations are 2-3 orders of magnitude higher) to selenite.

Mechanisms of toxic action. Comparison between toxicity of selenite at the population and sub-cellular level.

The exact mechanisms of selenium toxicity causing growth inhibition are not known. It has been proposed that selenium substitution to sulphur in sulphur-containing proteins, particularly non specific incorporation of selenocysteine replacing Cys, and following formation of dysfunctional enzymes (due to the physical differences between the sulphur and selenium molecules) is responsible for toxic effects of selenium (Stadtman, 1980; Brown et Shrift, 1982b; Pilon *et al.*, 2003).

The extent to which those biochemical and physiological effects lead to a growth inhibition has rarely been investigated. Our results suggest that cells can cope with a high concentration of selenium without reducing their division rate. In our experiments, we have shown that growth was never affected before ultrastructural impairment could be observed. This suggests that effects of selenite on metabolism (i.e. growth) is linked to an interference with the structural integrity of the cell. We could see that the chloroplast was the main target of selenite toxicity (less-dense stroma, effects on thylakoids, dissolution of the pyrenoid), which is in agreement with observations by other authors (Wong et Oliveira, 1991b). Impairment of the chloroplast probably leads to an inhibition of photosynthesis, thus to a reduction in the amount of energy available to the cells, and ultimately to growth inhibition.

Formation of storage structures

Different Se tolerance mechanisms have evolved, many of them are based on the prevention of incorporation of Se-Cys into proteins (Pilon *et al.*, 2003). An efficient mechanism used by bacteria is reduction to elemental selenium which is amorphous and poorly soluble. High electron-density particles of Se were found in micro-organisms (*Ralstonia metallidurans* CH34; Roux, 2001) including the phototrophic bacteria *Rhodospirillum rubrum* (Kessi *et al.*, 1999) and *Rhodobacter sphaeroides* (Bebien *et al.*, 2001) and three Se-respiring bacteria (Oremland *et al.*, 2004). In the case of *Rhodospirillum rubrum*, the selenium granules could be excreted across the plasma membrane and the cell wall after completion of the selenite reduction. Similar dark red granules assumed to be reduced selenium were observed in the blue-green alga *Phormidium luridum*, located in the intracellular medium as well as attached to the outer surface of the filaments (Sielicki et Burnham, 1973). It was proposed that selenite is reduced to elemental selenium through oxidation of sulphhydryl enzymes. In our case the abundance of other elements (particularly calcium and phosphorus) show that the granules we observed are not of the same nature.

Detoxification mechanisms involving the binding of excess metals to granules are frequently reported in the literature. These dense deposits are found in most of the major phyla and are particularly prevalent in invertebrates. They are metal-rich inclusions containing a high inorganic mineral component; they can vary widely in form, composition and location. Those concretions are categorized depending on their inorganic composition in three basic groups: Cu-containing granules, Fe-containing granules and Ca / Mg containing granules. The latest concretions can themselves be divided into phosphate or

carbonate rich varieties, based on their anionic content. The P-rich granules are known to sequester a number of metals with little specificity towards them. Hence, the association of contaminants with calcium and phosphorus in dense deposits is a classical phenomenon. The high capacity of PO_4 to form complexes with cations and the low solubility of those complexes can explain the formation of precipitates associating both P and cationic metals. Obviously, this argument can not be evoked in the case of anionic contaminants such as selenite. However, it could be argued that, once inside, selenite can be reduced into selenide which is very poorly soluble in the presence of cationic metals.

The formation of mineralised granules rich in phosphorus after exposure to an anionic contaminant has, to our knowledge, never been observed before. Granules containing selenium have already been reported in the liver of marine mammals and birds, but associated with mercury. We have no explanation to the simultaneous presence of P and Se in the granules we observed. Several hypotheses can be proposed, but more investigation is needed. The study of the intracellular speciation of selenium would at least allow us to know in which form it occurs.

The effects of Se on mineral nutrient element uptake (including P) by algae or plants have rarely been studied. Conflicting results show either an antagonism or a synergism between Se and P. Wu (1994) demonstrated lower phosphorus concentrations in both tall fescue and white clover after Se treatment, whereas Shabana and El-Attar (1996) showed that phosphorus uptake was enhanced by selenite in *Chlorella*. If phosphorus uptake is enhanced by selenite as proposed by Shabana and El-Attar (1996), algae may simply store the excess of P present in the intracellular medium. Similarly, Se was shown to inhibit photophosphorylation, the process by which ADP is transformed in ATP using inorganic P (Pick et Avron, 1973). If inorganic P is not used to form ATP, algae may store the excess of P. Otherwise, algae could simply store P because they can not divide anymore. The formation of polyphosphate bodies as a storage pool for phosphate when it exceeds the cellular metabolic requirement is a well known phenomenon; cells of *Chlamydomonas* species were found to contain these structures (Yu et Wang, 2004a; Yu et Wang, 2004b). However, the presence of Se in the granules remains unexplained. It has been proposed that in plants, the prevention of the non specific incorporation of Se-Cys into proteins and of the over-production of elemental Se, could be realised by the combination of both SL (selenocysteine lyase, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme) and SPS (selenophosphate synthetase) activities (Lacourciere *et al.*, 2000; Lacourciere et Stadtman, 2001). Those reactions would lead to the degradation of selenocysteine and formation of selenophosphate HSePO_4 . If such a mechanism occurs in *Chlamydomonas reinhardtii*, it could eventually explain the simultaneous presence of P and Se in the granules we observed.

Environmental considerations

Selenium is normally present in water at low parts-per-billion concentrations. Even in the most contaminated areas such as in the Kesterson Reservoir in California, where it caused severe toxicity problems, the concentration hardly reached μM levels. The EC_{50} value we found (80 μM) and lack of growth inhibition at 10 μM show it is unlikely that an effect on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* would occur in nature. Based on similar EC_{50} values available in the literature for algae, we could extrapolate this statement to the whole phytoplankton biomass in the natural environment. It is believed the poisoning of the upper trophic levels in selenium contaminated systems is due to the bioconcentration of selenium by primary producers and the subsequent biomagnification of the toxic organic forms of selenium up the aquatic food chain (Lemly, 2004). Our results confirm that the role of phytoplankton in Se ecotoxic effects in aquatic ecosystems may be mainly the bioaccumulation.

In a rehabilitation perspective, algal-bacterial selenium removal systems have been shown to have high treatment efficiencies to restore Se contaminated areas (Lundquist *et al.*, 1994). In these systems, algae are grown in drainage water to provide an inexpensive carbon and energy source for dissimilatory selenium-reducing bacteria. The resistance of *Chlamydomonas reinhardtii* to high selenium concentrations makes it a potential candidate in the choice of the species of algae to be used.

CONCLUSION

Our experimental approach enabled us to show that selenite inhibits metabolic processes by interference with the structural integrity of the cell. Effects observed at the population and sub-cellular levels were strongly linked. The most drastic effects involved impairment of the chloroplasts and over-production of starch. Photosynthetic and respiratory rates may be lowered due to these ultrastructural impairments, leading to a diminution of energy available to the cells, and ultimately to a reduction in growth. We observed, for the first time in a phytoplankton species, dense granules containing Se and rich in P that could be the result of a detoxification process.

Acknowledgements

We are grateful to Laurent Cournac for his help and discussions on the subject and to Gilles Durrieu for his advice on statistical analyses. We would also like to thank Virginie Camilleri, Isabelle Cavalie, Daniel Orjollet and Gaëlla Grasset for their technical assistance on inductively coupled plasma optical emission spectrometry, flow-through hydride generation atomic absorption spectrometry, ionic chromatography and EDAX-TEM respectively. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

- Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.C., Matagne, R.F., 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66, 1-9.
- Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C., Amiard-Triquet, C., 1991. Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biol. Cell.* 72, 103-112.
- Bebien, M., Chauvin, J.P., Adriano, J.M., Grosse, S., Vermeglio, A., 2001. Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4440-4447.
- Bennet, W.N., 1988. Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. *Wat. Res.* 22 (7), 939-942.
- Besser, J.M., Canfield, T.J., La point, T.W., 1993. Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 57-72.
- Boisson, F., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., 1995. Toxicity and accumulation of selenite and selenate in the unicellular marine alga *Cricosphaera elongata*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 487-493.
- Brown, T.A., Shrift, A., 1982b. Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol. Rev.* 57, 59-84.
- Chasteen, T.G., Bentley, R., 2003. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem. Rev.* 103 (1), 1-25.
- Conde, J.E., Sanz Alaejos, M., 1997. Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chem. Rev.* 97, 1979-2003.

- Davies, J.P., Yildiz, F., Grossman, A.R., 1994. Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. *Plant Cell* 6, 53-63.
- Delignette-Muller, M.L. (1995). Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Laboratoire de Biométrie-Génétique et Biologie des Populations. Lyon, Université Claude Bernard LYONI.
- Dorgerloh, M. (2004). How to express growth effects on algae under 91/414/EEC? SETAC Europe 2004, Prague.
- Fan, T.W.M., Teh, S.J., Hinton, D.E., Higashi, R.M., 2002. Selenium biotransformation into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat. Toxicol.* 57, 65-84.
- Gharieb, M.M., Wilkinson, S.C., Gadd, G.M., 1995. Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. *J. Ind. Microbiol.* 14, 300-311.
- Hamilton, S.J., 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci.Total Environ.* 326, 1-31.
- Harris, E.H., 1988. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, Inc., San Diego.
- Irmer, U., Wachholz, I., Schäfer, H., Lorch, D.W., 1986. Influence of lead on *Chlamydomonas reinhardtii* danegard (volvocales, chlorophyta): accumulation, toxicity and ultrastructural changes. *Envir. exp. Bot.* 26 (2), 97-105.
- Kessi, J., Ramuz, M., Wehrly, E., Spycher, M., Bachofen, R., 1999. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (11), 4734-4740.
- Kiffney, P., Knight, A., 1990. The toxicity and bioaccumulation of selenate, selenite and seleno-L-methionine in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 488-494.
- Lacourciere, G.M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N., Stadtman, T.C., 2000. *Escherichia coli* Nifs-like proteins provide selenium in the pathway for the biosynthesis of selenophosphate. *J. Biol. Chem.* 275 (31), 23769-23773.
- Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C., 2001. Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis. *Biofactors* 14, 69-74.
- Lemly, A.D., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotox. Environ. Safe.* 59, 44-56.
- Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L., 2003. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technol.* 89, 171-176.
- Lundquist, T.J., Green, F.B., Tresan, R.B., Newman, R.D., Oswald, W.J. (1994). The Algal-Bacterial Selenium Removal System: Mechanisms and Field Study. Selenium in the Environment. W. T. Frankenberger: 251-278.

- Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J. (2003). Uptake of two oxyanions (pertechnetate and selenite) by a unicellular phytoplankton species: *Chlamydomonas reinhardtii*. SETAC Europe 2003, Hambourg.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. FEMS Microbiol. Ecol. 44, 253-259.
- Ogle, R.S., Knight, A.W., 1996. Selenium Bioaccumulation in Aquatic Ecosystems: 1. effects of Sulfate on the Uptake and Toxicity of Selenate in *Daphnia magna*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30, 274-279.
- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S., 2004. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70 (1), 52-60.
- Padmaja, K., Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K., 1989. Effect of selenium on chlorophyll biosynthesis in mung bean seedlings. Phytochemistry 28 (12), 3321-3324.
- Pick, U., Avron, M., 1973. Inorganic sulfate and selenate as energy transfer inhibitors of photophosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 325 (2), 297-303.
- Pilon, M., Owen, J.D., Garifullina, G.F., Kurihara, T., Mihara, H., Esaki, N., Pilon-Smits, E.A.H., 2003. Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic arabidopsis expressing a mouse selenocysteine lyase. Plant Physiol. 131, 1250-1257.
- Pilon-Smits, E.A.H., 2002. Characterization of a Nifs-Like Chloroplast Protein from Arabidopsis. Implications for Its Role in Sulfur and Selenium Metabolism. Plant Physiol. 130, 1309-1318.
- Pilon-Smits, E.A.H., Hwang, S., Lytle, C.M., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., Terry, N., 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction and tolerance. Plant Physiol. 119, 123-132.
- Price, N.M., Thompson, P.A., Harrison, P.J., 1987. Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira Pseudonana* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 23, 1-9.
- Ratte, H.T. (2004). The myth of the most sensitive endpoint - biomass vs. growth rate in the alga growth inhibition test. SETAC Europe 2004, Prague.
- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., Coves, J., 2001. Mobilization of selenite by *Rastolnia metallidurans CH34*. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2), 769-773.
- Shabana, E.F., El-Attar, S.A., 1996. Influence of clay minerals on selenium toxicity to algae. Egyptian Journal of Microbiology 30 (2), 275-286.

- Sielicki, M., Burnham, J.C., 1973. The effect of selenite on the physiological and morphological properties of the blue-green alga *Phormidium Luridum* var. *Olivacea*. J. Phycol. (9), 509-514.
- Stadtman, T.C., 1980. Selenium-dependent enzymes. Annu. Rev. Biochem. 49, 93-110.
- USEPA (1998). Report on the Peer Consultation Workshop on Selenium Aquatic Toxicity and Bioaccumulation, USEPA.
- Vandermeulen, J.H., Foda, A., 1988. Cycling of selenite and selenate in marine phytoplankton. Mar. Biol. 98, 115-123.
- Vindimian, E. (2003). REGTOX: macro Excel™ for dose-response modelling.
- Wang, C., Lovell, R.T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 152, 223-234.
- Wheeler, A.E., Zingaro, R.A., Irgolic, K., 1982. The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 57, 181-194.
- Williams, M.J., Ogle, R.S., Knight, A.W., Burau, R.G., 1994. Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga *Selenastrum capricornutum*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 449-453.
- Wong, D., Oliveira, L., 1991a. Effects of selenite and selenate on the growth and motility of seven species of marine microalgae. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 1193-1199.
- Wong, D., Oliveira, L., 1991b. Effects of selenite and selenate toxicity on the ultrastructure and physiology of three species of marine microalgae. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 1201-1211.
- Wong, S.L., Nakamoto, L., Wainwright, J.F., 1994. Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. J. Appl. Phycol. 6, 405-414.
- Wrench, J.J., 1978. Selenium metabolism in the marine phytoplankters *Tetraselmis tetrathele* and *Dunaliella minuta*. Mar. Biol. 49, 231-236.
- Wrench, J.J., 1982. Temporal variations in dissolved selenium in a coastal ecosystem. Nature 299, 431-433.
- Wu, L. (1994). Selenium Accumulation and Colonization of Plants in Soils with Elevated Selenium and Salinity. Selenium in the environment. W. T. Frankenberger: 279-325.
- Yu, R.Q., Wang, W.X., 2004a. Biokinetics of cadmium, selenium and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 129, 443-456.
- Yu, R.Q., Wang, W.X., 2004b. Biological uptake of Cd, Se(IV) and Zn by *Chlamydomonas reinhardtii* in response to different phosphate and nitrate additions. Aquat. Microb. Ecol. 35, 163-173.

Zhang, G.H., Hu, M.H., Huang, Y.P., 1990. Se uptake and accumulation in marine phytoplankton and transfer of Se to the clam *Puditapes philippinarum*. Marine Environ. Res. 30, 179-190.

3.2.3. Principales avancées et conclusion

Ces études visaient à étudier la toxicité du sélénite sur la croissance et l'ultrastructure algales, ainsi qu'à rechercher d'éventuelles structures de stockage intra-cellulaire. Les principales avancées sont les suivantes :

1. Relation dose-effet sur la croissance algale :

Nous avons confirmé dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii* que des doses élevées de sélénite sont nécessaires à l'obtention d'une inhibition de croissance, avec une EC_{50} estimée à 80 μM , tandis que les concentrations dans l'environnement sont plutôt de l'ordre du nM. La toxicité directe du sélénite sur le compartiment phytoplanctonique n'est donc *a priori* pas un phénomène pouvant se produire dans l'environnement. Il se pourrait cependant que les communautés naturelles de phytoplancton soient plus sensibles que les monocultures d'algues étudiées dans des milieux optimisés, comme le suggère Riedel (1996). Par rapport aux toxicités rapportées dans la littérature pour le sélénite et d'autres espèces d'algues, *C. reinhardtii* se trouve être relativement sensible, et donc adaptée aux recherches que nous avons menées.

La modélisation des courbes de croissance nous a permis de montrer que l'effet du sélénite se traduit plutôt sur les densités algales que sur les taux de croissance. La durée de la phase exponentielle est diminuée, ce qui suggère un arrêt prématuré de la phase de division. L'effet est semblable à celui qui serait induit par l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments dans le milieu de culture.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence de réponse entre des cellules pré-exposées au sélénite et des cellules non pré-exposées, ce qui indique que dans les conditions expérimentales avec lesquelles nous avons travaillé, il n'y a pas eu d'adaptation des cellules au sélénite.

2. Effets au niveau de l'ultrastructure algale :

Le suivi en parallèle des effets au niveau sub-cellulaire et des effets au niveau populationnel montre que l'inhibition de croissance apparaît simultanément aux atteintes ultrastructurales, en particulier au niveau des chloroplastes. Il se pourrait que l'atteinte à ces organites, siège de la photosynthèse, se traduise par une diminution de l'énergie disponible à la cellule et finalement par un arrêt du processus de division cellulaire.

La première concentration donnant lieu à des effets visibles du sélénite sur l'ultrastructure algale ($[\text{Se}] = 50 \mu\text{M}$) correspond à la LOEC (concentration testée la plus faible provoquant une inhibition significative de la croissance algale). Les effets sont tout d'abord visibles sur

le chloroplaste, qui devient granuleux et moins dense. Les thylakoïdes prennent une allure d'empreintes, et le pyrénioïde se désagrège. Les résultats obtenus sur le chloroplaste et le pyrénioïde sont semblables à ceux décrits par Wong et Oliveira (1991b). L'allure d'empreinte prise par les thylakoïdes a déjà été observée après des contaminations par d'autres métaux (Irmer *et al.*, 1986).

Aux concentrations les plus élevées (~500 μM), nous avons observé une importante production d'amidon, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par Wong et Oliveira (1991b), qui montrent plutôt une diminution de l'accumulation d'amidon, mais chez des espèces marines. La sur-production d'amidon est une marque de stress chez les végétaux et peut en particulier avoir lieu lors de carences en nutriments.

3. Structures de stockage du sélénium

Suite à une exposition aiguë au sélénite, nous avons mis en évidence l'apparition de granules denses aux électrons. Ces granules contiennent du sélénium et sont également riches en phosphore, calcium et métaux traces. C'est à notre connaissance la première fois que de tels granules sont observés chez les organismes phytoplanctoniques après une contamination au sélénium. Ils ne sont pas de la même nature que les granules observés chez les bactéries ou chez *Phormidium luridum*, constitués de précipités de sélénium élémentaire (Sielicki et Burnham, 1973; Kessi *et al.*, 1999; Bebien *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2001; Oremland *et al.*, 2004). Il pourrait plutôt s'agir de granules de phosphate, qui apparaissent en général chez le phytoplancton soit pour stocker du phosphate excédentaire, soit pour immobiliser des métaux toxiques, mais habituellement plutôt dans le cas d'une contamination par des métaux cationiques. Il se pourrait également que la présence simultanée de sélénium et de phosphore soit liée à la formation de sélénophosphate comme mécanisme de prévention de l'incorporation de la sélénocystéine dans les protéines (Müller *et al.*, 1997; Lacourciere *et al.*, 2000; Lacourciere et Stadtman, 2001). Il est en tous cas fort probable que les granules correspondent à un mécanisme de détoxication.

En résumé, nous avons montré que l'effet du sélénite sur la croissance s'exprime par un arrêt prématuré de la phase exponentielle, qui se traduit par une diminution des densités maximales atteintes. L' EC_{50} calculée sur les densités maximales est de 80 μM (~ 6,3 mg.L^{-1}). Les premiers effets observés sur l'ultrastructure apparaissent aux mêmes niveaux d'exposition, ce qui suggère un lien entre effets au niveau sub-cellulaire et effets au niveau populationnel. Les principales atteintes sur l'ultrastructure sont un éclaircissement du stroma, une déformation des thylakoïdes, une réduction du pyrénioïde, et une spectaculaire sur-production d'amidon aux concentrations les plus élevées. Enfin, une

partie du sélénite intra-cellulaire est stockée dans des granules denses, riches en phosphore (supposé être du phosphate) et en calcium.

D'un point de vue environnemental, ces résultats confirment qu'il est peu probable que les concentrations de sélénite rencontrées dans l'environnement puissent induire une diminution de la biomasse algale. Le rôle principal du phytoplancton dans l'écotoxicité du sélénite est donc la bioaccumulation puis l'éventuel transfert trophique vers les espèces phytophages (communautés zooplanctoniques, bivalves filtreurs,...) ou le dépôt sur les sédiments, *via* l'accumulation de la nécromasse. Dans le chapitre suivant, nous allons aborder plusieurs aspects de la bioaccumulation.

3.3. Bioaccumulation à long terme du sélénite chez *Chlamydomonas reinhardtii*

3.3.1. Introduction

Les expériences de courte durée d'exposition ont montré que la vitesse d'internalisation du sélénite est rapide et que l'effet le plus marqué sur le transport trans-membranaire est une inhibition par le sulfate (cf chapitre 3.1). Le but des recherches menées dans ce chapitre est de confirmer/infirmier l'importance de la prise en charge ainsi que l'inhibition par le sulfate sur des durées d'exposition plus longues, représentatives des conditions rencontrées en milieu naturel. Les axes développés sont les suivants :

1. Estimer la bioaccumulation et analyser le lien entre bioaccumulation et toxicité :

A l'origine, le but de notre recherche était uniquement d'estimer la bioaccumulation à long terme du sélénite. Cependant, constatant que celle-ci était très variable d'un réplicat à l'autre et que cette variabilité concernait également la toxicité, nous avons étudié la corrélation entre les deux variables (bioaccumulation et toxicité). La toxicité d'un contaminant peut être liée à des interactions au niveau de la surface cellulaire et/ou à l'accumulation dans le milieu intra-cellulaire. Dans le cas du sélénite, les deux effets peuvent avoir lieu. A la surface cellulaire, la compétition avec les nutriments du milieu peut induire des carences. Dans le milieu intra-cellulaire, le sélénite peut se substituer au soufre et induire un dysfonctionnement des enzymes dans lesquelles il est intégré; il peut également être responsable d'un stress oxydant ; enfin, nous avons vu qu'il pouvait avoir des impacts sur l'ultrastructure à fortes concentrations (cf chapitre 3.2). Etudier la corrélation entre bioaccumulation et impact sur la croissance devrait nous permettre d'avoir une idée plus précise de la contribution de la fraction internalisée à l'égard de la

toxicité. Cet aspect n'a, à notre connaissance, jamais été étudié auparavant pour le sélénite et le phytoplancton.

2. Analyser l'impact du sulfate sur la bioaccumulation à long terme du sélénite :

L'effet le plus marquant que nous avons trouvé sur le transport du sélénite à court terme est une inhibition par le sulfate (cf. chapitre 3.1). Bien que plusieurs études montrent un antagonisme entre sélénium et sulfate, un effet direct de cet anion sur le transport du sélénite n'avait à notre connaissance jamais été trouvé. Ceci peut avoir d'importantes conséquences en termes d'influence des conditions nutritives du milieu sur l'impact environnemental du sélénite. Il nous a semblé intéressant de voir si cet effet était également valable pour des durées d'exposition plus longues. De manière générale, il est intéressant de tester si les effets observés à court terme peuvent se répercuter sur des effets à plus long terme, dans des conditions d'exposition plus réalistes.

Le protocole expérimental que nous avons utilisé, décrit au chapitre 2.3.1, consiste à exposer les cellules algales à du sélénite stable pendant toute la durée de la croissance. Les concentrations en sélénite et séléniate dans l'eau sont mesurées tout au long de l'expérience, comme décrit au chapitre 2.3.3. Les densités cellulaires sont mesurées de façon quotidienne. Des cellules sont récupérées en phase stationnaire de croissance pour mesurer la bioaccumulation.

3.3.2. Article 3: “Cellular burdens and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*”

Cellular burdens and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

H. Morlon¹, C. Fortin², C. Adam¹ and J. Garnier-Laplace¹

¹ Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. DEI/SECRE/LRE, Cadarache, Bât. 186, BP 3, 13115 St-Paul-lez-Durance Cedex, France.

² INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9.

Tel : +33-4-42-25-37-33

Fax : +33-4-42-25-64-44

e-mail : jacqueline.garnier-laplace@irsn.fr

Abstract

Cellular growth and intracellular concentrations of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* showed considerable variability between replicates at ambient concentrations of Se that became toxic to the alga. However, growth inhibition was well correlated to the cellular quota of selenite; the correlation between absorbed selenite and toxicity was better than the simple correlation between ambient selenite and toxicity usually used to express metal toxicity, suggesting selenite toxicity is mainly linked to intracellular accumulation. It is usually expected that effects of contaminants on organisms depend on internal concentrations. These results confirm this hypothesis.

INTRODUCTION

Selenium is well known as an essential element in natural systems, both as a nutrient and as a potential toxicant. It is a by-product of certain industrial and agricultural processes and is distributed unevenly in the environment. Se has previously led to several environmental damages (USEPA, 1998; Fan *et al.*, 2002) and could cause severe problems on a global scale in the future (Hamilton, 2002; Lemly, 2004). Se toxicity is mainly linked to its propensity to bioaccumulate within the base of food webs (Hamilton, 2004). Micro algae, that transform inorganic Se species into more bioavailable organic species and transfer them to higher organisms, play a crucial role in Se toxicity (Zhang *et al.*, 1990; Besser *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 2002). Deleterious effects on algae may also induce a decrease of primary production, affecting the whole ecosystem. The aim of our study was to investigate the bioaccumulation and toxicity of selenite (Se (IV)) over a complete algal batch growth cycle. Selenite was chosen because selenium contents in organisms and its toxicity are thought to be mainly linked to the concentration of this form in water. It was shown to be scavenged from water to a greater extent than selenate (Se (VI)) (Wrench, 1982; Vandermeulen et Foda, 1988; Hamilton, 2004). Only few studies deal with selenium bioaccumulation and toxicity in micro algae. We found one study on the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* (Kiffney et Knight, 1990), and two studies on marine algae (Boisson *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003). In all three cases, accumulated selenium increased with selenite concentration in the medium. No saturation occurred, even at concentrations reaching mg.L^{-1} , which is very high compared to concentrations that can be usually found in the environment. First toxic effects were also observed at those environmentally irrelevant mg.L^{-1} levels. In a previous study on selenite toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*, we showed that the growth rate was not a sensitive parameter, while the maximal cell density decreased with increasing selenite concentrations. Based on maximal cell density, the estimated EC_{50} was $80 \mu\text{M}$ (95 % CI [64; 98]), the LOEC $50 \mu\text{M}$ and the NOEC $10 \mu\text{M}$ (Morlon, in revision).

Toxicity of a contaminant may be linked to cell surface interactions (competition for transport sites) or to intracellular accumulation. In the case of selenite, both effects can occur: as an oxyanion, selenite can compete with anionic macronutrients at the membrane surface and hence reduce their availability to algae; it is also known to exert oxidative stress in the intracellular medium or to substitute to sulphur in sulphur-containing proteins, forming dysfunctional enzymes (Stadtman, 1980; Brown et Shrift, 1982b; Pilon *et al.*,

2003). The aim of this study was to investigate the bioaccumulation of selenite in *Chlamydomonas reinhardtii* and its relationship with toxicity.

MATERIAL AND METHODS

Algal cultures and experimental exposure conditions

Chlamydomonas reinhardtii cultures were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP; Cumbria, United Kingdom; culture 11/32B). Maintenance and experimental culturing were carried out axenically in a modified high salt medium (Table 1) under constant illumination at $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and with an ambient temperature of $25^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. The inoculation of algae in Se-contaminated media was carried out with cells from end of exponential growth phase cultures, by addition of the volume needed to obtain an initial density of $2,500 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$. Triplicate flasks containing exposure media (0, 10, 20, 30, 40 and 50 μM , obtained by addition of aqueous stock solutions of Na_2SeO_3 , Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared. Experiments were carried out at a pH of 7, monitored and adjusted daily (KOH, 0.1 M). Water samples were collected and filtered daily (0.2 μm PES filter membrane, Nalgene, USA) to determine major anions / cations and selenite concentrations. The effect of selenite was examined during a four-day exposure period corresponding to the complete algal growth cycle (from inoculation to stationary growth phase). At the end of the exposure (after 96h), 80 ml of cell suspensions per replicate were centrifuged to collect algae (100,000 g, 10 min) for measurement of intracellular selenium concentrations. To remove Se eventually adsorbed to the algal cell surface, algae were rinsed by re-suspension in 80 ml of fresh selenium-free media and collected again by centrifugation (100,000 g, 10 min). Total selenium content in algal pellets was then assessed as indicated in the section 2.3.

Algal growth measurements and statistical analysis

Cell density was measured daily in each medium using a Coulter Z2 particle counter (1:10 dilution with ISOTON II isotonic solution, using a 100 μm orifice tube; Beckman Coulter, Roissy, France).

We fitted growth curves as described in a previous paper (Morlon, in revision). We used the model proposed by Delignette-Muller (Delignette-Muller, 1995), that describes the

whole growth curve with three relevant parameters: initial population density $N(0)$, maximal cell density $N(\infty)$ (expressed in cells.ml⁻¹) and exponential growth rate μ (expressed in d⁻¹). The cell density at time t , $N(t)$, is then given by the equation:

$$N(t) = \frac{N(\infty)}{1 + \left(\frac{N(\infty)}{N(0)} - 1\right) \exp(-\mu t)} \quad (1)$$

Non-linear least-squares regressions using the Levenberg-Marquardt algorithm were performed to fit growth in each flask according to equation (1), with $N(0)$ fixed at 2500 cell.ml⁻¹, to estimate the two other parameters ($N(\infty)$ and μ).

A Hill model was then fitted to obtain a dose-response relationship between ambient selenite concentrations and maximal cell density. The Hill equation is characterised by two parameters: the Hill number nH and the 50% Effect Concentration EC_{50} , with the probability function written as follows:

$$f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + EC_{50}^{nH}} \quad (2)$$

The Excel macro REGTOX (based on the Marquardt algorithm; (Vindimian, 2003)) was used to calculate EC_x s. The confidence intervals on the parameters were estimated by a bootstrap non parametric simulation. Finally, an analysis of variance completed by lowest significant difference (LSD) post-hoc comparisons was performed to test for significant differences between maximal cell densities at different contamination levels.

To investigate the relationship between intracellular accumulation and toxicity, estimated maximal cell densities were plotted against cellular burdens (mol of selenium per cell). Non-parametric Spearman rank correlation coefficients of maximal cell densities against cellular quotas or ambient concentrations were calculated and compared. Tests of their significance were also performed.

The STATISTICA software package was used to perform all statistical analyses (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Chemical analyses

Anions and cations in water samples were respectively determined by ion chromatography (DIONEX-120, Sunnyvale, CA, USA; detection limits: Cl^- : $50 \mu\text{g.L}^{-1}$; NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} : $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Optima 4300 DV, Perkin Elmer Norwalk, CP, USA; detection limits: Mg^{2+} : $1 \mu\text{g.L}^{-1}$; Na^+ and Ca^{2+} : $5 \mu\text{g.L}^{-1}$; K^+ : $10 \mu\text{g.L}^{-1}$). Selenite in water samples was analysed directly after filtration by flow-through hydride generation atomic absorption spectrometry, a selenite specific method (FIAS-100 / AAS 4110-ZL Perkin Elmer Shelton, CT USA; detection limit: $0.04 \mu\text{g.L}^{-1}$). HCl was added at the time of the analyses to avoid any reduction of Se(VI) (final concentration of 1.2 M HCl).

To determine total selenium in algae, the first step consisted in converting organic selenium into inorganic Se(VI) (digestion with boiling a 1:1 mixture of nitric acid and hydrogen peroxide at 100°C for 90 min). Selenate was then reduced to selenite with boiling hydrochloric acid (final concentration of 4 M HCl) at 90°C for 45 min. Finally, Se(IV) was determined as described previously for aqueous samples.

Results were expressed as Se burden per algal cell ($\text{amol}^4 \cdot \text{cell}^{-1}$)

⁴ 1 amol= 10^{-18} mol

RESULTS AND DISCUSSION

Toxicity on growth

Means and standard errors of estimated $N(\infty)$ and μ are reported in Table 1. The growth rate did not decrease with increasing selenite concentrations while cell yield decreased markedly, which had already been observed in previous experiments (Morlon, in revision). Estimated benchmark doses based on the relationship between estimated $N(\infty)$ and selenite concentrations and associated 95% confidence intervals at 10, and 50% (i.e. EC_{10} and EC_{50}) based on 5000 bootstrap runs were 2 μM ([0.8; 4.3]), and 14 μM ([10; 18]) respectively. The toxicity we found was higher than expected from previous experiments (estimated EC_{50} : 80 μM [64; 98], (Morlon, in revision)). This may be explained by the intergenerational variability, which had already been observed before (Fortin et Campbell, 2000; Dutel, 2000-2001). Nevertheless, still high concentrations of selenite were necessary to cause significant growth inhibition such that reduction of algal biomass due to selenite is unlikely to occur in the environment.

LSD post-hoc comparisons showed that maximal cell density of each treatment (including controls) against one another was significantly different ($p < 0.05$), except when comparing the 30, 40 and 50 μM against one another ($p > 0.1$). At those toxic concentrations, it is noticeable that responses are very different from one replicate to the other, as shown by coefficients of variation (Table 1). Important variations in responses of replicates to high contamination pressures are a phenomenon we have also observed in other experiments on selenite, and on uranium (Gilbin, personal communication).

Table 1. Means and standard errors of measured average cell diameters at 96h and estimated μ and $N(\infty)$ when fitting equation (1) to experimental data sets from controls and from each Se treated experimental units. Coefficients of variation associated to $N(\infty)$.

Se conc (μM)	Control	10	20	30	40	50
μ (d^{-1})	2.23 \pm 0.05	2.42 \pm 0.19	2.56 \pm 0.14	2.48 \pm 0.30	2.64 \pm 0.00	2.64 \pm 0.00
$N(\infty)$ (10^6 cell.ml $^{-1}$)	2.05 \pm 0.07	1.25 \pm 0.04	0.90 \pm 0.04	0.38 \pm 0.10	0.42 \pm 0.13	0.55 \pm 0.10
CV(%)	6	6	7	48	52	32

Dependence of bioaccumulation on ambient concentration

Dissolved Se(IV) exposure concentrations were stable throughout the experiment with initial measured concentrations (mean \pm 1SE, $n=3$, expressed in μM) of 0, 8.6 (\pm 0.1), 17.5 (\pm 0.3), 29.4 (\pm 0.1), 38.1 (\pm 1.6) and 51 (\pm 0.2). Concentrations of anions and cations were also stable over time and in good agreement with nominal values (percentage of variation along the experiment: $<5\%$).

Results of intracellular contents of selenite depending on ambient measured concentrations are reported in Fig. 1.

When ambient concentrations reached highly toxic values, we again observed an important variability between replicates: the coefficients of variation corresponding to cellular quotas at 10, 20, 30, 40 and 50 μM were respectively 14, 13, 54, 37 and 41%.

Chlamydomonas cells were able to accumulate large amounts of selenite. The bioaccumulation increased with ambient concentrations. A maximum value seemed to be reached above 20 μM , but the variability was too high to be conclusive. Those results are in agreement with those found by Kiffney (1990), Boisson (1995) and Li (2003), with similar maximal bioaccumulation capacities.

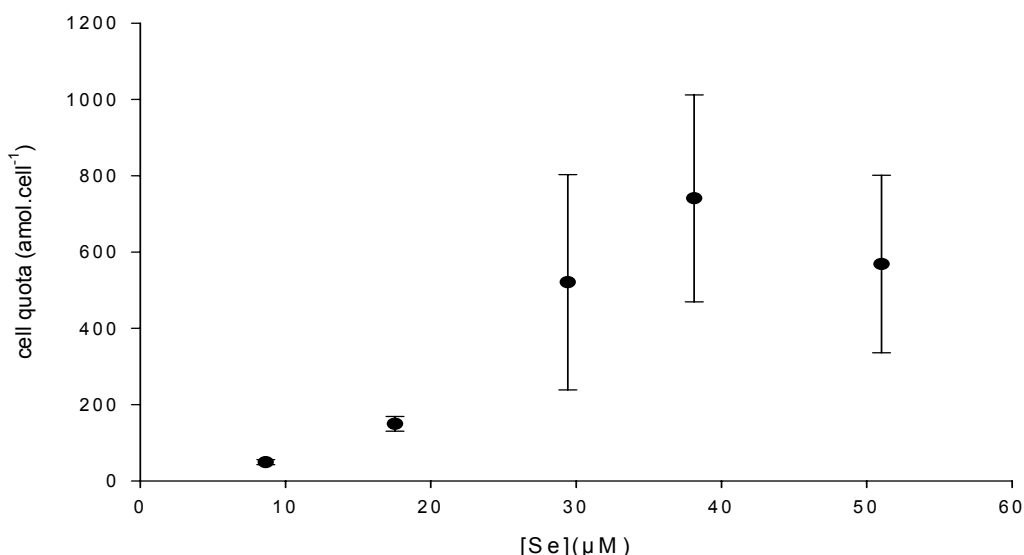


Fig 1. Means and standard errors of intracellular cell contents of selenite after 96h of growth, expressed in amol.cell^{-1} plotted against measured selenite concentrations in media ($n=3$).

1 amol = 10^{-18} mol⁵

Link between bioaccumulation and effects

Noting that batches where the toxicity was the highest corresponded to batches where the bioaccumulation was the highest, we plotted estimated maximal densities against cellular quotas (Fig. 2). Algal growth decreased in response to the increase in intracellular Se, as anticipated. The correlation between estimated maximal cell densities and cellular quotas (Spearman, $r=-0.95$, $p<0.05$) was however greatly improved with respect to the correlation between estimated maximal densities and ambient selenite concentrations (Spearman, $r=-0.84$, $p<0.05$). For the 30, 40 and 50 μM treatments where a high variability between replicates appeared, the correlation between estimated maximal densities and ambient concentrations was no longer significant (Spearman, $r=0.18$, $p>0.05$), whereas the correlation between estimated maximal densities and cellular quotas was still high and significant (Spearman, $r=-0.77$, $p<0.05$). This suggests that selenite exerts its toxicity through presence in the intracellular medium and is consistent with our previous observations of a toxicity linked to ultrastructural damages (Morlon, in revision).

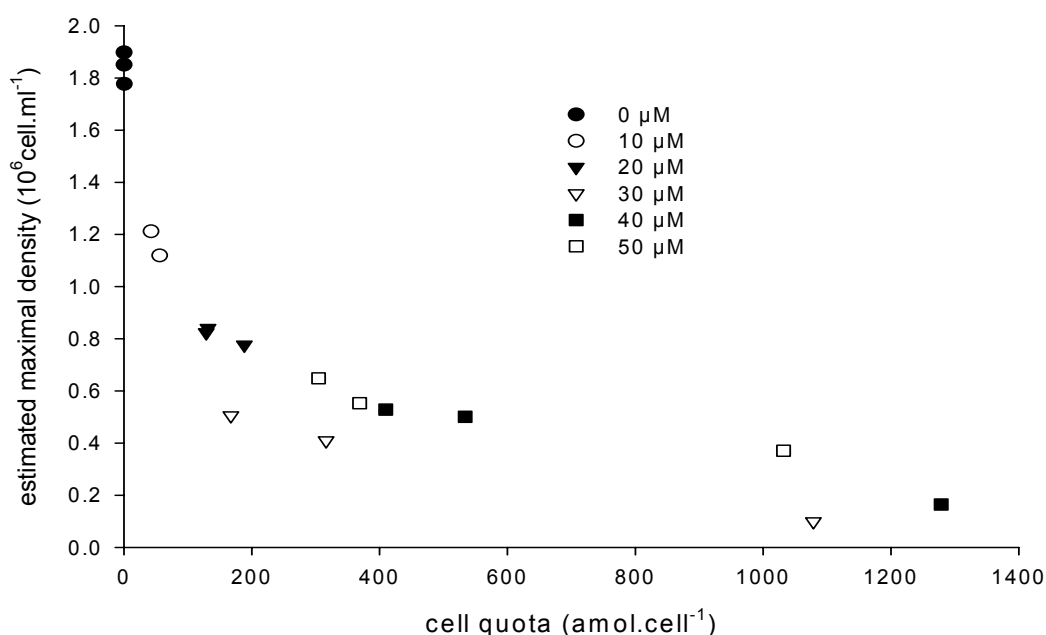


Fig 2. Estimated maximal densities plotted against measured intracellular contents.

CONCLUSION

As expected, Se bioaccumulation and toxicity increase with ambient selenite concentrations. However, when ambient Se reaches critical values, large variability in algal response is observed from one replicate to the other. Yet, we showed that intracellular quotas and estimated maximal density are well correlated. Thus, when faced to a high contamination pressure, it seems that in some of the batches algae accumulate a lot and do not grow well, while in others they accumulate less and grow better. The reasons for this variability are not clear. It has been suggested that a physiological adaptation of algae to high selenite concentrations may occur (Wrench, 1978; Bennet, 1988). It may be possible that this adaptation occurs randomly, which could explain the high variability observed.

Acknowledgments

We are grateful to Virginie Camilleri, Isabelle Cavalie and Daniel Orjollet for their technical assistance on inductively coupled plasma optical emission spectrometry, flow-through hydride generation atomic absorption spectrometry and ionic chromatography respectively. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

1. Fan, T.W.M., et al., *Aquat. Toxicol.* **57** (2002) 65-84.
2. USEPA, *Report on the Peer Consultation Workshop on Selenium Aquatic Toxicity and Bioaccumulation*. 1998, USEPA.
3. Hamilton, S.J., *Aquat. Toxicol.* **57** (2002) 85-100.
4. Lemly, A.D., *Ecotox. Environ. Safe.* **59** (2004) 44-56.
5. Hamilton, S.J., *Sci.Total. Environ.* **326** (2004) 1-31.
6. Besser, J.M., et al., *Environ. Toxicol. Chem.* **12** (1993) 57-72.
7. Zhang, G.H., et al., *Marine Environ. Res.* **30** (1990) 179-190.
8. Vandermeulen, J.H. and A. Foda, *Mar. Biol.* **98** (1988) 115-123.
9. Wrench, J.J., *Nature* **299** (1982) 431-433.
10. Kiffney, P. and A. Knight, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19** (1990) 488-494.
11. Boisson, F., et al., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28** (1995) 487-493.
12. Li, Z.Y., et al., *Bioresource Technol.* **89** (2003) 171-176.
13. Morlon, H., et al., *Aquat. Toxicol.* (submitted).
14. Brown, T.A. and A. Shrift, *Biol. Rev.* **57** (1982b) 59-84.
15. Stadtman, T.C., *Annu. Rev. Biochem.* **49** (1980) 93-110.
16. Pilon, M., et al., *Plant Physiol.* **131** (2003) 1250-1257.
17. Delignette-Muller, M.L., *Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes*, in *Laboratoire de Biométrie-Génétique et Biologie des Populations*. 1995, Université Claude Bernard LYON1: Lyon.
18. Vindimian, E., *REGTOX: macro ExcelTM for dose-response modelling*. 2003.
19. Dutel, L., *Bioaccumulation de l'uranium chez une algue verte unicellulaire: Adsorption et Absorption*. 2000-2001, IPSN. p. 35.
20. Fortin, C. and P.G.C. Campbell, *Environ. Toxicol. Chem.* **19**(11) (2000) 2769-2778.
21. Bennet, W.N., *Wat. Res.* **22**(7) (1988) 939-942.
22. Wrench, J.J., *Mar. Biol.* **49** (1978) 231-236.

3.3.3. Effet du sulfate sur la bioaccumulation à long terme du sélénite

3.3.3.1. Introduction

Nos études sur le transport à court terme du sélénite ont montré une inhibition significative de sa prise en charge par le sulfate, ce qui n'avait jamais été montré auparavant (cf. chapitre 3.1). Le but de cette expérience est de tester si l'inhibition du taux de transport initial, obtenue dans un milieu simplifié (milieu sans phosphate et sans métaux traces) avec des temps d'exposition courts (<1 h), se répercute sur la bioaccumulation de l'élément dans des conditions plus réalistes d'un point de vue environnemental, notamment avec des temps d'exposition plus longs (96 h).

3.3.3.2. Matériel et méthode

Nous avons utilisé la méthode expérimentale décrite au chapitre 2.3.1. Des cellules ont été inoculées à $2500 \text{ cell.mL}^{-1}$ dans des milieux contaminés à 500 nM de sélénite, avec des concentrations croissantes en sulfate. Les résultats des expériences à durée d'exposition courte (<1 h) montrent que la diminution la plus importante du taux de transport a lieu pour des concentrations en sulfate faibles (<8 μM). Les concentrations en sulfate que nous avons choisi pour cette expérience à durée d'exposition longue (96 h) étaient de 0,8, 8, 80 et 800 μM .

Dans notre milieu de culture habituel, la concentration en sulfate était de 80 μM . Une expérience précédente nous avait montré que la croissance n'était pas affectée par une diminution des concentrations de sulfate à 8 μM . Par contre, à la concentration testée la plus faible (0,8 μM), on ne savait pas si les algues étaient carencées. Nous avons donc suivi en parallèle la croissance algale dans deux milieux contrôles, avec des concentrations en sulfate de 80 μM et 0,8 μM .

Le niveau de sélénite que nous avons utilisé (500 nM) correspond à une concentration n'induisant *a priori* pas d'inhibition de croissance (cf chapitre 3.2 ou chapitre 3.3). Le pH a été ajusté à 7 de façon quotidienne. Les densités cellulaires ont également été mesurées de façon quotidienne. En fin de croissance, les cellules ont été récupérées par centrifugation et le sélénium intracellulaire a été déterminé (cf. chapitre 3.3.3).

3.3.3.3. Résultats et discussion

Les croissances algales obtenues pour les différentes conditions d'exposition sont reportées dans la figure 3.1.

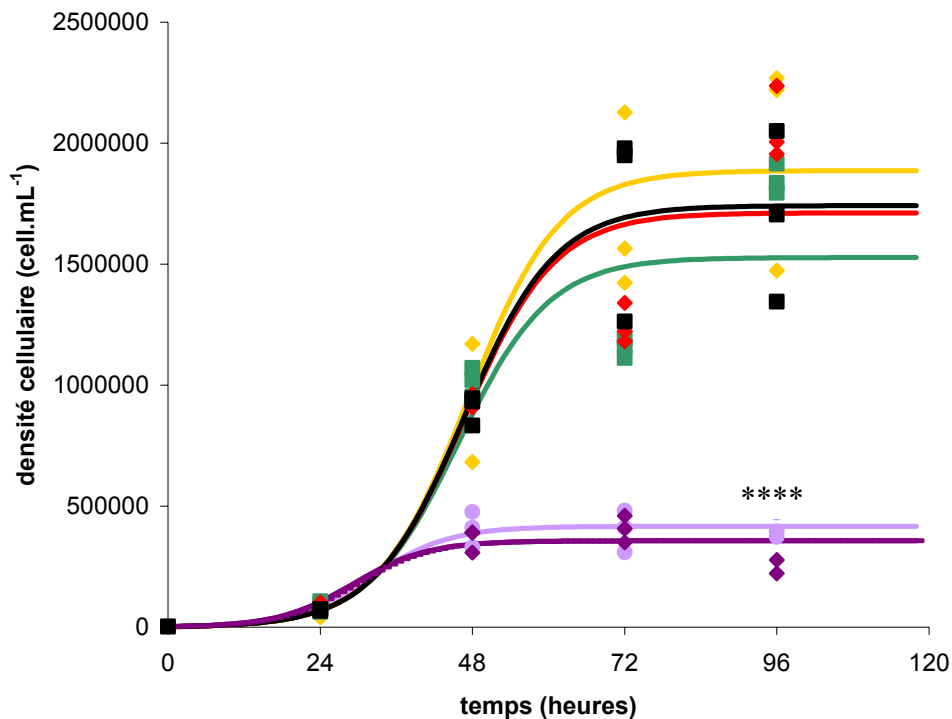


Fig 3.1 Croissances algales obtenues pour les milieux contrôles, avec des concentrations en SO_4 de $0,8 \mu M$ et $80 \mu M$ et pour les milieux contaminés à $500 nM$ Se, avec des concentrations en SO_4 de $0,8$, 8 , 80 et $800 \mu M$. **** : $p < 5.10^{-5}$). Les courbes tracées pour support visuel ont été obtenues par ajustement des données au modèle de Delignette-Muller (cf chapitre 2.3.4).

Pour des concentrations en sulfate de $0,8 \mu M$, la croissance est fortement diminuée (facteur proche de 4, test LSD, $p < 0,00005$), ce qui montre que dans ces conditions, les cellules sont carencées. Comme attendu, le sélénium à $500 nM$ n'induit pas d'inhibition de croissance.

La quantité de sélénite bioaccumulée, mesurée après 96 heures de croissance et ramenée à la surface algale (ainsi exprimée en $nmol.m^{-2}.nM^{-1}$) est reportée dans la figure 3.2.

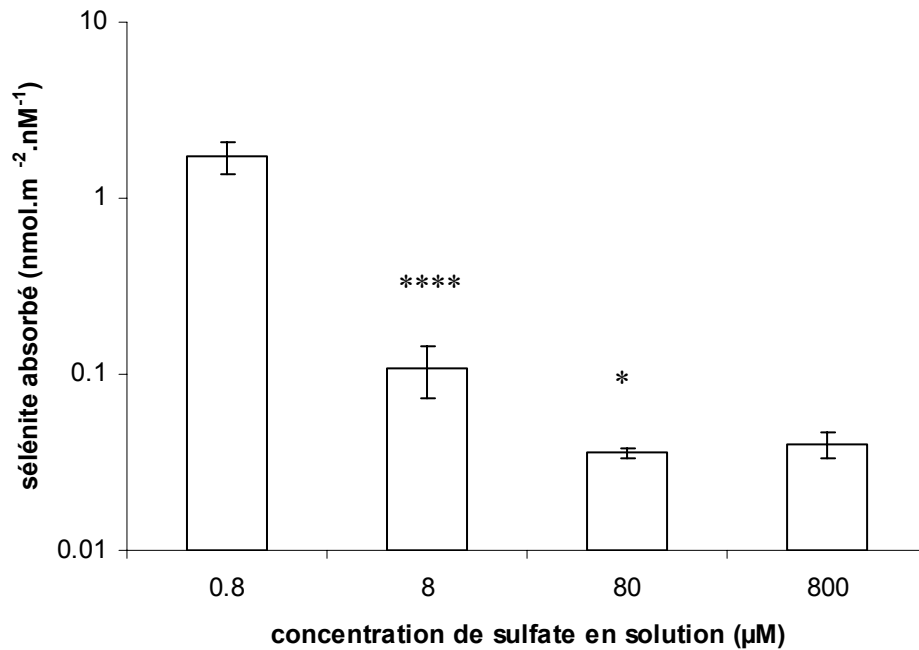


Figure 3.2 Sélénite absorbé en fonction de la concentration de SO_4 en solution $[Se]=500$ nM. $pH=7$. Les étoiles représentent la significativité par rapport à la concentration inférieure (**** : $p < 5.10^{-5}$. * : $p < 5.10^{-2}$) ($n=3$).

L'inhibition de l'accumulation par le sulfate est significative (ANOVA, $p < 0,05$). L'effet le plus marqué a lieu à faibles concentrations en sulfate (entre 0,8 et 8 µM, test LSD, $p < 0,00005$), comme c'est le cas sur des durées d'exposition courtes. La diminution de la prise en charge est encore significative pour une augmentation de la concentration en sulfate de 8 à 80 µM (test LSD, $p < 0,05$). Par contre, il n'y a pas de différence significative entre des traitements à 80 et 800 µM de sulfate (test LSD, $p > 0,05$). A la concentration la plus faible (0,8 µM), le milieu est carencé; il s'agirait donc plus d'une accumulation accrue lorsque les cellules sont carencées en sulfate que d'une inhibition à fortes concentrations. Dans cet état de carence, l'état physiologique des algues peut être modifié, et il faut donc rester vigilant quand aux conclusions tirées. Notons également que l'inhibition de la prise en charge du sélénite par le sulfate n'est pas complète, même à des concentrations élevées en sulfate.

L'importante bioaccumulation du sélénite, à des concentrations en sulfate qui correspondent à un milieu carencé, peut être expliquée de plusieurs façons :

- (i) La carence se répercute sur la croissance avec des densités cellulaires très nettement diminuées. Or on sait que la densité cellulaire peut avoir un fort impact sur l'accumulation. Par exemple, l'accès à la lumière (qui

conditionne l'activité photosynthétique et donc en partie le pouvoir réducteur de la cellule) peut être nettement réduit quand les densités cellulaires sont élevées, induisant une accumulation moindre. Le relargage d'exsudats à fortes densités cellulaires peut également induire une diminution de la biodisponibilité de l'élément. Enfin, le ratio élément/algues, comparativement plus élevé lorsque les densités cellulaires sont faibles, peut favoriser l'internalisation.

- (ii) Il se peut également que les cellules affaiblies par une déficience en soufre soient moins à même de réguler leur concentration interne en sélénite et accumulent plus.
- (iii) Enfin, l'hypothèse la plus probable est que le sélénite soit assimilé «en remplacement» du sulfate, par mimétisme chimique, quand les concentrations en sulfate sont faibles. En effet, les résultats que nous avons obtenus à court terme indiquent que le sélénite pourrait au moins en partie être assimilé par les voies de transport du sulfate, en particulier lorsque les concentrations en ce nutriment sont faibles (cf. chapitre 3.1). Il est par ailleurs connu que le métabolisme du sélénium est étroitement lié à celui du soufre (Wrench, 1978; Pilon-Smits *et al.*, 1999). Enfin, il a été montré que des cellules carencées en sulfate pouvaient s'adapter en améliorant l'efficacité de la prise en charge. C'est le cas chez *C. reinhardtii*, qui accroît son flux d'internalisation et synthétise des protéines périplasmiques en réponse à une déficience en soufre (Davies *et al.*, 1994; Yildiz *et al.*, 1994). De même, chez *Chlorella ellipsoïda*, une carence en sulfate déclenche rapidement l'induction d'un transport d'affinité et de vitesse maximale environ cinq fois supérieures à celles du transport habituel. Weiss (2001) a également montré chez *Dunaliella salina* une stimulation de la prise en charge d'un facteur 2,5 dans un milieu carencé. Si un tel mécanisme se met en place dans nos conditions d'exposition « carencées » en sulfate, le sélénite, internalisé par analogie avec le sulfate, pourrait également être pris en charge de façon plus active.

3.3.3.4. Conclusion et conséquences pour l'environnement

Nous avons montré que la bioaccumulation du sélénite après 96 heures d'exposition était accrue à faible concentration en sulfate (0,8 μM) chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous avons ainsi confirmé pour des durées d'exposition plus longues un résultat déjà obtenu sur

des durées d'exposition courtes et qui n'avait à notre connaissance jamais été montré auparavant.

Ceci peut avoir d'importantes conséquences sur le plan environnemental. Par exemple, la concentration élevée en sulfate présente dans certains effluents miniers pourrait nuancer l'impact du sélénium sur le phytoplancton. Toutefois, pour les expositions de courte durée comme pour les expositions de durée plus longue, même des concentrations élevées en sulfate n'inhibent pas totalement l'accumulation du sélénite. Le rôle du sulfate dans l'impact environnemental du sélénite serait plutôt visible dans les eaux carencées en sulfate, dans lesquelles la bioaccumulation et en conséquence les effets, pourraient être plus importants. La bioaccumulation et les effets du sélénite pourraient être sous-estimés dans les expériences en laboratoire, pour lesquelles des concentrations élevées en nutriment sont généralement utilisées.

3.3.4. Ordre de grandeur du facteur de concentration du sélénite et comparaison avec d'autres éléments

Les mesures que nous avons réalisées afin de suivre la biomasse algale étaient des mesures de densités cellulaires et de diamètre algal. Ces mesures nous ont permis d'exprimer « directement » la bioaccumulation en mole de sélénium par cellule algale ou par m² de surface algale. Cependant, ce mode d'expression ne permet pas d'avoir une idée du pouvoir de bioaccumulation de l'organisme. Nous avons donc estimé un BCF (Biological Concentration Factor) défini par $BCF = \frac{[Se]_{organisme}}{[Se]_{eau}}$, ou [Se]_{organisme} est exprimée en mole de sélénium par gramme de poids sec. Disposant du rayon algal, nous avons estimé le poids sec d'une algue. Nous avons pour cela choisi pour le ratio $\frac{poids_sec}{poids_humide}$ chez

Chlamydomonas reinhardtii la valeur 0,12⁶. Nous avons ensuite considéré que le poids d'une algue était celui de l'eau qu'elle contenait, et avons donc choisi la valeur 1,03 g.mL⁻¹ pour la densité volumique. Le poids sec (exprimé en g) d'une algue de rayon algal r (exprimé en m) est alors donné par l'équation 3.1:

$$poids_sec = 0,12 * 1,03 * \frac{4}{3} * \pi * r^3 * 10^6 \quad (3.1)$$

Le BCF ainsi calculé varie entre 690 et 7 100 pour l'expérience décrite dans l'article « Cellular burdens and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* ». Pour ce qui est de l'expérience d'inhibition par le sulfate, à

⁶ Celle-ci a été calculée à partir de la valeur de 58.10⁻¹² g.cell⁻¹ (poids sec) trouvée dans la littérature (Porter *et al.*, 1982)

la concentration habituellement utilisée dans nos expériences (80 μM SO_4), le BCF varie entre 4 200 et 5 400. Il atteint même une valeur de 270 000 pour la concentration en sulfate la plus faible (0,8 μM). Ces valeurs se situent dans la gamme de celles rapportées dans la littérature, qui sont très variables : Besser (1993) a trouvé des valeurs variant entre 440 et 1 600 pour la même espèce, Kiffney et Knight (1990) des valeurs variant entre 250 et 1000 pour *Anabaena flos -aquae*, et enfin Zhang (1990), des valeurs variant entre 8 000 et 18 000 pour *Skeletonema costatum*, entre 5 000 et 337 000 pour *Chaetoceros muelleri*, et enfin entre 4 000 et 45 000 pour *Phaedodactylum tricorutum*.

A titre de comparaison, des valeurs de facteurs de concentration (convertis en poids sec) chez *Scenedesmus obliquus* pour le cobalt, l'argent, et le manganèse de 4 564, 7 791, et 12 770 respectivement ont été trouvées ; chez *Cyclotella meneghiana*, les valeurs correspondantes sont de 19 040, 12 325 et 82 705 (Adam et Garnier-Laplace, 2000).

Les facteurs de concentration que nous avons estimés sont donc élevés, du même ordre de grandeur que ceux trouvés pour d'autres métaux. Ceci est en accord avec les résultats de Yu et Wang qui ont trouvé chez *Scenedesmus obliquus* (Yu et Wang, 2004a) et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Yu et Wang, 2004b) une accumulation du sélénium du même ordre de grandeur que celle du cadmium et du zinc, ou encore avec ceux de Wang et Dei (2001a), avec, chez quatre espèces marines, des facteurs de concentration variant entre 2 000 et 20 000, semblables à ceux du cadmium et seulement légèrement inférieurs à ceux du zinc. Ces mêmes auteurs ont trouvé dans une autre étude sur trois espèces d'algues marines le même ordre de grandeur d'accumulation pour le sélénite, et une accumulation inférieure pour le chromate (Wang et Dei, 2001b).

Ces facteurs de concentration élevés pour le sélénite montrent que le flux important trouvé lors des expositions à court terme se répercute sur une prise en charge conséquente pour des durées d'exposition plus longues. Ceci confirme le rôle bioaccumulateur du phytoplancton dans les écosystèmes aquatiques pour le sélénium.

3.3.5. Principales avancées et conclusion

Ces études visaient à acquérir des connaissances relatives à la bioaccumulation à long terme du sélénite. Elles nous ont fourni les résultats suivants :

1. Estimation du la bioaccumulation et lien entre bioaccumulation et toxicité :

Nous avons trouvé une capacité d'accumulation importante : la valeur maximale à 96 h est de plus de 1000 amol par cellule, atteinte pour des concentrations de l'ordre de 40 μM et le BCF varie entre 690 et 7 100. Ces capacités d'accumulation sont du même ordre de

grandeur que celles proposées par d'autres auteurs (Kiffney et Knight, 1990; Zhang *et al.*, 1990; Besser *et al.*, 1993). Toutefois, nous avons obtenu une importante variabilité d'un batch à l'autre (CV~40%) pour des concentrations ambiantes atteignant des niveaux toxiques, soit 30-50 μM . De même, pour une même concentration d'exposition, nous avons observé des effets d'inhibition sur la croissance très variables. Etudiant la corrélation entre densité maximale atteinte et bioaccumulation, nous avons pu constater qu'elle était très bonne ($r=-0,95$), meilleure que la simple corrélation entre toxicité et concentration ambiante ($r=-0,84$). La toxicité serait donc étroitement liée aux teneurs intracellulaires, ce qui suggère que les effets du sélénite sur la croissance sont une conséquence de la présence de l'élément dans le milieu intracellulaire plutôt qu'à l'interface entre le milieu extérieur et la membrane plasmique -qui pourrait par exemple perturber les échanges ioniques entre les milieux extra- et intra- cellulaires. Nous n'avons par contre pas d'éléments pour expliquer la forte variabilité observée.

2. Impact du sulfate sur la bioaccumulation à long terme du sélénite :

L'inhibition de la prise en charge du sélénite par le sulfate que nous avons observée sur des durées d'exposition courtes (<1 h) (cf chapitre 3.1) se répercute sur la bioaccumulation avec des durées d'exposition plus longues (96 h). La concentration en sulfate serait donc un facteur déterminant dans le cycle bio-géochimique du sélénite, avec, dans des milieux pauvres en sulfate, une accumulation accrue par le phytoplancton, et donc potentiellement un transfert plus important dans la chaîne trophique.

4. CONCLUSION GENERALE

4.1. Résumé des principaux résultats obtenus

Le but de nos recherches était de comprendre les mécanismes de prise en charge, bioaccumulation et toxicité du sélénite Se(+IV) chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous nous sommes pour cela appuyés, dans un premier temps, sur une approche « théorique » des mécanismes mis en jeu lors de l'exposition d'un organisme à un métal/métalloïde. Nous avons ensuite mené un ensemble d'études expérimentales reposant sur des expositions de courte (<1 h) ou longue (96 h) durée à différentes gammes de concentrations de sélénite dans le milieu extérieur. Les mécanismes supportés par les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans la figure 4.1.

4.1.1. Résultats concernant le transport membranaire

L'originalité de nos recherches concernant le transport membranaire du sélénite a été d'intégrer dans une même étude globale, sur le même organisme et dans les mêmes conditions d'expérimentation, les différents aspects de la prise en charge : distinction entre adsorption et absorption, dépendance vis-à-vis du temps, de la concentration ambiante, des concentrations en différents macro-nutriments, et enfin du pH. Les différents résultats que nous avons obtenus nous permettent de proposer plusieurs interprétations des interactions entre le sélénite et *C. reinhardtii* et des mécanismes de transport trans-membranaire:

- Peu de sélénium est adsorbé à la surface cellulaire : la majorité de l'élément est présent dans le milieu intra-cellulaire (Figure 4.1a).
- La prise en charge du sélénite est assurée par deux systèmes de transport membranaire distincts (Fig 4.1b et 4.1c) :

Un premier de haute affinité (Fig 4.1b), qui pourrait être un système de transport spécifique au sélénite, permet une internalisation rapide et intense ($\sim 2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$) quand les concentrations extra-cellulaires sont faibles ($\sim 0,5 \text{ nM}$). Les transporteurs mis en jeu sont peu nombreux et ils saturent rapidement quand la concentration augmente.

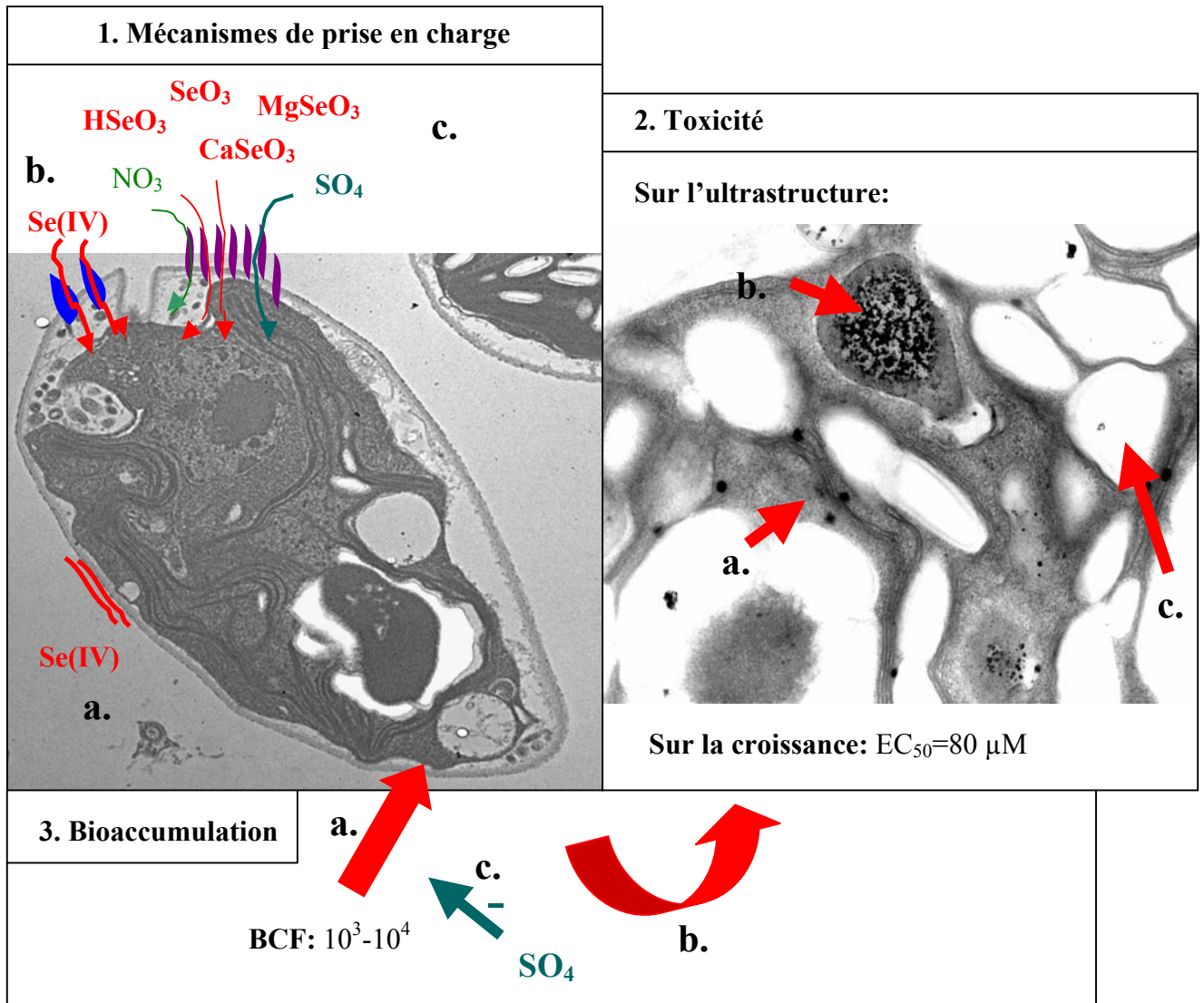


Figure 4.1. Représentation schématique des mécanismes de transport (1), toxicité (2) et bioaccumulation (3) du sélénite supportés par les résultats obtenus suite aux différentes études expérimentales menées. 1.a. adsorption négligeable devant l'absorption b. transporteurs peu nombreux de forte affinité (mis en évidence à des concentrations ~ nM) c. transporteurs nombreux de faible affinité en commun avec sulfate et nitrate (mis en évidence à des concentrations > μM) ; peu d'effet de la spéciation. 2. effets sur l'ultrastructure a. atteinte aux chloroplastes b. formation de granules riches en phosphore contenant du sélénium (mécanisme de détoxification ?) c. hyper-accumulation d'amidon ; effets sur la croissance (LOEC = 50 μM ; EC₅₀= 80 μM). 3.a. importante bioaccumulation (BCF : 690 - 7 100 -poids sec-) b. effet sur la croissance fortement corrélé à la bioaccumulation c. bioaccumulation inhibée par le sulfate.

Un deuxième système de transport (Figure 4.1c), ne saturant qu'à de très fortes concentrations (~mM), est caractérisé par des constantes de demi-saturation et des vitesses maximales élevées, ce qui suggère l'intervention de transporteurs nombreux et peu spécifiques. Ils assurent un flux d'internalisation maximum estimé à $0,2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour une large gamme de concentrations intermédiaires ($5 \text{ nM} \rightarrow 2,5 \text{ }\mu\text{M}$), le flux diminuant ensuite avec la concentration d'exposition pour la gamme d'exposition testée, allant jusqu'à 5 mM. Le sélénite est en compétition pour ce système de transport avec le sulfate et le nitrate ; les transporteurs mis en jeu pourraient être les transporteurs de faible affinité de ces deux éléments. La spéciation chimique du sélénite a apparemment peu d'effet sur la prise en charge, ce qui pourrait être lié à la faible spécificité des transporteurs.

La faible adsorption ainsi que la prise en charge par les transporteurs de faible affinité des nutriments anioniques sont en accord avec les mécanismes généraux pouvant être attendus quant à la prise en charge des oxyanions.

4.1.2. Résultats concernant la toxicité

L'originalité de nos recherches concernant la toxicité du sélénite a été de suivre en parallèle la toxicité sur la croissance et au niveau sub-cellulaire, en utilisant la microscopie électronique à transmission pour analyser les atteintes ultra-structurales. Le couplage à la spectrométrie par dispersion en énergie a permis de rechercher d'éventuelles structures de stockage, ce qui n'avait à notre connaissance encore jamais été fait.

Nous avons estimé une EC_{50} sur les densités maximales atteintes à 96 h de $80 \text{ }\mu\text{M}$ (milieu non carencé en nutriment), ce qui confirme la tolérance des cellules algales à de fortes concentrations en sélénite. Nous avons montré que l'effet sur la croissance était lié à un arrêt prématuré de la phase exponentielle de croissance, plutôt qu'à une diminution du taux de croissance, ce qui a habituellement lieu lors d'une carence en nutriment. Nous avons par ailleurs montré que les premiers effets visibles au niveau sub-cellulaire apparaissent aux mêmes concentrations que les premiers effets significatifs observés sur la croissance, ce qui suggère que l'inhibition de croissance puisse être liée aux atteintes ultrastructurales.

Les effets sur l'ultra-structure des cellules algales sont dirigés en premier lieu vers le chloroplaste (Figure 4.2a) : le stroma devient granuleux et moins dense, les thylakoïdes prennent une allure d'empreinte, et le pyrénoloïde est réduit. La photosynthèse pourrait être une des premières cibles du sélénite.

Aux concentrations plus élevées, les algues accumulent de l'amidon de façon anormale (Fig 4.2c). La sur-production d'amidon est une marque de stress chez les végétaux et peut

en particulier avoir lieu lors de carences en nutriments. Dans notre cas, étant donné l'antagonisme entre sélénite et sulfate que nous avons mis en évidence, la sur-production d'amidon pourrait être liée à une carence en sulfate. Ceci serait cohérent avec la forme de l'inhibition de croissance (arrêt prématuré de la division cellulaire observée sur les courbes de croissance), en général attribuée à une déficience en nutriment.

Enfin, des granules denses contenant du sélénium et riches en phosphore et calcium ont été mis en évidence dans le cytoplasme d'algues exposées à 500 μM de sélénite (Figure 4.2b). Ces granules pourraient être des granules de phosphate, qui apparaissent classiquement en réponse à certaines contaminations métalliques. C'est à notre connaissance la première fois que ce type de granules est observé après une exposition au sélénite. Jusqu'à présent, le rôle des granules de phosphate rapporté dans la littérature est un rôle de complexant pour les contaminants formant des cations, et il est donc surprenant de les observer suite à une exposition au sélénite.

4.1.3. Résultats concernant la bioaccumulation

Aux niveaux de sélénite exerçant une toxicité sur les algues, la relation entre concentration ambiante et bioaccumulation est complexifiée par l'importante variabilité observée d'un « batch » à l'autre. La bioaccumulation est toutefois relativement importante, avec une valeur maximale à 96 h de plus de 1000 amol par cellule, atteinte pour des concentrations de l'ordre de 40 μM et un BCF (exprimé sur la base du poids sec) variant entre 690 et 7 100. Nous avons montré que la toxicité était fortement corrélée à la bioaccumulation, avec une corrélation meilleure que celle entre concentration ambiante et toxicité, ce qui suggère que la toxicité est liée à des effets intra-cellulaires plutôt qu'à des effets de surface. Ceci est en accord avec les impacts que nous avons pu observer sur l'ultra-structure. Une fois dans le milieu intra-cellulaire, le sélénium pourrait causer des dommages aux structures cellulaires, en particulier aux chloroplastes, ce qui se répercuterait ensuite sur la division cellulaire. Nous avons également montré que l'inhibition de la prise en charge du sélénite par le sulfate, que nous avons mise en évidence sur des temps d'exposition courts (<1 h), était confirmée sur des temps d'exposition plus longs (96 h). Dans les deux cas, et plus particulièrement pour des temps d'exposition longs, l'effet du sulfate se traduirait plus par une prise en charge accrue dans les milieux carencés en sulfate que par une inhibition à fortes concentrations en sulfate.

4.2. Perspectives

L'ensemble des résultats acquis lors des différentes expériences menées avec le sélénite conduit à de nombreuses perspectives de recherche, dans le but d'approfondir les connaissances sur les mécanismes mis en jeu, d'aborder d'autres aspects relatifs à la

bioaccumulation et à la toxicité du sélénium à l'égard des algues phytoplanctoniques, et enfin d'élargir le champ d'investigation dans une approche environnementale, à l'échelle systémique.

4.2.1. Concernant les mécanismes de transport membranaire

Etude du transport de haute affinité mis en évidence à faibles concentrations

Nous avons mis en évidence l'existence d'un système de transport du sélénite de haute affinité, pour de faibles concentrations dans le milieu extérieur. Dans les écosystèmes naturels, où les niveaux de concentration sont de l'ordre du nM, le rôle de ce système de transport dans le cycle biogéochimique du sélénite pourrait être prépondérant par rapport au rôle des transporteurs mis en jeu à plus fortes concentrations. Il serait donc particulièrement intéressant de mener des études similaires à celles que nous avons abordées (caractérisation du transport par une approche Michaelienne, expériences d'inhibition compétitive, étude de l'impact de la spéciation) à faible concentration ambiante. Les paramètres physico-chimiques qui influent alors sur le transport pourraient être différents de ceux que nous avons observés. Etant donné le caractère essentiel du sélénium et les faibles concentrations pouvant être trouvées dans l'environnement, il ne serait pas surprenant que le système de transport soit spécifique au sélénite. Cependant, si l'existence d'un transport spécifique au sélénite a été démontré chez *Escherichia coli* (Brown et Shrift, 1982a), ceci n'a à notre connaissance jamais été fait chez les algues. Des expériences complémentaires pourraient permettre de tester la spécificité du transport mis en évidence. Si le transport s'avère spécifique, la spéciation chimique, et donc le pH, pourraient avoir une influence majeure, ce qui n'est pas le cas aux concentrations auxquelles nous avons travaillé.

Etude du lien entre spéciation chimique et prise en charge d'éléments formant des oxyanions

Nous avons montré que la spéciation du sélénite avait peu d'effet sur sa prise en charge lorsque les concentrations dans le milieu extérieur sont élevées ; nous avons attribué ceci à la faible spécificité des transporteurs mis en jeu. Le transport d'oxyanions par les transporteurs peu spécifiques des nutriments anioniques pouvant être un mécanisme général, le faible effet de la spéciation pourrait l'être aussi pour ces catégories d'éléments. Des recherches sur le lien entre spéciation et bioaccumulation pour d'autres éléments formant des oxyanions permettraient de tester cette hypothèse.

4.2.2. Concernant les mécanismes de toxicité et bioaccumulation

Test de l'inhibition de la prise en charge du sulfate par le sélénite

L'arrêt précoce du processus de division cellulaire, la surproduction d'amidon, ainsi que l'accumulation de phosphore (supposé être du phosphate), pourraient être la conséquence d'une déficience nutritive. Il est possible que le sélénite à fortes concentrations puisse inhiber le transport du sulfate et ainsi créer une carence en ce nutriment, responsable des effets observés. Afin de tester cette hypothèse, on pourrait envisager d'étudier l'influence de concentrations croissantes en sélénite sur le transport du sulfate à court terme (<1 h) et sur des durées d'exposition plus longues (96 h).

Etude de l'effet des concentrations en sulfate sur la toxicité du sélénite

Nous avons montré d'une part, une inhibition de la prise en charge du sélénite par le sulfate, et, d'autre part, une forte corrélation entre bioaccumulation et toxicité. Il se pourrait donc que la toxicité soit moindre dans les eaux riches en sulfate. Etant donnée la large gamme de concentrations de sulfate pouvant être trouvée dans l'environnement, il serait intéressant, d'un point de vue opérationnel, de tester cette hypothèse. Au niveau expérimental, afin de respecter le ratio Se/SO₄ pour lequel la prise en charge du sélénite est inhibée de manière significative sans utiliser des concentrations en sulfate aberrantes, il faudrait disposer d'une mesure de toxicité plus sensible que la croissance algale.

Recherche d'outils plus précoces et plus précis de mesure de la toxicité

Nos résultats montrent que la première cible du sélénite sur l'ultra-structure est le chloroplaste. Des mesures liées à la photosynthèse comme celles de la fluorescence, ou encore de l'activité des photosystèmes permettraient certainement d'obtenir des outils plus précoces et plus sensibles de la toxicité.

Recherches concernant les granules denses riches en phosphore contenant du sélénium

Nous avons pour la première fois chez le phytoplancton observé la formation de granules contenant du sélénium, et ils ne sont *a priori* pas de même nature que ceux qui ont été observés chez plusieurs bactéries. En effet, dans le cas des bactéries, les granules sont formés de précipités de sélénium élémentaire, alors que dans notre cas, ils ressemblent plutôt aux granules de phosphate et calcium généralement observés comme mécanisme de détoxification dans le cas de métaux formant des cations. Cette observation est donc à la fois originale et surprenante. Elle pose de nombreuses questions quant aux conditions d'apparition, aux mécanismes de formation et au rôle des granules qui sont autant de pistes d'investigation. Il se pourrait que la présence simultanée de sélénium et de phosphate vienne de la formation de sélénophosphate ; ce mécanisme est utilisé afin de prévenir

l'incorporation de sélénocystéine dans les protéines (Müller *et al.*, 1997; Lacourciere *et al.*, 2000; Lacourciere et Stadtman, 2001). Il est également possible que les granules soient formés pour stocker le phosphate excédentaire si les cellules ne sont plus capables de se diviser, et que le sélénite soit accumulé par analogie avec le phosphate.

Vers des conditions d'exposition plus proches de celles rencontrées dans l'environnement

Nous avons étudié le transport à court terme (<1 h) du sélénite et la bioaccumulation sur 96 h. L'étape suivante, pour travailler dans des conditions plus réalistes d'un point de vue environnemental, serait de mener des expériences en turbidostat en injectant du milieu « frais » quand la densité algale dépasse une valeur seuil fixée au préalable ; les cellules seraient ainsi maintenues à densité constante et en phase exponentielle de croissance. Cette technique permettrait d'estimer la quantité de sélénium accumulée par les cellules algales dans un état d'équilibre. Nous avons par exemple montré que le sulfate inhibe le transport du sélénite sur des expositions de courte durée et que ceci se traduit par une bioaccumulation réduite sur des temps d'exposition plus longs. Etudier l'effet du sulfate sur la bioaccumulation en turbidostat serait une suite logique aux expériences que nous avons menées.

Vers une modélisation des flux opérationnels

Dans les études à court terme (<1 h), nous avons étudié la relation entre plusieurs facteurs (temps, concentrations ambiantes, concentrations en différents nutriments, pH) et l'internalisation du sélénite. Ceci nous a permis de proposer des mécanismes de prise en charge ainsi que d'identifier les paramètres susceptibles d'avoir une influence sur l'accumulation de l'élément. Disposant de ces éléments, il serait intéressant, dans un objectif opérationnel de modélisation des flux dans les eaux de surface oxygénées, de mettre en place des relations mathématiques entre les paramètres d'intérêt et la bioaccumulation à plus long terme. Ceci pourrait être fait en mesurant la bioaccumulation après 96 h de croissance en batch, ou mieux après l'obtention d'un état d'équilibre en culture continue en turbidostat.

4.3. Conséquences pour l'environnement et exploitation opérationnelle des résultats

Nos résultats confirment que les algues ont une importante capacité d'accumulation du sélénite, avec un effet sur la biomasse ayant lieu à des concentrations peu susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement. Ainsi, le sélénite n'aurait pas d'effet direct sur la biomasse algale, mais le phytoplancton jouerait le rôle de vecteur de la colonne d'eau vers

les organismes de niveau trophique supérieur ou vers les sédiments. Le pool algal est maintenu, assurant le rôle de producteur primaire, tandis que la teneur en sélénite de ce pool est largement augmentée, ce qui explique l'importance de la voie trophique dans l'écotoxicité du sélénite.

Notons que si l'hyper-accumulation d'amidon liée à la présence de sélénite est un phénomène qui a lieu dans l'environnement, ceci pourrait éventuellement avoir des conséquences sur l'apport nutritif des algues aux organismes phytophages.

Nous avons montré que le flux de sélénite pouvait être supérieur à faible concentration ambiante, avec un flux maximal supérieur d'un facteur 10 lorsque les concentrations d'exposition sont de l'ordre du nM par rapport à des concentrations de l'ordre du μM , en raison de l'existence d'un transport de haute affinité. De même, le flux est supérieur à faibles concentrations en sulfate, en raison d'une compétition entre sélénite et sulfate pour les transporteurs partagés. Ainsi, les flux vers le compartiment phytoplanctonique pourraient être sous-estimés dans des expériences en laboratoire dans lesquelles les concentrations en sélénite et les concentrations en nutriments utilisées sont généralement élevées.

Dans les tests classiques en écotoxicologie, il est en général demandé de mesurer la concentration ambiante en contaminant, et non la quantité de contaminant bioaccumulée par l'organisme. Nous avons montré dans le cas du sélénite et de *Chlamydomonas reinhardtii* que la corrélation entre toxicité et bioaccumulation était meilleure que la simple corrélation entre toxicité et concentration ambiante. Ces résultats rejoignent l'idée de prendre pour le sélénite un critère de toxicité basé sur les concentrations dans les tissus plutôt que sur les concentrations dans l'eau. Ceci pourrait être un phénomène assez général et suggère de rendre systématique l'étape de mesure de la bioaccumulation.

Dans le domaine opérationnel, des modèles sont développés afin de pouvoir prédire les flux et effets des contaminants dans les écosystèmes. Dans le cas du sélénite et de son transfert de la colonne d'eau au compartiment phytoplanctonique, nos résultats suggèrent : *i)* de ne pas se contenter d'utiliser une relation linéaire entre concentration ambiante et quantité accumulée par le phytoplancton, en particulier à des niveaux de contamination de l'ordre du nM ; *ii)* qu'il est indispensable d'intégrer la concentration en sulfate dans la modélisation du cycle biogéochimique du sélénite.

Références

1. Adam, C., Garnier-Laplace, J., 2000. Bioaccumulation of silver-110m, cobalt-60, cesium-137 and manganese-54 by the freshwater algae *Scenedesmus obliquus* and *Cyclotella meneghiana* and by suspended matter collected during a summer bloom event. *Limnol. Oceanogr.* 48, 2303-2313.
2. Amweg, E.L., Stuart, D.L., Weston, D.P., 2003. Comparative bioavailability of selenium to aquatic organisms after biological treatment of agricultural drainage water. *Aquat. Toxicol.* 63, 13-25.
3. Baines, S.B., Fisher, N.S., 2001. Interspecific differences in the bioconcentration of selenite by phytoplankton and their ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 213, 1-12.
4. Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.C., Matagne, R.F., 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66, 1-9.
5. Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C., Amiard-Triquet, C., 1991. Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biol. Cell.* 72, 103-112.
6. Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikine, G., Frachisse, J.M., Maurel, C., 2000. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 199-218.
7. Bebien, M., Chauvin, J.P., Adriano, J.M., Grosse, S., Vermeglio, A., 2001. Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4440-4447.
8. Bennet, W.N., 1988. Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. *Wat. Res.* 22, 939-942.
9. Besser, J.M., Canfield, T.J., La point, T.W., 1993. Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 57-72.
10. Boisson, F., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., 1995. Toxicity and accumulation of selenite and selenate in the unicellular marine alga *Cricosphaera elongata*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 487-493.
11. Brown, T.A., Shrift, A., 1982a. Selective assimilation of selenite by *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 28, 307-310.
12. Brown, T.A., Shrift, A., 1982b. Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol. Rev.* 57, 59-84.
13. Campbell, G.C. (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 et D. R. Turner. New York, John Wiley & Sons. 3: 45-102.
14. Campbell, P.G.C., Errecalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton -applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133, 189-206.
15. Chasteen, T.G., Bentley, R., 2003. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem. Rev.* 103, 1-25.
16. Conde, J.E., Sanz Alaejos, M., 1997. Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chem. Rev.* 97, 1979-2003.

17. Crist, R.H., Oberholser, K., Shank, N., Nguye, M., 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* 15, 1212-1217.
18. Davies, J.P., Yildiz, F., Grossman, A.R., 1994. Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. *Plant Cell* 6, 53-63.
19. De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH. *Environ. Sci. Technol.* 36, 48-54.
20. Delignette-Muller, M.L. (1995). Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Laboratoire de Biométrie-Génétique et Biologie des Populations. Lyon, Université Claude Bernard LYONI.
21. Denison, F. (2002). Application of chemical speciation modelling to uranium toxicity and bioavailability studies: compilation of a coherent database for simple experimental systems and an investigation of the effect of database uncertainty on model predictions. St-Paul-lez-Durance, IRSN.
22. Denison, F. (2004). Uranium(VI) speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. Sciences De L'environnement. Aix Marseille 1, Université de Provence.
23. Doblin, M.A., Blackburn, S.I., Hallegraeff, G.M., 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros cf. tenuissimus* (Bacillariophyta). *J. Plankton. Res.* 21, 1153-1169.
24. Dorgerloh, M. (2004). How to express growth effects on algae under 91/414/EEC? SETAC Europe 2004, Prague.
25. Dutel, L. (2000-2001). Bioaccumulation de l'uranium chez une algue verte unicellulaire: adsorption et absorption. St-Paul-lez-Durance, IPSN.
26. El-Bayoumy, K., 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mut. Res.* 475, 123-139.
27. Elrashidi, M.A., Adriano, D.C., Workman, S.M., Lindsay, W.L., 1987. Chemical equilibria of selenium in soils: a theoretical development. *Soil Sci* 144, 141-152.
28. Essington, M.E., 1988. Estimation of the standard free energy of formation of metal arsenates, selenates, and selenites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 1574-1579.
29. Fan, T.W.M., Lane, A.N., Higashi, R.M., 1997. Selenium biotransformation by a euryhaline microalga isolated from a saline evaporation pond. *Environ. Sci. Technol.* 31, 569-576.
30. Fan, T.W.M., Teh, S.J., Hinton, D.E., Higashi, R.M., 2002. Selenium biotransformation into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat. Toxicol.* 57, 65-84.
31. Floriani, M. (2001). Techniques de microlocalisation d'éléments stables ou radioactifs dans des échantillons biologiques. St-Paul-lez-Durance, IRSN.
32. Fortin, C. (2000). Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Sciences de l'eau. Québec, Université du Québec.
33. Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2769-2778.
34. Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2001. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2214-2218.
35. Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 974-981.

36. Fu, L.H., Wang, X.F., Eyal, Y., She, Y.M., Donald, L.J., Standing, K.G., Ben-Hayyim, G., 2002. A selenoprotein in the plant kingdom. *J. Biol. Chem.* 277, 25983-25991.
37. Garnham, G.W., Codd, G.A., Gadd, G.M., 1992. Uptake of technetium by freshwater green microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 679-684.
38. Gharieb, M.M., Wilkinson, S.C., Gadd, G.M., 1995. Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. *J. Ind. Microbiol.* 14, 300-311.
39. Hall, J., Healey, F.P., Robinson, G.G.C., 1989. The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in two chlorophytes in batch culture. *Aquat. Toxicol.* 14, 1-13.
40. Hamilton, S.J., 2002. Rationale for a tissue-based selenium criterion for aquatic life. *Aquat. Toxicol.* 57, 85-100.
41. Hamilton, S.J., 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci. Total Environ.* 326, 1-31.
42. Hamilton, S.J., Muth, R.T., Waddell, B., May, T.W., 2000b. Hazard assessment of selenium and other trace elements in wild larval razorback sucker from the Green River, Utah. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 132-147.
43. Harris, E.H., 1988. *The Chlamydomonas Sourcebook: A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.* Academic Press, Inc., San Diego.
44. Harrison, P.J., Yu, P.W., Thompson, P.A., Price, N.M., Phillips, D.J., 1988. Survey of selenium requirements in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 47, 89-96.
45. Hodson, P.V., Hilton, J.W., 1983. The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Ecol. Bull.* 35, 335.
46. Hoffman, D.J., Ohlendorf, H.M., Aldrich, T.W., 1988. Selenium teratogenesis in natural populations of aquatic birds in Central California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 519-525.
47. Hu, M., Yang, Y., Martin, J.M., Yin, K., Harrison, P.J., 1996. Preferential uptake of Se(IV) over Se(VI) and the production of dissolved organic Se by marine phytoplankton. *Mar. Environ. Res.* 44, 225-231.
48. Irmer, U., Wachholz, I., Schäfer, H., Lorch, D.W., 1986. Influence of lead on *Chlamydomonas reinhardtii* danegard (volvocales, chlorophyta): accumulation, toxicity and ultrastructural changes. *Envir. Exp. Bot.* 26, 97-105.
49. Kessi, J., Ramuz, M., Wehrly, E., Spycher, M., Bachofen, R., 1999. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4734-4740.
50. Kiffney, P., Knight, A., 1990. The toxicity and bioaccumulation of selenate, selenite and seleno-L-methionine in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 488-494.
51. Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P., Sies, H., 2003. Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 133, 1448S-1451S.
52. Krijger, G.C., Kollöffel, C., Wolterbeek, H.T., 2000. Effect of nitrate on uptake of pertechnetate by tomato plants. *J. Env. Qual.* 29, 866-870.
53. Lacourciere, G.M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N., Stadtman, T.C., 2000. *Escherichia coli* Nifs-like proteins provide selenium in the pathway for the biosynthesis of selenophosphate. *J. Biol. Chem.* 275, 23769-23773.
54. Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C., 2001. Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis. *Biofactors* 14, 69-74.

55. Lair, N., Reyes-Marchant, P., 1997. The potamoplankton of the Middle Loire and the role of the "moving littoral" in downstream transfer of algae and rotifers. *Hydrobiologia* 356, 33-52.
56. Lee, L.H., Lustigman, B.K., Murray, S.R., 2002. Combined effect of mercuric chloride and selenium dioxide on the growth of the cyanobacteria, *Anacystis nidulans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 900-907.
57. Leisinger, U., Rüfenacht, K., Zehnder, A.J.B., Eggen, R.I.L., 1999. Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 149, 139-149.
58. Lemly, A.D., 1999. Selenium impacts on fish : an insidious time bomb. *Human Ecol. Risk Assess.* 5, 1139-1151.
59. Lemly, A.D., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotox. Environ. Safe.* 59, 44-56.
60. Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L., 2003. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technol.* 89, 171-176.
61. Lindström, K., 1983. Selenium as a growth factor for plankton algae in laboratory experiments and in some Swedish lakes. *Hydrobiologia* 101, 35-48.
62. Lortie, L., Gould, W.D., Rajan, S., McCready, R.G.L., Cheng, K.J., 1992. Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* Isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 12, 4042-4044.
63. Lundquist, T.J., Green, F.B., Tresan, R.B., Newman, R.D., Oswald, W.J. (1994). The Algal-Bacterial Selenium Removal System: Mechanisms and Field Study. *Selenium in the Environment*. W. T. Frankenberger: 251-278.
64. Martell, A.E., Smith, R.M., Motekaitis, R.J. (2001). NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes. *NIST Standard Reference Data*. Gaithersburg, M.D., U.S.A.
65. Montes-Bayon, M., Leduc, D.L., Terry, N., Caruso, J.A., 2002. Selenium speciation in wild-type and genetically modified Se accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 872-879.
66. Morel, F.M.M., 1983. Principles of Aquatic Chemistry New York, NY, USA.
67. Müller, S., Heider, J., Böck, A., 1997. The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 168, 421-427.
68. Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 253-259.
69. Niyogi, S., Wood, C.M., 2003. Effects of chronic waterborne and dietary metal exposures on gill metal-binding: Implications for the Biotic Ligand Model. *Human Ecol. Risk Assess.* 9, 813-846.
70. Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 21, 3681-3693.
71. OECD (2003). Draft guidance document for on the statistical analysis of ecotoxicity data. *OECD Environmental Health and Safety Publications*. Paris.
72. OECD-NEA (1996). Survey of thermodynamic and kinetic databases, Organisation for Economic Cooperation and Development, Nuclear Energy Agency.
73. Ogle, R.S., Knight, A.W., 1996. Selenium bioaccumulation in aquatic ecosystems: 1. effects of sulfate on the uptake and toxicity of selenate in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 274-279.

74. Ohlendorf, H.M., Hoffman, D.J., Saiki, M.K., Aldrich, T.W., 1986a. Embryonic mortality and abnormalities of aquatic birds: Apparent impacts of selenium from irrigation drainwater. *Sci.Total. Environ.* 52, 49-63.
75. Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S., 2004. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 52-60.
76. Padmaja, K., Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K., 1989. Effect of selenium on chlorophyll biosynthesis in mung bean seedlings. *Phytochemistry* 28, 3321-3324.
77. Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17, 342-347.
78. Paquin, P.R.J.W., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133, 3-35.
79. Peterson, J.A., Nebeker, A.V., 1992. Estimation of Waterborne selenium concentrations that are toxic thresholds for wildlife. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 154-162.
80. Pettit, D., Powell, K. (2001). IUPAC Stability constants database. Academic Software and the Royal Society of Chemistry.
81. Pick, U., Avron, M., 1973. Inorganic sulfate and selenate as energy transfer inhibitors of photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 325, 297-303.
82. Pilon, M., Owen, J.D., Garifullina, G.F., Kurihara, T., Mihara, H., Esaki, N., Pilon-Smits, E.A.H., 2003. Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic arabidopsis expressing a mouse selenocysteine lyase. *Plant Physiol.* 131, 1250-1257.
83. Pilon-Smits, E.A.H., 2002. Characterization of a Nifs-Like Chloroplast Protein from Arabidopsis. Implications for Its Role in Sulfur and Selenium Metabolism. *Plant Physiol.* 130, 1309-1318.
84. Pilon-Smits, E.A.H., Hwang, S., Lytle, C.M., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., Terry, N., 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction and tolerance. *Plant Physiol.* 119, 123-132.
85. Porter, K.G., Gerritsen, J., Orcutt, J.D., 1982. The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation, and respiration by *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 27, 935-949.
86. Pottu-Boumendil, J., 1989. Techniques en microscopie électronique. Principes et méthodes de préparation Paris.
87. Price, N.M., Harrison, G.I., Hering, J.G., Hudson, R.J., Nirel, P.M.V., Palenik, B., Morel, F.M.M., 1990. Preparation and Chemistry of the Artificial Algal Culture Medium Aquil. *Biol. Oceanogr.* 6, 443-461.
88. Price, N.M., Harrison, P.J., 1988. Specific selenium-containing macromolecules in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiol.* 86, 192-199.
89. Price, N.M., Thompson, P.A., Harrison, P.J., 1987. Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira Pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 23, 1-9.
90. Pyrzynska, K., 2002. Determination of selenium species in environmental samples. *Microchim. Acta* 140, 55-62.
91. Ratte, H.T. (2004). The myth of the most sensitive endpoint - biomass vs. growth rate in the alga growth inhibition test. SETAC Europe 2004, Prague.
92. Riedel, G.F., Ferrier, D.P., Sanders, J.G., 1991. Uptake of selenium by freshwater phytoplankton. *Water Air Soil Pollut.* 57-58, 23-30.

93. Riedel, G.F., Sanders, J.G., 1996. The influence of pH and media composition on the uptake of inorganic selenium by *chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1577-1583.
94. Riedel, G.F., Sanders, J.G., Gilmour, C.C., 1996. Uptake, transformation, and impact of selenium in freshwater phytoplankton and bacterioplankton communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 11, 43-51.
95. Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., Coves, J., 2001. Mobilization of selenite by *Rastolnia metallidurans CH34*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 769-773.
96. Saiki, M.K., Ogle, R.S., 1995. Evidence of impaired reproduction by western mosquitofish inhabiting seleniferous agricultural drainage. *Trans. Am. Fish Soc.* 124, 578-587.
97. Sanders, R.W., Gilmour, C.C., 1994. Accumulation of selenium in a model freshwater microbial food web. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2677-2683.
98. Seby, F., Potin-Gautier, M., Giffaut, E., Borge, G., Donard, O.F.X., 2001. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25°C. *Chem. Geol.* 171, 173-194.
99. Shabana, E.F., El-Attar, S.A., 1996. Influence of clay minerals on selenium toxicity to algae. *Egypt. J. Microbiol.* 30, 275-286.
100. Shamberger, R.J., 1985. The genotoxicity of selenium. *Mut. Res.* 154, 29-48.
101. Sharmasarkar, S., Reddy, K.J., Vance, G.F., 1996. Preliminary quantification of metal selenite solubility in aqueous solutions. *Chem. Geol.* 132, 165-170.
102. Sielicki, M., Burnham, J.C., 1973. The effect of selenite on the physiological and morphological properties of the blue-green alga *Phormidium Luridum* var. *Olivacea*. *J. Phycol.* 9, 509-514.
103. Simkiss, K., Taylor, M.G. (1995). Transport of Metals Across Membranes. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. A. Tessier etD. R. Turner. New York, John Wiley & Sons. 3: 1-44.
104. Skorupa, J.P. (1998). Selenium poisoning of fish and wildlife in nature: lessons from twelve real-world examples. Environmental Chemistry of Selenium. W. T. Frankenberger. New York, Marcel Dekker: 315-354.
105. Stadtman, T.C., 1980. Selenium-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 93-110.
106. Stewart, A.R., Luoma, S.N., Schlekat, C.E., Doblin, M.A., Hieb, K.A., 2004. Food web pathway determines how selenium affects aquatic ecosystems: a San Francisco Bay case study. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4519-4526.
107. Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 615-627.
108. Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1998. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* 219, 165-181.
109. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* 57, 134-144.
110. Twiss, M.R., Errecalde, O., Fortin, C., Campbell, P.G.C., Jumarie, C., Denizeau, F., Berkelaar, E., Hale, B., van Rees, K., 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chem. Spec. Bioavailab.* 1, 9-24.
111. USEPA (1998). Report on the Peer Consultation Workshop on Selenium Aquatic Toxicity and Bioaccumulation, USEPA.

112. Van Fleet-Stalder, V., Chasteen, T.G., Pickering, I.J., George, G.N., 2000. Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4849-4853.
113. Vandermeulen, J.H., Foda, A., 1988. Cycling of selenite and selenate in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 98, 115-123.
114. Vindimian, E. (2003). REGTOX: macro Excel™ for dose-response modelling.
115. Wang, C., Lovell, R.T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152, 223-234.
116. Wang, W., Dei, R.C.H., 2001a. Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton. *Environ. Pollut.* 111, 233-240.
117. Wang, W., Dei, R.C.H., 2001b. Influences of phosphate and silicate on Cr(VI) and Se(IV) accumulation in marine phytoplankton. *Aquat. Toxicol.* 52, 39-47.
118. Weiss, J.F., Srinivasan, V., Kumar, K.S., Landauer, M.R., 1992. Radioprotection by metals: selenium. *Adv. Space Res.* 12, 2223-2231.
119. Weiss, M., Haimovich, G., Pick, U., 2001. Phosphate and sulfate uptake in the halotolerant alga *Dunaliella* are driven by Na⁺-symport mechanism. *J. Plant Physiol.* 158, 1519-1525.
120. Wheeler, A.E., Zingaro, R.A., Irgolic, K., 1982. The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 181-194.
121. Williams, M.J., Ogle, R.S., Knight, A.W., Burau, R.G., 1994. Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 449-453.
122. Wong, D., Oliveira, L., 1991a. Effects of selenite and selenate on the growth and motility of seven species of marine microalgae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1193-1199.
123. Wong, D., Oliveira, L., 1991b. Effects of selenite and selenate toxicity on the ultrastructure and physiology of three species of marine microalgae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1201-1211.
124. Wong, S.L., Nakamoto, L., Wainwright, J.F., 1994. Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *J. Appl. Phycol.* 6, 405-414.
125. Wrench, J.J., 1978. Selenium metabolism in the marine phytoplankters *Tetraselmis tetraathele* and *Dunaliella minuta*. *Mar. Biol.* 49, 231-236.
126. Wrench, J.J., 1982. Temporal variations in dissolved selenium in a coastal ecosystem. *Nature* 299, 431-433.
127. Wu, L. (1994). Selenium Accumulation and Colonization of Plants in Soils with Elevated Selenium and Salinity. Selenium in the environment. W. T. Frankenberger: 279-325.
128. Yildiz, F.H., Davies, J.P., Grossman, A.R., 1994. Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. *Plant Physiol.* 104, 981-987.
129. Yokota, A., Shigeoka, S., Onishi, T., Kitaoka, S., 1988. Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low-CO₂-grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 86, 649-651.
130. Yu, R.Q., Wang, W.X., 2004a. Biokinetics of cadmium, selenium and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 129, 443-456.

131. Yu, R.Q., Wang, W.X., 2004b. Biological uptake of Cd, Se(IV) and Zn by *Chlamydomonas reinhardtii* in response to different phosphate and nitrate additions. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 35, 163-173.
132. Zhang, G.H., Hu, M.H., Huang, Y.P., 1990. Se uptake and accumulation in marine phytoplankton and transfer of Se to the clam *Puditapes philippinarum*. *Mar. Environ. Res.* 30, 179-190.

Annexe : certificats d'étalonnage des sources de ^{75}Se utilisées



RISO

Riso National Laboratory
Radiation Research Department
Building 202
Post Office Box 49
DK-4000 Roskilde
Denmark

Telephone +45 4677 5300
isotop@risoe.dk
Fax +45 4677 5347

Riso main numbers:
Telephone +45 4677 4677
risoe@risoe.dk
Fax +45 4677 5688
www.risoe.dk
Visiting address:
Frederiksborgvej 399
Roskilde · Denmark

Radiochemicals

Product Specifications

Principal radionuclide:	^{75}Se
Product Code:	4750
Control number:	160/02
Time of reference:	4 p.m. CET on July 04, 2002
Activity:	50,6 MBq
Radioactive concentration:	10,1 MBq/g of solution
Specific activity:	108 GBq/g Se
Chemical form:	H_2SeO_3
Carrier concentration:	93,5 μg Se/g of solution
Mass of solution:	5,023 g
Medium:	0.01 M HCl
Radionuclidic impurities:	Other gamma-emitters not detected

Signature:

Jesper Jørgensen
Irradiation and Isotope Services



RISO

Risø National Laboratory
Radiation Research Department

Building 202
Post Office Box 49
DK-4000 Roskilde

Denmark

Telephone +45 4677 5300

isotop@risoe.dk

Fax +45 4677 5347

Risø main numbers:

Telephone +45 4677 4677

risoe@risoe.dk

Fax +45 4677 5688

www.risoe.dk

Visiting address:

Frederiksborgvej 399

Roskilde - Denmark

Radiochemicals

Product Specifications

Principal radionuclide:	^{75}Se
Product Code:	4750
Control number:	552/02
Time of reference:	4 p.m. CET on January 27, 2003
Activity:	50,6 MBq
Radioactive concentration:	49,7 MBq/g of solution
Specific activity:	158 GBq/g Se
Chemical form:	H_2SeO_3
Carrier concentration:	311 μg Se/g of solution
Mass of solution:	1,018 g
Medium:	0.01 M HCl
Radionuclidic impurities:	Other gamma-emitters not detected

Signature:



Jesper Jørgensen

Irradiation and Isotope Services

Résumé

Le sélénium est un élément essentiel, mais qui devient très toxique à des concentrations plus élevées. Il est présent dans l'environnement à des concentrations variant du nM au μM et la pollution par cet élément est un phénomène mondial.

Ce travail vise à accroître les connaissances relatives à l'interaction entre le sélénite -Se(IV)- et un organisme phytoplanctonique d'eau douce : l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Les objectifs des expériences réalisées étaient : *i*) d'étudier les mécanismes de prise en charge du sélénite, à l'aide d'expositions de courte durée (< 1 h), en utilisant le Se^{75} comme radio-traceur ; *ii*) d'évaluer la toxicité de l'élément sur la croissance et l'ultrastructure algales, à l'aide d'expositions de longue durée (96 h) à du sélénite stable, en utilisant l'analyse EDAX-TEM ; *iii*) d'estimer la capacité de bioaccumulation de l'élément, et son éventuel lien avec la toxicité.

Les expériences à court terme ont montré une adsorption négligeable, et une absorption dépendant linéairement du temps, avec un flux estimé à environ $0,2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La prise en charge était proportionnelle aux concentrations ambiantes pour une large gamme de concentrations intermédiaires (du nM au μM). Cependant, les flux étaient plus élevés à très faibles concentrations ($< \text{nM}$) et diminuaient pour des concentrations élevées ($> \mu\text{M}$), suggérant qu'un transport de haute affinité mais rapidement saturé pourrait intervenir à faibles concentrations, doublé par un transport de faible affinité qui ne saturerait qu'à fortes concentrations ($\sim \text{mM}$). Ce dernier pourrait faire intervenir les transporteurs du sulfate et du nitrate, comme le suggère l'inhibition de la prise en charge du sélénite par ces éléments. Les modifications de spéciation du Se(IV) avec le pH n'ont a priori pas induit d'effet significatif sur la biodisponibilité.

Sur la base de la relation entre concentration en Se et densité cellulaire maximale atteinte, nous avons calculé une EC_{50} de $80 \mu\text{M}$ ([64; 98]). Nous n'avons pas mis en évidence de mécanismes d'adaptation, avec une toxicité similaire pour des algues pré-exposées ou non au sélénite. Les observations au MET ont suggéré que le chloroplaste soit la première cible de la cytotoxicité de l'élément, avec des effets sur le stroma, les thylakoïdes et le pyrénoloïde. Aux concentrations les plus élevées, nous avons observé une augmentation du nombre et du volume des grains d'amidon, ainsi que la formation de granules denses aux électrons. Les analyses en spectrométrie par dispersion en énergie ont montré que ceux-ci contenaient du sélénium et étaient également riches en calcium et phosphore.

Nous avons montré que l'inhibition de croissance était fortement corrélée à la bioaccumulation, et que cette dernière était inhibée par des concentrations croissantes en sulfate. Enfin, le facteur de concentration, calculé sur la base du poids sec, variait entre 690 et 7100.

Mots clés: sélénium - phytoplancton - transport - toxicité - bioaccumulation - nutriments - sulfate - spéciation - croissance - ultrastructure - EDAX-TEM - amidon - granules denses aux électrons- BCF

Abstract

Selenium is an essential element, but becomes very toxic at higher concentrations. It occurs in the environment at concentrations ranging from nM to μM and selenium pollution is a worldwide phenomenon.

This work aims at improving the knowledge on the interactions between selenite - Se(IV) - and a freshwater phytoplanktonic organism : the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. The aim of the performed experiments were : *i*) to investigate selenite -Se(IV^o)- uptake mechanisms in *C. reinhardtii*, using Se^{75} as a radiotracer in short-term exposures (< 1 h); *ii*) to assess selenite toxicity as measured with growth impairment and ultrastructural damage (with EDAX-TEM analysis), using long-term exposures (96 h) to stable selenite; *iii*) to evaluate the bioaccumulation capacity of selenite and its potential links with toxicity.

Short-term experiments revealed a negligible adsorption and a time-dependent linear absorption with an estimated absorbed flux of about $0.2 \text{ nmol.m}^{-2}.\text{nM}^{-1}.\text{h}^{-1}$. The uptake was proportional to ambient levels in a broad range of intermediate concentrations (from nM to μM). However, fluxes were higher at very low concentrations ($< \text{nM}$), and decreased with increasing high concentrations ($> \mu\text{M}$), suggesting that a high affinity but rapidly saturated transport mechanism could be used at low concentrations, in parallel with a low affinity mechanism that would only saturate at high concentrations ($\sim \text{mM}$). The latter could involve transporters used by sulphate and nitrate, as suggested by the inhibition of selenite uptake by those elements. Se(IV) speciation changes with pH did not induce significant effect on bioavailability.

On the basis of the relationship between Se concentration and maximal cell density achieved, an EC_{50} of $80 \mu\text{M}$ ([64; 98]) was derived. No adaptation mechanisms were observed as the same toxicity was quantified for Se-pre-exposed algae. Observations by TEM suggested chloroplasts as the first target of selenite cytotoxicity, with effects on the stroma, thylakoids and pyrenoids. At higher concentrations, we could observe an increase in the number and volume of starch grains. For cells collected at 96 h, electron-dense granules were observed. Energy-dispersive X-ray microanalysis revealed that they contained selenium and were also rich in calcium and phosphorus.

Finally, growth inhibition was highly correlated to the bioaccumulation of selenite. The latter was inhibited by increasing concentrations of sulphate, and calculated dry weight concentration factors varied between 690 and 7100.

Key words: selenium - phytoplankton - transport - toxicity - bioaccumulation - nutrients - sulphate - speciation- growth - ultrastructure - EDAX-TEM - starch - electron-dense granules - BCF