

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

**Rôle du fer sur la prise en charge, la toxicité et le destin intracellulaire
du cuivre chez l'algue verte d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii***

Par

Gbatchin Monsounmola Emeric Kochoni

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Philosophiæ Doctor (Ph. D.) en Sciences de l'eau

Membres du Jury :

Examineurs externes :

Céline Guéguen, Université
de Sherbrooke

Michael R. Twiss, Clarkson
University

Président du jury et
examineur interne :

Maikel Rosabal Rodriguez,
UQAM

Directeur de recherche :

Claude Fortin, INRS-ETE

À ma chère épouse, Loetitia Megnikpa

À ma fille, Reguy Kochoni

« Mieux vaut la fin d’une chose que son commencement » (Ecclésiaste 7.8).

Résumé

Le modèle du ligand biotique (en anglais *Biotic Ligand Model*) permet de prédire la prise en charge et la toxicité des métaux en fonction de leur spéciation et de la présence d'ions compétitifs. De nombreuses études ont été conduites pour davantage améliorer le modèle et faciliter son utilisation dans la gestion des écosystèmes aquatiques. Malgré sa popularité croissante, son applicabilité dans certaines conditions reste incertaine. Par exemple, peu d'attention a été accordée au rôle des éléments traces essentiels sur la toxicité d'un autre élément. À travers nos travaux, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes qui président la prise en charge, la toxicité et la gestion intracellulaire du cuivre en utilisant l'algue verte d'eau douce, *Chlamydomonas reinhardtii*, comme modèle biologique. Nous avons réussi à montrer que le fer joue un rôle protecteur contre la toxicité du cuivre en milieu aquatique, avec une CE50-72 h (mesurer sur la croissance cellulaire) pouvant décroître de 2 nM dans un milieu régulier en Fe ($10^{-17,6}$ M de Fe^{3+}) à 4 pM en milieu pauvre en Fe ($10^{-19,0}$ M de Fe^{3+}), soit une augmentation de la toxicité de 500 fois. Nous avons pu mettre en évidence, en nous fondant notamment sur des approches biophysique et transcriptomique, que cet important rôle du fer sur la sensibilité des algues au cuivre, serait de nature physiologique et que le complexe protéique que forment la ferroxidase FOX1 et la perméase FTR1 occuperait dans ce contexte une place centrale dans l'assimilation du fer et du cuivre. L'étude de la distribution intracellulaire du cuivre chez *C. reinhardtii*, nous a par ailleurs permis, à partir d'approches métallomiques et protéomiques, de comprendre que le fer affecterait aussi l'homéostasie (gestion et destin intracellulaire) du cuivre. Cette étude peut être considérée comme une contribution à l'amélioration de nos connaissances des co-interactions du Cu et du Fe chez une algue verte d'eau douce tout en contribuant à mieux cerner les limites des outils comme le BLM, utilisés pour prédire la biodisponibilité des métaux, sur la base de leurs propriétés physico-chimiques dans l'eau.

Abstract

The Biotic Ligand Model allows predicting metal uptake and toxicity based on metal speciation and the presence of competitive ions. Many studies have been conducted in order to further improve this model, and to apply it to aquatic ecosystems management. Despite its increasing popularity, its applicability in some conditions remains unclear. For example, little attention has been paid to the role of essential trace elements on the toxicity of another element. Our research objective is to better understand the mechanisms that govern the uptake, toxicity and fate of copper by using a freshwater alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, as a biological model. We showed that iron plays a protective role against the toxicity of copper in an aquatic environment, with an EC50-72 h (based on cell growth) which can decrease from 2 nM in a regular Fe medium (10-17.6 M of Fe³⁺) to 4 pM in low iron medium (10-19.0 M of Fe³⁺), i.e. a 500-fold increase in toxicity. We have been able to demonstrate, based particularly on biophysical and transcriptomic approaches, that this important role of iron on the sensitivity of algae to copper is more physiological and that the protein complex formed by ferroxidase FOX1 and permease FTR1 could play in this context a central place in the Fe and Cu assimilation pathways. The study of the intracellular distribution of copper in *C. reinhardtii* has also enabled us, using metallomic and proteomic approaches, to figure out that iron could also impact the homeostasis (intracellular management and fate) of copper. This study can be seen as a contribution to improve tools like BLM, used to predict metal bioavailability in water, based on their physicochemical properties.

Avant-propos

Cette thèse est une modeste contribution à l'évolution des connaissances en sciences de l'eau et plus spécifiquement en Écotoxicologie aquatique. C'est un nouvel apport de notre équipe à une bonne compréhension des interactions métaux-organismes et notamment à l'affinement du modèle du ligand biotique (MLB) à mieux évaluer les risques liés aux métaux. Mon sujet de recherche soulève plusieurs questions scientifiques ; aussi ai-je stratégiquement choisi, dans une démarche scientifique, d'en aborder les plus pertinentes au regard surtout des enjeux et possibilités techniques actuelles. C'est le lieu de souligner les apports déterminants des progrès scientifiques, notamment en chimie analytique, sans lesquels la plupart des questions que j'ai examinées seraient encore intactes.

C'est aussi le lieu de rendre hommage à la science et de souligner l'importance d'avoir une éthique et une rigoureuse démarche scientifique dans la réalisation des travaux de recherche, surtout de nos jours où les fausses informations et les vérités alternatives sont de plus en plus érigées en normes.

Remerciements

Ce travail dont j'ai eu l'honneur de réaliser au centre Eau Terre Environnement de l'institut national de la recherche scientifique (INRS-ETE), sous la direction du Professeur Claude Fortin, résulte en réalité d'un travail d'équipe et de collaboration. Dans cette rubrique, je souhaite donc témoigner toute ma reconnaissance à tous ceux qui ont été, d'une manière ou d'une autre, d'une aide quelconque dans la réalisation de cette thèse.

J'adresse mes premiers mots de remerciement à mon directeur de recherche, Claude Fortin, qui m'a fait confiance en m'accueillant dans son équipe et m'a constamment soutenu durant tout mon parcours. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, tes orientations et pour avoir fait de moi un chercheur accompli et décomplexé. C'est un grand honneur de travailler avec toi.

J'exprime aussi ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner, de réviser et d'améliorer ce document. Votre présence à cette soutenance m'honore profondément.

Mes remerciements s'adressent également à Peter Campbell, pour ses bons conseils, sa disponibilité à répondre à mes questions et son soutien. Je suis très fier de travailler aussi avec vous.

J'exprime aussi mes mots de gratitude à Maikel Rosabal, pour ses conseils et pour m'avoir encouragé à étudier les aspects métallomiques des questions que soulèvent mes résultats préliminaires. J'adresse aussi mes remerciements à Michel Lavoie pour ses conseils et pour avoir lu et corrigé mes premiers manuscrits.

C'est le lieu d'exprimer aussi ma reconnaissance envers Patrice Gonzalez et son équipe pour leur contribution à la réalisation des expériences de transcriptomique et expression des gènes ; une même reconnaissance envers Lekha Sleno et son équipe pour leur collaboration à la réalisation des expériences de protéomique et peptidomique.

Je veux manifester ma gratitude à toute l'équipe technique des laboratoires du centre ETE de l'INRS et au directeur Stéfane Prémont, pour leur disponibilité et pour n'avoir ménagé aucun effort pour m'assister et m'aider à atteindre mes objectifs au laboratoire. Un

vibrant merci à Julie Perreault pour m’avoir aidé à faire mes analyses à l’ICP-MS et au HPLC, sans oublier Anissa Bensadoune et Jean-François Dutil pour leurs appuis.

Un spécial merci à tous mes collègues pour m’avoir encouragé et aidé au besoin. Votre présence était source de motivation, notamment lorsque nous étions amenés à rester tard au laboratoire pour suivre une expérience en cours ou finir une manipulation. Merci à Kim Racine, Fengjie Liu, Camille Guilleux, Bienvenu Nguimgou Signing, Caroline Doose, Sandra Kim Tiam, Vincent Laderriere, Geneviève Rioux, Linbin Zhou, Imad Aharchaou, Océane Hourtané, Bahloul Faouzia, Marie Bonnet, Mariem Charbti, Louise Zilber, Nicolas Dupuy et Julien Michaud-Valcourt.

Merci également à tous mes collègues de bureau : Hind El-Housni, Sophie Costis, Elisabeth Viry, Daniel Roy, Nicolas Kiulia, et Mona Chaali. Merci aussi à tous les étudiants que j’ai croisés durant ma thèse à savoir Yao Bigah, Isbath Sanni, Linda Lara, Marie Aba Otron, Laura Malbezin, Mariem Fadhlaoui, Priscille Ahossi. J’exprime ici ma profonde gratitude à Sokhna Ndiaye dont les réflexions et assiduité au laboratoire m’ont souvent inspiré et motivé.

Plus globalement, je veux dire un grand merci à l’INRS et à son personnel pour m’avoir accueilli et offert un cadre de travail convivial, motivant et adéquat à une bonne émulation intellectuelle. Un spécial merci à Linda Aubert, Jean-Daniel Bourgault, Pascale Dion et Mélanie Laverdière.

Je tiens à remercier mes parents, mes frères et sœurs de même que mes amis pour leur soutien moral, spirituel et matériel. Spécial merci à Rafou Yessoufou pour son assistance et sa disposition de cœur, à Bettecha Millot pour son soutien et à Vincent Ishola Ezin pour ses mots d’encouragement et pour avoir lu mes manuscrits.

J’exprime ma plus profonde gratitude à mon épouse Loetitia Megnikpa et à ma fille Reguy Kochoni, pour leur patience, leur soutien, leur motivation et pour m’avoir encouragé à aller au bout de cette thèse.

Un grand merci aux organismes de soutien dont le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), les Chaires de recherche du Canada (CRC) et le regroupement des écotoxicologues du Québec (EcotoQ). Pour finir, merci à la SETAC

(Society of Environmental Toxicology and Chemistry) pour m'avoir accordé une bourse de participation au 38^e congrès annuel de SETAC Amérique du Nord.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Avant-propos.....	v
Remerciements.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des figures	xi
Liste des tableaux.....	xvi
Partie I : Introduction générale	1
1. Contexte général	1
2. Les métaux dans l'environnement : État des lieux et des connaissances scientifiques ..	3
2.1. Métaux et évolution du système biologique	3
2.2. Oligo-éléments et eau douce.....	4
2.3. Modélisation et mécanisme d'action des métaux : Modèles de prise en charge des métaux dans l'eau (MIL et MLB).....	5
2.3.1. Aspects théoriques	5
2.3.2. Cadre conceptuel.....	6
2.3.3. Mécanismes mis en jeu	8
2.3.4. Conditions d'application	9
2.4. Cuivre dans l'eau	11
2.4.1. Origine, propriétés et production	11
2.4.2. Sources et émission du cuivre dans l'eau	12
2.4.3. Le cuivre : Un métal essentiel.....	13
2.4.4. Spéciation et biodisponibilité du Cu en eau douce	15
2.4.5. Prise en charge et régulation du cuivre	17
2.4.6. Toxicité du cuivre	22
2.4.7. Mécanismes de détoxification du cuivre	23
2.5. Méthodes d'étude des interactions métaux-organismes dans l'eau	30

2.5.1. Contexte général	30
2.5.2. Organisme modèle	31
2.5.3. Méthodes d'études des effets et adaptation à la toxicité.....	34
3. Présentation de la thèse	39
Partie II : Articles scientifiques.....	43
Article 1 : Iron modulation of copper uptake and toxicity in a green alga (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>).....	44
Article 2 : New insights in copper homeostasis in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> under Fe-limited condition	74
Article 3 : Role of iron in gene expression and in the modulation of copper uptake in a freshwater alga: Insights on Cu and Fe assimilation pathways	110
Partie III : Discussion générale	148
3.1 Hypertoxicité du cuivre : Influence du statut nutritif du milieu en fer chez <i>C. reinhardtii</i>	148
3.2 Gestion interne du cuivre.....	151
3.3 Mécanisme de prise en charge du cuivre	153
3.4 Conclusion générale.....	156
4. Références bibliographiques	158

Liste des figures

- Figure 1.1.** Tableau périodique simplifié démontrant la répartition des ions métalliques et métalloïdes dans les différentes classes : **classe A**, **classe B** et **classe de transition**. Le Cu, en fonction de son état redox (ou état électronique) appartient soit à la classe B (Cu(I)) ou à la classe de transition (Cu(II)). ¹Famille du Lanthane ; ²famille de l'Actinium (adapté de Nieboer & Richardson (1980)). 1
- Figure 1.2.** Schéma illustrant les âges des métaux comprenant l'âge de la pierre qui remonte aux temps préhistoriques (adapté de Murr (2015)). 2
- Figure 1.3.** Schéma conceptuel de la prise en charge des métaux par les organismes aquatiques mettant en évidence les mécanismes en jeu dans le cadre du MLB (adapté de Paquin *et al.* (2002)). 9
- Figure 1.4.** Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes et ses différentes étapes. M^{Z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^{Z-} = ligand (ex. : acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^-) ; M-X = métal complexé à la surface (Campbell *et al.*, 2002). 10
- Figure 1.5.** Schéma conceptuel des différentes voies de transport identifiées du cuivre dans une cellule végétale. Sont présentés : (i) Les transporteurs membranaires (COPT1, COPT3, COPT5, COX17, PAA1, PAA2, RAN1), (ii) les chaperons de cuivre (CCH, CCS, PCCC) et (iii) les facteurs de désintoxication (métallothionéines (MTs), phytochélatines (PCs) ou glutathion (GSH)) (d'après Yruela (2005)). 18
- Figure 1.6.** Résumé schématique des mécanismes de prise en charge du cuivre par une cellule algale : (A) Réduction du Cu(II) par les réductases de la membrane cellulaire (Jones *et al.*, 1987) ; (B) Production photochimique de Cu(I) (Moffett & Zika, 1988); (C) Réduction facilitée par des ligands thiolés (Walsh *et al.*, 2015). (1) Prise en charge de l'ion Cu^{2+} par un système à faible affinité. (2) Prise en charge de l'ion Cu(I) par un système à forte affinité. (3) Prise en charge du Cu(I) par la voie d'assimilation de la cystéine (Walsh *et al.*, 2015). 21
- Figure 1.7.** Représentation schématique d'une MT eucaryote. Ici, les deux domaines de la protéine (fragments α et β) lient respectivement 4 et 3 atomes de cuivre (adaptée du site

internet : https://www.analyticaltoxicology.com/metallothioneines/ , consulté le 26 mars 2021).	26
Figure 1.8. Schéma général montrant la spéciation des métaux en solution (adaptée de Twiss <i>et al.</i> (2001)).	30
Figure 1.9. Schéma d'une cellule de <i>Chlamydomonas</i> (adapté de Merchant <i>et al.</i> (2007)).	33
Figure 1.10. Protocole du fractionnement subcellulaire (d'après Lavoie <i>et al.</i> (2009b)).	37
Figure 2.1. Growth of <i>C. reinhardtii</i> cell population over time in a low metal medium in which essential element concentrations are the lowest possible while high enough to sustain normal growth. Only the free copper concentration was varied (N = 3).	52
Figure 2.2. Growth of <i>C. reinhardtii</i> after 72 h of exposure to four different concentrations of free ionic copper (10^{-14} , 10^{-13} , 10^{-12} , and 10^{-11} M) in four exposure media. In each medium, the concentration of one essential element was manipulated (Zn, Mn, Co, and Fe). Each panel shows the cell density after 72 h as a function of Cu^{2+} concentration. Error bars are the standard deviations of three replicates. In the low Fe medium, the growth difference between copper treatments is significant (ANOVA; $p < 0.001$) (see Tables SI2.3-SI2.6 for the total and free concentrations of each element).	53
Figure 2.3. Relative cell yield (ρ/ρ_0) after 72 h as a function of exposure copper concentrations in low ($\circ$, LFe) and high iron media ($\bullet$, HM). Error bars represent the standard deviations of two or three replicates of algal cultures. Half-maximal effective concentrations (EC50) are given with their respective 95% confidence intervals.	54
Figure 2.4. Accumulation of Cu in <i>C. reinhardtii</i> after 72 h of exposure as a function of free copper concentrations in low ($\circ$, LFe) and high iron media ($\bullet$, HM). Error bars are the standard deviations of two or three replicates.	55
Figure 2.5. Dose-response curves showing relative cell populations after 72 h as a function of intracellular copper accumulation (in amol/cell) in low ($\circ$, LFe) and high iron media ($\bullet$, HM) exposed cells. The error bars represent standard deviations of the mean of two to three replicates.	56

Figure SI2.1. Cellular growth over time of *C. reinhardtii* exposed to four different concentrations of free copper (10^{-14} , 10^{-13} , 10^{-12} and 10^{-11} M) in four low-concentrated media in Zn (a), Mn (b), Co (c) and Fe (d). 73

Figure 3.1. Copper accumulation ($\text{amol} \cdot \text{cell}^{-1}$; $\pm \text{SD}$, $n = 3$) by *C. reinhardtii* after 2 and 72 h of exposure to ^{65}Cu ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) in an Fe-limited medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$) or an Fe-replete medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$). In (A) alga cells were previously grown in an Fe-limited medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$; acclimated algae or L-algae) and in (B) alga cells were not acclimated to an Fe-limited medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$; non-acclimated algae or M-algae). Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Tukey Kramer HSD test). 88

Figure 3.2. Copper subcellular distribution in *C. reinhardtii* acclimated to Fe-limited media (L-alga; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$) and subsequently exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) for 2 and 72 h in an Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$, (A: Absolute values, B: Relative values) or non-Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$, C: Absolute values, D: Relative values) media. Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Tukey Kramer HSD test). ORG = organelles; GR = granules; HSP = heat-stable proteins and peptides; and HDP = heat-denatured proteins. 90

Figure 3.3. Copper subcellular distribution in *C. reinhardtii* not acclimated to an Fe-limited media (M-alga; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$) and exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) for 2 and 72 h in an Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$, (A: Absolute values, B: Relative values) or non-Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$, C: Absolute values, D: Relative values) media. Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Tukey Kramer HSD test). ORG = organelles; GR = granules; HSP = heat-stable proteins and peptides; and HDP = heat-denatured proteins. 91

Figure 3.4. SEC-ICP-MS chromatograms in the HSP fractions isolated from *C. reinhardtii*. Peaks indicate ^{65}Cu bound to biomolecules within the HSP fraction after 24 (upper panels) and 72 h (lower panels) of exposure of acclimated *C. reinhardtii* (L-alga) to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) in Fe-limited (A; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$) and non-Fe-limited (B; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$) exposure conditions. The vertical dotted lines represent elution times of two MW standards (black) and the expected beginning elution times of PCs (green). The

red horizontal dotted line represents the size gradient of the operationally defined MW from HMW (high molecular weight; > 15.6 – 7.2 kDa; elution time: 13.5 – 17.0 min) to LMW (low molecular weight; < 2.6 kDa; elution time: > 21.5 min). The recorded chromatogram covers 0 to 45 min, but only results from 10 to 23 min were shown here. 95

Figure 3.5. SEC-ICP-MS chromatogram of the separation of ^{65}Cu complexes present in the HSP fraction after 72 h of exposure time of *C. reinhardtii* to ^{65}Cu ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 39.3$ nM) in Fe-replete media. The ligand candidates for the binding of Cu in the HSP fraction were identified by proteomic and peptidomic analyses. Based on these analyses, the colors indicate a rough delineation of the retention times (RT) of the proteins (red) and the (poly)peptides (green) along a molecular weight (MW) gradient (black line) of these biomolecules. 98

Figure SI3.1. Schematic overview of the different stages and technical approaches used during this work. 108

Figure SI3.2. Overview of the subcellular fractionation scheme based on Lavoie *et al.* (2009b)). , P1: Pellet 1; P2: Pellet 2; P3: Pellet 3; S1: Supernatant 1; S2: Supernatant 2; S3: Supernatant 3; S4: Supernatant 4; DB: Debris; GR: Granules; ORG: Organelles; HSP: Heat stable peptides and proteins; HDP: Heat-denatured proteins. 109

Figure 4.1. Copper uptake kinetics by *C. reinhardtii* previously grown in low iron conditions (L-algae) and exposed to ^{65}Cu (27.5 nM) in Fe^{3+} -replete (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18}$ M) and Fe^{3+} -depleted media (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19}$ M). Each point is the average of 3 replicates per exposure time from two independent experiments. Error bars represent standard deviations (n = 3). 122

Figure 4.2. Internalization fluxes of free $^{65}\text{Cu}^{2+}$ in *C. reinhardtii* acclimated in Fe^{3+} -limited media (L-algae; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19}$ M) and exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (see the detailed concentrations in Table SI4.3) in +LFe (Fe-replete media, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18}$ M) and -LFe (Fe-depleted media, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19}$ M) for 60 min. 125

Figure 4.3. Significant differences in gene expression depending on the experimental conditions. L = Acclimated algae; M = Non-acclimated algae; Fe = iron element; $\pm$ = addition/absence of Fe^{3+} in the exposure media. Red color means less expression and

yellow or white color means high expression levels. The level of significance corresponds to: 0 ‘****’ 0.001 ‘***’ 0.01 ‘**’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1. 127

Figure 4.4. Heatmap of gene expression correlation in *C. reinhardtii*. The heatmap was constructed using the Pearson correlation coefficient of genes expression. Positive correlations are marked in yellow and negative ones in red. The blue lines delimit groupings of co-regulated genes. Clusters defined by hierarchical clustering are indicated at top and left. 129

Figure SI4.1. Copper uptake kinetics by *C. reinhardtii* (L-algae) exposed to ^{65}Cu (27.5 nM) in Fe^{3+} -depleted (A and B) and Fe^{3+} -replete (C and D) media. Results show no change in $^{63}\text{Cu}^{2+}$ uptake rate over time while $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake rate increased over time. 145

Figure SI4.2. Copper uptake kinetics for non-acclimated algal cells (M-algae) exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (27.5 nM) in Fe^{3+} -depleted (-MFe) (A) and Fe^{3+} -replete (+MFe) (B) media showing there is no change in $^{63}\text{Cu}^{2+}$ uptake rate over time. The $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptakes were plotted together in (C) for comparison. 146

Figure SI4.3. Copper internalization flux for non-acclimated algal cells (M-algae) exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (27.5 nM) in Fe^{3+} -depleted (-MFe) and Fe^{3+} -replete (+MFe) media. When $[\text{Cu}^{2+}]$ was varied, the internalized flux observed over 60 min showed no clear trends whether the exposure media were Fe^{3+} replete (+MFe) or depleted (-MFe). 147

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Les sept métaux connus depuis l'Antiquité (adapté de Cramb (1996)).	2
Tableau 1.2. Émissions mondiales de cuivre ($10^3 \text{ t}\cdot\text{an}^{-1}$) dans l'eau au début des années 1980 (d'après (Pacyna <i>et al.</i> , 1995)).	13
Tableau 1.3. Quelques cuproprotéines et leurs fonctions dans les cellules végétales (Adapté de Rubino & Franz (2012)).	15
Table SI2.1. Ionic composition of MHSM1 and LM1 to LM4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	59
Table SI2.2. Components and proportions of the stock solutions used in the preparation of the MHSM1 culture medium.	60
Table SI2.3. Ionic composition of LZn1 to LZn4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	61
Table SI2.4. Ionic composition of LMn1 to LMn4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	62
Table SI2.5. Ionic composition of LCo1 to LCo4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	63
Table SI2.6. Ionic composition of LFe1 to LFe4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	64
Table SI2.7. Ionic composition of HM1 to HM10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	65
Table SI2.7. Ionic composition of HM1 to HM10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M). (continued).	66
Table SI2.8. Ionic composition of LFe1 to LFe10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	67

Table SI2.8. (continued): Ionic composition of LFe1 to LFe10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).	68
Table SI2.9. Percent recovery (%) of total dissolved copper after exposure to <i>C. reinhardtii</i> in LZn, LMn, and LCo media.	69
Table SI2.10. Percent recovery (%) of total dissolved copper after exposure to <i>C. reinhardtii</i> in LFe and HM media.....	70
Table SI2.11. Percent recovery (%) of copper after acid digestion of IAEA-413 algae material.	71
Table SI2.12. Summary of free Cu ²⁺ toxicity data found in the literature.....	72
Table 3.1. Proteins identified in SEC fractions 2 and 3 using bottom-up proteomics by LC-MS/MS analysis.	97
Table SI3.1. Total and free molar concentrations of the culture media calculated by using MINEQL+ 5.0 at pH 7.0 and 25 °C.....	104
Table SI3.2. Total and free molar concentrations of media after 2 h exposure calculated by using MINEQL+ 5.0 at pH 7.0 and 25 °C. In this experiment, metals were not buffered by NTA nor EDTA.	104
Table SI3.3. Total and free molar concentrations of the exposure media calculated by using MINEQL+ 5.0 at pH 7.0 and 25 °C. The media were designed for the 24 and 72 h of exposure times.	105
Table SI3.4. List of standards biomolecules, their retention time in SEC and molecular weight (MW) used to plot the calibration curve.	105
Table SI3.5. List of peptides identified by peaks (fractions) and specific peptidomics methods used.....	106
Table SI3.6. Occurrence of amino acids present in detected proteins with potential binding of Cu in order to identify likely candidates as Cu ligands. The values are the percentage (%) of amino acids obtained by dividing the number of amino acids of interest by the total number of amino acids in each protein.	107

Table 4.1. List and functions of genes examined.	119
Table 4.2. Stability constants ($K_{\text{Cu-Rcell}}$) for the binding of Cu to the acclimated <i>C. reinhardtii</i> (L-alga) transport sites and maximum fluxes (J_{max}).	124
Table 4.3. Gene induction and repression factors in <i>C. reinhardtii</i> after 60 min of exposure time to $[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 25.7 \text{ nM}$ in Fe-replete media (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18} \text{ M}$) and Fe-depleted media (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$). L = Acclimated algae; M = Non-acclimated algae; Fe = iron element; $\pm$ = addition/absence of Fe^{3+} in the exposure media. Significant induction (>2 , green) and repression (<0.5 , orange) factors are indicated by values, compared to the respective controls. “/” indicates no changes with respect to control levels. The statistical significance coding is: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1.	128
Table 4.4. Groups of genes for which expressions vary together. All the 9 groups of genes were formed from the dendrogram which appears in the heatmap (Figure 4) realized based on the correlation factors of the genes (Table SI4.11).	130
Table SI4.1. Total and free molar concentrations of the culture media calculated by using MINEQL+ 5.0.	136
Table SI4.2. Total and free molar concentrations of exposure media calculated by using MINEQL+ 5.0.	136
Table SI4.3. Average concentrations (total and free) of ^{65}Cu in the exposure media designed to obtain the uptake kinetic parameters of Cu^{2+} ions by <i>C. reinhardtii</i> . Free ion concentrations were calculated by using MINEQL+ 5.0. All concentrations are in molar (M).	137
Table SI4.4. Percent recovery (%) of copper after acid digestion of IAEA-413 algae material.	137
Table SI4.5. Accession number and specific primer pairs used for <i>C. reinhardtii</i>	138
Table SI4.6. Mean of expression levels ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) of the genes studied compared to the reference genes.	139

Table SI4.7. Gene induction and repression factors showing standard deviations (SD) of each factor. L = Acclimated algae; M = Non-acclimated algae; Fe = iron element; $\pm$ = addition/absence of Fe^{3+} in the exposure media.	140
Table SI4.8. p-values of the ANOVAs for the studied gene expression, obtained from <i>C. reinhardtii</i> acclimated (L-algae) or not (M-algae) to low Fe media and exposed to $[\text{}^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 25.7 \text{ nM}$ in Fe-replete media (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18} \text{ M}$) and Fe-depleted media (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$).	141
Table SI4.9. The raw data used to plot Figure 4.1.	142
Table SI4.10. The raw data used to plot Figure 4.2.	143
Table SI4.11. Pearson correlation coefficient data used to build the gene expression correlation.	144

Introduction générale

Partie I : Introduction générale

1. Contexte général

Les métaux sont des éléments chimiques naturellement présents dans la croûte terrestre (Wedepohl, 1995). Ils représentent environ 75% des éléments chimiques du tableau périodique des éléments (Figure 1.1) (Morris, 1992). Les métaux disposent de propriétés particulières (solidité, résistance, malléabilité, conductivité (chaleur, électricité) et magnétisme) faisant d'eux des ressources importantes et stratégiques exploitables par l'Homme (Whitacre, 2011). L'Homme exploite en effet les métaux depuis l'antiquité (Tableau 1.1) (Aitchison, 1960; Habashi, 2008). La civilisation a été fondée sur les métaux dans l'antiquité et au moyen-âge (Figure 1.2) (Cramb, 1996; Murr, 2015). De nos jours les métaux sont des composants importants de nos quotidiens (maisons, autos, électroménagers, outils, ordinateurs et autres appareils électroniques) et sont indispensables pour nos infrastructures (autoroutes, ponts, chemins de fer, aéroports, production et distribution alimentaire). Mais cette omniprésence des métaux dans notre quotidien remonte aux origines de la vie, une vie dont les ions métalliques constituent un important paramètre.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La ¹	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac ²															
1			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
2			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr	

Figure 1.1. Tableau périodique simplifié démontrant la répartition des ions métalliques et métalloïdes dans les différentes classes : **classe A**, **classe B** et **classe de transition**. Le Cu, en fonction de son état redox (ou état électronique) appartient soit à la classe B (Cu(I)) ou à la classe de transition (Cu(II)). ¹Famille du Lanthane ; ²famille de l'Actinium (adapté de Nieboer & Richardson (1980)).

Introduction générale

Tableau 1.1. Les sept métaux connus depuis l'Antiquité (adapté de Cramb (1996)).

N°	Métal (symbole)	Date (avant JC) ¹
1	Or (Au)	6000
2	Cuivre (Cu)	4200
3	Argent (Ag)	4000
4	Plomb (Pb)	3500
5	Etain (Sn)	1750
6	Fer (Fe)	1500
7	Mercure (Hg)	750

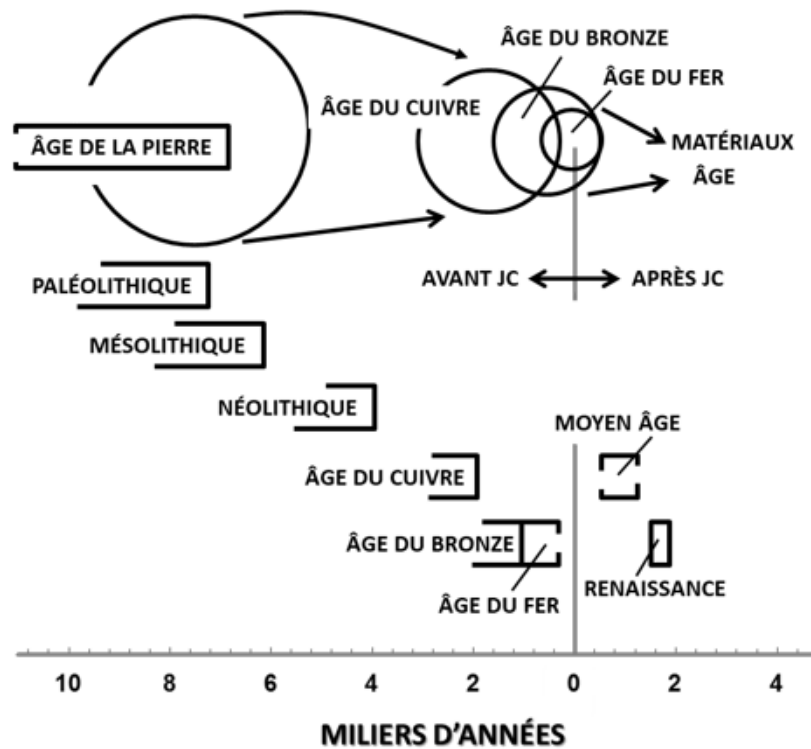
¹Date approximative de découverte

Figure 1.2. Schéma illustrant les âges des métaux comprenant l'âge de la pierre qui remonte aux temps préhistoriques (adapté de Murr (2015)).

2. Les métaux dans l'environnement : État des lieux et des connaissances scientifiques

2.1. Métaux et évolution du système biologique

Depuis son apparition sur la terre, la vie a toujours évolué en s'accommodant des changements de son environnement immédiat et/ou global. Aussi la survenue de l'oxygène sur la Terre s'est-elle accompagnée d'un réajustement du vivant (Kleczkowski & Garncarz, 2012). Ces réajustements se sont traduits surtout par l'incorporation de certains éléments métalliques dans le fonctionnement du vivant en mettant notamment à contribution leurs propriétés redox (Gardès-Albert *et al.*, 2003; Kleczkowski & Garncarz, 2012; Kropat *et al.*, 2005). Dès lors, s'est établi un équilibre entre la présence (disponibilité) en trace d'éléments métalliques dans l'environnement et les besoins du vivant en ces éléments, équilibre bien entretenu par une machinerie complexe, l'homéostasie (Perales-Vela *et al.*, 2006).

Cependant, depuis l'avènement de l'Homme et surtout plus récemment depuis la révolution industrielle (XIX^e siècle), cet équilibre, fruit de millions d'années d'évolution et d'adaptation, est compromis (Klaassen, 2013; Ronga-Pezeret, 2014). Les activités humaines ont particulièrement perturbé le cycle géochimique des métaux traces avec d'importantes répercussions pour les écosystèmes. L'exploitation industrielle des métaux, jusqu'ici bien enfouis dans la croûte terrestre, a eu pour conséquences leur dispersion à grande échelle dans les écosystèmes notamment aquatiques et leur mise en contact avec les organismes aquatiques à des concentrations dépassant parfois leurs besoins métaboliques (pollution, contamination) (Klee & Graedel, 2004). Ces organismes disposent en effet de mécanismes homéostatiques efficaces pour maintenir le bon équilibre des concentrations des métaux traces (Staehlin *et al.*, 2016). Mais la mobilisation d'éléments traces métalliques vers les systèmes aquatiques peut perturber ce contrôle homéostatique et avoir des impacts sur le biote qui, à défaut de s'adapter, vont disparaître. Outre les sources anthropiques de contamination, les métaux sont naturellement introduits dans les systèmes aquatiques principalement (i) par lessivages de la roche mère à la base de leur bassin versant ou (ii) par dépôts atmosphériques des poussières volcaniques.

Introduction générale

2.2. Oligo-éléments et eau douce

Les oligo-éléments ou les microéléments comme le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo) et le zinc (Zn) sont des éléments chimiques indispensables pour la plupart des organismes vivants. Les quantités requises en oligo-éléments sont beaucoup plus faibles que celles requises en macronutriments (Ca, Mg, K, N et P) (Johnsson, 2005). En raison de leur caractère indispensable à la vie, ils sont aussi qualifiés comme d'autres éléments chimiques d'éléments essentiels (Arnon & Stout, 1939). En effet, selon Manahan (1993), un élément est considéré comme essentiel pour un organisme lorsque celui-ci ne peut ni croître ni accomplir son cycle de vie en son absence ou ne peut pas être remplacé par tout autre élément et a une influence directe sur le métabolisme de l'organisme. Ce sont des éléments minéraux utilisés en quantité trace par la cellule pour répondre à ses besoins métaboliques. D'autres termes sont aussi utilisés dans la littérature comme synonyme des oligo-éléments à savoir «métaux traces», «éléments traces», «microéléments», «micronutriments» et «métaux lourds» (l'emploi de ce dernier terme est toutefois critiqué par certains, cf. (Pourret & Bollinger, 2018)).

Comme avec les macroéléments ou éléments majeurs (Na, K, Ca, Mg, N et P), les organismes aquatiques se procurent en oligo-éléments (ou éléments mineurs) directement de leur environnement immédiat. Environ une dizaine d'entre eux (Cu, I, Fe, Mg, Mn, Mo et Zn) est connue pour avoir des rôles biologiques spécifiques. Ils s'associent essentiellement aux molécules organiques soit comme métalloprotéines ou comme de simples complexes métaux-protéines. Alors que certains ont des rôles fonctionnels bien définis, d'autres sont présents et ne semblent pas avoir un rôle physiologique bien connu. S'ils sont indispensables aux métabolismes cellulaires à faibles concentrations, les oligo-éléments deviennent cependant, à concentrations élevées, toxiques.

Comprendre les mécanismes gouvernant les interactions biologiques et chimiques entre éléments traces métalliques et organismes aquatiques est la clé pour élucider d'une part leur rôle dans l'écologie des eaux naturelles et d'autre part celui des organismes aquatiques dans la géochimie des métaux. Pour mieux évaluer le risque écologique et établir un lien entre la concentration de métaux dans l'eau et la toxicité des métaux chez

Introduction générale

les organismes aquatiques, des modèles ont été développés (Paquin *et al.*, 2002). Dans la suite de ce chapitre nous présenterons ces outils dans les détails.

2.3. Modélisation et mécanisme d'action des métaux : Modèles de prise en charge des métaux dans l'eau (MIL et MLB)

Depuis environ quatre décennies, les études sur la biodisponibilité¹, la prise en charge, l'accumulation et la toxicité des métaux ont connu une production très prolifique initiée d'abord par les progrès de l'informatique puis grâce au développement de la chimie analytique. Dans les années 70, plusieurs travaux de recherche ont en effet permis d'aboutir à un consensus scientifique sur la spéciation chimique des métaux dans l'eau, admise comme un paramètre très important dans la détermination de leur réactivité, leur transport, leur devenir, leur biodisponibilité et leur toxicité potentielle (Smith *et al.*, 2015; Twiss *et al.*, 2001). Dans le même sillage, plusieurs programmes de calculs ont été développés pour modéliser la spéciation des métaux avec les ligands organiques et inorganiques (MINEQL, MINTEQA2, HydroGeoLogic, Visual MINTEQ, WHAM, etc.). Ces modèles de spéciation permettent de déterminer, sous l'hypothèse que l'équilibre thermodynamique est atteint, les parts relatives des différentes formes chimiques présentes en solutions. Ces progrès ont eu pour conséquence entre autres de mettre en évidence l'existence d'une forte corrélation entre l'activité de l'ion métallique libre (dont on peut désormais calculer la proportion dans une solution) et la prise en charge et la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques. De cette corrélation se dégage la théorie sur l'activité de l'ion métallique libre, théorie de base du développement des modèles de prise en charge des métaux que sont (i) le Modèle de l'Ion Libre (MIL) et son auxiliaire plus élaboré (ii) le Modèle du Ligand Biotique (MLB).

2.3.1. Aspects théoriques

En 1983, et se fondant sur les résultats de plusieurs travaux en milieu marin, Morel (1983) aura été le premier à formaliser théoriquement, dans le cadre du MIL, l'importance de l'activité de l'ion métallique dans l'eau. La toxicité ou la bioaccumulation d'un métal

¹ La biodisponibilité est la quantité d'une substance rendue disponible et capable d'interagir avec une surface cellulaire et déclencher une réponse biologique.

Introduction générale

varie en fonction de la concentration en ion métallique libre M^{z+} (ou aquo-ion et noté $M(H_2O)_n^{z+}$) en solution (Morel, 1983). L'activité de l'ion métallique libre reflète donc la réactivité globale du métal dans l'eau. Cette réactivité est un paramètre déterminant dans la modélisation de la biodisponibilité et la toxicité des métaux (Smith *et al.*, 2014; Twiss *et al.*, 2001). Toutefois, cette assertion ne suppose pas que l'ion métallique libre est la seule espèce métallique biodisponible (ou toxique). L'hypothèse du MIL indique plutôt que la réponse biologique est proportionnelle à l'activité de l'ion métallique libre en solution (Campbell, 1995; Campbell & Stokes, 1985; Di Toro *et al.*, 2001; Santore *et al.*, 2001).

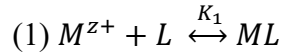
Des études ultérieures en eaux douces ont montré que, pour une même activité de l'ion métallique libre, d'autres facteurs tels que la dureté et le pH peuvent affecter la toxicité métallique (Allen & Hansen, 1996; Campbell, 1995). Sur la base de ces résultats, le concept du Modèle du Ligand Biotique (MLB) a été proposé et développé pour tenir compte à la fois la spéciation chimique et de la compétition des ions dans l'estimation de la toxicité des métaux (Paquin *et al.*, 2002; Santore *et al.*, 2001). Le MLB est un modèle qui repose sur les mêmes fondements conceptuels que le MIL. Une caractéristique commune entre ces deux modèles (MIL et MLB) est qu'ils utilisent des principes géochimiques pour caractériser les réactions qui se produisent en solution. Le MLB apparaît comme un modèle de calcul fédérateur qui prédit les effets de la chimie de l'eau sur la toxicité des métaux (Paquin *et al.*, 2002).

2.3.2. Cadre conceptuel

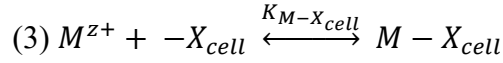
Le MLB prédit que la réponse biologique induite par un métal M dissout est une fonction directe de l'activité de l'ion métallique libre (Campbell, 1995). Il utilise la chimie des équilibres entre l'organisme et le milieu aqueux pour démontrer comment cette réponse biologique s'explique mieux par la concentration en cation du milieu (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2018). Il considère les sites de fixation du métal à la surface membranaire comme des ligands parmi d'autres en solution, susceptibles de liaison avec l'ensemble des espèces cationiques. Il décrit les interactions du métal avec la membrane biologique comme une réaction de complexation de surface avec un ligand cellulaire appelé **ligand biotique**. L'hypothèse principale du MLB est que le métal considéré est en équilibre dans le milieu, qu'il s'agisse de l'équilibre entre les différentes formes chimiques du métal ou de

Introduction générale

l'équilibre avec les différents ligands biotiques. La réaction de complexation avec le ligand biotique $-X_{cell}$ peut se matérialiser par les réactions suivantes :



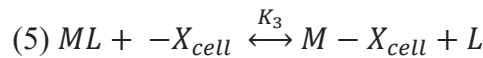
$$(2) K_1 = \frac{[ML]}{[M^{z+}] \cdot [L]}$$



$$(4) \{M - X_{cell}\} = K_{M-X_{cell}} \{-X_{cell}\} \cdot [M^{z+}]$$

Avec K_1 et $K_{M-X_{cell}}$ les constantes d'équilibre des réactions (1) et (3) respectivement et L un ligand en solution. Les symboles $\{ \}$ et $[\]$ correspondent respectivement à des concentrations à la surface biologique et en solution. En postulant que la réponse biologique varie en fonction de la concentration du complexe $\{M - X_{cell}\}$, c'est-à-dire selon le degré de saturation des sites $-X_{cell}$, et que la concentration des sites $-X_{cell}$ libres demeure approximativement constante dans la gamme d'exposition, on peut déduire à partir de l'équation (4) que la réponse biologique sera fonction de la concentration de l'ion métallique libre, $[M^{z+}]$, en solution.

Même si la réaction avec le ligand cellulaire $-X_{cell}$ s'effectuait par échange de ligands (par exemple avec le complexe ML), la concentration du complexe $\{M - X_{cell}\}$ peut aussi être fonction de la concentration en $[M^{z+}]$ en solution (Campbell, 1995). Si K_3 est la constante d'équilibre de la réaction d'échange avec ML , on a :



$$(6) \{M - X_{cell}\} = K_3 \cdot \frac{\{-X_{cell}\} \cdot [ML]}{[L]}$$

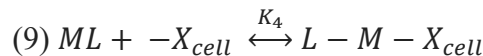
Or de (2) on peut avoir :

$$(7) \frac{[ML]}{[L]} = K_1 \cdot [M^{z+}]$$

Ainsi des équations (6) et (7) on a :

$$(8) \{M - X_{cell}\} = K_3 \cdot K_1 \cdot \{-X_{cell}\} \cdot [M^{z+}]$$

Toutefois, si la réaction (5) s'effectue sans échange de ligand, nous serions en présence d'un complexe ternaire $L - M - X_{cell}$:



Introduction générale

Et on aura :

$$(10) \{M - X_{cell}\} = K_4 \cdot \{-X_{cell}\} \cdot [ML]$$

Ainsi la formation du complexe ternaire donnerait lieu à une exception (Cf section 2.3.4) au MIL/MLB, car la concentration du métal à la surface cellulaire devient une fonction de la concentration du complexe ML d'intérêt, plutôt que de $[M^{z+}]$.

2.3.3. Mécanismes mis en jeu

Les deux modèles de prise en charge des métaux par les organismes aquatiques (MIL et MLB) supposent que parmi les diverses espèces métalliques en solution, seul l'ion métallique libre peut être transporté par les sites actifs (transporteurs, canaux ou les sites d'action toxique) de surface cellulaire, et ensuite induire des effets toxiques (Brown & Markich, 2000; Campbell, 1995; Morel, 1983). Comme évoqué plus haut, le BLM considère que d'autres constituants dissous présents en solution peuvent influencer sur l'ampleur de la fixation du métal sur les ligands biotiques. La principale caractéristique du MLB qui le distingue du MIL, est la prise en compte de la compétition de l'ion métallique libre avec d'autres cations majeurs (comme le Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ et H^+) pour la liaison aux ligands biotiques. Le MLB présente l'avantage d'intégrer l'ensemble des informations fournies par le MIL. Le fondement de ce modèle est de tenir compte de la densité des sites d'action toxique (Paquin *et al.*, 2002). Ainsi, l'effet biologique d'un métal se manifeste alors quand la concentration du complexe métal-ligand biotique $\{M - X_{cell}\}$ atteint un certain niveau critique (Di Toro *et al.*, 2001; Santore *et al.*, 2001). L'ensemble des mécanismes mis en jeu est décrit dans la Figure 1.3.

Introduction générale

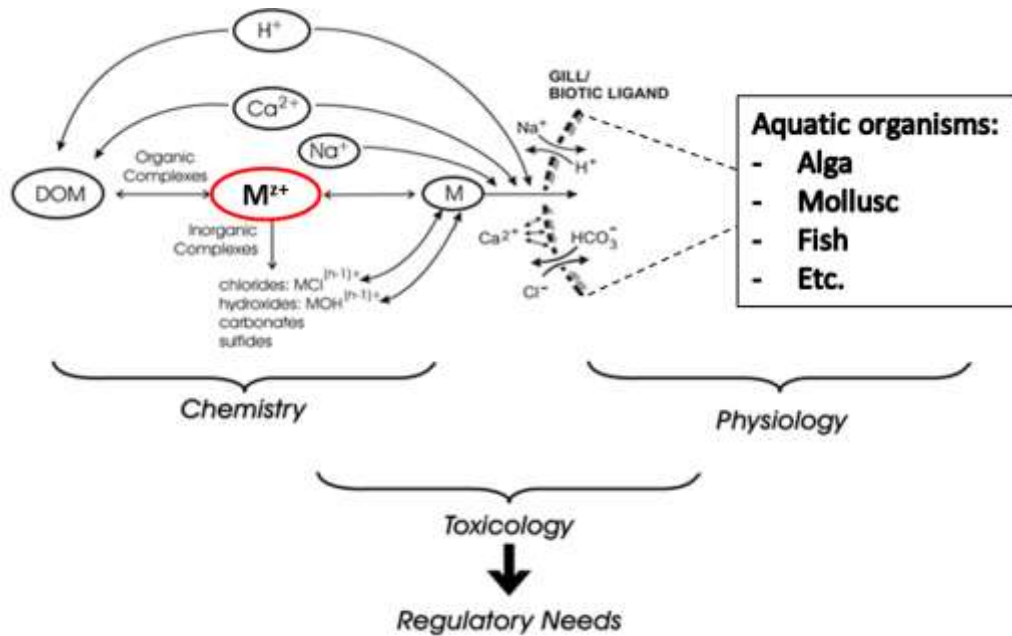


Figure 1.3. Schéma conceptuel de la prise en charge des métaux par les organismes aquatiques mettant en évidence les mécanismes en jeu dans le cadre du MLB (adapté de Paquin *et al.* (2002)).

2.3.4. Conditions d'application

Le MLB est un modèle développé sur la base d'hypothèses sur lesquelles il importe de veiller vu l'importance du modèle pour les scientifiques et les organismes réglementaires (Campbell, 1995; Campbell *et al.*, 2002) :

1. La membrane cellulaire constitue le site clé pour l'interaction des métaux en solution avec les organismes aquatiques. Pour traverser la membrane, le métal doit se lier au ligand biotique sous la forme d'une réaction de complexation de surface (équations 3 ou 5).
2. Le transport du métal de la solution à travers la couche de diffusion (voir Figure 1.4) vers la surface biologique et sa complexation avec le ligand biotique se produisent plus rapidement que l'internalisation (prise en charge par l'organisme aquatique), qui est l'étape limitante. Un pseudo-équilibre thermodynamique s'établit donc entre les espèces métalliques en solution et la surface cellulaire.

Introduction générale

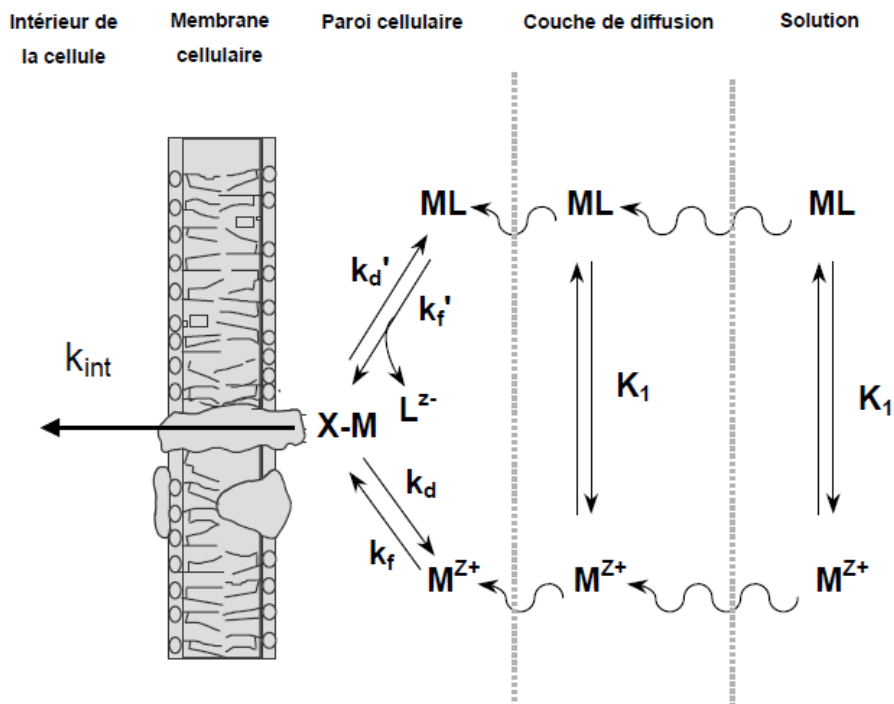


Figure 1.4. Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes et ses différentes étapes. M^{Z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^{Z-} = ligand (ex. : acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^-) ; $M-X$ = métal complexé à la surface (Campbell *et al.*, 2002).

3. La réponse biologique, définie comme étant la prise en charge ou la toxicité, est directement proportionnelle à la concentration du complexe de surface $\{M - X_{cell}\}$.
4. La concentration des sites de liaisons libres $\{-X_{cell}\}$ demeure relativement constante dans la gamme de concentration d'intérêt toxicologique du métal, c'est-à-dire lorsque $\{-X_{cell}\} \gg \{M - X_{cell}\}$.
5. La nature de la membrane biologique reste inchangée durant la période d'exposition du métal.

De façon générale, c'est le non-respect de ces critères qui engendre les diverses exceptions au MLB. Les exceptions au MLB peuvent être dues à plusieurs facteurs comprenant l'absorption de complexes organiques ou inorganiques spécifiques comme les complexes de citrate de cadmium ou de thiosulfate d'argent (Errecalde *et al.*, 1998; Fortin & Campbell, 2001) ou l'absorption par diffusion passive des complexes lipophiles (Croot *et al.*, 1999; Phinney & Bruland, 1997a; Phinney & Bruland, 1997b). Les exceptions à ce modèle se classent en quatre grands groupes (Campbell, 1995) :

Introduction générale

- (i) Le groupe des ligands organiques formant des complexes lipophiles avec le métal (Boullemant *et al.*, 2009).
- (ii) Le second groupe renferme des ligands inorganiques assimilables formant des complexes avec les métaux. C'est le cas du complexe thiosulfate-argent qui est transporté à travers la membrane plasmique par l'intermédiaire du système de transport sulfate/thiosulfate (Fortin & Campbell, 2001).
- (iii) Le troisième groupe d'exceptions comporte les ligands organiques de faible poids moléculaire produisant des complexes hydrophiles. Les travaux d'Errecalde *et al.* (1998) montrent clairement que la biodisponibilité du Cd et Zn diverge des prédictions du modèle en présence d'un métabolite de faible poids moléculaire, tels que le citrate qui facilite accidentellement la prise en charge du complexe métal-ligand à travers la membrane biologique ce qui semble en accord avec la disponibilité accrue du métal.
- (iv) Le quatrième cas implique la matière organique dissoute (MOD) naturelle avec des exceptions où la réponse biologique est supérieure ou inférieure à celle prédite en milieu inorganique (Campbell, 1995).

Ayant évoqué jusqu'ici les métaux traces de façon générale, nous allons, à partir de la session suivante, illustrer plus spécifiquement nos assertions avec des exemples sur le cuivre, notre métal d'intérêt, en utilisant davantage de littératures sur les microalgues.

2.4. Cuivre dans l'eau

2.4.1. Origine, propriétés et production

Le cuivre (Cu) est le 29^e élément du tableau périodique des éléments avec une masse atomique de 63,546 g·mol⁻¹. C'est un métal de transition appartenant au groupe 11 IB (argent, or), disposant de deux isotopes stables (⁶³Cu et ⁶⁵Cu) et de quatre états d'oxydation : Cu(0), Cu(I), Cu(II) et Cu (III). En revanche, l'ion cuivreux (Cu(II) ou Cu²⁺) est l'état redox généralement rencontré dans l'eau (Ellingsen *et al.*, 2007). Le cuivre est un métal ductile avec une bonne conductivité électrique et thermique. Dans la croûte terrestre, le cuivre occupe le 25^e rang d'abondance avec en une valeur moyenne de 55 ppm (mg·kg⁻¹) (Burkhead *et al.*, 2009; Misra, 2000). L'abondance moyenne du cuivre est comparable à

Introduction générale

celle du zinc (Zn ; 70 ppm), mais il est rare comparé au fer (Fe ; 50 000 ppm), à l'aluminium (Al ; 81 000 ppm) et au manganèse (Mn ; 950 ppm) (Burkhead *et al.*, 2009; Doerr, 2018).

Naturellement, on retrouve le cuivre sous forme de métal pur et de minéraux, le plus souvent sous forme de cuprite (Cu_2O) et de malachite ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$). Dans les minerais, le cuivre se trouve principalement sous forme de sulfures (CuS et Cu_2S), d'oxydes et de carbonates (Doerr, 2018; Wood, 1975). Les minerais les plus importants sont la chalcopirite ($\text{Cu}_2\text{S}, \text{Fe}_2\text{S}_3$), la bornite (Cu_5FeS_4) et la cubanite (CuF_2S_3) (Berry & Mason, 1961; Doerr, 2018). L'oxydation des minéraux sulfurés de cuivre se traduira par la libération de Cu^{2+} dans l'eau et la tendance de ce dernier à exister sous une forme hydratée $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (Flemming & Trevors, 1989). Les ions de cuivre en solution peuvent (i) être complexés, (ii) précipiter ou (iii) être adsorbés, et ces trois processus contrôlent les concentrations de cuivre dissous, la mobilité et la biodisponibilité du cuivre (Flemming & Trevors, 1989).

D'après Ressources naturelles Canada², la production minière mondiale de cuivre en 2019 était de 20 millions de tonnes. Au Canada, elle est d'environ 544 milles tonnes soit ~2,7% de la production mondiale.

2.4.2. Sources et émission du cuivre dans l'eau

Le cuivre est un métal ubiquiste présent naturellement dans les océans, les lacs, les rivières et les sols. Les sources naturelles et anthropiques contribuent toutes deux aux concentrations en cuivre de l'eau. Les sources naturelles comprennent l'érosion des roches, les éruptions volcaniques. Mais les sources anthropiques restent de loin les plus importantes contributrices. Les activités agricoles (engrais, pesticides, algicides) et industrielles (fonderies, raffineries, rejets industriels, plomberie et tuyauterie) peuvent affecter les sols et les plans d'eau. Les rejets en milieu aquatique sont principalement dus à l'érosion des équipements en cuivre ou en laiton. Mais les déchets urbains sont aussi une autre source importante de mobilisation. En effet, le traitement des eaux usées urbaines est l'une des sources non industrielles les plus importantes. Le cuivre est l'un des composés toujours détectés à l'entrée et la sortie des stations d'épuration des eaux usées. Les

² <https://www.rncan.gc.ca/nos-ressources-naturelles/mines-materiaux/faits-mineraux-metaux/faits-sur-le-cuivre/20577> (site web consulté le 14 avril 2021)

Introduction générale

concentrations de cuivre dans les rivières varient de 9 nmol·L⁻¹ à 6,5 µmol·L⁻¹, avec une médiane de 0,16 µmol·L⁻¹ (Moore & Ramamoorthy, 1984).

À l'échelle mondiale, la médiane annuelle des rejets anthropiques de cuivre dans les écosystèmes aquatiques ont été estimés en 1988 à 112 x 10⁶ kg (van der Voet *et al.*, 2013). Le tableau 1.2 nous donne une estimation des émissions anthropiques annuelles de cuivre dans l'eau au début des années 1980s.

Tableau 1.2. Émissions mondiales de cuivre (10³ t·an⁻¹) dans l'eau au début des années 1980 (d'après (Pacyna *et al.*, 1995)).

Sources	(10 ³ t·an ⁻¹)	Total
Traitement des déchets	11,6-70,0	34,7-190,5
Vapeur électrique	3,6-23,0	
Exploitation minière, fonte, raffinage	2,5-26,0	
Manufacture	11,0-56,5	

2.4.3. Le cuivre : Un métal essentiel

Le cuivre (Cu) est à la fois un oligo-élément essentiel et un métal potentiellement toxique pour les organismes aquatiques. C'est un métal de transition dont le caractère essentiel est lié à sa capacité à osciller entre deux états redox (I et II) (Doerr, 2018; Puig & Thiele, 2002).

En tant que nutriment, le Cu agit comme un cofacteur catalytique important dans la chimie redox des protéines qui exercent des fonctions biologiques fondamentales et nécessaires pour la croissance et le développement des organismes (Linder, 1991; Tapiero *et al.*, 2003). Il joue un rôle de 1^{er} plan au sein des centres actifs des enzymes qui catalysent notamment (i) la formation du tissu conjonctif (lysyl oxydase) (Festa & Thiele, 2011), (ii) la respiration cellulaire (cytochrome c oxydase) (de Romaña *et al.*, 2011), (iii) la photosynthèse (plastocyanines) (Grotz & Guerinot, 2006; Hanikenne *et al.*, 2009), et enfin (iv) le contrôle du niveau des radicaux d'oxygène (espèces réactives d'oxygène) avec le Cu/Zn-superoxyde dismutase (Asada *et al.*, 1975; Bowler *et al.*, 1994; Miller, 2012). Il participe également au transport de l'oxygène chez plusieurs espèces (hémoglobine, hémolymphe) (Brouwer *et al.*, 2003; Decker & Terwilliger, 2000; Magnus *et al.*, 1994). Le cuivre est utilisé dans plusieurs compartiments cellulaires et la répartition intracellulaire du

Introduction générale

cuivre est régulée en réponse à des demandes métaboliques et des changements dans l'environnement cellulaire (Kropat *et al.*, 2015; La Fontaine *et al.*, 2002a). Le tableau 1.3 présente les différentes cuproprotéines rencontrées dans les cellules végétales.

Les besoins en Cu varient en fonction des sources d'approvisionnement des organismes. Chez le poisson par exemple la voie alimentaire est la principale source en Cu avec un besoin quotidien qui varie entre 15 et 60 nmole de $\text{Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$ de poids sec (Lanno *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1997). Chez le phytoplancton d'eau douce, le besoin en Cu diffère d'une espèce à l'autre et dépend fortement de la spéciation. Par exemple chez *Scenedesmus subspicatus* l'optimum de croissance s'étend sur une large gamme de concentration en Cu^{2+} libre (de 10^{-15} à 10^{-7} M), soit environ huit ordres de grandeur ; la gamme optimale pour la croissance de *Chlorella fusca* couvre quant à elle environ trois ordres de grandeur de la concentration en Cu^{2+} libre (de 10^{-13} à 10^{-10} M). En revanche chez *C. reinhardtii*, l'optimum de croissance est atteint à une concentration relativement faible soit 10^{-11} M de $[\text{Cu}^{2+}]$ libre (Knauer *et al.*, 1997b). Par ailleurs, Knauer *et al.* (1997b) font observer globalement que le besoin en oligo-éléments peut varier entre les algues marines et dulcicoles.

Si à faibles concentrations le cuivre est essentiel à la vie des organismes, il devient toxique lorsqu'il est présent en excès. En effet, eu égard à ses propriétés redox, une légère augmentation du cuivre dans l'organisme peut entraîner une génération rapide de radicaux libres dans les tissus où il est accumulé. Ceci ne risque pas de se produire en milieu naturel où la concentration en cuivre ($8\text{-}80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) est suffisante pour répondre aux besoins des organismes (Kamunde *et al.*, 2002). Toutefois, dans une eau contaminée, la concentration en cuivre dissous peut dépasser les $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Bervoets & Blust, 2003; Campbell *et al.*, 2008). Le métabolisme du cuivre doit donc être étroitement régulé, pour assurer un approvisionnement suffisant sans accumulation toxique. On a en fait constaté que dans les eaux contaminées (notamment dans les zones affectées par des activités minières), les concentrations en Cu demeurent peu variables dans les organismes aquatiques récoltés de sites contaminés et moins contaminés (Giguère *et al.*, 2006; Rosabal *et al.*, 2012). L'homéostasie du cuivre implique donc un équilibre entre l'absorption, la distribution, l'utilisation, le stockage et la détoxification (Grosell *et al.*, 1997; Rainbow, 2002).

Introduction générale

Tableau 1.3. Quelques cuproprotéines et leurs fonctions dans les cellules végétales (Adapté de Rubino & Franz (2012)).

Cuproprotéines	Fonctions
<i>Protéines de transfert d'électrons</i>	
Plastocyanine	Transfert d'électrons pour la photosynthèse
Cytochrome c oxydase	Transfert d'électrons pour la respiration
<i>Oxydoréductases</i>	
Amine oxydase	oxydation des amines primaires (réduction de O_2 à H_2O_2)
Ascorbate oxydase	Oxydation des ascorbates (réduction de O_2 à H_2O)
Cu/Zn SOD	Dismutation du superoxyde (réduction de $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 , oxydation de $O_2^{\cdot-}$ à O_2)
Cytochrome c oxydase	(réduction de O_2 à H_2O)
Galactose oxydase	Oxydation des alcools primaires des sucres en aldéhydes (Réduction de O_2 à H_2O_2)
Laccase, tyrosinase	Oxydation des phénols (réduction de O_2 à H_2O)
Particules de méthane mono-oxygénase	Oxydation de CH_4 à CH_3OH (réduction de O_2 à H_2O , oxydation de $NADH$ à NAD^+)
Nitrite reductase	Réduction de NO_2^- à N_2
Oxyde nitreux réductase	Réduction de N_2O à N_2

2.4.4. Spéciation et biodisponibilité du Cu en eau douce

2.4.4.1. Spéciation du cuivre

L'importance de la spéciation du cuivre sur sa biodisponibilité et sa toxicité pour les organismes aquatiques (algues, mollusques, poissons, etc.) est bien documentée (Allen & Hansen, 1996; Smith *et al.*, 2015; VanBriesen *et al.*, 2010). Dans les systèmes aquatiques, le Cu(II), dont le caractère mou/dur est limite entre métaux de classe A et B (Mason & Jenkins, 1995), est alors soumis à l'influence de plusieurs processus et facteurs tels que la

Introduction générale

chélation par des ligands organiques. Par ailleurs, le cuivre est majoritairement sous forme particulaire dans les eaux naturelles et à tendance à se fixer, à précipiter ou à s'adsorber à la matière organique, aux oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse, ou aux particules d'argile (Adediran & Kramer, 1987). Les facteurs qui influent sur l'adsorption du cuivre comprennent le pH, les concentrations en cuivre, les cations compétiteurs ainsi que les propriétés des ligands (Smith *et al.*, 2015). La désorption de cuivre peut également se produire, en particulier en présence de fortes concentrations de cations compétiteurs tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} (Flemming & Trevors, 1989).

En solution, l'ion Cu^{2+} peut d'autre part se complexer avec OH^- et CO_3^{2-} pour former, par exemple, le $\text{Cu}(\text{OH})^+$ et le $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$. À cause de cette complexation avec le CO_3^{2-} , la biodisponibilité du cuivre diminue avec l'augmentation de l'alcalinité de l'eau. Dans les eaux de surface, l'ion Cu^{2+} forme également des complexes stables avec une large gamme de composés organiques tels que des acides humiques et fulviques. On trouve donc dans les rivières, 76 à 99% de cuivre sous forme de complexe organique (Flemming & Trevors, 1989). Bien que la proportion de Cu^{2+} peut être élevée en milieu acide, elle est typiquement faible (<5%) dans les eaux naturelles (Mueller *et al.*, 2012).

2.4.4.2. Biodisponibilité du cuivre

La biodisponibilité du cuivre reflète le potentiel du cuivre à se fixer aux récepteurs membranaires d'un organisme. Elle est fortement contrôlée par la chimie de l'eau et les diverses interactions qui s'y déroulent (Eriksen *et al.*, 2001; Lewis, 1995). Par ailleurs, la demande ou le besoin en cuivre d'un organisme dépend dans une grande mesure de l'état physiologique de l'organisme, mais aussi, comme évoqué précédemment, de la spéciation et de la teneur de l'eau en cuivre et autres éléments métalliques (zinc, fer, cadmium, etc.) qui sont des antagonistes métaboliques du cuivre. Plusieurs travaux soulignent en effet l'existence possible d'antagonismes entre métaux, notamment entre le Cu et le Zn (Hill & Matrone, 1970; Mason & Jenkins, 1995). Toutefois, les détails de ces mécanismes ne sont pas bien connus et d'autres travaux affirment que le Cu et le Zn ne seraient *a priori* pas en compétition pour le même site de fixation (Watanabe *et al.*, 1997).

Introduction générale

Un aspect particulier du cuivre comme un métal trace essentiel réside dans sa capacité à passer rapidement d'un état redox à un autre avec des affinités chimiques spécifiques qui influencent sa prise en charge par les organismes aquatiques.

2.4.5. Prise en charge et régulation du cuivre

2.4.5.1. Prise en charge du cuivre

La prise en charge (internalisation ou absorption) des métaux se fait par la liaison de ces derniers avec des ligands spécifiques de transport membranaire (Chowdhury & Blust, 2001). Elle est habituellement fonction de la concentration externe en ions métalliques libres suivant l'équation de la cinétique de saturation (Eq 11).

$$(11) V = \frac{V_{max} \cdot [M^{Z+}]}{K_s + [M]}$$

Où V_{max} est la vitesse maximum atteinte lorsque tous les ligands de transport sont totalement saturés et $[M^{Z+}]$ est la concentration de l'ion métallique libre. K_s est la constante de demi-saturation, équivalente à la concentration en ions métalliques libres à laquelle la moitié des molécules de transport est liée.

De façon générale, le mécanisme de prise en charge du Cu est relativement bien documenté. D'importants progrès ont été réalisés dans la connaissance des molécules de transports membranaires notamment chez les organismes chlorophylliens (algues, plantes) (Page *et al.*, 2009; Yruela, 2005). En effet, plusieurs familles de transporteurs de métaux traces ont été identifiées (Page *et al.*, 2009; Yruela, 2005). Pour ce qui concerne le transport du Cu, nous pouvons citer (i) les ATPases de type P qui interviennent dans la distribution de cuivre dans la cellule (Page *et al.*, 2009), (ii) les transporteurs de la famille des CTR (*Copper Transporter*)/COPT (*COPper Transporter*) qui fonctionnent dans l'acquisition de cuivre de l'eau vers l'intérieur de la cellule (Page *et al.*, 2009) notamment dans les conditions du milieu déficient en Cu (Dancis *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 2015) et (iii) les chaperons impliqués dans la distribution intra-organite de la cellule. Les transporteurs de la famille des CTR n'utilisent pas l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP, le Cu étant transporté dans la cellule suivant le gradient de concentration parce que le cuivre intracellulaire est immédiatement séquestré. La figure 1.5 résume le rôle de chaque famille de transporteurs

Introduction générale

dans les voies de transport du cuivre par la cellule. Les différentes fonctions de chaque transporteur de cuivre sont détaillées comme suit :

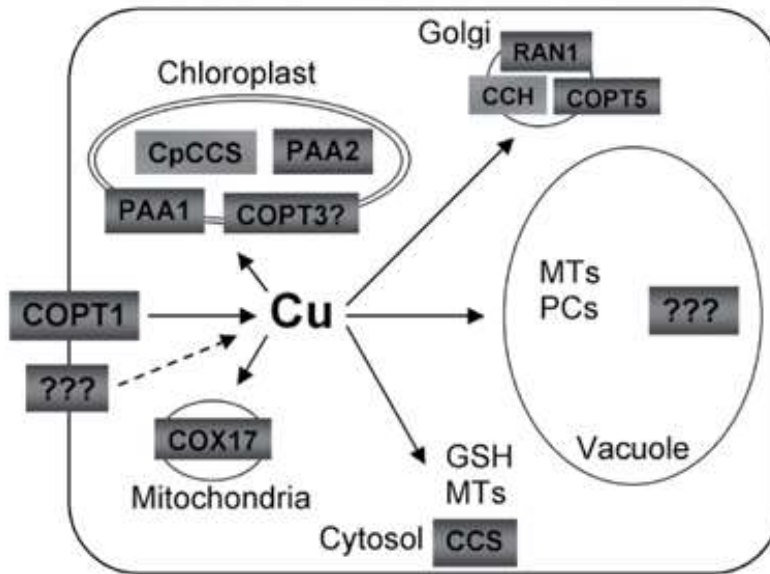


Figure 1.5. Schéma conceptuel des différentes voies de transport identifiées du cuivre dans une cellule végétale. Sont présentés : (i) Les transporteurs membranaires (COPT1, COPT3, COPT5, COX17, PAA1, PAA2, RAN1), (ii) les chaperons de cuivre (CCH, CCS, PCCC) et (iii) les facteurs de désintoxication (métallothionéines (MTs), phytochélatines (PCs) ou glutathion (GSH)) (d'après Yruela (2005)).

- ATPases de type P transporteurs de Cu : Ils font partie de la famille des ATPases type P transporteurs de métaux traces qui sont des molécules rencontrées dans un large éventail d'organismes, y compris les algues et contribuent au transport d'une gamme de métaux essentiels et potentiellement toxiques (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) à travers les membranes cellulaires. Ces ATPases sont classés en deux catégories : (i) les ATPases de type 1B (1B ATPases) et (ii) de type 1A (ces derniers seraient associés aux transports de K^{+}) (Palmgren & Axelsen, 1998). Il existe deux sortes d'ATPases de type 1B, à savoir ceux qui transportent les cations monovalents (Cu/Ag) et ceux qui transportent les cations divalents (Cd/Pb/Zn/Co) (Axelsen & Palmgren, 2001; Cobbett *et al.*, 2003).
- CTR/COPT (transporteurs de cuivre) : Très répandus, ces transporteurs de Cu sont identifiés dans les plantes et les algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) et seraient apparentés aux transporteurs CTR des levures. Quatre à cinq membres de cette

Introduction générale

famille, CTR/COPT, ont été trouvés chez *C. reinhardtii* (Page *et al.*, 2009) et *Arabidopsis thaliana* (Yruela, 2005).

- Chapérons à cuivre : Les chapérons à Cu appartiennent à la famille des protéines cytosoliques, solubles, et métallorécepteurs à faible poids moléculaire appelées métallochaperons. Ils participent aux trafics intracellulaires des ions métalliques. Les chapérons à Cu ont une fonction biologique essentielle pour le transport du Cu cytoplasmique vers les sites cuproprotéiques (et/ou cuproenzymes) spécifiques. Ce qui empêche ou limite les interactions inappropriées du Cu avec d'autres composants cellulaires. Chez les algues, trois différentes sortes de chapérons à Cu ont été mis en évidence : CCH, COX17 et CCS (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Shin *et al.*, 2012).

2.4.5.2. Régulation de la prise en charge du cuivre

En raison de sa nature hautement réactive, le Cu^{2+} se lie fortement à des ligands dans les cellules où il peut participer à des réactions dont les produits finaux sont susceptibles d'endommager les membranes cellulaires, les protéines et les acides nucléiques (Peña *et al.*, 1999). La prise en charge (adsorption et absorption) cellulaire comme la distribution intracellulaire d'un micronutriment aussi essentiel, mais potentiellement toxique, comme le cuivre, est donc un processus complexe (Pilon *et al.*, 2009; Tapiero *et al.*, 2003). L'homéostasie (c'est-à-dire le maintien à un niveau adéquat de la concentration intracellulaire) du cuivre est coordonnée par un ensemble de protéines veillant à ce qu'il soit livré aussi bien aux compartiments subcellulaires spécifiques qu'aux protéines à cuivre qui minimisent la présence d'ions de cuivre libres qui pourraient causer des dommages aux composants cellulaires. La régulation du cuivre est d'autant plus importante que sa réactivité avec le vivant est étroitement contrôlée par ses propriétés redox et sa capacité à former des liaisons de coordination stables avec les groupements thiols et imidazoles qui facilitent son insertion dans les protéines (Gray *et al.*, 2000).

La première stratégie dont dispose un organisme pour éviter la toxicité des métaux est d'empêcher l'entrée initiale (c.-à-d. la prise en charge) du métal dans la cellule (Mason & Jenkins, 1995). Parmi les mécanismes possibles pour atteindre cet objectif stratégique (limiter la prise en charge des métaux), celui qui semble plus pertinent dans le cadre de nos

Introduction générale

travaux consiste à réduire le transport cellulaire à travers la bicouche lipidique. Certaines espèces d'algues phytoplanctoniques utilisent en effet plusieurs mécanismes pour contrôler le flux d'internalisation des métaux essentiels. Le cas des perméases dont le fonctionnement est régulé par un mécanisme de rétroaction négative illustre bien cette stratégie. En effet, chez ces espèces, le nombre et les types de perméases membranaires pour un métal essentiel donné sont fonction de la concentration de ce métal dans les réservoirs intracellulaires (Sunda, 1989; Twiss *et al.*, 2004). Lorsque la concentration du métal est supérieure aux valeurs optimales de ces réservoirs, une réduction rapide du nombre de perméases se produit avec une réduction concomitante du taux maximal de transport. En revanche, lorsque les concentrations intracellulaires des métaux déclinent, l'inhibition de la rétroaction est suspendue avec une augmentation du nombre de nouvelles perméases (Mason & Jenkins, 1995). De plus d'après Mason & Jenkins (1995) la régulation de ce mécanisme serait de nature transcriptionnelle ou traductionnelle.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré que l'homéostasie des ions métalliques est principalement médiée par des transporteurs membranaires, soumis à un contrôle transcriptionnel étroit dans la plupart des cas (Pilon *et al.*, 2009). Ces travaux ont permis d'identifier des protéines membranaires (ATPases, COPT ou CTR) et cytoplasmiques (chaperons) participant respectivement à la prise en charge (ou dans l'exportation) et la distribution intracellulaire du cuivre par les cellules (Page *et al.*, 2009; Yruela, 2005). De manière générale, deux principaux systèmes de régulation du cuivre existent et sont modulés par la concentration en cuivre du milieu :

- **Un système de réponse à une carence en cuivre :** La réponse cellulaire directe à une carence en cuivre est sous le contrôle d'un régulateur de transcription dont l'activation entraîne la surexpression des gènes associés à l'import de cuivre de haute affinité. C'est le cas de régulateur Mac1 (chez la levure) induisant l'expression des gènes Ctr1 et Ctr3 (Georgatsou *et al.*, 1997) et du régulateur CRR1 (*Cu response regulator*) chez les algues vertes dulcicoles du genre *Chlamydomonas* (Burkhead *et al.*, 2009). L'intervention de Mac1 et de CRR1 répond à la diminution de la concentration en cuivre dans la cellule. Lorsque la concentration en cuivre devient suffisante, Mac1 et CRR1 sont alors spécifiquement dégradés (Zhu *et al.*, 1998). Outre l'augmentation de ses capacités d'import, la cellule peut mobiliser son

Introduction générale

stock de cuivre intracellulaire, grâce au transporteur de cuivre vacuolaire notamment (Rees *et al.*, 2004).

- **Système de réponse à un excès de cuivre :** En présence d'un excès de Cu, un facteur de transcription intervient comme régulateur en activant notamment l'expression des protéines de détoxification du cuivre. C'est le cas chez la levure du facteur de transcription Ace1p activant l'expression des protéines Cup1p et Crs5p (Gross *et al.*, 2000; Labbé & Thiele, 1999; Winge *et al.*, 1998). De même chez *C. reinhardtii*, l'implication du facteur de transcription CRR1 dans le mécanisme homéostatique du métabolisme du cuivre est très largement rapportée (Kropat *et al.*, 2015; Merchant *et al.*, 2020).

Afin de maintenir l'homéostasie des métaux, la plupart des organismes utilisent une combinaison des deux systèmes. La prise en charge d'un ion pouvant être régulé soit par inhibition de la machinerie d'import, soit en rendant le métal indisponible à l'absorption (Hill *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1979; Rutherford & Bird, 2004). Une telle stratégie est rapportée par Knauer *et al.* (1997a) et Sunda & Huntsman (1998a) dans la régulation des métaux essentiels (Cu, Zn et Mn) chez les microalgues du genre *Scenedesmus* et *Chlamydomonas*, respectivement. Elle est aussi évoquée chez les mammifères par Dameron & Harrison (1998) pour réguler partiellement la teneur en Fe. La Figure 1.6 résume de façon schématique les différentes voies de la prise en charge du cuivre par une cellule algale :

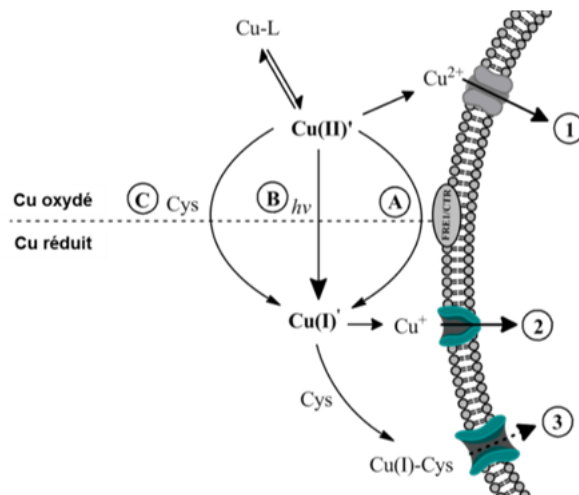


Figure 1.6. Résumé schématique des mécanismes de prise en charge du cuivre par une cellule algale : (A) Réduction du Cu(II) par les réductases de la membrane cellulaire (Jones *et al.*, 1987) ; (B) Production

Introduction générale

photochimique de Cu(I) (Moffett & Zika, 1988); (C) Réduction facilitée par des ligands thiolés (Walsh *et al.*, 2015). (1) Prise en charge de l'ion Cu^{2+} par un système à faible affinité. (2) Prise en charge de l'ion Cu(I) par un système à forte affinité. (3) Prise en charge du Cu(I) par la voie d'assimilation de la cystéine (Walsh *et al.*, 2015).

2.4.6. Toxicité du cuivre

Le cuivre est un métal trace essentiel qui est nécessaire en petites quantités ($0,1-3,15 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) pour les besoins métaboliques des organismes vivants (algue, crustacés, poissons, mammifères, etc.). Il intervient notamment dans le fonctionnement d'une trentaine d'enzymes. Cependant, au-delà de $3,15 \times 10^{-1} \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ le cuivre peut être toxique (Bradl, 2005; Wright & Welbourn, 2002).

Les effets du cuivre sur les organismes aquatiques peuvent être directs ou indirects. Différentes espèces, et même des organismes de la même espèce, peuvent présenter des sensibilités différentes au Cu dans l'eau. Les poissons et les crustacés sont 10 à 100 fois plus sensibles aux effets toxiques du cuivre que sont les mammifères. Les algues, en particulier les algues bleues et vertes, sont 1000 fois plus sensibles aux effets toxiques du cuivre que les mammifères (Wright & Welbourn, 2002). On peut classer les organismes en deux catégories en fonction de leur comportement face au cuivre (Whitacre, 2011) :

- Ceux qui vont bioaccumuler et stocker le cuivre (bivalves, balanes et insectes aquatiques),
- Ceux qui vont activement réguler le niveau du cuivre (poissons, crustacés décapodes et algues)

De façon spécifique, la toxicité du cuivre est généralement due à son action inhibitrice sur l'activité des enzymes à ATP (ATPase à Na/K, ATPase à Mg^{2+} et ATPase à Ca^{2+}) perturbant en conséquence le flux des ions (Blanchard & Grosell, 2005; McIntyre *et al.*, 2008). Soulignons que cette capacité inhibitrice du Cu vient en effet de sa forte affinité pour les groupements thiolates et la liaison peptidique. Il peut ainsi se lier et inactiver les sites actifs de certaines enzymes ou former des complexes non spécifiques avec toutes sortes de protéines.

En outre, les propriétés redox de cuivre peuvent conduire à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) lorsque les niveaux de cuivre cellulaires sont élevés (Bopp *et al.*, 2008; Harris & Gitlin, 1996). En effet, les ions libres deviennent toxiques dans la

Introduction générale

cellule en créant des ERO (exemple des radicaux hydroxyles au cours de réactions de type Fenton) : $Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH^{\bullet}$. Les ERO sont des molécules radicalaires très réactives qui peuvent endommager durablement tous les constituants de la cellule *via* : (i) la rupture des brins d'ADN par oxydation des acides nucléiques (génotoxicité) et (ii) l'oxydation des lipides et des protéines (troubles de la perméabilité de la membrane cellulaire). Quel que soit le résultat, l'une ou l'autre des deux voies compromet le fonctionnement normal de la cellule (Laliberte & Labbe, 2008).

Enfin le cuivre et certains autres métaux de transition ayant des propriétés chimiques proches, l'excès de l'un peut déplacer l'équilibre de certains cofacteurs métalliques avec leur site de liaison (Stohs & Bagchi, 1995). C'est le cas notamment des protéines en doigt de zinc³, au sein desquelles le Zn(II) peut être remplacé par le Cu(II), empêchant ces protéines de se lier à leurs séquences spécifiques sur l'ADN (Sarkar, 1995). C'est dans ce sens qu'en analysant la détoxification des métaux, Mason & Jenkins (1995) ont proposé trois classes de ligands ou biomolécules subcellulaires physiologiquement importantes pour contrôler les effets des métaux. La première classe est faite de biomolécules dont la liaison au métal induit des effets bénéfiques. C'est par exemple le cas des apométalloenzymes qui nécessitent un cofacteur métallique pour leur fonctionnement. La deuxième classe est l'exact contraire de la première. Elle est constituée de biomolécules dont la liaison au métal entraîne des effets délétères pour la cellule. C'est notamment le cas des molécules qui sont inactivées lorsqu'elles sont liées à un métal inapproprié. Enfin, la troisième classe regroupe les ligands dits insensibles aux métaux, leur complexation avec le métal n'induisant ni effets bénéfiques ni délétères. D'après Campbell & Hare (2009), la distribution subcellulaire des métaux sont sous le contrôle de divers systèmes fondés sur ces trois classes de biomolécules.

2.4.7. Mécanismes de détoxification du cuivre

Les ions métalliques n'étant pas biodégradables, les systèmes mis en place par les organismes pour contrer la toxicité des métaux traces utilisent divers mécanismes. Ces

³ Les **doigts de zinc** (ou *zinc fingers* en anglais) sont des motifs structuraux de petites tailles trouvés dans les protéines et capables de complexer un ou plusieurs ions zinc pour stabiliser leurs plis. Ils fonctionnent typiquement comme des domaines d'interaction avec l'ADN, l'ARN, les protéines ou de petites molécules Wikipedia c (2016) Zinc finger

Introduction générale

mécanismes peuvent être de nature génétique ou physiologique et dépendent fortement des processus biochimiques du métabolisme des métaux se produisant dans les cellules. Les cellules algales utilisent à la fois des approches extra et intracellulaires pour mettre en œuvre ces mécanismes de lutte contre la toxicité des métaux (Priyadarshini *et al.*, 2019). D'après Gaur & Rai (2001), ces mécanismes peuvent être classés en trois grandes catégories : (i) La séquestration des métaux sur les composants extracellulaires, (ii) la séquestration des métaux par des chélateurs intracellulaires et (iii) l'efflux de métaux de la cellule.

2.4.7.1. Séquestration des métaux sur des composants extracellulaires

Ce mécanisme vise à réduire la biodisponibilité des métaux, leur prise en charge par la cellule et enfin leur concentration intracellulaire. Ce mécanisme comprend deux volets différents à savoir la liaison des ions métalliques sur la surface cellulaire et l'exsudation des ligands complexant les métaux (Gaur & Rai, 2001).

La liaison des ions métalliques sur les polymères extracellulaires et sur les parois cellulaires a souvent été invoquée dans la littérature comme un des plus importants mécanismes notamment chez les algues (Mangal *et al.*, 2019; McIntyre & Guéguen, 2013; Vasconcelos & Leal, 2008). Elles peuvent en effet, grâce aux exo-polysaccharides présents sur la paroi cellulaire, accumuler jusqu'à 80-90% des métaux en solution (Gaur & Rai, 2001; Mehta *et al.*, 2000). La présence de groupes carboxyle, phosphatiques et autres sur la paroi cellulaire lui confère une charge négative nette grâce à laquelle ces groupes fonctionnels participent à la liaison des métaux soit par échange d'ions ou par d'autres mécanismes (Crist *et al.*, 1988; Gaur & Rai, 2001). Certains auteurs pensent que la liaison des métaux sur la surface de l'algue comprenait aussi bien la liaison aux ligands spécifiques (transporteurs protéiques) qu'aux sites d'adsorption inertes. D'après Genter (1996), un mutant de *Chlamydomonas reinhardtii* déficient en paroi cellulaire, aurait été plus sensible au Cd^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} que la souche originale.

Quant à l'exsudation des ligands complexant les métaux, ce sont Fogg & Westlake (1953) qui auraient été les premiers à évoquer ce processus en rapportant la complexation et la détoxification de Cu^{2+} par un matériau extracellulaire produit par *Anabaena cylindrica*. Ce mécanisme de production d'exsudats, connu chez les micro-organismes comme une

Introduction générale

importante stratégie pour surmonter la carence en fer (sidérophores), est décrit aussi chez plusieurs espèces d'algues comme mécanisme pour éviter aussi la toxicité des métaux comme le Cu^{2+} (Gaur & Rai, 2001; Vasconcelos & Leal, 2008). La production par des cellules eucaryotes d'agents complexant fortement les métaux a également été rapportée par Xue & Sigg (1990). Mais depuis lors, des observations de la sécrétion par les algues, à la fois, de ligands de forte et de faible affinités ont été aussi décrites, les deux ligands (de forte et de faible affinités) pourraient être importants pour protéger les algues de la toxicité des métaux (Gaur & Rai, 2001).

2.4.7.2. La formation de complexes intracellulaires

La formation de complexes métalliques est omniprésente dans la cellule (La Fontaine *et al.*, 2002b; Outten *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 1999). Elle permet de stocker temporairement les cations notamment sous forme de composés soufrés (groupements thiols). Les systèmes moléculaires impliqués dans la formation de ces complexes comprennent la séquestration dans les corps polyphosphates, les phytochélatines et les métallothionéines, ou la liaison à des chélateurs puissants ou faibles, mais abondant (comme le polyphosphate) (Cobbett, 2000a; Twiss & Nalewajko, 1992). La détoxification peut également impliquer le système redox des métaux de transition pour atteindre des états d'oxydation moins toxiques ou moins solubles. De plus, des réponses aux effets des métaux peuvent améliorer la détoxification, comme c'est le cas lorsque les métaux provoquent un stress oxydatif dans la cellule induisant ainsi une toxicité qui peut être atténuée par la synthèse d'enzymes ou de métabolites appropriés qui neutralisent le stress oxydatif induit par les métaux. La tolérance à un métal peut dépendre du déploiement simultané de plusieurs de ces stratégies. Ci-dessous, nous passons succinctement en revue les plus importantes :

2.4.7.2.1. Système des Glutathion/Phytochélatines

Le glutathion (GSH : γ -Glu-Cys)-Gly) est formé d'un ensemble de trois acides aminés (acide glutamique, cystéine et glycine). En se polymérisant, le GSH forme les phytochélatines (PCs). Les PCs de structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (avec n variant de 2 à 11), ont été décrites chez les végétaux, les algues et certains champignons (Cobbett, 1999; Cobbett, 2000a; Grill *et al.*, 1987; Perales-Vela *et al.*, 2006). Par ailleurs, certaines variantes structurelles des PCs ont été identifiées chez certaines espèces végétales à savoir :

Introduction générale

γ -GluCys) $_n$ - β -Ala, (γ -GluCys) $_n$ -Ser et (γ -GluCys) $_n$ -Glu (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Les GSH et les PCs forment des complexes avec la plupart des métaux traces dont le cuivre jouant ainsi un rôle important dans les mécanismes cellulaires de détoxification des métaux (Balzano *et al.*, 2020; Cobbett & Goldsbrough, 2002; Perales-Vela *et al.*, 2006).

2.4.7.2.2. Système des Métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) jouent également un rôle essentiel dans la complexation des métaux. Ce sont de petites protéines, de faible masse moléculaire (4 à 8 kDa), généralement riches en cystéines (environ 30 %), sans histidines ni acides aminés aromatiques (Sabolić *et al.*, 2010). Elles sont constituées de deux sous-unités α et β , chacun présentant un cluster métal-thiolate (Figure 1.7) et dont les parties liées aux métaux sont caractérisées par six séquences répétitives de C-X-C (où C symbolise la cystéine et X n'importe quel autre acide aminé) (Balzano *et al.*, 2020; Sabolić *et al.*, 2010). Grâce aux groupes thiol (SH des cystéines, les MTs possèdent une forte affinité ou capacité de liaison avec divers ions métalliques. Ainsi, une molécule d'apo-MT (i.e. MT libre ou non liée aux métaux) peut lier 7 à 9 ions Zn^{2+} ou Cd^{2+} (ou toute combinaison de ces deux), jusqu'à 12 ions Cu et jusqu'à 18 ions Hg (Sabolić *et al.*, 2010). Les MTs sont surtout présentes chez les animaux, mais aussi chez certaines plantes, algues et bactéries (Balzano *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2009; Tripathi & Poluri, 2021). D'après La Fontaine *et al.* (2002a), les algues unicellulaires du genre *Chlamydomonas* ne disposeraient pas d'informations génétiques propres pour les MTs et utiliserait la voie des PCs pour la détoxification du cuivre et d'autres métaux.

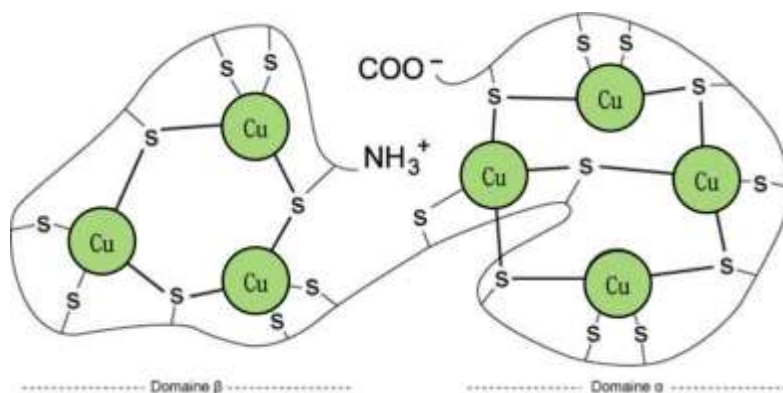


Figure 1.7. Représentation schématique d'une MT eucaryote. Ici, les deux domaines de la protéine (fragments α et β) lient respectivement 4 et 3 atomes de cuivre (adaptée du site internet : <https://www.analyticaltoxicology.com/metalllothioneines/>, consulté le 26 mars 2021).

Introduction générale

Le coût énergétique de la biosynthèse de ces molécules complexantes étant très élevé, la formation de complexes ne serait envisagée comme une voie efficace de détoxification que dans le cas d'expositions aux métaux traces en faible concentration (Nies, 1999).

2.4.7.2.3. *Système des Polyphosphates*

Les polyphosphates sont des polymères d'orthophosphates (Pi) rencontrés chez plusieurs espèces d'algues qui les mobilisent pour répondre à ses besoins métaboliques notamment lorsqu'elles subissent une carence en phosphore (Gaur & Rai, 2001). Ils sont présents dans la cellule sous forme de granules de polyphosphates (poly P) et localisés dans de petites vacuoles dont la membrane dispose d'un mécanisme enzymatique pour opérer leur acidification. Leur densité électronique, leur acidité et leur enrichissement en pyrophosphate (PPi), poly P et cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) sont autant de caractéristiques communes avec des organites de cellules eucaryotes décrits comme des acidocalcisomes par Ruiz *et al.* (2001). Les acidocalcisomes ont de multiples rôles liés aux fonctions de leurs principaux constituants, PPi, poly P et cations (Docampo, 2006). Nous évoquerons plutôt ici leur rôle dans la complexation des métaux et donc leur détoxification (Kulakovskaya, 2018; Ruiz *et al.*, 2001; Xie & Jakob, 2019). En effet, chez les algues, la disponibilité en phosphore est souvent synonyme d'une atténuation de la toxicité des ions métalliques (Gaur & Rai, 2001). Cette capacité est liée au caractère polyanionique des polyphosphates qui permet l'attraction des cations électrophiles vers les atomes d'oxygène riches en électrons des polyphosphates (Gaur & Rai, 2001). Une analyse par dispersion énergétique aux rayons X a montré que les polyphosphates peuvent accumuler plusieurs métaux. Ils peuvent se complexer aux métaux « durs » comme le Ba, le Mn et le Zn en conformité avec leur grande affinité pour l'oxygène. Ils peuvent aussi complexer des métaux « moyennement durs » (Cu, Co, Pb) et même certains métaux « mous » (Cd et Hg).

2.4.7.2.4. *Oxydoréduction*

Elle est utilisée par certains micro-organismes pour séquestrer les métaux. Elle consiste en la réduction d'un métal jusqu'à un état d'oxydation le moins toxique possible. Pour être réduit, le métal doit posséder un potentiel redox compris entre celui des couples H_2/H^+ (-421 mV) et $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (+808 mV) ; ceci représente l'échelle physiologique redox

Introduction générale

pour la plupart des cellules aérobies. Le cuivre par exemple (-268 mV) peut être réduit dans la cellule alors que ce n'est pas le cas pour le zinc (-1180 mV). Toutefois, la plupart des produits de réduction sont soit insolubles (Cr^{3+}), soit encore plus toxiques (AsO_2^-) que les espèces non réduites. Aussi, la réduction est-elle nécessairement couplée à la séquestration de l'ion réduit, l'empêchant ainsi de nuire, ou à l'efflux du composé réduit (Nies, 1999).

2.4.7.3. Efflux

L'efflux est un système qui permet de réduire l'accumulation intracellulaire de métaux traces. Il fait intervenir des ATPases de transport à métaux (Cu, Zn, Cd, Pb, Ag ou As). Par exemple, il existe, chez la levure, une pompe à cadmium codée par le gène *ycf1* (Li *et al.*, 1997). La surexpression de *ycf1* permet la croissance de la levure jusqu'à une concentration en cadmium de 500 μM . Ce transporteur, situé dans la membrane de la vacuole, permet d'extraire le métal du milieu cytoplasmique. Ce mécanisme de détoxification est également largement utilisé chez les procaryotes.

Différents systèmes enzymatiques qui interviennent dans l'excrétion et la compartimentalisation des métaux, ainsi que dans les réponses aux stress oxydatifs, participent également aux mécanismes de détoxification (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Hanikenne *et al.*, 2009).

2.4.7.4. Localisation et spéciation intracellulaire du cuivre

La localisation et la spéciation intracellulaire du Cu (ou de toute autre espèce chimique) sont comme les deux faces d'une même pièce de monnaie étant donné qu'il nous semble difficile d'évoquer l'une sans implicitement évoquer aussi la seconde. Aussi, étudier ces deux notions revient tout simplement à comprendre comment se déroule le trafic intracellulaire du Cu, plus spécifiquement celui du Cu^+ . Nous avons souligné plus haut (session 2.4.6) que les propriétés redox du Cu en font une espèce chimique dont les mécanismes de prise en charge dans une cellule eucaryote sont étroitement régulés pour éviter notamment une surcharge en Cu libre susceptible d'entraîner une production de radicaux libres et des dégâts oxydatifs sévères (Lloyd & Phillips, 1999). Ces mécanismes impliquent donc des transporteurs membranaires spécifiques, dont les affinités (forte ou faible) pour le Cu, sont très bien calibrées pour répondre adéquatement aux enjeux du stress dû au cuivre (Burkhead *et al.*, 2009; Kropat *et al.*, 2015; Merchant *et al.*, 2020). Aussi, une

Introduction générale

fois à l'intérieur de la cellule, la distribution du Cu devrait-elle subir rigoureusement les mêmes contrôles étroits. Les enzymes et protéines à cuivre étant présentes dans tous les compartiments cellulaires, il en résulte donc une évolution adaptative de tous les mécanismes pour réguler le transport du Cu intracellulaire. C'est en effet le rôle des métallochaperons d'acheminer le cuivre (Cu^+) depuis son point d'entrée au niveau de la membrane plasmique jusqu'à sa destination. Chez *S. cerevisiae*, des expériences génétiques ont mis en évidence de petites protéines cytosoliques pouvant se lier aux Cu^+ et les conduire vers des compartiments spécifiques ou vers des protéines cibles dans la cellule (Lee *et al.*, 2005b; Lee & Thiele, 2000; Winge *et al.*, 1998). Il s'agit notamment des chaperons ATX1, CCS et COX 17 qui délivrent le Cu au (i) compartiment sécrétoire (d'où le Cu^+ est transféré à une ATPase de type P chargée de doter une protéine à Cu (par exemple la ferroxidase Fet3) en autant de Cu que nécessaire pour son fonctionnement optimal), (ii) Cu/ZnSOD cytosolique et (iii) Cyt c oxydase des mitochondries, respectivement (Burkhead *et al.*, 2009; Kropat *et al.*, 2015; Merchant *et al.*, 2020; Rae *et al.*, 1999). Le seul chaperon de Cu^+ présent à la fois chez l'algue verte *C. reinhardtii* et dans les plantes terrestres est ATX1 et sa fonction est analogue à ATOX1 et Atx1 des mammifères et levures, respectivement. Alors que le métallochaperon chargé de délivrer le Cu^+ dans les chloroplastes est resté très longtemps non élucidé, les travaux de Blaby-Haas *et al.* (2014) ont apporté la preuve que chez *Arabidopsis thaliana*, un chaperon, nommé PCH1 (plastid chaperone 1), délivre du Cu^+ spécifiquement à un ATPase chloroplastique de type P, PAA1 (P-type ATPase in Arabidopsis 1). Ce chaperon de Cu^+ aurait en effet évolué très tôt chez les végétaux par épissage alternatif du pré-ARNm codant pour PAA1. Ainsi, dans les plantes, PCH1 est codé soit par épissage alternatif du pré-ARNm de PAA1 soit à partir d'un locus séparé. Ces travaux ont aussi permis de découvrir une interaction entre le CCS (le chaperon de Cu^+ pour le Cu/Zn SOD du stroma) et PAA2, puis de conclure que PAA1 et PAA2 fonctionneraient en tandem ; PAA1 important du Cu^+ cytosolique dans le stroma et PAA2, l'amenant dans la lumière du thylacoïde (Blaby-Haas *et al.*, 2014).

Pour finir, soulignons que l'implication de certaines biomolécules dans le contrôle de l'homéostasie du Cu, fait d'elles des actrices clés dans la localisation et la spéciation du Cu dans les cellules d'algues. Il s'agit en effet (i) des ATPases de type P qui pompent activement les ions Cu à travers la membrane cellulaire (Blaby-Haas & Merchant, 2012);

Introduction générale

(ii) des phytochélatines pour la détoxification du Cu (Smith *et al.*, 2014); et (iii) des exsudats de type phytochélatine, chélatant le Cu pour l'excréter (Hall, 2002; Xue & Sigg, 1990).

2.5. Méthodes d'étude des interactions métaux-organismes dans l'eau

2.5.1. Contexte général

Les métaux sont présents dans l'eau sous différentes formes chimiques, soit sous forme d'ions libres ou sous forme de complexes avec des ligands de nature chimique différente (chlorures, carbonates, hydroxydes et matière organique dissoute, particules en suspension) (Di Bonito *et al.*, 2018; McIntyre & Guéguen, 2013; Parent *et al.*, 1996). La Figure 1.8 illustre les interactions entre un ion métallique libre (M^{z+}) et les trois catégories de ligands avec lesquels des complexes peuvent se former dans l'eau. Les ligands jouent un rôle important dans la spéciation des métaux, en fonction notamment de l'environnement et des propriétés intrinsèques du métal d'intérêt. Les interactions métaux-organismes devraient donc dépendre aussi de la forme dans laquelle les métaux se trouvent dans le milieu. D'où l'importance, de connaître l'ensemble des paramètres physico-chimiques pouvant modifier leur spéciation et agir ainsi sur leur assimilation par les organismes (Lavoie *et al.*, 2016a; Twiss *et al.*, 2001). Les approches méthodologiques utilisées pour étudier la toxicité et la détoxification des métaux chez les organismes aquatiques devraient donc intégrer ces réalités dans leur design.

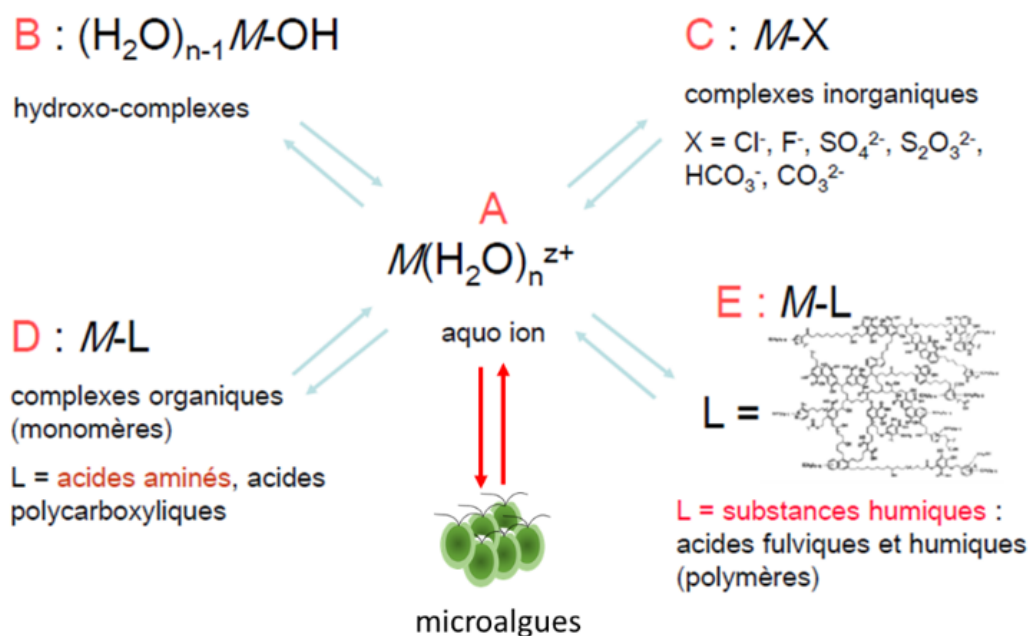


Figure 1.8. Schéma général montrant la spéciation des métaux en solution (adaptée de Twiss *et al.* (2001)).

Introduction générale

2.5.2. Organisme modèle

2.5.2.1. Généralité

D'après Segner & Baumann (2016) le terme espèce modèle ou organisme modèle fait référence à une espèce étudiée pour comprendre les principes des phénomènes biologiques qui ne sont pas spécifiques à l'organisme étudié, mais qui sont de nature plus générale. Les organismes modèles nous enseignent les principes de fonctionnement de base, qui sont les mêmes dans tous ou dans de nombreux organismes. Ainsi, la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* peut nous apprendre quelque chose sur les humains. Les espèces modèles doivent répondre à des critères techniques tels qu'un entretien facile et peu coûteux en laboratoire, une croissance rapide et un potentiel reproducteur élevé, une traçabilité génétique ou la disponibilité d'un large éventail d'outils expérimentaux et méthodologiques. C'est en vertu de ces critères que le poisson zèbre (*Danio rerio*) peut par exemple, aujourd'hui être utilisé comme organisme modèle pour les maladies humaines (Ablain & Zon, 2013; Segner & Baumann, 2016). En écotoxicologie, les organismes modèles sont utilisés dans les bio-essais (ou tests de toxicité) comme indicateurs de la toxicité potentielle d'un échantillon (élément ou produit chimique). Pendant longtemps, l'évaluation et le contrôle des effluents potentiellement toxiques reposaient uniquement sur des analyses chimiques. Non seulement cette approche est très coûteuse, mais ne permettait pas la détection de toutes les espèces chimiques susceptibles de provoquer une réponse toxique. L'intégration des bio-essais permet de rendre compte de la toxicité des substances sur la base de critères ou de paramètres biologiques mesurés et croisés avec les données chimiques. Traditionnellement, la mortalité était le paramètre le plus analysé à travers des tests de toxicité aiguë, cependant, les normes établies uniquement sur la base des tests de létalité aiguë se sont révélées inadéquates et moins pertinentes en matière de protection environnementale. De plus, les contraintes éthiques liées à l'utilisation de certains organismes (souris, poisson, grenouille, etc.) ont restreint l'utilisation continue de ces tests. Aussi a-t-on développé, des essais biologiques basés sur des réponses sublétales ou chroniques (croissance, taille, poids, etc.), plutôt que sur la mortalité uniquement. De nos jours, plusieurs paramètres ont été ajoutés à cette liste au fur et à mesure de l'évolution des connaissances et des technologies allant jusqu'au niveau moléculaire (Egorova & Ananikov, 2017; Schade *et al.*, 2019). Dans leur revue de littérature, Segner & Baumann

Introduction générale

(2016) ont résumé en trois points les domaines dans lesquels les espèces modèles peuvent éclairer l'évaluation des risques écotoxicologiques. Il s'agit notamment d'informer sur (i) l'extrapolation interspécifique des modes d'action des produits chimiques, (ii) la propagation des effets des produits chimiques, des premiers effets moléculaires aux effets toxiques et (iii) les conditions d'extrapolation interspécifique des effets toxicologiques et écologiques. Au total, les espèces modèles sont utiles pour (i) identifier les mécanismes qui gouvernent la toxicité des produits chimiques, (ii) prédire les conséquences toxicologiques et écologiques de l'exposition aux produits chimiques et (iii) évaluer dans quelles conditions les informations sur le mode d'action et les effets sur une espèce peuvent être extrapolés à d'autres espèces.

L'utilisation des algues unicellulaires dans les bio-essais date des années 1970, initialement pour évaluer le potentiel d'eutrophisation des eaux douces recevant des effluents (Stauber, 1995). Cependant, en raison de leur sensibilité, reproductibilité, facilité à entretenir et pertinence écologique, les essais biologiques sur les algues se sont largement répandus et sont utilisés pour évaluer divers effets ou stress dus aux xénobiotiques (Florence *et al.*, 1994; Stauber, 1995). En effet, les algues unicellulaires sont la base de la plupart des chaînes alimentaires des écosystèmes aquatiques et représentent une grande partie de leur productivité (Schade *et al.*, 2019). Tout impact négatif sur les algues peut donc affecter directement ou indirectement les organismes des niveaux trophiques supérieurs. Dans l'eau, les algues sont particulièrement sensibles à un large éventail de métaux et de composés organiques, aussi leur sensibilité peut-elle être utilisée comme indicatrice de changement environnemental. Au nombre des espèces d'algues unicellulaires les plus couramment utilisées en écotoxicologie ou plus spécifiquement dans l'étude de l'homéostasie des métaux, l'algue verte d'eau douce *C. reinhardtii* occupe une place de choix (Hanikenne, 2003; Hanikenne *et al.*, 2009). Dans la section suivante, nous présentons l'intérêt d'utiliser *C. reinhardtii* comme un modèle biologique.

2.5.2.2. Exemple de *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii est une algue verte unicellulaire dulcicole, utilisée comme un bon modèle pour l'étude des cellules photosynthétiques (Hanikenne, 2003; Harris, 2009). Elle a une forme ovale et est dotée d'une paire de flagelles dont elle se sert

Introduction générale

pour se mouvoir. Sa souche sauvage est normalement entourée d'une paroi cellulaire rigide principalement en glycoprotéines, entourant la membrane plasmique. *C. reinhardtii* est un phytoplancton d'environ $\sim 10\ \mu\text{m}$ de diamètre et dispose en son sein d'un seul chloroplaste en forme de U, occupant $\sim 40\%$ du volume cellulaire et entourant plusieurs mitochondries, le noyau et les autres organites du cytosol (Figure 1.9) (Harris, 2009; Merchant *et al.*, 2007). Selon la classification phylogénétique des eucaryotes (*Eukaryota*), *C. reinhardtii* serait issu du groupe (clade) des *Archaeplastida* du sous-clade des *Chloroplastids*, de l'embranchement (division) des *Chlorophyta* ou algues vertes; de la classe des *Chlorophyceae* et de l'ordre des *Volvocales* (Adl *et al.*, 2005; Merchant *et al.*, 2006).

Chlamydomonas spp sont des algues ubiquistes qui occupent diverses niches environnementales (sols, étendues neigeuses et des glaciers, mines acides, tourbières et étangs d'eaux usées) ce qui suggère que ce genre a une capacité importante d'acclimatation notamment à la disponibilité de micronutriment (Merchant *et al.*, 2006). Elles tirent normalement l'énergie de la photosynthèse et peuvent également prospérer dans l'obscurité totale. C'est une microalgue simple à cultiver et à maintenir dans un milieu inorganique simple. Elle tolère physiologiquement une large gamme de pH. C'est son adaptabilité relative et son temps de génération rapide qui ont fait de *C. reinhardtii* un modèle largement utilisé pour la recherche en biologie.

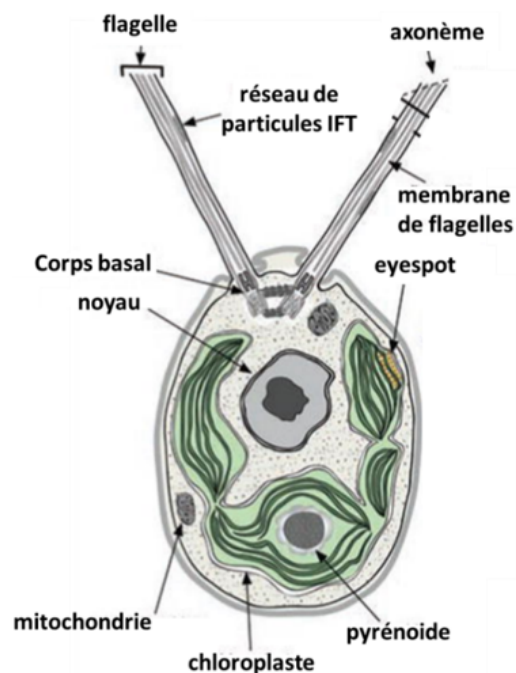


Figure 1.9. Schéma d'une cellule de *Chlamydomonas* (adapté de Merchant *et al.* (2007)).

Introduction générale

En écotoxicologie, *C. reinhardtii* est notamment utilisée pour détecter les effets toxiques et les faibles niveaux de stress environnemental. Elle est spécifiquement appropriée pour l'étude des interactions entre métaux et cellules d'un point de vue éco-physio-toxicologique (Hanikenne, 2003; Lee *et al.*, 2005a; Sunda & Huntsman, 1998b). Elle est par ailleurs génétiquement et biochimiquement bien caractérisée (Harris, 2009; Pröschold *et al.*, 2005). Elle a été entièrement séquencée et dispose d'une annotation adéquate et des informations sur les voies métaboliques, rendant ainsi possibles diverses études génomiques ou multi-omiques (Hanikenne, 2003; Kathir *et al.*, 2003; Merchant *et al.*, 2007).

En plus des qualités ci-dessus évoquées et qui font d'elle une algue modèle, le choix de *C. reinhardtii* vient aussi du fait que l'idée de ce projet de recherche est fondée sur des observations inattendues de la toxicité du cuivre chez *C. reinhardtii* (Lavoie *et al.*, 2012b). Ce qui nous permet de faire une comparaison logique de nos résultats avec ceux déjà documentés. De plus, plusieurs protéines membranaires qui interviennent dans la prise en charge des éléments traces essentiels (dont le cuivre) sont bien connues, de même que leur mécanisme de régulation (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Hanikenne *et al.*, 2009; Merchant *et al.*, 2006).

Soulignons pour finir que *C. reinhardtii* est largement utilisée dans notre laboratoire comme organisme modèle (Fortin & Campbell, 2000). Elle est facile à cultiver en laboratoire et n'a besoin que d'un milieu de culture simple ne nécessitant que de nutriments inorganiques.

2.5.3. Méthodes d'études des effets et adaptation à la toxicité

2.5.3.1. Mesure de la toxicité

La toxicité est la capacité d'un produit chimique à provoquer un effet délétère lorsque l'organisme est exposé à ce produit (Hodgson & Dow, 2015) ou la capacité d'une substance à provoquer un effet nocif lorsqu'elle est administrée, par accident ou par conception, à un organisme vivant (Hodgson, 2004). La toxicité peut être mesurée par l'effet de la substance sur un organisme ou une cellule. Toutefois, au sein de la même espèce, certains individus

Introduction générale

peuvent réagir différemment à la même concentration d'une substance en raison d'un certain nombre de facteurs (sexe, âge, stade de développement, poids corporel, *etc.*). Par principe, la toxicité d'une substance peut être déterminée par des essais de terrain ou au laboratoire. Le choix de l'un ou de l'autre peut dépendre de plusieurs facteurs en lien notamment avec le ou les organisme(s) cible(s), les technologies disponibles, les objectifs fixés, pour ne citer que ceux-là. Les essais de terrains présentent au moins deux avantages : (i) elle permet l'étude de la résistance des organismes testés dans les conditions d'un milieu naturel ; (ii) elle est indispensable pour l'étude des contaminants dont la composition chimique complexe et souvent variable est difficilement reproductible en laboratoire. Quant aux essais au laboratoire, ils s'imposent pour mettre en évidence la toxicité d'une substance ou d'un produit chimique dont la constitution chimique est bien caractérisée. D'autre part, ils permettent d'évaluer de façon précise l'influence des divers facteurs affectant le degré de résistance des organismes expérimentés.

Divers facteurs susceptibles d'influencer l'effet toxique d'une substance doivent être pris en compte dans la mesure de la toxicité : la concentration, la durée d'exposition, la température, l'oxygénation, la salinité, Le CO₂ dissous et le pH (Cuss *et al.*, 2020). Le choix du modèle biologique est aussi déterminant dans la mesure de la toxicité d'une substance donnée. En effet, la sensibilité d'un organisme à un produit potentiellement toxique peut varier d'une espèce à une autre. En testant donc plusieurs espèces, on peut réussir à modéliser pour un même produit la sensibilité et réussir ainsi à définir un seuil de toxicité pour toutes les espèces d'un milieu donné.

Numériquement, on peut exprimer la toxicité d'une substance soit en fonction du temps nécessaire pour obtenir un certain effet (la concentration étant donnée) ou soit en fonction de la concentration qui entraîne un certain effet en un temps déterminé. L'expression la plus répandue est la concentration efficace à 50% (CE50) c'est-à-dire la concentration qui a induit un effet de 50% sur la population testée. De nos jours, grâce à ces données de CE50 le MLB est devenu un outil efficace pour prédire la toxicité des éléments trace métalliques dans l'eau.

Introduction générale

2.5.3.2. Étude de la distribution subcellulaire et de la spéciation

L'étude de la localisation et des formes de métaux dans les organismes et les cellules est utile pour comprendre leur processus de transport et leur mécanisme de détoxification. La capacité cellulaire à accumuler et à tolérer les métaux est en effet étroitement liée aussi bien à l'internalisation et au transport des métaux qu'à leur localisation subcellulaire (Küpper *et al.*, 1999). Ils peuvent ainsi fournir des informations précieuses sur l'approche de détoxification et le mécanisme de tolérance des métaux par l'organisme ou les cellules (Hall, 2002). De plus, les différentes formes ou espèces de métaux peuvent présenter des toxicités différentes pour les cellules et les organismes. Par conséquent, connaître les zones d'accumulation et les formes (espèces chimiques) des métaux revient à avoir les informations utiles pour comprendre les mécanismes d'action en cours, ce qui devrait permettre le cas échéant de discuter du mécanisme de tolérance en cas d'un stress métallique dans les organismes ou la cellule.

L'approche méthodologique la plus utilisée pour séparer et localiser les métaux est le fractionnement subcellulaire. Il a été développé par Wallace & Luoma (2003) et consiste en une série de centrifugations et d'ultracentrifugations différentielles. On utilise ensuite la spectrométrie de masse pour déterminer et quantifier les métaux contenus dans les fractions (Sun & Luo, 2018). Cette approche nécessite une bonne lyse des cellules et une séparation étanche des fractions. Le tampon de lyse et d'homogénéisation prend ici toute son importance et permet de limiter les risques de mélange entre les fractions. L'utilisation d'un tampon de lyse constitué d'un milieu de culture dont la force ionique a été diminuée a permis d'optimiser cette méthode pour *C. reinhardtii* (Lavoie *et al.*, 2009a). Ces travaux d'optimisation ont notamment permis de minimiser les différents artefacts inhérents à ces procédures de fractionnement de sorte que ce protocole est l'un des plus robustes et des mieux documentés applicables à *C. reinhardtii* (Lavoie *et al.*, 2009a). La Figure 1.10 détaille schématiquement les différentes étapes du fractionnement subcellulaire.

Introduction générale

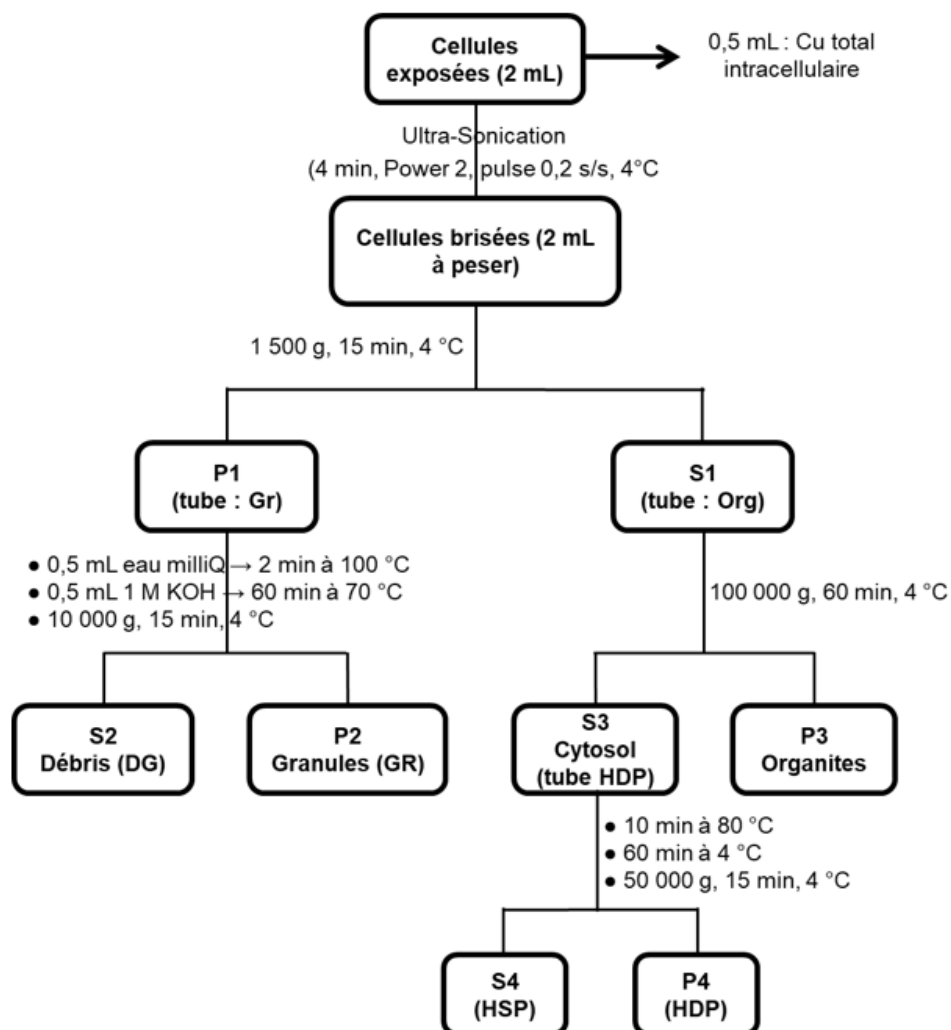


Figure 1.10. Protocole du fractionnement subcellulaire (d'après Lavoie *et al.* (2009b)).

En plus du fractionnement subcellulaire (qui fait partie des méthodes dites indirectes), d'autres approches méthodologiques sont décrites dans la littérature et permettent aussi de connaître la localisation des métaux dans la cellule. Ils sont souvent basés sur la microscopie et sur l'imagerie (méthodes directes) et parfois permettent aussi de connaître la spéciation des éléments métalliques. En effet, connaître la spéciation des éléments dans l'organisme ou dans la cellule peut fournir des informations importantes pour étudier les mécanismes qui gouvernent le métabolisme des métaux dans l'organisme. Un paramètre important dans l'analyse de la spéciation cellulaire est d'éviter la transformation chimique des échantillons. Par conséquent, il est très avantageux que le processus ne nécessite qu'une préparation minimale des échantillons. Diverses

Introduction générale

publications décrivent la méthode d'analyse par centrifugation différentielle pour la spéciation des éléments dans les échantillons, mais le processus est généralement très long et nécessite également l'utilisation de réactifs spéciaux (Sun & Luo, 2018). L'une des techniques de couplage les plus répandues dans les études de spéciation des métaux consiste en une méthode de séparation, par chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), des espèces métalliques (complexes métaux-ligands) suivie de leur détection par spectrométrie de masse élémentaire à source d'ionisation induite par plasma haute fréquence (ICP-MS). Ce mode d'ionisation présente l'avantage d'être indépendant de la matrice, des composés co-éluants avec les analytes et de leur structure moléculaire. L'ICP-MS permet aussi d'atteindre des limites de détection très basse, de l'ordre du femtogramme et se révèle spécifique de l'isotope de l'élément étudié. Ces caractéristiques font de l'utilisation du couplage HPLC-ICP-MS une technique de plus en plus utilisée pour analyser des biomolécules et complexes métalliques présents dans les compartiments cellulaires. Soulignons ici que l'approche chromatographique la plus utilisée pour la spéciation des complexes métalliques est la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) qui est couplée à l'ICP-MS (*SEC-ICP-MS*). Par ailleurs, de nouvelles technologies sont rapportées dans la littérature visant à fournir davantage d'informations sur la structure locale autour des éléments complexés. Elles sont considérées comme plus adaptées pour l'identification des espèces métalliques avec un faible volume d'échantillons (Sun & Luo, 2018).

2.5.3.3. *Études des effets au niveau moléculaire*

Étant donné l'important rôle que jouent les métalloprotéines chez le phytoplancton, le déficit en éléments traces métalliques dans un milieu aura un impact certain aussi bien sur leurs fonctions physiologiques qu'écologiques. D'où l'intérêt de disposer du génome complet d'une espèce qui permet non seulement de connaître son origine et son histoire évolutive, mais aussi d'avoir un large aperçu de sa capacité métabolique et de ses réponses potentielles aux changements environnementaux (Allen *et al.*, 2008; Armbrust *et al.*, 2004; Bowler *et al.*, 2008; Lommer *et al.*, 2012). Les techniques de séquençage à haut débit de l'ARN (RNA-seq), offrent l'occasion et la possibilité d'effectuer des études sur l'ensemble des gènes régulés notamment ceux induits ou sensibles aux stress métalliques (Simon *et al.*, 2013).

Introduction générale

La disponibilité du génome de *Chlamydomonas* a rendu possibles les études sur les changements apportés au transcriptome et au protéome dans diverses conditions nutritionnelles. Ces approches méthodologiques ont permis par exemple de savoir que chez *C. reinhardtii* la disponibilité en Cu du milieu affecte la régulation des transporteurs de Cu, le métabolisme des lipides, les protéines sensibles à l'oxygène et le nombre de cuproenzymes (Castruita *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2013). La majorité du Cu requis par le phytoplancton est essentiellement réparti entre les trois plus abondantes enzymes à cuivre : Plastocyanine, cytochrome c oxydase et multi-cuivre oxydase (Merchant *et al.*, 2006). Connaître donc les réponses induites par les oligo-éléments essentiels en général et le Cu en particulier nous fournira les informations utiles pour mieux comprendre l'effet d'un contexte nutritif déficitaire sur *C. reinhardtii* (Castruita *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2013).

Les progrès en biologie moléculaire et en chimie analytique permettent aujourd'hui d'investiguer des milliers des gènes et métabolites par échantillon. On désigne par technologies et approches OMICS, l'ensemble de ces méthodes qui comprennent la génomique, la transcriptomique, la métabolomique, la protéomique, la lipidomique, la métagénomique, etc., et permettent de mesurer qualitativement et quantitativement les différences et les changements dans les gènes et leurs produits moléculaires (Simmons *et al.*, 2015). L'intégration de ces informations moléculaires avec des paramètres physiologiques, dans le cadre d'expositions à divers contaminants (laboratoire ou milieu naturel), doit donc pouvoir aider à décrire les mécanismes sous-jacents à la toxicité. Ces approches méthodologiques offrent donc de nouvelles perspectives en écotoxicologie prédictive dans l'évaluation et le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques.

3. Présentation de la thèse

Le cuivre est un élément essentiel pour tous les organismes vivants. Il est nécessaire à de nombreux processus biologiques, mais il peut devenir toxique lorsque les concentrations cellulaires dépassent un certain seuil. Les niveaux cellulaires du cuivre comme ceux de tout autre élément essentiel devraient donc être strictement contrôlés pour maintenir les fonctions cellulaires à leur optimum.

Depuis quelques années, plusieurs travaux effectués au sein de la communauté scientifique ont contribué à mieux comprendre les processus sous-jacents aux interactions

Introduction générale

métal-organismes dans un système aquatique. Il s'agit essentiellement d'analyser l'effet de différents paramètres physico-chimiques de l'eau sur la biodisponibilité et le destin intracellulaire des éléments traces métalliques. Même si les modèles actuels de prédiction de la biodisponibilité des métaux permettent de mieux caractériser les réponses biologiques qui découlent des interactions sus mentionnées, il n'en demeure pas moins que certains facteurs et leurs implications demeurent mal évaluées. Ces dernières années, des mélanges de métaux ont été étudiés pour mettre en évidence leurs effets antagonistes ou synergiques. Cependant, les intérêts de ces études ont été le plus souvent portés sur les éléments non essentiels, et peu d'attention a été accordée au rôle des micronutriments essentiels sur les effets d'un autre élément. Dans le cadre de cette thèse, nous avons examiné si l'utilisation de faibles concentrations d'éléments essentiels (Co, Mn, Zn et Fe) modifiait la réponse biologique d'une algue verte d'eau douce (*Chlamydomonas reinhardtii*) au cuivre. Certains travaux antérieurs de notre laboratoire ont en effet révélé une toxicité anormalement élevée du Cu^{2+} sur la croissance des algues dans un milieu moins riche en micronutriments (Lavoie *et al.*, 2012b). Étant donné l'importance du cuivre dans le métabolisme cellulaire, ces résultats nous ont fortement incités à explorer en détail cette nouvelle observation pour répondre aux questions qu'elles soulèvent.

Pour ce faire, nous avons fait l'hypothèse que : le statut nutritif des micronutriments dans le milieu de culture influe sur la sensibilité des organismes au Cu ; notre objectif principal étant de comprendre le rôle précis que jouent les micronutriments dans les réponses biologiques des microalgues vertes d'eau douce au cuivre. Plus spécifiquement, il a été surtout question de :

- Caractériser les effets des micronutriments (Fe^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) sur la prise en charge, l'accumulation et la toxicité du Cu,
- Comprendre comment ces éléments exercent leurs effets de modulation sur la prise en charge et la toxicité du Cu,
- Examiner les implications de ces effets sur le destin intracellulaire du Cu,
- Explorer les aspects génomiques, transcriptomiques et protéomiques de ces effets,
- Etablir quelles sont les implications de ces effets pour le BLM et pour l'environnement.

Introduction générale

L'analyse de nos premiers résultats ayant clairement indiqué que parmi les quatre micronutriments étudiés, seul le Fe^{3+} explique les réponses observées chez les microalgues, les idées principales qui se dégagent de nos objectifs spécifiques ont été regroupées en trois différentes sujets de recherche dans le but surtout de permettre leur publication dans des revues scientifiques. Il s'agit de :

- Article 1 : Intitulé « **Iron modulation of copper uptake and toxicity in a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*)** », le but de cet article était de caractériser les effets du Fe sur la sensibilité des microalgues au Cu. Pour ce faire, nous avons réalisé des expositions des algues au Cu^{2+} pendant 72 h dans des milieux d'exposition limité et non limité en Fe^{3+} et suivi la croissance cellulaire. Les données collectées ont permis de réaliser différentes courbes dose-réponses et de déterminer les concentrations efficaces en fonctions des différents scénarii d'exposition. L'objectif de cet article atteint, il s'agissait par la suite d'explorer dans l'article 2 comment le niveau du milieu en Fe^{3+} affecte la répartition et la spéciation du Cu internalisé par les microalgues.
- Article 2 : Le sujet de cet article se résume dans le thème « **New insights in copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii* under Fe-limited condition** ». Il s'agissait ici de comprendre les mécanismes qui gouvernent la distribution subcellulaire du Cu chez *C. reinhardtii* notamment en fonction des conditions du milieu en Fe^{3+} . Notre démarche méthodologique comprenait donc aussi bien des expériences de fractionnement subcellulaire que des approches métallomique et protéomique permettant de caractériser les réponses des algues jusqu'au niveau moléculaire.
- Article 3 : À la suite de l'article 2 et sur la base des résultats de l'article 1, l'article 3 avait pour objectif de comprendre les mécanismes qui président, notamment au niveau moléculaire, la prise en charge du Cu^{2+} et du Fe^{3+} par les cellules algales. Il se résume dans le thème « **Role of iron in gene expression and in the modulation of copper uptake in a freshwater alga: Insights on Cu and Fe assimilation pathways** ». Deux approches méthodologiques ont été utilisées ici pour caractériser les transporteurs membranaires impliqués notamment dans le processus d'assimilation du Fe et du Cu. La première approche consistait à réaliser des

Introduction générale

expériences de prise en charge à court terme pour déterminer les paramètres cinétiques caractérisant la fixation de ces métaux par leurs transporteurs membranaires. La deuxième approche consistait à analyser les réponses transcriptomiques des systèmes de transport connus chez les microalgues afin de mieux comprendre les mécanismes que les cellules algales utilisent en rapport avec les modifications du milieu en Fe^{3+} .

En somme, cette thèse est donc structurée en trois grandes parties. Après la Partie 1 qui est constituée d'un chapitre introductif sur le contexte général et l'état des connaissances sur le cuivre et son interaction avec le milieu aquatique, la partie 2 traite du sujet de la thèse en trois chapitres correspondants chacun aux trois articles énumérés ci-dessus. La Partie 3 quant à elle est constituée d'une discussion générale sur les principaux résultats obtenus et d'une conclusion générale. Enfin, cette thèse se termine par une partie références bibliographiques.

Partie II : Articles scientifiques

Article 1

Article 1 : Iron modulation of copper uptake and toxicity in a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*)

La modulation de la prise en charge et de la toxicité du cuivre par le fer chez une algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*)

Auteurs : Emeric Kochoni¹ and Claude Fortin¹

¹Institut national de la Recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne,
Québec, QC G1K 9A9, Canada

Publié dans la revue *Environmental Science & Technology*, 13 mai 2019,
10.1021/acs.est.9b01369

Contribution des auteurs :

Emeric Kochoni :

- Conception et réalisation des expériences de toxicité sur les algues,
- Analyse des résultats à l'ICP-MS,
- Traitements et analyses des données,
- Rédaction de l'article.

Claude Fortin :

- Conception de l'étude,
- Supervision des expériences,
- Co-écriture de l'article.

Abstract

Little attention has been paid to the role of essential trace elements on the toxicity of another element. In this work, we examined if low concentrations of essential elements (Co, Mn, Zn, and Fe) modified the response of a freshwater green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) to copper. To do so, we followed cell growth over 72 h in exposure media where the essential element concentrations were manipulated. Among these elements, iron proved to have a strong impact on the cells' response to copper. The free Cu^{2+} concentrations required to inhibit cellular growth by 50% (EC50) over 72 h decreased from 2 nM in regular Fe medium ($10^{-17.6}$ M Fe^{3+}) to 4 pM in low iron medium ($10^{-19.0}$ M Fe^{3+}); a 500-fold increase in toxicity. Moreover, at low Cu^{2+} concentrations ($10^{-13.0}$ to $10^{-10.5}$ M), Cu uptake increased under low iron conditions but remain relatively stable under regular iron conditions. These results show clearly that iron plays a protective role against copper uptake and toxicity to *C. reinhardtii*. In freshwaters, iron is always abundant but the expected free iron concentrations in surface waters can vary between $10^{-14.0}$ to $10^{-20.0}$ M, depending on pH (e.g., when pH increases from 6 to 8). We conclude that copper toxicity in natural waters can be modulated by iron and that, in some conditions, the Biotic Ligand Model may need to be further developed to account for the influence of iron.

1. Introduction

Understanding metal interactions with aquatic organisms is a key step to answer many questions about the nutritional importance of metals as well as their accumulation and toxicity. Research efforts in the last three decades of the 20th century have led to important paradigms such as the Free-Ion Activity Model (FIAM) and The Biotic Ligand Model (BLM) (Campbell, 1995; Di Toro *et al.*, 2001; Morel, 1983; Paquin *et al.*, 2002). These models are based on consensual data that show that metal accumulation and toxicity depend not on its total concentration in solution but on the free metal-ion concentration. In other words, ligands present in solution can complex metals and reduce their bioavailability to aquatic organisms. Thus, metal speciation, i.e., distribution of their different metal species in solution, will be very important to determine harmful effects on aquatic organisms (Batley *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2003). While the FIAM was only considering

Article 1

metal speciation in the exposure solution, the BLM has shifted the focus on interactions at the solution-membrane interface, integrating competition among ions for binding. Concretely, interactions between ions in solution and cells take place at the cell surface with specific transport systems within the plasma membrane, which can lead to ion internalization. According to the BLM, the free metal ion M^{z+} can bind to such a transport site but this binding can be inhibited by the presence of major cations such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , or H^+ . These competitive reactions can greatly reduce metal toxicity, and many authors have contributed to formerly include these protective / antagonistic effects in the BLM at several levels of the food chain (De Schampelaere & Janssen, 2002; De Schampelaere *et al.*, 2003; Gensemer *et al.*, 2002; Pagenkopf, 1983). However, shortcomings or limitations of the BLM have been highlighted in some reviews which contribute to help develop or improve the BLM (Campbell *et al.*, 2002; Niyogi & Wood, 2004; Slaveykova & Wilkinson, 2005). Among the possible limitations, the influence of essential micronutrients (e.g., Fe, Cu, Co, Mn, Zn) on metal uptake by freshwater organisms is not well-known and is often assumed to be negligible compared to major cations (Ca, K, Mg, Na, H). Although major cations are more abundant (>1 mg/L) than micronutrients (<1 mg/L), this difference should be overcome by a greater affinity of the metals over major cations (Stumm & Morgan, 1996). Research on this topic in freshwater systems is rare although a few publications have clearly indicated that their effects are not as negligible as was initially thought. For example, studies on metal adsorption onto bacteria, based on surface complexation modeling approaches, have provided insights on the incorporation of trace element competition into the biotic ligand model (Duval, 2016; Fein, 2017). For freshwater algae, it was showed that Mn can affect Cd uptake and reduce its toxicity to *Scenedesmus vacuolatus* (Töpperwien *et al.*, 2007). Similarly, it was observed that Zn can strongly affect Cd uptake and toxicity to *Chlamydomonas reinhardtii* (Lavoie *et al.*, 2012b). In the latter case, the authors showed that low zinc concentrations could lead to an increase in zinc ion transporters which in turn can lead to an increase in cadmium uptake and toxicity. Moreover, the same authors found an abnormally high copper toxicity toward *C. reinhardtii* at a free copper concentration as low as 10^{-13} M when the exposure solution contained very low concentrations of essential elements (Lavoie *et al.*, 2012b). The half-maximum effect concentration (EC50) previously reported for this species was $10^{-8.2}$ M

Article 1

Cu^{2+} (Stoiber *et al.*, 2010; Stoiber *et al.*, 2012). Thus, based on the intriguing observations of copper toxicity to *C. reinhardtii*, we hypothesized that the nutritive status of trace elements in the culture medium affects the sensitivity of this alga to Cu (Lavoie *et al.*, 2012b). The role of iron was also more carefully looked into as copper and iron are closely involved in cellular metabolism. In fact, in many metabolic pathways, copper and iron are used together or alternatively as heme, protein cofactor, etc., suggesting that their cellular metabolisms are very closely linked (La Fontaine *et al.*, 2002a; La Fontaine *et al.*, 2002b; Merchant *et al.*, 2006; Schoffman *et al.*, 2016). We thus investigated the sensitivity of *C. reinhardtii* growth to copper and its accumulation in two different iron nutrition conditions: (i) in iron depleted media and (ii) in iron replete media.

2. Experimental section

2.1. Biological material and culture medium

The test alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, was obtained from the Canadian Phycological Culture Centre (CPCC) of the University of Waterloo (Ontario, Canada). *C. reinhardtii* is a unicellular microalga that is about $\sim 5 \mu\text{m}$ in diameter, widely used as a biological model, notably for the study of interactions between metals and cells from an eco-physio-toxicological point of view (Hanikenne, 2003; Lavoie *et al.*, 2012b). It is also genetically and biochemically well characterized, and its genome has been fully sequenced (Hanikenne, 2003; Harris, 2009; Kathir *et al.*, 2003; Merchant *et al.*, 2007; Pröschold *et al.*, 2005).

Algal cells were cultured in 100 mL of MHSM1 (Modified High Salt Medium) medium (Table SI2.1) in 250 mL glass Erlenmeyer flasks (Fortin & Campbell, 2000). A new autoclaved culture medium was inoculated once a week in order to maintain a good physiological state of the algae. MHSM1 medium was prepared from six stock solutions (Table SI2.2) previously filtered and stored at 4°C . The ionic strength of the medium was adjusted to $22 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ with 1 M NaNO_3 solution and the pH was adjusted to 7.0 ± 0.1 with a 1 M NaOH solution. To buffer the solution pH, 10 mM 3-N-morpholino-propanesulfonic acid (MOPS) was used (see Table SI2.1 for details of the solution composition). All manipulations were carried out axenically under a laminar flow hood, and all culture flasks were autoclaved before their use. The cultured algae were placed on an orbital shaker (100

Article 1

rpm) inside an environmental chamber (Convion, CMP4030) maintained at a temperature of 20.0 ± 0.2 °C, and the light intensity was maintained to 100 ± 10 μE or $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in order to obtain asynchronous algal cultures.

All vessels used in this study were soaked for 24 h in 15% (v/v) HNO_3 (ACS grade, Fisher Chemical) solution, washed five times with demineralized water, three times with ultrapure water, and dried under a class 100 laminar flow hood to avoid possible airborne particulate contamination.

2.2. Exposure media and experimental designs

The exposure media contained the same major nutrients as the MHSM1 culture medium, but instead of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), metal concentrations were buffered by NTA (nitrilotriacetic acid). In our experiments, the concentrations of several essential elements were manipulated. In order to avoid covariation of a free essential metal concentration upon the addition of another, the free NTA^{3-} concentration was kept constant. This was achieved by the joint addition of an appropriate amount of NTA and metal as determined by thermodynamic calculations using MINEQL+ 5.0 speciation software as detailed in a previous publication.(Lavoie *et al.*, 2012b) For all experiments, algae previously cultured in MHSM1 medium were collected, washed three times with the rinse solution (exposure medium without trace metals) to remove any EDTA, ligands, or trace metals associated with cell surface, and transferred to exposure media for 72 h as described below.

Three series of copper exposures were carried out in triplicate. The first series was performed in a low metal medium (LM) in order to study the toxic effect of copper on cell growth when essential element concentrations are the lowest possible while high enough to sustain normal growth. The LM medium was designed to simulate an exposure medium in conditions where algae are at the limit of metal starvation, providing thus an opportunity to probe the impact of low essential elements on copper toxicity (Table SI2.1). The second series of exposure was performed in four different media (LZn (Low Zinc), LMn (Low Manganese), LCo (Low Cobalt), and LFe (Low Iron); Tables SI2.3-SI2.6) in which free essential metal concentrations were individually lowered to quantify their respective contribution in the observed copper uptake and toxicity (72 h cell growth). These exposure

Article 1

media were designed so that in each case, only the metal of interest (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , or Fe^{3+} , respectively) was maintained at a low concentration with respect to the normal growth medium. This allowed us to investigate which one of these depleted essential metals has an impact on copper uptake and toxicity (the various treatments and their identification are presented in Tables SI2.3-SI2.6). The third series of experiments were performed in High Metal media (HM; Table SI2.7) and Low Fe media (LFe, Table SI2.8). These allowed us to quantify the effect of copper (uptake and toxicity) when all essential metals were maintained constant at the same free ion concentrations as in the standard culture medium (MHSM1), i.e., $10^{-7.1}$ M Zn^{2+} , $10^{-8.7}$ M Co^{2+} , 10^{-18} M Fe^{3+} , and 10^{-6} M Mn^{2+} compared to a medium where free Fe^{3+} concentration (10^{-19} M Fe^{3+}) was lower. These exposure media allowed us to examine the cells' response under micronutrient-replete conditions (HM) compared to that under micronutrient-deplete conditions (LM) in order to test our working hypothesis. Free Cu^{2+} concentrations ranged from $10^{-14.0}$ to $10^{-11.0}$ M in LM media and up to $10^{-8.5}$ M in HM media (see Tables SI2.3-SI2.8 for details).

2.3. Measurement process of cell density and copper accumulation

Throughout the 72 h exposure, cell population density was measured at 0, 6, 12, 24, 48, and 72 h. Cell numbers, diameter, and surface area were estimated with an electronic particle counter (Multisizer 3 Coulter Counter, 70 mm aperture; Beckman) after appropriate dilution in isotonic solution (Isoton II). This allowed the construction of algal growth curves and for Cu uptake results to be normalized as a function of exposed surface area ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$).

After the 72 h exposure period, algae were gently harvested by filtration which was carried out with a hand pump generating a low vacuum (10 cm Hg) in order to keep the algal cells intact. Two superimposed polycarbonate filter membranes (Millipore) of 2 μm porosity were used. The upper filter was used to harvest algae while the lower one was used to quantify potential Cu adsorption on the filter membrane. Aliquots of the filtrates were collected to determine copper concentration ($[\text{Cu}]_a$) remaining in the bulk solution after a given exposure period and for mass balance calculations (see below). After filtration, the algae were rinsed with 10 mL of rinse solution (simplified MHSM1 medium without trace elements) supplemented with EDTA (10^{-4} M) for 10 min and then three times

Article 1

with 10 mL of the rinse solution. This step was designed to remove the Cu attached to the outer membrane of the algae and the remaining cell associated Cu was operationally defined as intracellular Cu. (Hassler *et al.*, 2004; Knauer *et al.*, 1997a; Mehta *et al.*, 2000)

The two filter membranes were separately inserted in 50 mL propylene tubes with 5 mL of concentrated nitric acid (trace metal grade, Fisher) and 1 mL of hydrogen peroxide (Optima grade, Fisher). The tubes were then put in a digester at 95 °C and mineralized for 4 h. Then, 0.5 mL of hydrofluoric acid (ACS grade, Fisher) was added thereto, and the tubes were placed again in the digester at 95 °C for an additional 2 h. After digestion, the volume of digestate was adjusted to 50 mL with ultrapure water (resistivity >18.2 MΩ cm; Nanopure grade) in order to reach 10% (v/v) of nitric acid matrix. All samples were stored at 4 °C and protected from light until copper analysis.

2.4. Trace elements analysis and quality assurance and control

Copper concentration in the samples were mainly analyzed by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Thermo Scientific) for low Cu concentrations, and ICP-AES (ICP Atomic Emission Spectrometry, Varian Vista AX) was used for higher trace element concentrations. Fisher certified reference standards were used for the both analyses. Each sample concentration was determined in triplicate, and the repeatability of ICP measurements was generally $\geq 97\%$. Analytical quality assurance (QA) and quality control (QC) were done using a certified reference material (CRM). For ICP analysis, single element standards (SCP Science) were used for calibration curve; multielemental certified standards (900-Q30-100, SCP Science) and a proficiency testing study for trace elements in water (#TE107-01, Environment Canada) were used as quality control for samples analysis, and the recoveries of each control material were $113 \pm 1\%$ and $95 \pm 10\%$, respectively. Details of mass balances are provided in the Tables SI2.9 and SI2.10; the average recovery of copper after the exposure is $83.0 \pm 0.2 \%$. For acid digestions, the IAEA-413 algae material (International Atomic Energy Agency) was selected for quality control of experimental performance. The average recovery of Cu for the digestion process was $95.4 \pm 3.5\%$ (Table SI2.11).

2.5. Statistical analysis

All means are shown with standard deviation ($\pm$ SD). Differences among treatments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). When significant differences were observed, means were compared using a t test. The significant threshold was established at 0.05. Analyses were carried out using JMP Pro 13.0.0 software (SAS Institute, Riverside, CA, U.S.A.). All graphs and regression models were produced by using the Sigma Plot software (version 12.5). When measured values were pooled, error propagation calculations were performed.

3. Results and Discussion

3.1. Combined and individual effects of essential trace metal on copper toxicity

3.1.1. Combined effect of trace elements

While testing the effects of cationic metals on cadmium toxicity, Lavoie *et al.* (2012b) noticed an abnormally high copper toxicity on algal growth in low $[\text{Cu}^{2+}]$ ranged from 10^{-14} to 10^{-13} M. They hypothesized that “low $[\text{Cu}^{2+}]$ might exert greater toxicity in a growth medium with very low trace metal concentrations (but sufficiently high to sustain normal growth) than in metal-rich media because of a decrease in competing free essential metals”. We thus set out to repeat this experiment and investigated if very low concentrations of copper could inhibit the growth of a freshwater green alga. To do so, we performed a long-term (72 h) exposure of *C. reinhardtii* to three very low $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Free}}$ ranging from 10^{-14} to 10^{-12} M in the LM medium which contained minimal concentrations of essential trace elements (Table SI2.1). Results shown in Figure 2.1 indicate that the growth of *C. reinhardtii* was inhibited at the highest free Cu concentration tested (10^{-12} M). Algal cells exposed to 10^{-13} and 10^{-14} M Cu^{2+} showed a normal growth pattern while at 10^{-12} M, a much lower growth rate was observed following the lag phase which corresponded to the first 24 h. Indeed, the measured growth rates between 24 and 60 h (corresponding to the exponential growth phase) were 0.044 ± 0.002 , 0.043 ± 0.002 , and 0.017 ± 0.006 division h^{-1} at 10^{-14} , 10^{-13} and 10^{-12} M Cu^{2+} , respectively.

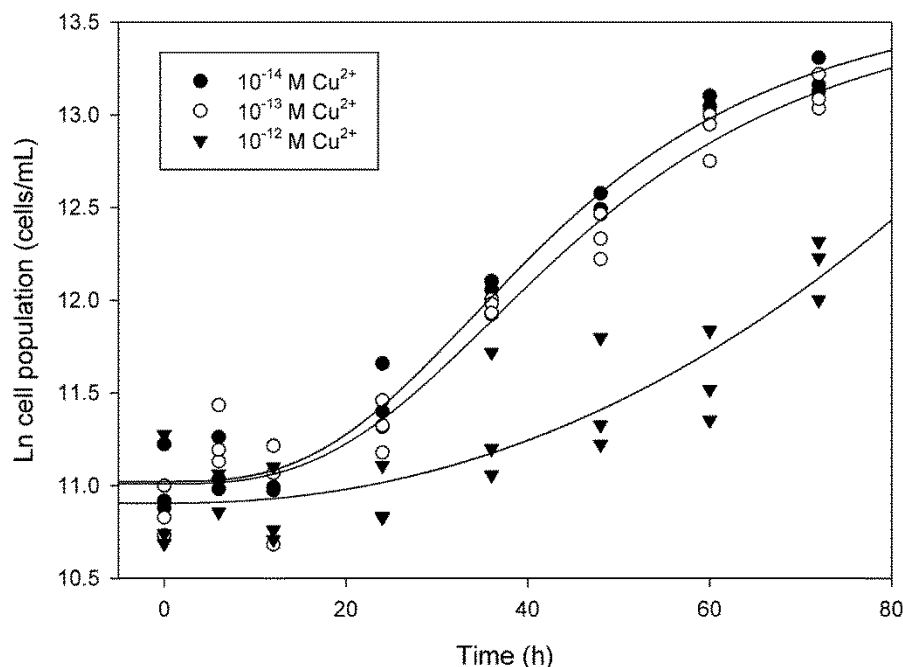


Figure 2.1. Growth of *C. reinhardtii* cell population over time in a low metal medium in which essential element concentrations are the lowest possible while high enough to sustain normal growth. Only the free copper concentration was varied ($N = 3$).

These results thus confirm that copper can be toxic to *C. reinhardtii* at very low concentrations when essential trace elements are present at low concentrations. In freshwaters, the focus is often on major cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , and H^{+}) as these have been shown to modify metal uptake and toxicity (Deleebeeck *et al.*, 2007; François *et al.*, 2007). Little attention has however been paid to essential trace metals that could also decrease uptake and toxicity of other metals, albeit this has been previously noticed for marine algae (Foster & Morel, 1982; Harrison & Morel, 1983; Lane *et al.*, 2008; Sunda & Huntsman, 1996; Sunda & Huntsman, 1998a). Therefore, we hypothesized that this enhanced sensitivity of algae to copper can be explained by the influence of the trace element nutritive status of the algae (Burkhead *et al.*, 2009; Georgatsou *et al.*, 1997). We thus set out to figure out which micronutrient of interest is modulating the toxicity of Cu to *C. reinhardtii*.

3.1.2. Individual effect of trace elements

To understand and quantify the contribution of each trace element present in the exposure solution to copper uptake and toxicity, we performed a series of long-term (72 h)

Article 1

exposures of *C. reinhardtii* to Cu^{2+} in different Low Metal (LM) media (LCo, LFe, LMn, and LZn) (see Tables SI2.3-SI2.6). The results presented in Figure 2.2 show that when only Zn^{2+} , Mn^{2+} , or Co^{2+} was present at low concentration in the exposure media, no inhibition of algal growth by Cu^{2+} was noticed after 72 h over the tested range of copper concentrations ($p > 0.05$). When Fe^{3+} was present at low concentration, Cu^{2+} completely inhibited algal growth at 10^{-11} M ($p < 0.0001$) (see Figure SI2.1 for full growth curves). Thus, among these four trace elements, only Fe^{3+} seems to modulate Cu^{2+} uptake and toxicity to *C. reinhardtii*.

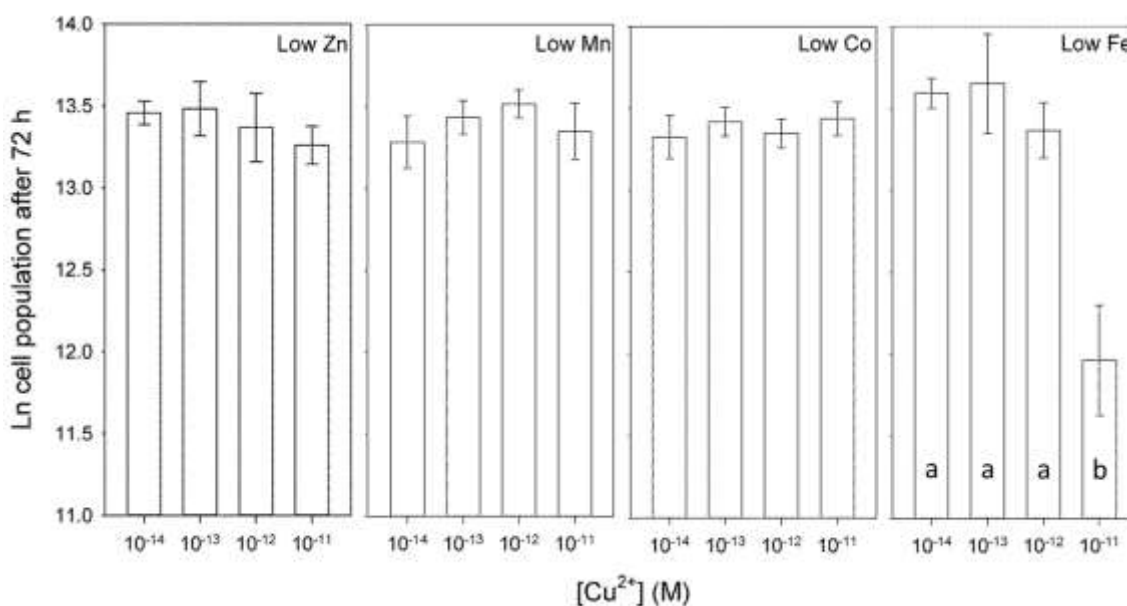


Figure 2.2. Growth of *C. reinhardtii* after 72 h of exposure to four different concentrations of free ionic copper (10^{-14} , 10^{-13} , 10^{-12} , and 10^{-11} M) in four exposure media. In each medium, the concentration of one essential element was manipulated (Zn, Mn, Co, and Fe). Each panel shows the cell density after 72 h as a function of Cu^{2+} concentration. Error bars are the standard deviations of three replicates. In the low Fe medium, the growth difference between copper treatments is significant (ANOVA; $p < 0.001$) (see Tables SI2.3-SI2.6 for the total and free concentrations of each element).

We then determined Cu toxicity thresholds (EC50) in both Fe replete and depleted cells (Figure 2.3). Using the LFe medium ($[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-19.0}$ M), we obtained an EC50 of only 4.2 pM [2.7-7.2; 95% confidence interval]. Using the HM medium ($[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-17.6}$ M) we obtained a much higher EC50 (2.3 nM [1.8-2.9]) than in the LFe medium. This 500-fold difference indicates that copper can become much more toxic at very low Fe concentrations. Published copper EC50 toxicity data using the same algal species revealed toxicity thresholds of 6.0 ± 1.1 nM, a value close to the one we observed in the HM

medium. To our knowledge, the lowest EC₅₀ value based on free Cu²⁺ for a unicellular alga previously published is 40.4 pM [39.6-41.2] obtained with *P. subcapitata* using natural surface waters (De Schamphelaere *et al.*, 2003). This value is still 1 order of magnitude higher than what we observed in the low iron medium. Table SI2.12 provides a summary of free Cu²⁺ toxicity data found in the literature.

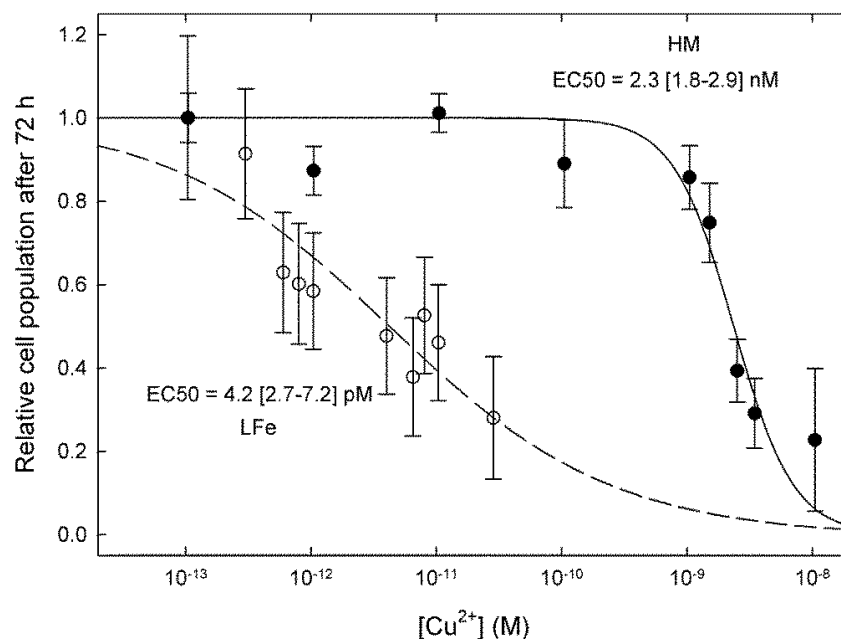


Figure 2.3. Relative cell yield (ρ/ρ_0) after 72 h as a function of exposure copper concentrations in low ($\circ$, LFe) and high iron media ($\bullet$, HM). Error bars represent the standard deviations of two or three replicates of algal cultures. Half-maximal effective concentrations (EC₅₀) are given with their respective 95% confidence intervals.

These results show clearly that iron plays a role in copper toxicity to *C. reinhardtii*. This assertion is consistent with the results of Cu²⁺ accumulation inside the algae during their exposures to Cu²⁺ under both iron depleted/replete conditions. According to the accumulation curves (Figure 2.4), it appeared that, at low Cu²⁺ concentrations ($\sim 10^{-13.0}$ to $10^{-10.5}$ M), Cu accumulation inside *C. reinhardtii* increases under iron-depleted conditions but remain constant under iron-replete conditions. In this range of [Cu²⁺], copper accumulation reached up to ~ 150 amol $\cdot$ cell⁻¹ representing a 6-fold increase compared to that observed for algal cells in iron-replete media. Higher intracellular Cu was also reported in the marine diatom, *Nitzschia closterium*, grown previously in Fe deficient medium compared to *N. closterium* cells grown in normal Fe medium (Stauber & Florence, 1985).

Article 1

The impact of Fe^{3+} on Cu^{2+} uptake and toxicity in *C. reinhardtii* could be explained by two mechanisms: a competitive effect between Fe^{3+} and Cu^{2+} at the binding sites of metals on the cell surface as described in the BLM, and/or a feedback mechanism in which the low iron conditions trigger the synthesis of additional Fe transporters (Raven, 1981). Both mechanisms involve that Fe and Cu share a common transport system. The fact that these two metals are known to be metabolically linked is an argument in favor of this hypothesis (Arredondo & Núñez, 2005; Hill *et al.*, 1996; La Fontaine *et al.*, 2002a; Taylor *et al.*, 2005). For example, Merchant *et al.* (2006) have found that multicopper oxidases are generally associated with permease or transporter for iron delivery across the membrane. According to Kropat *et al.* (2015), in a copper-deficient situation, a blue copper protein (plastocyanin) can be replaced by cytochrome (Cyt) c6, a functionally equivalent heme (iron)-containing c-type Cyt. Moreover, it was shown that Fe-deficient cells of *C. reinhardtii* exhibited greater copper reductase activity (Herbik *et al.*, 2002). Additional work on higher plants also suggested that iron could have an impact on Cu uptake (Chen *et al.*, 2004; Krämer *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 1997). From a nutritional perspective, it can also be argued that the cells in conditions close to Fe limitations may become more susceptible to copper toxicity despite normal growth at $[\text{Cu}^{2+}] \leq 3 \times 10^{-13} \text{ M}$.

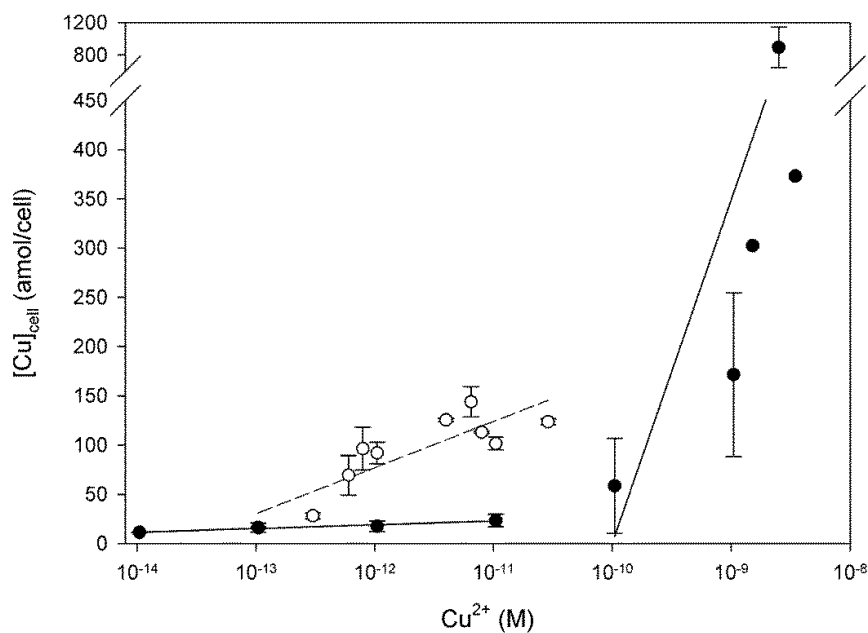


Figure 2.4. Accumulation of Cu in *C. reinhardtii* after 72 h of exposure as a function of free copper concentrations in low (○, LFe) and high iron media (●, HM). Error bars are the standard deviations of two or three replicates.

In the higher end of the concentration range ($[\text{Cu}^{2+}] \leq 10^{-10} \text{ M}$) which corresponds to the onset of growth inhibition for iron-replete cells, we observed that Cu^{2+} accumulation increased up to $890 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ (Figure 2.4). This suggests that less internal copper is required in iron depleted cells to induce toxic effects compared to iron-replete cells. To further illustrate this point, we plotted dose-response curves and extracted EC_{50} values based on intracellular copper (Figure 2.5). These clearly show that the internal dose required to inhibit growth by 50% is much lower for iron-depleted cells (104 amol/cell [93-115]) than for iron-replete cells (477 amol/cell [270-740]). In other words, iron can protect the cells from copper uptake and also from internal damage. This suggests that iron somehow modifies the internal handling of copper. The use of high-resolution imaging techniques, metallomics, or subcellular fractionation schemes could provide more information on how iron protects algal cells from copper toxicity (Lavoie *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 2019; Slaveykova *et al.*, 2009).

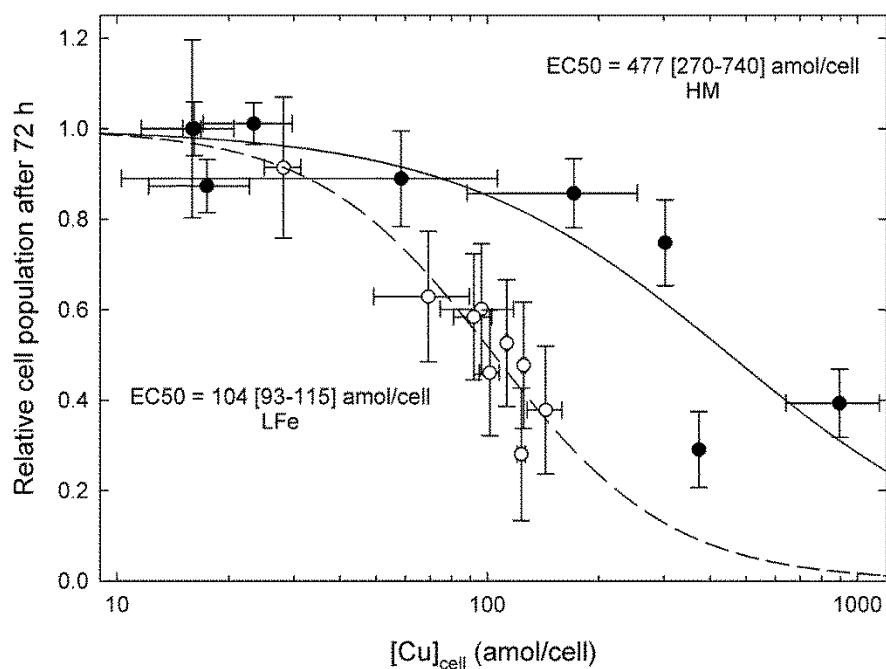


Figure 2.5. Dose-response curves showing relative cell populations after 72 h as a function of intracellular copper accumulation (in amol/cell) in low (○, LFe) and high iron media (●, HM) exposed cells. The error bars represent standard deviations of the mean of two to three replicates.

3.2. Environmental implications

In freshwaters, as opposed to marine waters, iron is usually abundant. The observed aqueous concentrations in surface waters are related to the watershed geochemistry. Due to dissolution and precipitation reactions involving iron hydroxides, iron mobility will be strongly influenced by pH. Similarly, iron binding to dissolved organic matter will contribute to the watershed transport of iron (Tipping *et al.*, 2002). It follows that free iron concentrations in the water column will be highly dependent on pH. At acidic pH, iron oxides become more soluble and less likely to bind to organic matter due to proton competition. At circumneutral pHs, iron becomes less soluble and stronger binding to organic matter occurs, driving down the free iron concentrations. Lofts *et al.* (2008) estimated that free iron activity in freshwaters decreased from 10^{-14} to 10^{-20} M when pH increased from 6 to 8. In this work, we showed that a decrease in free Fe^{3+} from $10^{-17.6}$ to $10^{-19.0}$ resulted in a sharp increase in copper sensitivity in a green alga. We thus predict that pH can influence copper toxicity to unicellular algae in natural waters in three ways: (i) through speciation changes affecting free Cu^{2+} , (ii) through competition between protons and Cu^{2+} ions for uptake, but also (iii) from changes in ambient free Fe^{3+} concentrations.

Acknowledgements

We acknowledge the technical assistance provided by K. Racine, F. Liu, S. Prémont, J. Perreault, A. Bensadoune, and J.-F. Dutil. Helpful discussions on preliminary data with Peter G. C. Campbell, Neil Price, and Michel Lavoie were also very much appreciated. Constructive comments provided by three anonymous reviewers contributed to the improvement of the manuscript. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Grant RGPIN-2014-05082 and the Canada Research Chair program 950-231107.

The authors declare no competing financial interest.

Article 1

Supporting information

Iron modulation of copper uptake and toxicity in a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*)

Authors: Emeric Kochoni and Claude Fortin*

Institut national de la Recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

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

The Supporting information is available free of charge on the ACS Supporting Information at DOI: 10.1021/acs.est.9b01369.

Details on the composition of all exposure media and their resulting speciation; percent recoveries of total dissolved copper before and after exposure; percent recoveries for standard material used during the mineralization procedure; summary of free Cu²⁺ toxicity data found in the literature; growth curves in the presence of copper for the low Zn, Mn, Co, or Fe experiments.

12 Tables and 1 Figure

Table SI2.1. Ionic composition of MHSM1 and LM1 to LM4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	MHSM1		LM1		LM2		LM3		LM4	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	6.80E-05	6.57E-05	3.28E-05	2.03E-05	3.28E-05	2.03E-05	3.28E-05	2.03E-05	3.28E-05	2.03E-05
Cl	5.98E-06	5.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.20E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	1.09E-08	3.59E-09	6.79E-08	1.04E-11	6.79E-08	1.04E-11	6.79E-08	1.04E-11	6.79E-08	1.04E-11
Cu	7.04E-08	1.49E-10	3.69E-08	1.04E-14	3.74E-07	1.04E-13	3.74E-06	1.04E-12	3.74E-05	1.04E-11
Fe	5.92E-07	2.25E-18	1.28E-07	1.07E-19	1.28E-07	1.07E-19	1.28E-07	1.07E-19	1.28E-07	1.07E-19
K	4.22E-03	4.21E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.12E-05	7.89E-05	8.12E-05	7.63E-05	8.12E-05	7.63E-05	8.12E-05	7.63E-05	8.12E-05	7.63E-05
Mn	2.10E-06	1.86E-06	3.28E-08	5.15E-09	3.28E-08	5.15E-09	3.28E-08	5.15E-09	3.28E-08	5.15E-09
MoO ₄	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	2.95E-08	3.00E-08	2.95E-08	3.00E-08	2.95E-08	3.00E-08	2.95E-08
Na	1.02E-04	1.02E-04	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	5.07E-03	5.06E-03	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	4.06E-10	1.37E-04	5.27E-10	1.37E-04	5.27E-10	1.37E-04	5.27E-10	1.37E-04	5.27E-10
SO ₄	8.12E-05	7.80E-05	8.12E-05	7.52E-05	8.12E-05	7.52E-05	8.12E-05	7.52E-05	8.12E-05	7.52E-05
Zn	2.33E-07	9.56E-08	8.61E-08	1.04E-11	8.61E-08	1.04E-11	8.61E-08	1.04E-11	8.61E-08	1.04E-11
EDTA	8.06E-07	6.07E-18								
NTA			1.00E-04	8.12E-08	1.00E-04	8.12E-08	1.04E-04	8.12E-08	1.36E-04	8.12E-08
MOPS	1.00E-02	4.18E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Article 1

Table SI2.2. Components and proportions of the stock solutions used in the preparation of the MHSM1 culture medium.

Stock solutions ^a	Volume used ^b	Components	Concentrations	Suppliers
Ammonium #2	5 mL·L ⁻¹	NH ₄ NO ₃	15.0 g·L ⁻¹	Omega
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.00 g·L ⁻¹	Omega
		Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	3.21 g·L ⁻¹	BDH
Phosphate #2	250 µL·L ⁻¹	KH ₂ PO ₄	29.6 g·L ⁻¹	BDH
		K ₂ HPO ₄	57.6 g·L ⁻¹	BDH
KNO ₃ (1.0 M)	4 mL·L ⁻¹		101 g·L ⁻¹	Omega
AAP ^d	1 mL·L ⁻¹	H ₃ BO ₃	186 mg·L ⁻¹	ACP
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg·L ⁻¹	Fisher
		FeCl ₃ ·6H ₂ O	160 mg·L ⁻¹	BDH
		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300 mg·L ⁻¹	Fisher
		Zn ^c (1 g·L ⁻¹)	1.59 mg·L ⁻¹	Fisher
		Co ^c (1 g·L ⁻¹)	0.64 mg·L ⁻¹	Fisher
		Mo ^c (1 g·L ⁻¹)	2.88 mg·L ⁻¹	Fisher
		Cu ^c (1 g·L ⁻¹)	4.47 µg·L ⁻¹	Fisher
NaOH (0.1 M) ^d	Variable		4.00 g·L ⁻¹	BDH

a: Each solution is filtered on 0.2 µm porosity polycarbonate filter membranes.

b: Volume of stock solution needed to prepare the culture medium; final volume = 1000 mL.

c: A standard stock solution for instrument calibration acidified with HNO₃.

d: Solution to be added 24 h after autoclaving. The amount to be added depends on the presence or absence of buffer and the desired pH. In the absence of buffer, 1 mL·L⁻¹ is sufficient to reach a pH of 7.

Table SI2.3. Ionic composition of LZn1 to LZn4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	LZn1		LZn2		LZn3		LZn4	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	1.06E-04	7.67E-05	1.06E-04	7.67E-05	1.06E-04	7.67E-05	1.06E-04	7.67E-05
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	1.41E-05	3.63E-09	1.41E-05	3.63E-09	1.41E-05	3.63E-09	1.41E-05	3.63E-09
Cu	2.21E-08	1.05E-14	2.21E-07	1.05E-13	2.21E-06	1.05E-12	2.21E-05	1.05E-11
Fe	1.57E-06	2.25E-18	1.57E-06	2.25E-18	1.57E-06	2.25E-18	1.57E-06	2.25E-18
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.02E-05	8.39E-05	8.02E-05	8.39E-05	8.02E-05	8.39E-05	8.02E-05
Mn	7.86E-06	1.86E-06	7.86E-06	1.86E-06	7.86E-06	1.86E-06	7.86E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	2.97E-08	3.00E-08	2.97E-08	3.00E-08	2.97E-08	3.00E-08	2.97E-08
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.17E-08	1.05E-11	8.17E-08	1.05E-11	8.17E-08	1.05E-11	8.17E-08	1.05E-11
NTA	1.00E-04	4.82E-08	1.00E-04	4.82E-08	1.00E-04	4.82E-08	1.21E-04	4.82E-08
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI2.4. Ionic composition of LMn1 to LMn4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	LMn1		LMn2		LMn3		LMn4	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	2.42E-06	3.55E-09	2.32E-05	3.55E-09	2.32E-05	3.55E-09	2.32E-05	3.55E-09
Cu	3.87E-09	1.05E-14	3.90E-08	1.05E-13	3.90E-07	1.05E-12	3.90E-06	1.05E-11
Fe	2.73E-07	2.25E-18	2.64E-06	2.25E-18	2.64E-06	2.25E-18	2.64E-06	2.25E-18
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.02E-05	8.39E-05	8.02E-05	8.39E-05	8.02E-05	8.39E-05	8.02E-05
Mn	8.60E-09	5.25E-09	3.28E-08	5.25E-09	3.28E-08	5.25E-09	3.28E-08	5.25E-09
MoO ₄	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.25E-05	9.55E-08	7.83E-04	9.55E-08	7.83E-04	9.55E-08	7.85E-04	9.55E-08
NTA	1.00-04	8.44E-09	1.00-04	8.44E-09	1.00-04	8.44E-09	1.05-04	8.44E-09
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI2.5. Ionic composition of LCo1 to LCo4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	LCo1		LCo2		LCo3		LCo4	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	1.06E-04	9.60E-05	1.06E-04	9.60E-05	1.06E-04	9.60E-05	1.06E-04	9.60E-05
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	7.24E-09	1.05E-11	7.24E-09	1.05E-11	7.24E-09	1.05E-11	7.24E-09	1.05E-11
Cu	3.92E-09	1.05E-14	3.92E-08	1.05E-13	3.92E-07	1.05E-12	3.92E-06	1.05E-11
Fe	2.77E-07	2.25E-18	2.77E-07	2.25E-18	2.77E-07	2.25E-18	2.77E-07	2.25E-18
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05
Mn	3.07E-06	1.86E-06	3.07E-06	1.86E-06	3.07E-06	1.86E-06	3.07E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.37E-05	9.55E-08	8.37E-05	9.55E-08	8.37E-05	9.55E-08	8.37E-05	9.55E-08
NTA	1.00E-04	8.57E-09	1.00E-04	8.57E-09	1.00E-04	8.57E-09	1.03E-04	8.57E-09
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI2.6. Ionic composition of LFe1 to LFe4 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	LFe1		LFe2		LFe3		LFe4	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9
Cu	3.84E-09	1.05E-14	3.84E-08	1.05E-13	3.84E-07	1.05E-12	3.84E-06	1.05E-11
Fe	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05
Mn	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08
NTA	1.00E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09	1.03E-04	8.37E-09
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI2.7. Ionic composition of HM1 to HM10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	HM1		HM2		HM3		HM4		HM5	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06
Ca	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05
Cl	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06
CO ₃	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08
Co	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09
Cu	4.25E-09	1.05E-14	4.25E-08	1.05E-13	4.25E-07	1.05E-12	4.25E-06	1.05E-11	4.25E-05	1.05E-10
Fe	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18
K	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03
Mg	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05
Mn	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08
Na	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02
NH ₄	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04
NO ₃	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03
PO ₄	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08
NTA	1.00E-04	7.98E-09	1.00E-04	7.98E-09	1.00E-04	7.98E-09	1.04E-04	7.98E-09	1.42E-04	7.98E-09
MOPS	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03

Table SI2.7. Ionic composition of HM1 to HM10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M). (continued).

Media	HM6		HM7		HM8		HM9		HM10	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06	3.01E-06	2.72E-06
Ca	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05	7.36E-05	6.57E-05
Cl	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06	5.98E-06	5.95E-06
CO ₃	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08	Atm	3.68E-08
Co	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09	2.53E-06	3.55E-09
Cu	4.25E-04	1.05E-09	6.04E-04	1.51E-09	9.94E-04	2.51E-09	1.36E-03	3.47E-09	3.91E-03	1.05E-08
Fe	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18	5.70E-06	2.25E-18
K	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03	4.22E-03	4.21E-03
Mg	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05	8.07E-05	7.69E-05
Mn	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06	3.21E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08
Na	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02	1.67E-02
NH ₄	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04	9.37E-04	8.70E-04
NO ₃	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03	5.07E-03	5.04E-03
PO ₄	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08	1.37E-04	1.35E-08
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08	8.70E-05	9.56E-08
NTA	5.18E-04	7.98E-09	7.02E-04	7.98E-09	1.09E-03	7.98E-09	1.46E-03	7.98E-09	4.00E-03	7.98E-09
MOPS	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03	1.00E-02	9.21E-03

Table SI2.8. Ionic composition of LFe1 to LFe10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	LFe1		LFe2		LFe3		LFe4		LFe5	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9
Cu	3.84E-08	1.05E-13	1.10E-07	3.02E-13	2.19E-07	6.03E-13	2.89E-07	7.94E-13	3.84E-07	1.05E-12
Fe	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05
Mn	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08
NTA	1.00E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI2.8. (continued): Ionic composition of LFe1 to LFe10 media. Free ion concentrations were calculated using MINEQL+ 5.0. All concentrations are given in molar (M).

Media	LFe6		LFe7		LFe8		LFe9		LFe10	
Compound	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05	1.06E-04	9.61E-05
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9	2.46E-06	3.55E-9
Cu	1.45E-06	3.98E-12	2.35E-06	6.46E-12	2.89E-06	7.94E-12	3.81E-06	1.05E-11	1.05E-05	2.88E-11
Fe	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19	1.33E-08	1.10E-19
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05	8.39E-05	8.19E-05
Mn	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06	3.04E-06	1.86E-06
MoO ₄	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08	3.00E-08	2.99E-08
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05	8.12E-05	7.49E-05
Zn	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08	8.19E-05	9.55E-08
NTA	1.00E-04	8.37E-09	1.02E-04	8.37E-09	1.00E-04	8.37E-09	1.03E-04	8.37E-09	1.10E-04	8.37E-09
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI2.9. Percent recovery (%) of total dissolved copper after exposure to *C. reinhardtii* in LZn, LMn, and LCo media.

	LZn 1 to 4			LMn 1 to 4			LCo 1 to 4		
	Cu (g/L) before	Cu (g/L) after	Percent recovery (%)	Cu (g/L) before	Cu (g/L) after	Percent recovery (%)	Cu (g/L) before	Cu (g/L) after	Percent recovery (%)
Cu1	4.95E-06	(4.17±0.17)E-06	84.3±3.5						
Cu2	1.71E-05	(1.27±0.05)E-05	74.3±2.9						
Cu3	1.47E-04	(1.46±0.03)E-04	99.3±1.7	2.92E-05	(1.73±0.10)E-05	59.2±3.4	2.62E-05	(1.93±0.05)E-05	73.6±2.0
Cu4	1.43E-03	(1.42±0.01)E-03	99.1±0.5	2.71E-04	(2.51±0.06)E-04	92.7±2.0	2.62E-04	(2.50±0.01)E-04	95.1±0.2

Article 1

Table SI2.10. Percent recovery (%) of total dissolved copper after exposure to *C. reinhardtii* in LFe and HM media.

	LFe 1 to 10			HM 1 to 10		
	Cu (g/L) before	Cu (g/L) after	Percent recovery (%)	Cu (g/L) before	Cu (g/L) after	Percent recovery (%)
Cu1	2.03E-05	(1.35±0.48)E-05	66±24	2.16E-06	(3.4±1.7)E-07	15.6±8.1
Cu2	6.12E-05	(5.34±0.94)E-05	87±15	6.27E-06	(3.8±1.5)E-06	61±24
Cu3	1.27E-04	(1.05±0.30)E-04	82±24	1.78E-05	(1.45±0.03)E-05	81.4±1.9
Cu4	1.73E-04	(1.49±0.25)E-04	86±15	1.85E-04	(1.59±0.01)E-04	85.8±0.4
Cu5	2.30E-04	(2.24±0.32)E-04	97±14	1.73E-03	(1.54±0.01)E-03	89.4±0.8
Cu6	8.64E-04	(8.47±0.36)E-04	98±42	1.86E-02	(1.47±0.01)E-02	78.9±0.6
Cu7	1.45E-03	(1.43±0.34)E-03	98±24	2.64E-02	(1.91±0.04)E-02	72.3±1.3
Cu8	1.73E-03	(1.72±0.18)E-03	100±10	4.27E-02	(3.46±0.05)E-02	81.1±1.1
Cu9	2.29E-03	(2.25±0.31)E-03	98±14	5.68E-02	(4.80±0.05)E-02	84.4±0.8
Cu10	6.28E-03	(6.37±0.21)E-03	101±3	1.58E-01	(1.32±0.01)E-01	83.2±0.8
Average recovery			92±18			73.3 ± 4.0

Article 1

Table SI2.11. Percent recovery (%) of copper after acid digestion of IAEA-413 algae material.

Mesured concentrations (mg·kg⁻¹)	Expected concentrations (mg·kg⁻¹)	Percent recovery (%)
10.8	11.1	97.3
10.3	11.1	93.1
10.8	11.1	96.9
11.2	11.1	100.9
10.6	11.1	95.3
10.5	11.1	94.6
10.7	11.1	96.5
9.86	11.1	88.8
Average recovery		95.4 ± 3.5

Article 1

Table SI2.12. Summary of free Cu²⁺ toxicity data found in the literature.

Species	pH	Endpoint	EC50	Ref
<i>C. reinhardtii</i>	6.8	120-h growth	400 nM Cu ²⁺ (IC30)	(Macfie <i>et al.</i> , 1994)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	5.0-8.5	Inhibition of phosphorus uptake (<1 h)	0.076-8320 nM Cu ²⁺	(Peterson <i>et al.</i> , 1984)
<i>P. subcapitata</i>	8.1	?-h growth	12 nM Cu ²⁺	(Nagai & Kamo, 2014)
<i>P. subcapitata</i>			47 nM Cu _{tot} (~30% free)	(Angel <i>et al.</i> , 2017)
<i>Chlorella</i> sp.	7.9	72-h growth	30 nM Cu _{tot} (~30% free)	
<i>C. reinhardtii</i>	7.5	24-h growth	6.0 nM Cu ²⁺	(Stoiber <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. reinhardtii</i>	7.5	24-h growth	7 nM Cu ²⁺	(Stoiber <i>et al.</i> , 2010)
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	6.8	96-h growth	33 µM Cu ²⁺	(Lombardi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Chlorella</i> sp.	5.5-8.0	48-h growth	11-275 nM Cu ²⁺	(Wilde <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. subcapitata</i>	5.7-8.6	72-h growth	0.040-430 nM Cu ²⁺	(De Schamphelaere <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. subcapitata</i>	5.5-8.7	72-h growth	0.039-347 nM Cu ²⁺	(De Schamphelaere & Janssen, 2006)
<i>C. vulgaris</i>			0.26-3240 nM Cu ²⁺	
<i>P. subcapitata</i>	5.9-8.5	72-h growth	0.56-470 nM Cu ²⁺	(De Schamphelaere <i>et al.</i> , 2005)
<i>Chlorella</i> sp.	6-7.5	48-h growth	2.8-330 nM Cu ²⁺	
<i>P. subcapitata</i>	7.5	72-h growth	52-130 nM Cu ²⁺	(Franklin <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chlorella</i> sp.			36-130 nM Cu ²⁺	
<i>Navicula pelliculosa</i>	7.0	72-h growth	420-540 nM Cu ²⁺	(Nagai & De Schamphelaere, 2016)
<i>Chlorella</i> sp.	5.7-6.5	72-h growth	21-550 nM Cu ²⁺	(Franklin <i>et al.</i> , 2000)
<i>C. reinhardtii</i>	7.0	72-h growth	0.0042-2.3 nM Cu ²⁺	This study

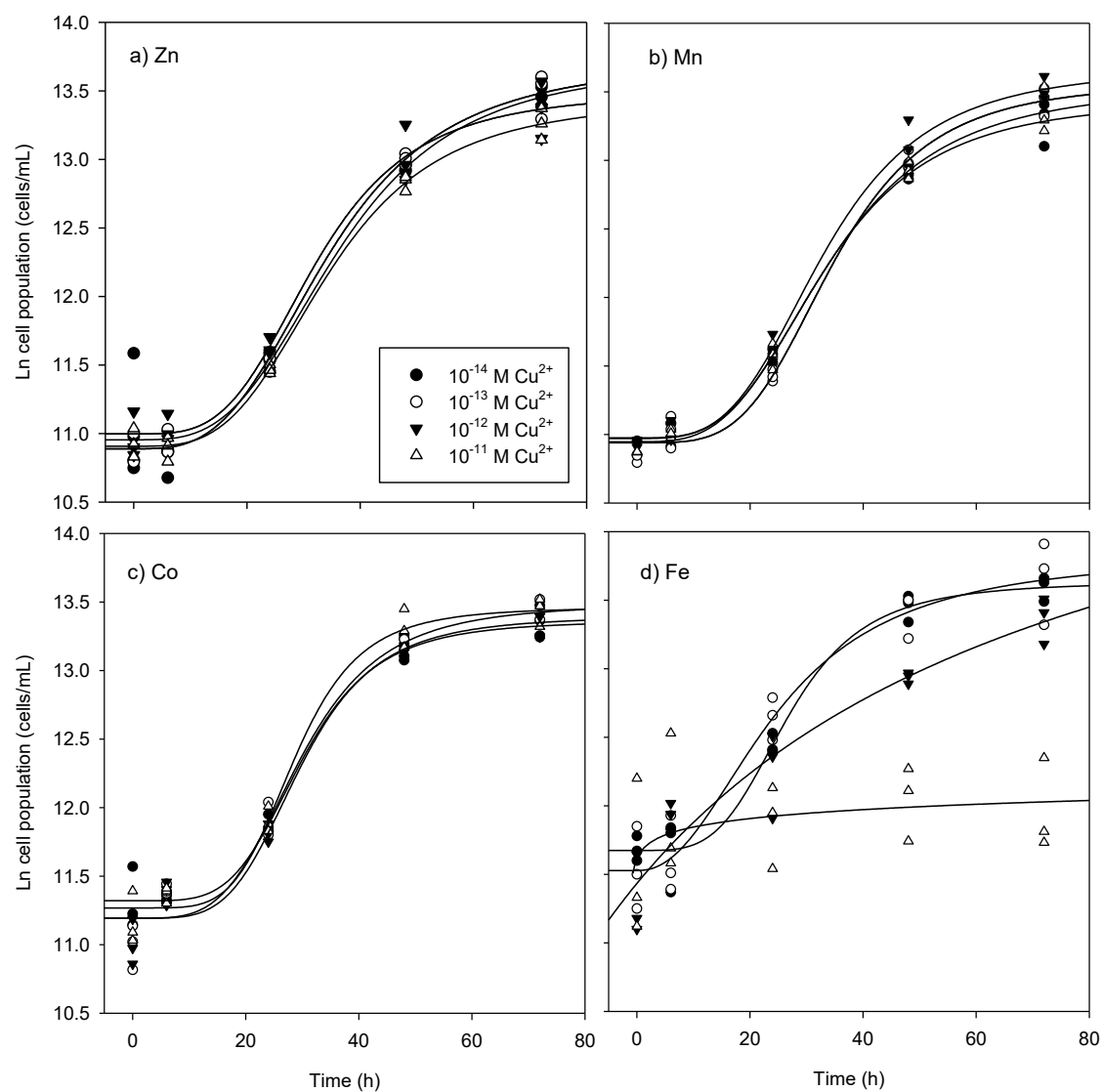


Figure SI2.1. Cellular growth over time of *C. reinhardtii* exposed to four different concentrations of free copper (10^{-14} , 10^{-13} , 10^{-12} and 10^{-11} M) in four low-concentrated media in Zn (a), Mn (b), Co (c) and Fe (d).

Article 2

Article 2 : New insights in copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii* under Fe-limited condition

Nouvel éclairage sur l'homéostasie du cuivre chez *Chlamydomonas reinhardtii* dans des conditions limitées en Fe

Auteurs : Emeric Kochoni,^{1,2} Imad Aharchaou,^{1,2} Leanne Ohlund,³ Maikel Rosabal,^{2,4} Lekha Sleno,^{2,3} and Claude Fortin^{1,2}

¹Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada. E-mail: claud.fortin@ete.inrs.ca

²EcotoQ, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

³Département de Chimie, Université du Québec à Montréal (UQAM), 2101, rue Jeanne-Mance, Montréal, QC, H2X 2J6, Canada

⁴Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), 141 Avenue du Président-Kennedy, Montréal, QC, H2X 1Y4, Canada

Article en préparation pour soumission à la revue *Metallomics*

Contribution des auteurs :

Emeric Kochoni :

- Conception et réalisation des expériences de fractionnement subcellulaire et de couplage SEC-ICP-MS,
- Analyse des résultats à l'ICP-MS,
- Traitements et analyses des données,
- Rédaction de l'article.

Article 2

Imad Aharchaou :

- Aide à la conception et à la réalisation des expériences de fractionnement subcellulaire et de couplage SEC-ICP-MS,
- Évaluation de la qualité des données brutes et traitées,
- Aide à la rédaction de l'article.

Leanne Ohlund :

- Contribution aux analyses LC-MS/MS

Maikel Rosabal :

- Conception, supervision et réalisation des expériences de couplage SEC-ICP-MS,
- Co-écriture de l'article.

Lekha Sleno :

- Conception, supervision et réalisation des analyses LC-MS/MS,
- Co-écriture de l'article.

Claude Fortin :

- Conception et supervision des expériences,
- Co-écriture de l'article.

Abstract

Copper is a redox-active transition element critical to various metabolic processes such as enzyme catalysis, cellular transport, detoxification and signal transduction. These functions are accomplished in tandem with copper binding ligands, biomolecules mainly represented by proteins. The main goal of this work was to understand the mechanisms that govern the intracellular fate of Cu in the freshwater green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, and more specifically to understand the mechanisms underlying Cu detoxification by algal cells in an Fe-limited medium. We show that Cu accumulation was up to 51-fold greater for algae exposed to Cu in an Fe-limited medium as compared to an Fe-replete medium. Using the stable isotope ^{65}Cu as a tracer, we studied the subcellular distribution of Cu within the various cell compartments of *C. reinhardtii*. These data were coupled with metallomic and proteomic approaches to identify potential Cu-binding ligands in the heat-stable protein and peptide fractions of the cytosol. Copper was mostly found in the organelles (78%), heat-stable proteins and peptides (21%) fractions. The organelle fraction appeared to be the main target compartment in Fe-depleted cells. As Fe levels in the medium were clearly shown to influence Cu homeostasis, we found that *C. reinhardtii* can cope with this additional stress by utilizing different Cu-binding ligands. Indeed, in addition to expected Cu-binding ligands such as glutathione and phytochelatins, 25 proteins were detected that may also play a role in the Cu detoxification processes in *C. reinhardtii*. Our results shed new light on the coping mechanisms of *C. reinhardtii* when exposed to environmental conditions that induce high rates of copper accumulation.

Key words: Detoxification mechanisms, phytochelatins, subcellular distribution, copper binding proteins, metallomics, proteomics.

Significance to metallomics

This work analyzes not only the intracellular distribution of Cu in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, but also the mechanisms that govern its detoxification. These mechanisms involve the activity of biomolecules, often proteins, which interact with Cu (or other metals) through functional groups (-SH, -NH, -OH or COOH) present. The

analysis of these Cu-ligand complexes using metallomics and proteomics approaches makes it possible to identify or infer their cellular functions.

1. Introduction

Modeling of a system requires an understanding of the phenomena that take place and an ability to quantify them in order to subsequently predict (anticipate) them (Connon *et al.*, 2012). Modeling can be used to overcome certain technological constraints and reduce delays, and above all, limit project costs and fill gaps between scientific progress and regulation applicability (Vighi *et al.*, 2019). In ecotoxicology, the emergence and development of predictive models, such as the Biotic Ligand Model (BLM), improved not only our comprehension of aqueous metal bioavailability, but also the potential interactions between chemicals (metals and ligands) and the effects upon aquatic organisms (Brix *et al.*, 2017). Taking into account the effects of aquatic physicochemical parameters (ionic composition, pH, DOC) on metal bioavailability is increasingly considered in the environmental regulation (Adams *et al.*, 2020; Brix *et al.*, 2020). Despite these advances in our capacity to predict metal bioavailability, several aspects of physiologic mechanisms governing trace metal interactions with aquatic organisms remain unclear, such as metal interference with cell metabolism and metal homeostasis (Mebane *et al.*, 2020).

It was shown that in freshwater algae, trace essential elements can also play a role on metal bioavailability and homeostasis (Lavoie *et al.*, 2012b; Sunda & Huntsman, 1998a; Töpperwien *et al.*, 2007). Recently, we showed that the nutritional status of iron (Fe^{3+}) in water has an effect on copper (Cu^{2+}) accumulation and toxicity in the freshwater green alga, *C. reinhardtii* (Kochoni & Fortin, 2019). We showed that a typical ambient concentration of Fe^{3+} ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} \approx 10^{-18}$ M) had a protective effect against Cu toxicity, while a lower concentration ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} \approx 10^{-19}$ M) resulted in hypersensitivity to Cu by algal cells. These observations, also reported in marine diatoms (Maldonado *et al.*, 2006; Schoffman *et al.*, 2016), raised several questions: How can Fe^{3+} deficiency induce Cu hypertoxicity in algae? What are the fundamental mechanisms underlying this Cu toxicity at low ambient Fe? And what detoxifying mechanisms are triggered in algal cells to cope with this situation? The objective of the present study was to understand how the nutrient status in iron affects Cu

Article 2

intracellular fate and homeostasis in *C. reinhardtii*. More specifically, the aim was to study the subcellular distribution of Cu at limited and non-limited Fe³⁺ in the growth medium and to characterize the Cu binding ligands involved with its detoxification in *C. reinhardtii*. Metal detoxification mechanisms in algae are well documented, elucidating the roles of biomolecules rich in thiol groups such as cysteine (Cys), glutathione (GSH) and phytochelatins (PCs) (Balzano *et al.*, 2020; Cobbett, 2000b; Navarrete *et al.*, 2018). According to Crémazy *et al.* (2013b) and Lavoie *et al.* (2009b), these biomolecules are expected to be found in the HSP (heat stable peptides and proteins) fraction following a subcellular fractionation scheme. We therefore hypothesized that Cu is mainly complexed by organic ligands rich in –SH, and thus is contained in the HSP fraction. Our methodological approach therefore consisted of several investigation techniques and biomolecules analyses using *C. reinhardtii* as a biological model. First, Cu subcellular fractionation was carried out on the algal cells. Second, using only the HSP fraction, metallomics and proteomics analyses were conducted (Haraguchi, 2017; Haraguchi *et al.*, 2008; Pérez-Pérez *et al.*, 2017) for molecular characterization of the Cu-binding ligands present in this cell compartment.

2. Materials and methods

2.1. Test organism and growth conditions

The freshwater unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC11 strain, wild type) was obtained from the Canadian Phycological Culture Centre (University of Waterloo, ON, Canada). Axenic cultures were maintained in a good physiological state in modified high salt medium (MHSM1, Table SI3.1) at pH 7 in 250-mL Erlenmeyer flasks as described in Crémazy *et al.* (2013b) and Lavoie *et al.* (2009b). In the present work, we used ⁶³Cu as a copper source to prepare the MHSM1 medium to obtain algae cells with a copper signature dominated by ⁶³Cu. The cells were cultured in an environmental growth chamber (Conviron, CMP4030) under constant conditions (continuous illumination of 100 mol·m⁻²·s⁻¹, temperature maintained at 20.0 ± 0.2 °C, and rotary agitation of 100 rpm; see Kochoni & Fortin (2019) for more details). The culture was refreshed once a week under the same conditions presented above. Two batches of algal cells were compared in

this work depending on their growth conditions, i.e. if they were acclimated or not to an iron-limited condition. The non-acclimated algae (M-alga) were grown in regular MHSM1 medium Fe^{3+} ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$). The acclimated algae (L-alga) were grown prior to the exposure experiments in an iron-limited condition (LM1 medium, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$, Table SI3.1). Additionally, the culture was kept in the exponential phase for about 8 days (2 or 3 generations) by refreshing it twice a week under the iron-limited condition. For the last transfer, which took place 48 to 72 h before exposure to copper, 10 to 20 mL of culture was transferred into 500 mL of MHSM1 or LM1 medium for M-alga and L-alga, respectively. This step was done in a 1-L Erlenmeyer flask in order to have a sufficient number of cells ($\sim 150\,000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$, determined using a particle counter) for the exposure experiments. All culture glassware and media were autoclaved at 121 °C for 15 min before use.

2.2. Exposure condition of algae cells to copper

Unless otherwise mentioned, cells were exposed to ^{65}Cu ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$). Exposure media were specifically designed for each exposure condition. Two exposure times (2 and 72 h) were performed and two treatments (Fe-limited and non-Fe-limited) were compared (Figure SI3.1). Tables SI3.2 and SI3.3 show the detailed ionic composition of the exposure media, both for total and calculated free ion concentrations. A total of four samples were performed per exposure experiment: one control and three treatments (triplicate).

Before the initiation of the exposure experiments, algal cells that were cultured in 500 mL of culture medium (MHSM1 or LM1) were collected by filtration on a 2- μm polycarbonate filter (Isopore TM, Merck Millipore), rinsed three times with 10 mL of the rinse solution (see LM-R in Table SI3.2) and suspended in a new 50 mL tube containing 20 mL of the rinse solution. Then, the exact volume needed of the re-suspended algae were determined and added to 400 mL of the exposure medium to achieve *in fine* a cell density of approximately $150\,000 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cell density was then determined using a particle counter (Multisizer TM 3 Coulter Counter®; Beckman) and noted. The exposures were carried out in 500 mL tubes previously washed with acid (10% HNO_3 , v/v) for 24 h, rinsed three times first with deionized water then with milli-Q water (resistivity $> 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$;

Article 2

TOC < 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), and autoclaved (15 min, 121 °C) before use. A magnetic bar was placed in each tube, which was then placed on an agitating plate for the entire duration of the exposure, which took place at room temperature (20-22 °C) and under constant brightness (lab light). At the end of each exposure, 4 mL of EDTA (0.1 M) was added to each tube to bind virtually all the trace metals (including $^{65}\text{Cu}^{2+}$) still present in the exposure media and thus stop their transfer in the cells (Hassler *et al.*, 2004).

2.3. Subcellular fractionation procedure

In order to determine the distribution of copper inside algal cells, subcellular fractionation was performed according to the procedure described and optimized by Lavoie *et al.* (2009a). At the termination of the exposures, 400 mL of the exposed algae suspension was centrifuged (Sorwall® RC 5C Plus, Du Pont) for 10 min at 9 000 rpm and 20-22 °C. The supernatant was then removed from each container and a volume of approximately 30 mL was left in the bottles. Pellets were then re-suspended and transferred to 30 mL centrifuge tubes. These tubes were centrifuged for 4 min at 9 000 rpm and 20-22 °C. When the centrifugation was completed, the supernatant was removed entirely, leaving only the pellet at the bottom of the tube. Cells were then re-suspended in 10 mL of the rinse solution (LM-R, Table SI3.2), centrifuged four times (9 000 rpm, 4 min, 20-22 °C) and re-suspended each time in 10 mL of rinse solution. At each step of this process, 4 mL aliquots of the exposure solution (from which cells were removed using 25 mm sterile syringe filters (Polyethersulfone Membrane); 0.45 μm porosity (VWR International)) and the supernatant were collected for ^{65}Cu analyses. After the last centrifugation, algal cells were collected and re-suspended in 2 mL of rinse solution in 7 mL polypropylene tubes. Aliquots of 0.5 mL of the re-suspended cells were set aside, from which 20 μL were used to determine the exact cell density. The rest of the cells were harvested and mineralized in order to determine the total intracellular metal concentration and perform a mass balance calculation. The remaining ~1.5 mL of the final algal suspension was then homogenized at low temperature (4 °C, or under ice) by using an ultra-sonicator (Branson SFX150, Danbury, CT, U.S.A.) for 4 min (power = 22 W; pulse = 0.2 s/s) in order to lyse the cells. To make sure that cells were broken efficiently, cell size was determined (using a particle counter) before and after sonication. The homogenates were then put in 3 mL

Article 2

ultracentrifugation Eppendorf tubes and weighed to obtain the exact volume of cell suspension and to determine the total number of broken cells. A differential centrifugation process designed to separate different subcellular fractions (Figure SI3.1) was conducted to separate the following five subcellular fractions: (i) a debris (DB: nuclei, cell membranes, cell walls), (ii) a granules-like (GR: NaOH-resistant materials), (iii) organelles (ORG: mitochondria, Chloroplast/Pyrenoid, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum), (iv) a heat-stable proteins and peptides (HSP: GSH, PCs and other unidentified thermostable peptides) and (v) heat-denatured proteins (HDP: enzymes) (see Figure SI3.1). However, metal accumulation in the DB fraction was not included in our discussion as the current state of knowledge of its toxicological significance is not well defined (Campbell *et al.*, 2005; Cardon *et al.*, 2019).

As illustrated in Figure SI3.1, once broken, homogenized samples were centrifuged at 1500 g at 4 °C for 15 min. The supernatant (S1), comprising a mixture of organelles and cytosolic solution, was transferred to another Eppendorf tube and again centrifuged at 100 000 g at 4 °C for 60 min. The pellet (P1) was re-suspended in 0.5 mL of Milli-Q water and heated in the oil bath at 100 °C for 2 min and then transferred to another oil bath at 70 °C for 10 min. After that, 0.5 mL of KOH (1 M) was added and further heated in the oil bath at 70 °C for 60 min, followed by centrifugation at 10 000 g and 4°C for 15 min. The resultant supernatant (S2), which constitutes the DB fraction, was transferred to a 13-mL tube while the pellet (P2) provided the GR fraction. The original S1 supernatant was then ultracentrifuged for 60-min to provide supernatant (S3), which is the cytosolic fraction, and pellet (P3), which constitutes the ORG fraction. The supernatant S3 was then transferred to an Eppendorf tube, placed in an oil bath at 80 °C for 10 min and transferred to an ice bath for 60 min, which easily allows the HDP fraction to be separated from the HSP fraction. As for the pellet (P3), it was set aside for mineralization. After 60 min on ice, supernatant S3 was centrifuged at 50 000 g (4°C, 15 min), and the supernatant (S4) was transferred to a 13-mL tube and the pellet (P4), which is the HDP fraction, was kept in the tube and put aside until the mineralization step. All centrifugation steps were performed using a WX ultra series centrifugation (Thermo Scientific).

2.4. SEC-ICP MS analyses and copper speciation

Coupling of size exclusion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC-ICP-MS) was used to separate the biomolecules present in the HSP fraction (Aharchaou *et al.*, 2017). The aim of this experiment was to determine the copper distribution among different molecular weight pools inside the HSP fraction of the cells to get insight into the biomolecules involved in copper detoxification mechanisms in *C. reinhardtii*. These HSP fractions were obtained by applying a subcellular fractionation protocol as described in the above section (section 2.3) with some modifications. Briefly, at the end of the rinse steps (see section 2.3), algal cells were homogenized in a fresh ammonium acetate buffer (100 mM, pH 7.4). Then, 1.5 mL of each homogenate sample was subjected to ultracentrifugation (100 000 g, 60 min, 4 °C) to isolate the cytosol (supernatant) from the rest of the cell contents (pellet). The cytosol was then heated (80 °C, 10 min), cooled (4 °C, 60 min) and re-subjected to a final ultracentrifugation step (50 000 g, 10 min, 4 °C) to collect heat-stable proteins and peptides present in the final supernatant (HSP fraction).

Size-exclusion chromatographic (SEC) separation of the HSP fractions (n =3 per treatment) was performed on a Thermo Spectra HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Winsford, England, UK) equipped as described previously in Aharchaou *et al.* (2017). The SEC column, Superdex™ 30 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), with a size separation range of 0.1 to 7 kDa, was used to elute samples with 100 mM ammonium acetate buffer (pH 7.4) at a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹. Before each analysis and between each run, the column was washed for 45 min with 150 µL of 10 mM EDTA-Cys buffer (pH 7.4) with the mobile phase to remove any metal ions adsorbed on the stationary phase and avoid potential cross contamination of samples. For each injection, 200-250 µL of sample was run through the column, and absorbance at 280 and 254 nm was measured (as an indication of the presence of proteins and peptides respectively). Then, ⁶⁵Cu signal, was monitored in real time, by coupling an ICP-MS (XSERIES 2, Thermo Fisher Scientific, Winsford, England, UK) to the SEC-HPLC system. The ⁶⁵Cu intensity (number of counts) was recorded and plotted as a function of the retention time (RT) in order to reveal Cu-ligand peaks in each HSP aliquot injected to

Article 2

the systems. In addition to the ^{65}Cu signal, the signals of ten other elements (corresponding to ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{64}Zn , ^{65}Cu , ^{75}As , $^{77}\text{ArCl}$, ^{82}Se , ^{83}Kr , ^{111}Cd , ^{208}Pb) were also monitored simultaneously as quality control of this methodological approach. The Superdex column was calibrated with several molecular weight standards shown in Table SI3.4. The molecular masses of Cu-biomolecule complexes contained in the HSP fractions were then estimated by using the molecular weight calibration graph. SEC-ICP-MS analyzes in HSP fractions were conducted in triplicate for each treatment tested.

For samples destined for proteomics and peptidomics analyses, algae were exposed to 39.3 nM of free $^{65}\text{Cu}^{2+}$ and HSP fractions were extracted as described above and submitted to the SEC-ICP-MS protocol. An injection of 200 μL of HSP into the SEC-ICP-MS system was done once to locate the RT of the ^{65}Cu -protein/peptide complexes wanted (from Cu1 to Cu6). Then, the ICP-MS was disconnected from the HPLC, and for the eight subsequent injections, all localized peaks were separately collected based on their RT in 50 mL tubes (Falcon Conical Centrifuge Tubes), frozen and lyophilized. At the end of the lyophilization process, the content of each tube was re-suspended in 1 mL of milli-Q water and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the proteomics and peptidomics analyses.

2.5. LC-MS/MS analyses of SEC fractions

2.5.1. Targeted Phytochelatin and glutathione (peptide) analyses

2.5.1.1. Sample preparation

Sample fractions (190 μL) were mixed with 10 μL of 100 mM dithiothreitol (DTT Sigma-Aldrich Canada Co, Oakville, ON, CA). Standard solutions (10 μM) of GSH, PC2 and PC6 (phytochelatins with 2 and 6 thiol groups) with 5 mM final DTT concentration were also prepared. Samples (20-30 μL) and standards (10 μL) were analyzed by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (HPLC-QqTOF-MS), on a Shimadzu Nexera UHPLC coupled to a Sciex TripleTOF 5600 system equipped with a DuoSpray ion source in negative ion mode with 4.5 kV source voltage, $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ source temperature, 35 psi curtain gas and 50 psi GS1/GS2 gas flows, and a declustering potential of 80 V. Separation of components was performed using two different columns and methods. The first column used was an Agilent (Santa Clara, CA, U.S.A.) Eclipse C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 μm) with mobile phases of water (A) and

acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid, at 40 °C and a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The elution gradient employed was as follows: 5% B held for 0.5 min, then increased linearly to 30% B at 8 min, up to 80% B at 10 min and held for 1 min before re-equilibrating at 5% B for 5 min before the next injection. The second chromatographic column employed was an Imtakt (Portland, OR, U.S.A.) Scherzo SM-C18 (150 x 3 mm, 1.8 µm) with mobile phases of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid, at 40 °C and a flow rate of 0.25 mL·min⁻¹. The elution gradient employed was as follows: 3% B held for 3 min, then increased linearly to 95% B at 15 min and held for 1 min before re-equilibrating at 3% B for 8 min before the next injection.

2.5.1.2. Sample analyses

Both TOF-MS and MS/MS analyses were performed using electrospray ionization (ESI) in negative mode with the mass range of m/z 100-1200 and m/z 40-800, respectively. To ensure accurate mass measurements, the instrument was calibrated every four injections with a mix of standard compounds covering a range of m/z from 100 to 1000. Manual data verification and visualization were done with PeakView 2.2 and MasterView 1.1 (Sciex).

2.5.2. Proteomics analyses

2.5.2.1. Sample preparation

Molecular weight cut-off (MWCO) filtration was used to concentrate SEC fractions 1 to 3 (SEC fractions correspond to Cu peaks obtained after the HSP fraction was subjected to SEC-ICP-MS analyses and collected in separate tubes). Aliquots of 500 µL of each fraction containing approximately 10-15 µg of proteins were concentrated to 25 µL with 10 kDa Amicon MWCO filters (Millipore-Sigma, Burlington, MA, U.S.A.).

2.5.2.2. Trypsin digestion

Concentrated samples were diluted with 250 µL of 100 mM ammonium bicarbonate buffer (ABC) at pH 8.5 and 10 µL of 100 mM dithiothreitol, incubated at 37 °C for 20 min, followed by alkylation with 15 µL of 100 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in the dark at 37 °C for 30 min. Trypsin (10 µL of 0.1 mg·mL⁻¹ solution) (Sigma-Aldrich) was added to each sample and incubated overnight at 37 °C. Digested samples were cleaned up by solid phase extraction using Oasis HLB cartridges (1 cc, 30

Article 2

mg, Waters, Milford, MA) with methanol elution. Dried extracts were reconstituted in 100 μ L 10% ACN prior to LC-MS/MS analyses.

2.5.2.3. LC-MS/MS analyses and data processing

Samples were injected (30 μ L) onto an Aeris PEPTIDE XB-C18 100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m column, with a SecurityGuard ULTRA C18-peptide guard column (Phenomenex, Torrance, CA) using a Nexera UHPLC system (Shimadzu, Columbia, MD) with water (A) and ACN (B), both containing 0.1% formic acid, as a mobile phase at the flow rate of 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹ (40 °C). The gradient started at 5% B, was held for 2.5 min, and was linearly increased to 30% B at 24 min, to 50% B at 26 min, to 85% B at 26.55 min, then to 95% B at 26.6 min and held there for 1.5 min, and re-equilibrated for 8.5 min between injections.

High-resolution TOF-MS and MS/MS analyses were performed on a hybrid QqTOF-MS, TripleTOF 5600 (Sciex, Concord, ON, Canada), equipped with a DuoSpray ion source in positive mode with 5 kV source voltage, 500 °C source temperature, 35 psi curtain gas and 50 psi GS1/GS2 gas flows, and declustering potential of 80 V. TOF-MS acquisition was from m/z 120-1250 followed by data-dependant MS/MS acquisition on the 15 most intense ions from m/z 80-1500 with dynamic background subtraction and a collision energy of 30 ± 10 V. Protein Pilot 5.0.2 (Sciex) was used to search LC-MS/MS data against a *C. reinhardtii* protein database downloaded from Uniprot.org (September, 2020) with a set of common contaminant proteins added. Proteins and peptides were identified with a local 1% false discovery rate (FDR) using a target-decoy database search algorithm. ProteinPilot search results were loaded into Scaffold v4 (Proteome Software) to compare protein and peptide IDs across the samples.

2.6. Element determinations and controls

Concentrations of ⁶⁵Cu and Fe in the media, the subcellular fractions and the cells were determined following the mineralization step (HNO₃ 10%, Trace Metal Grade and H₂O₂, Optima Grade) and by using ICP-MS and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Varian Vista AX), respectively. Copper content in algae was corrected using the signal from control algae, which was always less than 2%. Unless otherwise indicated, all experiments were performed in triplicate and the quality assurance and control were done as described in previous work (see Kochoni & Fortin (2019)). The

Article 2

copper stable isotopes (^{63}Cu and ^{65}Cu) used to design the culture and exposure media were 99% pure (Trace Sciences International, Canada). For ICP analyses, Fisher certified reference standards were used, and the repeatability of values obtained by ICP were $\geq 97\%$. In addition, the calibration curves, used to quantify metals by the both ICP instruments, were prepared with single standard elements (SCP Science). For the quality control, multi-elemental certified standards (900-Q30-100, SCP Science) and a proficiency testing study for trace elements in water (#TE105-05, Environment and Climate change Canada) were used and the recovery levels of each control material were $99.6 \pm 4.6\%$ ($n = 22$) and $110.5 \pm 5.1\%$ ($n = 22$), respectively. The mass balances of copper were performed after the subcellular experiment by comparing the sum of ^{65}Cu contained in the various subcellular fractions with the total of ^{65}Cu inside algal cells. The average recovery for copper mass balances obtained after subcellular fractionation was $90 \pm 17\%$ ($n = 12$). Cell densities, sizes, and surface distributions were determined using a particle counter (Multisizer TM 3 Coulter Counter®; Beckman). The chromatographic recovery of copper was performed in the presence and absence of the column and reached 96.8 %.

2.7. Statistics and data treatment

All numerical data are shown as means ± 1 standard deviation (SD); $n = 3$, unless otherwise mentioned. Statistically significant differences among treatments were determined by using a nonparametric test (Kruskal-Wallis) and a Tukey honestly significant difference (HSD) test was performed on ranks to discriminate among treatments. All conclusions are based on at least a 5% level of significance ($p > 0.05$). Unless specified, all statistical tests were performed using JMP Pro 13.0.0 software (SAS Institute, Riverside, CA, U.S.A.) and graphs were produced by using the MS Excel 2016 and Sigma Plot 12.5 (Systat Software, Inc., U.S.A.). Error propagation was calculated each time measured values were pooled.

3. Results and discussion

3.1. Copper accumulation in *C. reinhardtii*

Copper accumulation by *C. reinhardtii* was determined after 2 and 72 h of exposure to 3.55 nM free $^{65}\text{Cu}^{2+}$. The aim was to better characterize the effect of the nutritional status of trace elements in the medium on the accumulation of Cu by *C. reinhardtii*. To this end,

Article 2

two batches of algae were used, differing by the Fe^{3+} level in their growth media: algae acclimated to Fe-limited culture medium (L-alga) and algae grown in the non-Fe-limited culture medium (M-alga). Algal cells were exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ under Fe-limited (-LFe) and non-Fe-limited (+LFe) medium. We observed that the amount of Cu accumulated inside L-alga (Figure 3.1A) was greater when the exposure medium was limited in Fe^{3+} , with a concentration of $69 \pm 10 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ after 2 h of exposure in -LFe medium, versus a 9-fold less Cu concentration of $7.9 \pm 0.5 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ in +LFe medium. This trend was even more marked after 72 h of exposure, reaching $1990 \pm 490 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ in the -LFe medium, against a 51-fold less concentration of $39.2 \pm 0.6 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ in the +LFe medium (Figure 3.1A). For M-alga on the other hand (Figure 3.1B), the accumulation of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ after 2 h of exposure was not significantly different, regardless of the exposure medium, and was less than $3 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$. This trend remained after 72 h of exposure even if the amount of accumulated Cu slightly increased over time, reaching $77.5 \pm 8.1 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ in -LFe medium, versus $76.4 \pm 6.7 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$ in +LFe medium (Figure 3.1B).

This remains much lower than Cu accumulation by L-alga in -LFe medium (Figure 3.1), indicating that Fe^{3+} can influence Cu^{2+} accumulation by the algal cells. Our results show that a continuous exposure of algae in an Fe-limited medium makes them more prone to accumulate Cu^{2+} , however, this tendency does not seem irreversible. After 72 h in a medium not limited in Fe^{3+} (+LFe), Cu^{2+} accumulation by algal cells was reduced by 98% (Figure 3.1A) which is equivalent to 50% ($39.2 / 76.4$) of the capacity of algal cells to accumulate Cu^{2+} when exposed in the -LFe medium (Figure 3.1B). This result is consistent with that obtained in our previous work in which the role of iron in copper uptake and accumulation by *C. reinhardtii* has been clearly demonstrated (Kochoni & Fortin, 2019). We were able to show, over a wide range of low Cu^{2+} concentrations ($10^{-13.0}$ to $10^{-10.5} \text{ M}$), that the accumulation of Cu by *C. reinhardtii* tends to increase in an iron-limited medium but remains constant under a regular iron medium, reaching about $150 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1}$, i.e. a 6-fold increase over that observed for algal cells in non-iron-limited media. Even if the conditions of the present study are not strictly the same as those of the previous one, the results obtained in both cases support our hypothesis that Fe^{3+} plays a protective role against Cu^{2+} accumulation and toxicity in *C. reinhardtii*.

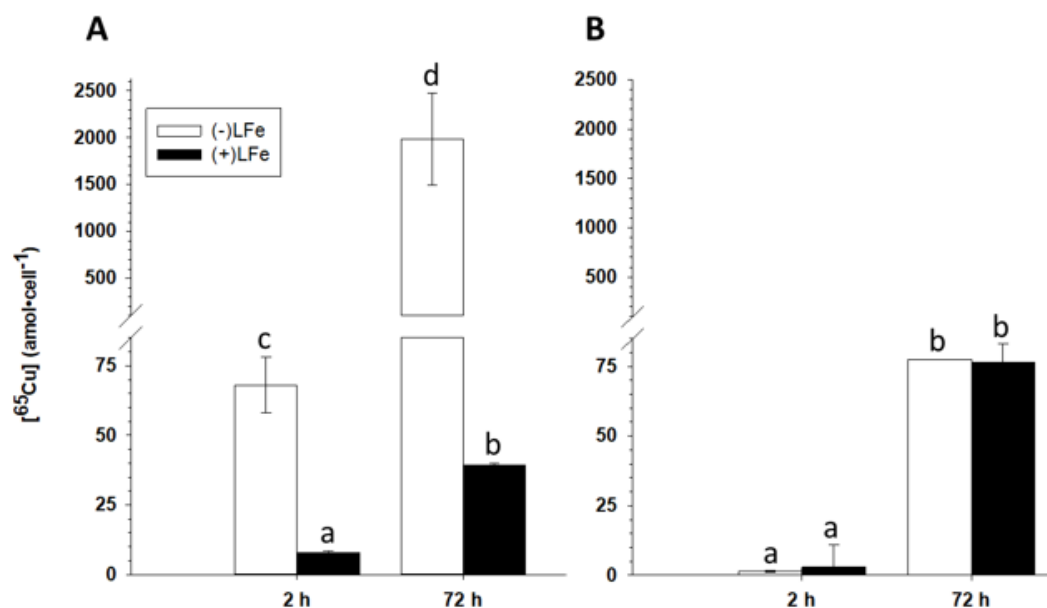


Figure 3.1. Copper accumulation ($\text{amol} \cdot \text{cell}^{-1}$; $\pm \text{SD}$, $n = 3$) by *C. reinhardtii* after 2 and 72 h of exposure to ^{65}Cu ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) in an Fe-limited medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$) or an Fe-replete medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$). In (A) alga cells were previously grown in an Fe-limited medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$; acclimated algae or L-algae) and in (B) alga cells were not acclimated to an Fe-limited medium ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$; non-acclimated algae or M-algae). Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Tukey Kramer HSD test).

Increased element accumulation by algae following their acclimation to low concentrations of this same element is well documented (Bossuyt & Janssen, 2004; Lavoie *et al.*, 2016a), albeit the effect of the homeostatic dynamics of a limiting element (e.g. Fe^{3+}) on that of another element (e.g. Cu^{2+}) is not well known or considered (Lavoie *et al.*, 2012b). However, some have reported that this is not always the case for both freshwater (Lavoie *et al.*, 2012b; Sunda & Huntsman, 1998a; Töpperwien *et al.*, 2007) and marine phytoplankton (Annett *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010; Peers *et al.*, 2005). Given the close link between iron and copper metabolism (Arredondo & Núñez, 2005; La Fontaine *et al.*, 2002a; Taylor *et al.*, 2005), we hypothesize, as in our previous study (Kochoni & Fortin, 2019) that both elements share, at least partially, the same transport system. This could explain the effect of Fe^{3+} on the accumulation of Cu^{2+} by *C. reinhardtii*, by integrating both the competitive effect between these two elements and the positive feedback in response to an Fe^{3+} deficient medium (Lavoie *et al.*, 2016a; Raven, 1981). However, these results on Cu accumulation by algal cells raised questions that deserved investigations, namely: What is the internal fate of Cu? What are the mechanisms underlying the intracellular

management of Cu under these Fe-limited conditions? The Cu data analyses obtained from subcellular distribution results can help to, at least, partially answer these questions.

3.2. Copper subcellular distribution

The intracellular fate of Cu in *C. reinhardtii* was investigated to understand the internal handling of this element and the effect of iron nutritional status of the cells on this intracellular fate. The aim was to get insight on the mechanisms involved in Cu detoxification by *C. reinhardtii* as previously done for other metals by Crémazy *et al.* (2013b) and Lavoie *et al.* (2009b). To do this, examination of the subcellular distribution of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ was carried out and the presence of Cu detected in four operationally defined subcellular fractions; ORG, GR, HSP and HDP. The ORG and the HDP fractions are categorized as metal-sensitive fractions (MSF) while the HSP and the GR as biologically detoxified metal (BDM) (Aharchaou *et al.*, 2017; Wallace *et al.*, 2003).

After 2 h of exposure, the Cu content in L-algae was less than $15 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$, regardless of the exposure conditions. Indeed, no fraction contains relatively more than 50% of the total cellular copper (Figure 3.2). After 72 h of exposure, Cu distribution among fractions became significantly different between treatments carried out, indicating both an effect of Fe^{3+} and a temporal evolution of Cu distribution within cellular compartments. However, the concentration of Cu measured in most fractions remained under $30 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$, except when L-algae were exposed to Cu^{2+} in the -LFe medium. Under these conditions, Cu content reached values of $350 \pm 130 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ in HSP and $1320 \pm 280 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ in ORG, i.e. $\sim 21\%$ and $\sim 78\%$ of the total intracellular Cu, respectively (Figure 3.2). Thus, after 72 h of exposure in -LFe medium, Cu distribution in algal cells was as follows: ORG ($78 \pm 16\%$) > HSP ($20.7 \pm 7.8\%$) > GR ($1.16 \pm 0.09\%$) > HDP (< 1%), indicating that approximately 80% of intracellular Cu was in sensitive fractions (dominated by ORG) and the remaining 20% was detoxified and mostly stored in dissolved organic forms (HSP). Moreover, and regardless of the exposure media tested, we noticed that between 2 and 72 h of exposure, the proportion of Cu in the ORG fraction increased, and this tendency seems more marked when L-algae were exposed to Cu^{2+} in the -LFe medium. Indeed, the proportion of Cu in ORG increased from 40% after 2 h to 80% after 72 h, while

it remained between 20% and 50% in the HSP fraction and decreased in the GR and the HDP fractions (Figure 3.2).

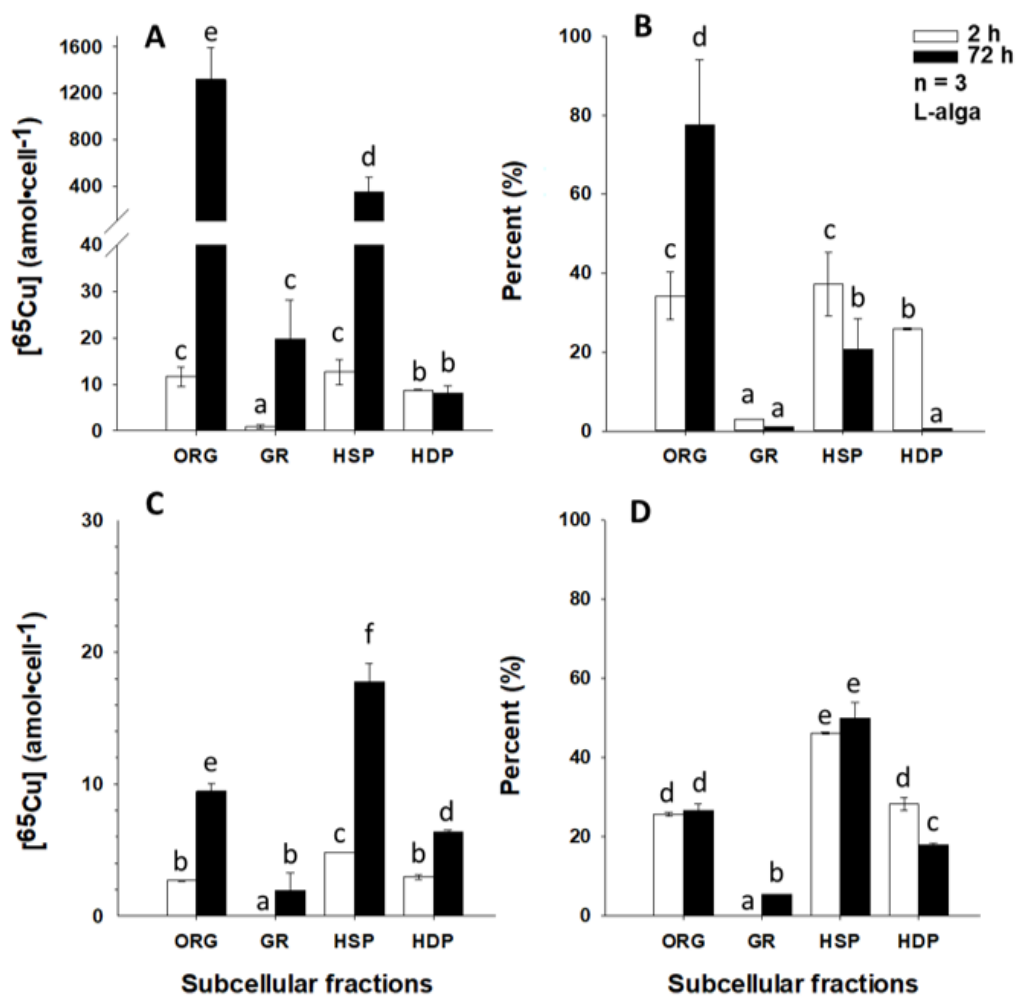


Figure 3.2. Copper subcellular distribution in *C. reinhardtii* acclimated to Fe-limited media (L-alga; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$) and subsequently exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) for 2 and 72 h in an Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$, (A: Absolute values, B: Relative values) or non-Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$, C: Absolute values, D: Relative values) media. Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Tukey Kramer HSD test). ORG = organelles; GR = granules; HSP = heat-stable proteins and peptides; and HDP = heat-denatured proteins.

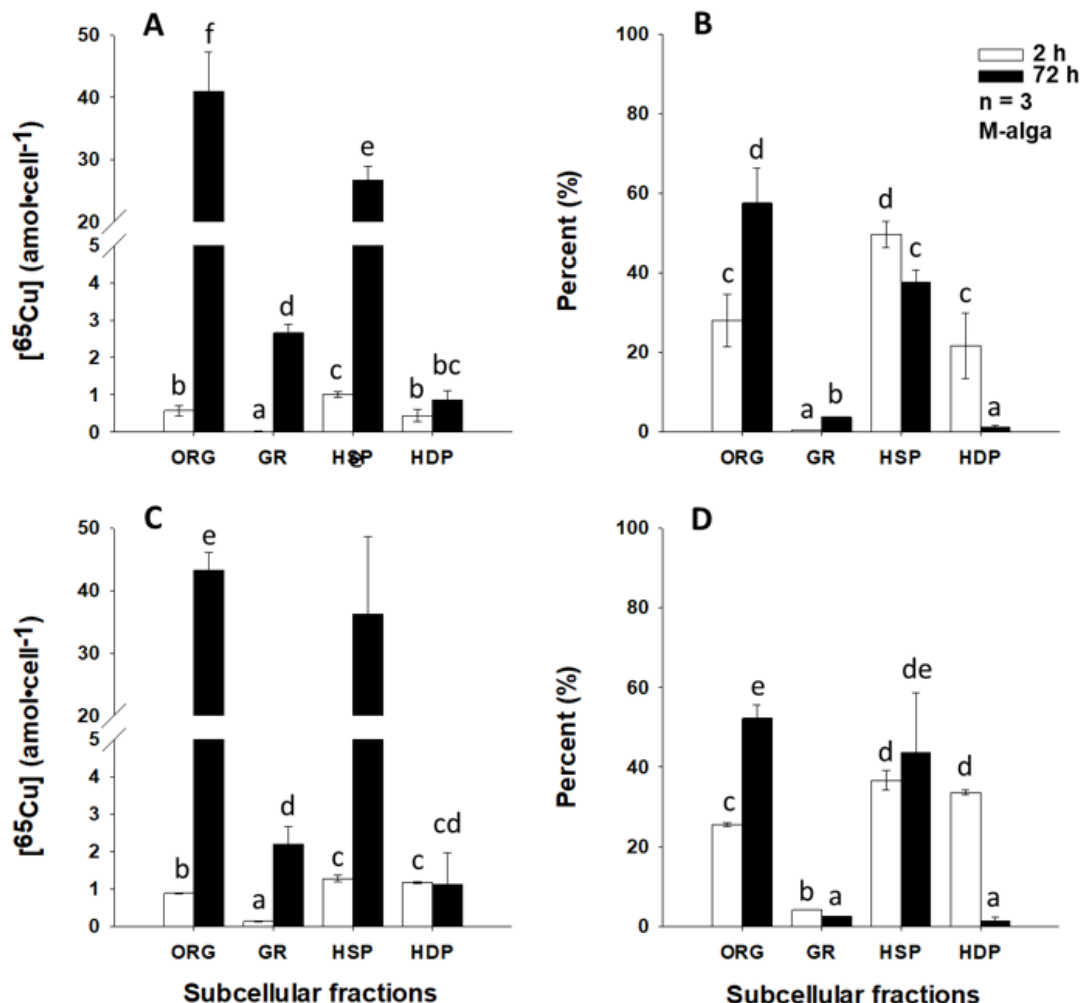


Figure 3.3. Copper subcellular distribution in *C. reinhardtii* not acclimated to an Fe-limited media (M-alga; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$) and exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) for 2 and 72 h in an Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$, (A: Absolute values, B: Relative values) or non-Fe-limited ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$, C: Absolute values, D: Relative values) media. Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Tukey Kramer HSD test). ORG = organelles; GR = granules; HSP = heat-stable proteins and peptides; and HDP = heat-denatured proteins.

In M-algae, the Cu content in the fractions remained low compared to L-algae (Figure 3.3). It also appears that the difference between treatments was not significant, even if between 2 and 72 h of exposure to Cu^{2+} the Cu content within fractions increased, as the proportions in MSF and BDM fractions remained globally stable around 50% regardless of the exposure medium (Figure 3.3). We also noticed that Cu accumulation seemed to increase over time more in favor of the ORG fraction. However, even if this proportion reached ~60% of the total Cu, it remains much less marked than in L-algae. Overall, our

Article 2

results show that the intracellular distribution of Cu in *C. reinhardtii* cellular compartments is not homogeneous, which seems normal when we consider the essentiality of this element, the intrinsic function of each cellular compartment and especially the Fe³⁺ nutrient status of the culture and exposure medium. Copper plays a key role in the cell and could be found in all cell compartments due to its involvement in electron transfers within the main organelles (ORG), by acting as an enzymatic cofactor (HDP) and the storing of Cu in its detoxified forms (HSP and GR).

Many copper active sites in various parts of biological cells were described by Solomon *et al.* (2014), and several studies confirmed the ubiquity of Cu subcellular distribution in algae, emphasizing the interspecific character of this distribution (Kropat *et al.*, 2015; Merchant *et al.*, 2020). For example, according to Morelli & Scarano (2004), Cu was rather found bound to PCs in the HSP fraction of *Phaeodactylum tricornutum* which were exposed for 48 h to 10 µM of total Cu. Few studies are available on the subcellular distribution of Cu and none have evaluated the role of iron in this distribution. Indeed, iron and copper metabolism is well known in microalgae (Blaby-Haas & Merchant, 2012; La Fontaine *et al.*, 2002a; Scheiber *et al.*, 2019), but the homeostatic effects of one on the other have not been elucidated at the subcellular level. However, in other species, previous work was done on how copper influences iron metabolism and *vice versa* (Gulec & Collins, 2014; Maldonado *et al.*, 2006; Semeniuk *et al.*, 2016). It is clear from our results that Cu subcellular distribution is strongly altered when the algae are grown under Fe-limited conditions. It is evident that in our low copper exposure concentrations ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$), detoxification is not the main activity in *C. reinhardtii* as the Cu requirement of organelles is increasing. Similar Cu hyper-accumulation was reported to occur within a compartment of *C. reinhardtii* identified as belonging to the organelle fraction during Zn-limitation (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2014). According to these authors, Cu trafficking to these organelles may be a cell strategy to prevent protein mismetallation during Zn deficiency, enabling efficient cuproprotein metallation or remetallation upon Zn resupply (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2014). Our result suggests that Cu may be needed within organelles likely to replace or to fill, directly or indirectly, the Fe deficiency. This substitution phenomenon, well-known in several species of algae including *C. reinhardtii*, usually happens in the opposite direction (Castruita *et al.*, 2011; Hanikenne *et al.*, 2009).

Article 2

Indeed, to cope with Cu^{2+} deficiency, algae operate a form of Cu economy by reducing essential needs of this element and by promoting the activity of non-copper-dependent proteins capable of ensuring the same functions. This is the case of plastocyanin, a cuproprotein of the photosynthetic system, replaced by cytochrome c_6 (Cyt c_6) under Cu^{2+} deficiency conditions, and also the case of a copper amine oxidase replaced by an amine oxidase containing flavin (Hsieh *et al.*, 2013; Kropat *et al.*, 2015; Schoffman *et al.*, 2016). However, the use of cuproproteins to cope with iron deficiency conditions in freshwater living organisms is not reported in the literature. But in marine diatoms continuously exposed to an Fe limited environment, a similar process was documented by Schoffman *et al.* (2016) resulting from a selective tradeoff in particular for the benefit of plastocyanins (the main cuproprotein of chloroplasts). Thus the large number of cellular functions that *C. reinhardtii* tries to keep active when coping with iron deficiency (Blaby-Haas & Merchant, 2013) suggests that further investigations are required to allow for a better understanding of our results. This may involve, for instance, characterizing and comparing the entire Cu and Fe transport systems in *C. reinhardtii* at the molecular level, especially under Fe^{3+} -limited conditions. However, taking into account the entire element economy in a cell, additional research should address this question by looking not only at membrane transporters, but also inside the cell, as elegantly revealed by Merchant *et al.* (2020) in their review on copper homeostasis in algae. In the meantime, it is important to characterize the nature of the Cu-ligand complexes contained in the HSP fraction.

3.3. Potential Cu-binding ligands in HSP

Microalgae possess a range of potential cellular mechanisms that may be involved in the detoxification of metals and thus tolerate their stress. In algal cells, HSP is a fraction that contains biomolecules or bio-ligands known for their ability to bind metal cations, thus participating in their storage and detoxification. These include certain proteins of the metalloprotein class (e.g. Metallochaperones), certain peptides, such as GSH and PCs, and amino acids such as cysteine (Cys), *etc.* (Balzano *et al.*, 2020; Cobbett & Goldsbrough, 2002; Smith *et al.*, 2014). Figure 3.4 shows results of the SEC-ICP-MS analyses performed to characterize ^{65}Cu signal over time in the HSP fraction from L-algae after 24 and 72 h of exposure to ^{65}Cu ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) under Fe^{3+} -limited (A) and non- Fe^{3+} -limited medium (B). The aim of this methodological approach is to carry out a broad screening of

Article 2

the biomolecules (peptides, polypeptides, and proteins) contained in this cellular compartment (HSP) by monitoring the ^{65}Cu signal and intensity over time. We observed a change in the signal of ^{65}Cu over time with an intensity all the more important as the exposure medium was not limited in Fe^{3+} . This observation contrasts with our expectations as the +LFe medium accumulates less Cu inside the HSP fraction than in -LFe medium, which should normally result in a lower Cu intensity with +LFe than with -LFe. This discrepancy remains to be elucidated but could result from an amplification of ^{65}Cu signals in the presence of Fe^{3+} . However, attention should focus primarily on the location of the peaks rather than on their heights. On the other hand, we have no discrimination between Cu-biomolecule complexes over time, the same peaks of ^{65}Cu being already observed after 24 h of exposure, even if their intensity increased over time. In total, four peaks appear at different RT 12.0 (Peak1: $^{65}\text{Cu}_{12.0}$), 13.8 (Peak 2: $^{65}\text{Cu}_{13.8}$), 14.8 (Peak 3: $^{65}\text{Cu}_{14.8}$), and 16.1 (Peak 4: $^{65}\text{Cu}_{16.1}$), and correspond to the signal of the ^{65}Cu -biomolecule complexes of different MW contained in the HSP fractions.

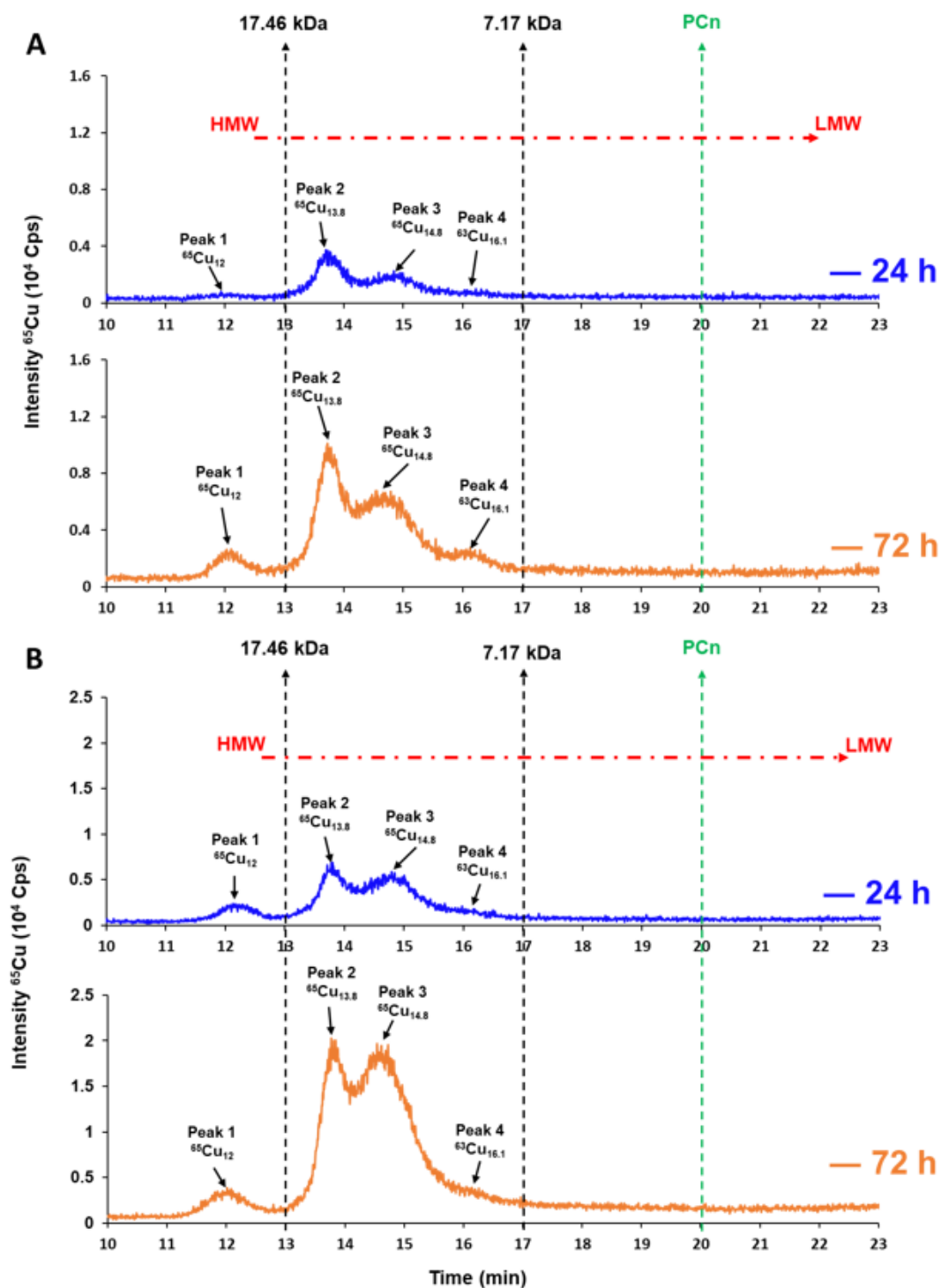


Figure 3.4. SEC-ICP-MS chromatograms in the HSP fractions isolated from *C. reinhardtii*. Peaks indicate ^{65}Cu bound to biomolecules within the HSP fraction after 24 (upper panels) and 72 h (lower panels) of exposure of acclimated *C. reinhardtii* (L-alga) to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 3.55 \text{ nM}$) in Fe-limited (A; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-19} \text{ M}$) and non-Fe-limited (B; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 10^{-18} \text{ M}$) exposure conditions. The vertical dotted lines represent elution times of two MW standards (black) and the expected beginning elution times of PCs (green). The red horizontal dotted line represents the size gradient of the operationally defined MW from HMW (high molecular weight; > 15.6 – 7.2 kDa; elution time: 13.5 – 17.0 min) to LMW (low molecular weight; < 2.6 kDa; elution time: > 21.5 min). The recorded chromatogram covers 0 to 45 min, but only results from 10 to 23 min were shown here.

Article 2

These complexes can be classified into three operational groups based on their MW, namely (i) biomolecules of high molecular weight (HMW; $> 15.6 - 7.2$ kDa; TR: 13.5 – 17.0 min), (ii) biomolecules of medium molecular weight (MMW; $7.2 - < 2.6$ kDa; TR: 17.0 – 21.5 min) and (iii) those of low molecular weights (LMW; < 2.6 kDa; TR: > 21.5 min). Copper peaks evolved over time with an increase in their intensity in HMW and MMW complexes but no LMW complexes were observed. Based on the calibration curve of the chromatographic column (Table SI3.4), the RT of PCs are expected to be found between 22 and 36 min depending on their MW and the chelated cations, which well corresponds to the range of LMW sizes. It therefore appears that after 2 and 72 h of exposure of the algae to 3.55 nM free Cu^{2+} , no peak of ^{65}Cu -PCs complexes was detected. This absence of PCs after exposure of algae to Cu could be explained by multiple reasons. It is possible that the free concentration of Cu^{2+} (3.55 nM) in the exposure medium was not sufficiently high to induce the synthesis of PCs. In some species, the presence of PCs is only detectable above a threshold concentration of element in the exposure solution (Schat *et al.*, 2002). Another possible explanation is related to the efficiency of the column recovery. Indeed, PCs could be retained in the column during SEC separations so that, the eluted quantity is not sufficient to be detectable, in particular if little PCs had been produced because of the low kinetics of PC biosynthesis or the low level of exposure to Cu (for both exposure periods of 2 and 72 h). In addition, Cu is not a very efficient PCs inducer; Cu is generally classified in several studies in 3rd or 4th place among PCs inducers in algae and higher plant, after Pb, Cd and sometimes As (Schat *et al.*, 2002; Scheidegger *et al.*, 2011) and this classification depends on the species (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Our observations could also reflect a delay in response, the kinetics of PC biosynthesis being slow in certain species. However, it is reported that PC synthesis often occurs very early after exposure of the algae to toxic concentrations of metal (Morelli & Scarano, 2004). Finally, in certain species of algae such as *C. reinhardtii*, the toxic effect of Cu does not systematically induce, like Cd, the biosynthesis of PCs (Miao & Wang, 2007; Navarrete *et al.*, 2018). These algae would tend to use other mechanisms, certainly less expensive in energy, to detoxify Cu and would reserve the use of PCs in exceptional circumstances (Lavoie *et al.*, 2016b; Miao & Wang, 2007; Navarrete *et al.*, 2018). The detection of PCs in HSP, in Peaks

Article 2

5-6, occurring at a higher Cu^{2+} concentration (39.3 nM), confirms our hypothesis that *C. reinhardtii* would tend to use other detoxification mechanisms other than PCs before resorting to them when needed, especially to deal with higher Cu concentrations (Lavoie *et al.*, 2016b; Navarrete *et al.*, 2018).

Table 3.1. Proteins identified in SEC fractions 2 and 3 using bottom-up proteomics by LC-MS/MS analysis.

Fractions (#)	Accession Number (AN)	MW (kDa)	Sequence coverage (%)	Unique peptides	Protein name
2	A8IT01	42	44	21	Carbonic anhydrase
2	Q9FE86	26	41	11	Peroxiredoxin
2	A8HP84	40	26	8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
2	A8I2V3	22	54	8	Peroxiredoxin
2	A8IGH1	26	41	9	Superoxide dismutase
2	A8I2E0	24	27	6	Superoxide dismutase
2	A8I8Z1	23	21	4	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
2	A0A2K3DMT2	323	1.6	3	Uncharacterized protein
2	A8J0E4	31	21	6	Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II
2	A0A2K3E5S1	61	9.2	4	Uncharacterized protein
2	Q945T1	28	11	3	GrpE protein homolog
2	A8HSB0	11	29	3	Histone H4
2	A8IDP6	18	20	2	Calmodulin
2	A8J9H8	17	24	3	Nucleoside diphosphate kinase
2	A8HMC0	47	6.9	2	Calreticulin
2	A8HRZ0	27	7.9	2	Histone H1
2	A0A2K3DCZ1	54	4.0	2	Uncharacterized protein
2	A8J1T4	52	4.6	2	Dihydrolipoyl dehydrogenase
2	A8J2X6	41	6.5	2	N-acetyl-glutamate semialdehyde dehydrogenase
2 / 3	A0A2K3DA85	32	2.5 / 19	1 / 5	Uncharacterized protein
2 / 3	Q6UKY5	12	11 / 22	1 / 2	Acyl carrier protein
3	A8JH68	15	28	6	Plastocyanin
3	A0A2K3DI03	14	21	3	CP12 domain-containing protein
3	A8IAW5	16	19	2	Predicted protein
3	A8HND3	11	23	3	Predicted protein

To better identify and characterize all potential Cu-bioligands in this cellular compartment, LC-MS/MS analysis was performed on isolated fractions from SEC. Figure

3.5 and Tables 3.1, SI3.5 and SI3.6 summarize the essential findings from these experiments.

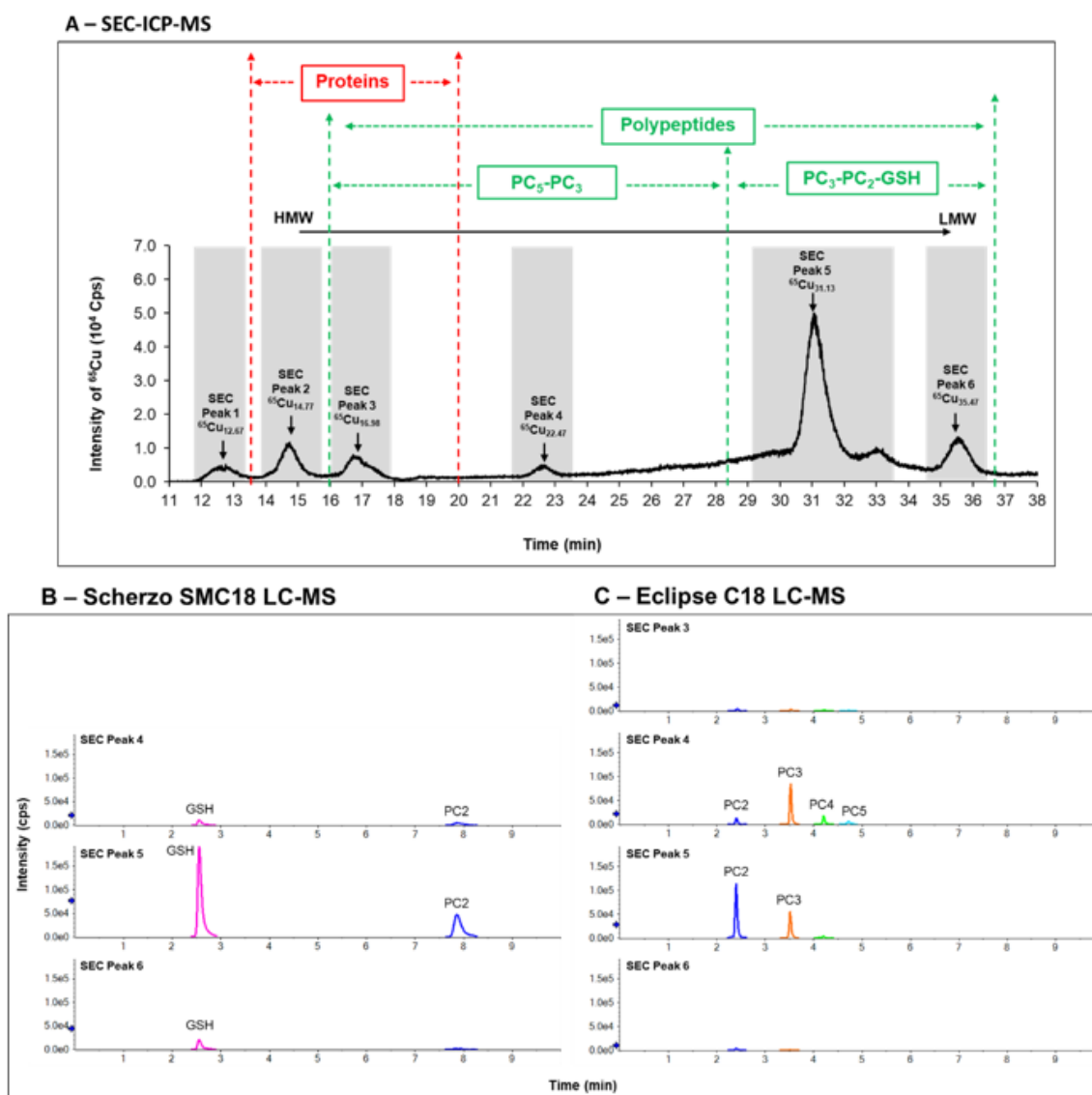


Figure 3.5. SEC-ICP-MS chromatogram of the separation of ^{65}Cu complexes present in the HSP fraction after 72 h of exposure time of *C. reinhardtii* to ^{65}Cu ($[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 39.3 \text{ nM}$) in Fe-replete media. The ligand candidates for the binding of Cu in the HSP fraction were identified by proteomic and peptidomic analyses. Based on these analyses, the colors indicate a rough delineation of the retention times (RT) of the proteins (red) and the (poly)peptides (green) along a molecular weight (MW) gradient (black line) of these biomolecules.

In total, six peaks of the Cu-ligand complexes were observed (Figure 3.5A) and LC-MS/MS analyses (proteomics and targeted peptide analyses) were performed to assign their molecular nature (Figure 3.5B to 3.5F, Tables SI3.5 and SI3.6). In Figure 3.5A, the first peak ($^{65}\text{Cu}_{12.67}$) showed no proteins found from *C. reinhardtii* HSP (only contaminants

Article 2

found with complete uniprot database search) and could correspond to non-specifically bound polymers likely released from the column. The other peaks correspond to Cu-complexes with proteins and polypeptides. Proteins (in red) were detected in Peak 2 ($^{65}\text{Cu}_{14.77}$) and 3 ($^{65}\text{Cu}_{16.98}$). Twenty-one proteins were identified from SEC Peak 2 and six from Peak 3 (with two proteins in common between the two fractions). Some peptides (PCs and GSH, in green) (Ahner *et al.*, 1995) were detected in fractions 4 to 6. Four different PCs (PC2, 3, 4 and 5) could be confirmed in peaks 3, 4, 5 and 6 (Figure 3.5B-3.5F, Table SI3.5), , based on accurate mass measurements, relative RT and comparison with PC2 and PC6 standard compounds. The presence of GSH (Figure 3.5C), another important LMW-thiol, was also confirmed by accurate mass and retention time matching with standard GSH. Reduced GSH represents the molecular building block for the biosynthesis of PCs and plays a key role in reducing intracellular oxidative stress as well as metal sequestration (Miao & Wang, 2007; Rauser, 1995). These ligands are well known to complex metal ions, including Cu^{2+} (Navarrete *et al.*, 2018; Seregin & Kozhevnikova, 2020; Vatamaniuk *et al.*, 2000), however, this is not the case for all the 25 proteins detected in peaks 2 and 3, and their presence in HSP does not necessarily mean that they all bind Cu. Certain proteins listed *a priori* play a role: (i) direct or indirect (Superoxide dismutase, Calreticulin, Histone H1, 4) in handling Cu detoxification (or another trace element), (ii) others because they can alleviate intracellular oxidative stress (Peroxiredoxin, Superoxide dismutase), and (iii) others by operational or technical default because they are known for their homeostatic (e.g. Plastocyanin, Acyl carrier protein, carbonic anhydrase, Dihydrolipoyl dehydrogenase) and metabolic (e.g. carbonic anhydrase, dehydrogenases, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase, etc.) roles. These proteins can overlap on several functions which makes them likely candidates for complexing Cu^{2+} . Only one of these proteins, plastocyanin is well known to have an active Cu-binding site (Merchant *et al.*, 2020), and another glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, is cited in the literature as having an ability to bind Cu^{2+} (Matsumura *et al.*, 2011). However, carbonic anhydrase has been artificially designed to bind Cu^{2+} and used as fluorescent probe to monitor cytoplasmic Cu^{2+} (Kim *et al.*, 2020; Linder, 1991; Tabbi *et al.*, 2019). Moreover, based on the GO annotation, in addition to carbonic anhydrase and plastocyanin which have active metal sites (Zn^{2+} and Cu^{2+} , respectively), five other proteins in the list would have putative active sites for

Article 2

complexing metals and therefore constitute candidates for Cu-binding ligands in HSP: two superoxide dismutases (AN: A8IGH1(+1) and A8I2E0(+1)), a predicted protein (AN: A8HND3), calmodulin and calreticulin (see details in Table SI3.6).

To identify candidates capable of binding Cu, it is important to define an objective and scientifically relevant criterion. Ligands that can form stable complexes with metals include S-, N-/O-, and O-containing functional groups (Doerrer, 2018; Seregin & Kozhevnikova, 2020). However, it is known that in biological systems the situation is much more complex and metal concentrations in cells is often changing (Gayomba *et al.*, 2015; Seregin & Kozhevnikova, 2020). First, Cu-containing proteins were organized into three groups based on their nuclearity, Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and UV-visible spectroscopic characteristics, and common amino-acid side chains (Doerrer, 2018). Based on this, Malkin & Malmström (1970) first proposed three different types of protein-bound copper, usually referred to as Type 1, Type 2 and Type 3 copper. Even though this categorization and terminology is still widely-used today, it should be noted, however, that our knowledge of Cu biochemistry has improved since then and now includes many Cu species that do not fit within these parameters (Doerrer, 2018; Gray *et al.*, 2000). Therefore, putting all of this together, our first criterion to identify good Cu-binding candidate proteins was to use the number of Cys residues in the protein. Indeed, given the important role played by Cys within protein and peptide metal binding sites (Banci *et al.*, 2010; Doerrer, 2018), it is possible to define for each protein a Cys-to-protein (total amino acid residues) ratio (Table SI3.6). Then based on the threshold of x% of Cys (arbitrarily fixed) we can define as good candidate proteins those having a ratio higher than the fixed threshold. Thus, for a threshold of 2%, only three proteins (carbonic anhydrase, CP12 domain-containing protein and one predicted protein (AN: A8HND3)) are candidates in the list of 25 proteins, i.e. around 13%, of which two are clearly annotated as being able to bind to metals (Table SI3.6). Among these two proteins, only carbonic anhydrase is known to have the ability to bind Cu²⁺ (Kim *et al.*, 2020; Linder, 1991) but no clear evidence is established as to its role in Cu detoxification. The second one (AN: A8HND3) is a predicted and annotated protein that can bind metal ions but requires further investigations to determine if it also has the ability to bind Cu and be potentially involved in its detoxification. It is also possible to refine this approach by adding or by combining several relevant criteria. For example, by

Article 2

combining the ratios of the seven most frequent or more probable amino acids encountered in the metal-binding sites (Arg, His, Lys, Cys, Met, Asp, Glu) (see Table SI3.6 and Doerrer (2018)) and deduce a classification score for each protein in decreasing order of plausible candidates for complexing Cu^{2+} . While relevant, the latter approach requires even more investigations to achieve the most realistic combination. Another approach may consist of the use of bioinformatics tools to search for patterns (or protein profiles) that are conserved and characteristic of the binding sites of divalent metals, in particular copper (Chan *et al.*, 2020; Cobbett *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2012). These motifs can not only provide indications as to the function of proteins not yet characterized, but also on their possible metal cofactors (Koch *et al.*, 1997; Pretzler & Rompel, 2018; Shin *et al.*, 2012). Copper-binding motifs have been identified and characterized in many proteins. The amino-terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding (ATCUN) motif, is an example of a Cu(II)-binding motif that shows high affinity and specificity for Cu(II) (or Ni(II)), and well known for its ability to facilitate metal exchange with appropriate receptor ligands (Koch *et al.*, 1997; Neupane *et al.*, 2014). The way in which copper is coordinated by these motifs is therefore important for its intracellular distribution and also for effective functioning of copper-dependent proteins. It would therefore be important to look for these motifs in the sequences of the proteins identified in this study (Bouyssi re *et al.*, 2003; Mounicou *et al.*, 2009). In addition, the combined use of X-ray crystallography and mass spectrometry could also be a valuable strategy to investigate and characterize metal binding sites in proteins (Handing *et al.*, 2018; Messori & Merlino, 2017).

4. Conclusion

Copper is an essential element and its homeostasis is tightly and efficiently well regulated. However, this capacity to keep the internal Cu concentration within an optimal range can sometimes be disturbed. Our results show that an Fe^{3+} -depleted medium disrupts Cu homeostasis in algal cells, which greatly increased Cu accumulation. The freshwater green alga *C. reinhardtii* can cope with this by mobilizing various internal mechanisms to manage the excess Cu. In accordance with our hypothesis, we found that these mechanisms involved traditional approaches of binding metals through bio-ligands like GSH and PCs. In addition to these LMWs ligands, it was also detected in the HSP fraction of many proteins, categorized as MMW and HMW ligands, but the effective role of most of them

Article 2

in the copper detoxification process in *C. reinhardtii* remains unknown. We have also highlighted another strategy used by algae in Fe³⁺-limited conditions in which organelles are highly involved. We suppose that this copper traffic to organelles could be in response to the iron deficit by replacing it with copper, in particular to maintain, as reported in marine diatoms, vital functions like respiration (or photosynthesis) through electron transfer chains. These results shed new light on the adaptive capacities of *C. reinhardtii*, which is a model organism encountered over several latitudes, to cope with wide environment physicochemical variations. A molecular characterization (metallomics, proteomics and metabolomics) of the content of the ORG fraction could further shed light on these mechanisms. Our results could also have physiological links with changes in membrane transporters related to the nutritional context of the medium in Fe³⁺. Therefore, it will be important, in order to better understand these results, to carry out more in-depth investigations, by studying the mechanisms that govern the internalization of these two trace metals by algae through their membrane transport systems.

Conflicts of interest

Authors have no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical assistance provided by J. Perreault, O. Hourtané, N. Dupuy and K. Racine. Language assistance provided by S. Hepditch is also gratefully acknowledged. This work was supported by Ecotoq (FRQNT strategic network grant; 2020-RS4-265031), by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC Discovery Grant; RGPIN-2014-05082) and the Canada Research Chair program (950-231107).

Article 2

Supporting Information

New insights in copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii* under Fe-limited condition

Emeric Kochoni,^{1,2} Imad Aharchaou,^{1,2} Leanne Ohlund,³ Maikel Rosabal,^{2,4} Lekha Sleno,^{2,3} and Claude Fortin^{1,2}

¹Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada. E-mail: claudio.fortin@ete.inrs.ca

²EcotoQ, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

³Département de Chimie, Université du Québec à Montréal (UQAM), 2101, rue Jeanne-Mance, Montréal, QC, H2X 2J6, Canada

⁴Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), 141 Avenue du Président-Kennedy, Montréal, QC, H2X 1Y4, Canada

Article 2

Table SI3.1. Total and free molar concentrations of the culture media calculated by using MINEQL+ 5.0 at pH 7.0 and 25 °C.

Media Compounds	MHSM1		LM1	
	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	6.80E-05	6.57E-05	3.28E-05	2.03E-05
Cl	5.98E-06	5.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.20E-08	Atm	3.95E-08
Co	1.09E-08	3.59E-09	7.60E-10	1.04E-11
⁶³ Cu	7.04E-08	1.49E-10	1.81E-10	1.04E-14
Fe	5.92E-07	2.25E-18	7.99E-07	1.07E-19
K	4.22E-03	4.21E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.12E-05	7.89E-05	8.12E-05	7.63E-05
Mn	2.10E-06	1.86E-06	6.62E-09	5.15E-09
MoO ₄	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	2.95E-08
Na	1.02E-04	1.02E-04	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	5.07E-03	5.06E-03	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	4.06E-10	1.37E-04	5.27E-10
SO ₄	8.12E-05	7.80E-05	8.12E-05	7.52E-05
Zn	2.33E-07	9.56E-08	5.34E-10	1.04E-11
EDTA	8.06E-07	6.07E-18	8.06E-07	5.11E-16
MOPS	1.00E-02	4.18E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI3.2. Total and free molar concentrations of media after 2 h exposure calculated by using MINEQL+ 5.0 at pH 7.0 and 25 °C. In this experiment, metals were not buffered by NTA nor EDTA.

Media Compounds	-LFe		+LFe		LMR	
	Total	Free	Total	Free	Total	Free
Ca	1.67E-04	1.62E-04	1.67E-04	1.62E-04	1.67E-04	1.62E-04
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
⁶⁵ Cu	9.98E-05	2.57E-08	9.98E-05	2.57E-08		
Fe			9.28E-09	4.39E-18		
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.35E-05	8.39E-05	8.35E-05	8.39E-05	8.35E-05
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
SO ₄	8.12E-05	7.43E-05	8.12E-05	7.43E-05	8.12E-05	7.43E-05
MOPS	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

Article 2

Table SI3.3. Total and free molar concentrations of the exposure media calculated by using MINEQL+ 5.0 at pH 7.0 and 25 °C. The media were designed for the 24 and 72 h of exposure times.

Compounds	Media	-LFe^a		+LFe^a		+LFe^b	
		Total	Free	Total	Free	Total	Free
BO ₃		3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca		3.28E-05	3.13E-05	3.28E-05	3.13E-05	3.28E-05	3.13E-05
Cl		5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm		3.95E-08	Atm	3.95E-08	Atm	3.95E-08
Co		6.77E-10	1.29E-11	6.77E-10	1.29E-11	7.93E-11	1.29E-11
⁶⁵ Cu		9.92E-05	3.55E-09	9.92E-05	3.55E-09	1.09E-04	3.93E-08
Fe		1.07E-09	1.07E-19	1.07E-08	1.07E-18	1.89E-09	1.07E-18
K		4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg		8.12E-05	7.96E-05	8.12E-05	7.96E-05	8.12E-05	7.96E-05
Mn		5.81E-09	5.15E-09	5.81E-09	5.15E-09	5.62E-09	5.13E-09
MoO ₄		3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08
Na		1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄		9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃		1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄		1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10	1.37E-04	5.25E-10
SO ₄		8.12E-05	7.51E-05	8.12E-05	7.51E-05	8.12E-05	7.51E-05
Zn		6.95E-10	1.04E-11	6.95E-10	1.04E-11	7.92E-11	1.05E-11
NTA		1.00E-04	6.35E-10	1.00E-04	6.35E-10	1.09E-04	6.31E-11
MOPS		1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03	1.00E-02	4.31E-03

a: Media designed to maintain Cu²⁺ exposure concentration at 3.55 nM

b: Media designed to maintain Cu²⁺ exposure concentration at 39.3 nM

Table SI3.4. List of standards biomolecules, their retention time in SEC and molecular weight (MW) used to plot the calibration curve.

	Time (min)	MW (Da)	Log MW
Cys	35.600	121.2	2.08
PC2	30.420	539.7	2.73
EDTA	29.740	292.2	2.47
PC6	23.640	1468.9	3.17
MT2	14.870	6800.0	3.83
Ribo	14.100	14200.0	4.15
CA	13.000	29000.0	4.46

Article 2

Table SI3.5. List of peptides identified by peaks (fractions) and specific peptidomics methods used.

Fractions (#)	Intensity	TR (min)	Methods	Identified Peptides (GSH and/or PCn)
3	4.5 e3	2.415		PC2
	4.5 e3	3.530	PC Eclipse neg mode method	PC3
	2.5 e3	4.210	5-30-8-80-10	PC4
	1.0 e3	4.726		PC5
4	1.0 e4	2.558	PC Scherzo SMC18-MF:	GSH
	<1.0 e4	7.884	Scherzo_neg_3_95_15_IDA	PC2
	1.5 e4	2.405		PC2
	8.0 e4	3.521	PC Eclipse Method:	PC3
	2.0 e4	4.202	Eclipse_5_30_8_80_10_500u	PC4
	<1.0 e4	4.721	l_min_NEG_IDA	PC5
	1.5 e4	2.405		PC2
	8.5 e4	3.521	PC Eclipse neg mode method	PC3
	2.0 e4	4.202	5-30-8-80-10	PC4
	<1.0 e4	4.721		PC5
5	2.0 e5	2.559	Scherzo SMC18-MF:	GSH
	5.0 e4	7.868	Scherzo_neg_3_95_15_IDA	PC2
	8.5 e4	2.404	PC Eclipse Method:	PC2
	5.9 e4	3.514	Eclipse_5_30_8_80_10_500u l_min_NEG_IDA	PC3
6	<1.0 e4	2.321		GSH
	2.0 e4	2.565		GSH
	<1.0 e4	11.049	Scherzo SMC18-MF:	GSH
	<1.0 e4	7.870	Scherzo_neg_3_95_15_IDA	PC2
	<1.0 e4	12.479		PC2
			PC Eclipse Method:	
	<1.0 e4	2.402	Eclipse_5_30_8_80_10_500u l_min_NEG_IDA	PC2

Article 2

Table SI3.6. Occurrence of amino acids present in detected proteins with potential binding of Cu in order to identify likely candidates as Cu ligands. The values are the percentage (%) of amino acids obtained by dividing the number of amino acids of interest by the total number of amino acids in each protein.

Identified Proteins	Accession Number (AN)	Arg (%)	His (%)	Lys (%)	Cys (%)	Met (%)	Asp (%)	Glu (%)	Molecular function / biological process / cellular component
Carbonic anhydrase	A8IT01	4.51	5.57	3.98	2.12	1.86	3.98	5.04	Zinc ion binding
Peroxiredoxin	Q9FE86	5.53	1.28	7.23	0.85	0.85	6.38	5.53	Thioredoxin peroxidase activity
Plastocyanin	A8JH68	3.45	2.07	4.83	0.69	1.38	4.83	4.14	Copper ion binding
Uncharacterized protein	A0A2K3DA85	9.15	0.00	5.05	0.00	0.63	1.89	3.15	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A8HP84	4.55	2.14	8.02	1.07	2.41	6.95	3.48	Glucose metabolic process
Peroxiredoxin	A8I2V3	3.54	1.01	7.07	1.52	1.01	6.57	5.56	Response to oxidative stress
Superoxide dismutase	A8IGH1	4.70	2.56	6.84	0.00	2.99	4.27	5.13	Metal ion binding
Acyl carrier protein	Q6UKY5	5.98	0.00	6.84	0.00	4.27	5.98	10.26	Fatty acid metabolic process
Superoxide dismutase	A8I2E0	1.83	3.67	5.96	0.00	2.29	6.42	3.67	Metal ion binding
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	A8I8Z1	4.91	2.68	5.36	1.79	2.23	2.68	4.91	Riboflavin biosynthetic process
Uncharacterized protein	A0A2K3DMT2	2.79	0.05	2.79	0.08	0.21	4.41	2.79	
Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II	A8J0E4	3.09	0.00	8.93	1.03	1.37	5.50	5.84	Photosystem II stabilization
CP12 domain-containing protein	A0A2K3DI03	6.11	1.53	9.92	3.05	2.29	9.92	5.34	Negative regulation of reductive pentose-phosphate cycle
Predicted protein	A8IAW5	4.64	0.00	9.27	0.00	1.32	4.64	6.62	Integral component of membrane
Uncharacterized protein	A0A2K3E5S1	4.62	3.08	5.64	1.54	1.71	4.62	4.96	Oxidation-reduction process
Predicted protein	A8HND3	7.29	2.08	9.38	3.13	2.08	4.17	5.21	Metal ion binding
GrpE protein homolog	Q945T1	8.08	0.77	5.00	0.38	3.08	5.77	9.62	Regulation of catalytic activity
Histone H4	A8HSB0	14.56	1.94	9.71	0.00	1.94	2.91	3.88	Nucleosome assembly
Calmodulin	A8IDP6	3.68	1.84	7.36	0.00	6.13	11.04	14.11	Metal ion binding
Nucleoside diphosphate kinase	A8J9H8	5.33	1.33	6.00	0.67	3.33	3.33	8.67	Cellular response to hydrogen peroxide
Calreticulin	A8HMC0	0.71	1.43	12.62	0.48	1.90	12.14	10.00	Metal ion binding
Histone H1	A8HRZ0	0.39	0.79	34.25	0.00	0.79	1.57	9.84	Chromosome condensation
Uncharacterized protein	A0A2K3DCZ1	2.34	0.18	2.34	0.72	1.26	1.26	0.54	
Dihydrolipoyl dehydrogenase	A8J1T4	3.98	2.79	7.17	1.59	3.59	3.59	6.77	Cell redox homeostasis
N-acetyl-glutamate semialdehyde dehydrogenase	A8J2X6	4.44	2.61	5.48	1.83	2.61	4.18	4.44	Protein dimerization activity

Figures

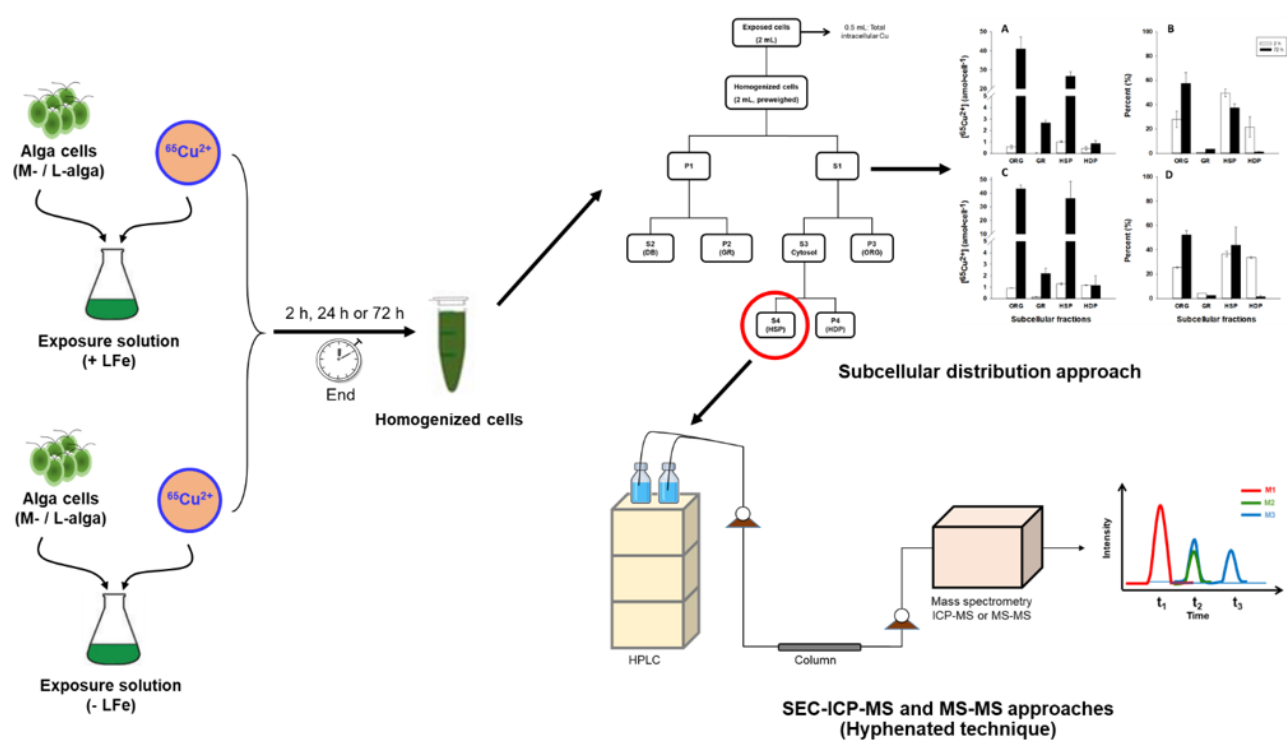


Figure SI3.1. Schematic overview of the different stages and technical approaches used during this work.

Article 2

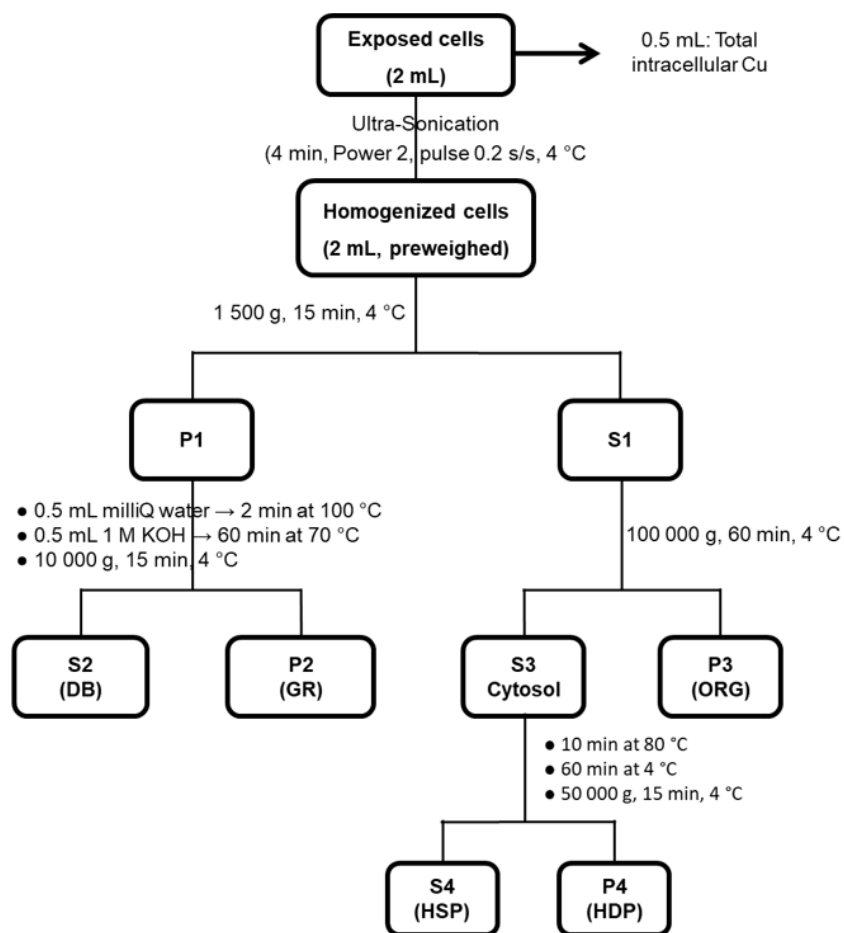


Figure SI3.2. Overview of the subcellular fractionation scheme based on Lavoie *et al.* (2009b)). , P1: Pellet 1; P2: Pellet 2; P3: Pellet 3; S1: Supernatant 1; S2: Supernatant 2; S3: Supernatant 3; S4: Supernatant 4; DB: Debris; GR: Granules; ORG: Organelles; HSP: Heat stable peptides and proteins; HDP: Heat-denatured proteins.

Article 3

Article 3 : Role of iron in gene expression and in the modulation of copper uptake in a freshwater alga: Insights on Cu and Fe assimilation pathways

Rôle du fer dans l'expression des gènes et dans la modulation de la prise en charge du cuivre dans une algue d'eau douce : Aperçus des voies d'assimilation du Cu et du Fe

Auteurs : Emeric Kochoni^{1,2}, Caroline Doose^{1,2}, Patrice Gonzalez³, Claude Fortin^{1,2}

¹ Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

² EcotoQ, 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

³ Université de Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

Article soumis et en cours de révision pour être resoumis à la revue Environmental Toxicology and Chemistry (ETC)

Contribution des auteurs :

Emeric Kochoni :

- Conception et réalisation des expériences de prise en charge du Cu par les microalgues vertes,
- Analyse des résultats à l'ICP-MS,
- Traitements et analyses des données,
- Rédaction de l'article.

Article 3

Caroline Doose :

- Traitements et analyses statistiques des données de transcriptomique,
- Co-écriture de l'article.

Patrice Gonzalez :

- Conception, supervision et réalisation des analyses de transcriptomique,
- Traitements des données de transcriptomique,
- Co-écriture de l'article.

Claude Fortin :

- Conception de l'étude,
- Supervision des expériences,
- Co-écriture de l'article.

Abstract

Metal uptake and toxicity can currently be related to its aqueous speciation and to the presence of competitive ions as described by the Biotic Ligand Model. Beyond these simple chemical interactions at the surface of aquatic organisms, several internal biological feedback mechanisms can also modulate metal uptake. This is particularly important for essential elements for which specific transport systems were developed over the course of evolution. Based on the results of short-term Cu^{2+} uptake experiments and on the analysis of the expression of certain genes involved in Cu and Fe homeostasis, we studied the effects of Fe^{3+} on Cu^{2+} uptake by the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. We observed a significant increase in Cu^{2+} uptake rate in algal cells acclimated to Fe^{3+} -limited medium up to 4.7 times greater compared to non-acclimated algal cells. The overexpression of the ferroxidase FOX1 and permease FTR1 genes suggests an activation of the high affinity Fe^{3+} assimilation system, which could constitute a plausible explanation for the increase in Cu^{2+} uptake rate in acclimatized algae. We show that iron availability can have a significant impact on copper uptake. Our observations reinforce the importance of considering physiological factors to better predict metal bioavailability.

1. Introduction

Copper and iron are two of the most important essential elements because of the role they play in cells. Due to their chemical properties (especially their redox potential), they are able to act as enzymatic cofactors in several redox reactions in cell metabolism (Burkhead *et al.*, 2009; La Fontaine *et al.*, 2002b; Ravet & Pilon, 2013). However, copper can become toxic to living organisms, especially at high concentrations, and cause irreversible damage that can lead to cell death (Balamurugan & Schaffner, 2006; Hanikenne *et al.*, 2009; Marchetti & Maldonado, 2016). Therefore, ingenious systems of regulation and control of the availability of these trace elements exist in organisms, allowing them to ensure homeostasis of these elements within cells (Blaby-Haas & Merchant, 2017; Burkhead *et al.*, 2009). Homeostasis is a highly modulated dynamic and physiological equilibrium that results from a long evolution process in response to difficult environmental conditions encountered in the past (Hanikenne, 2003; Hennigar & McClung, 2015). Copper and iron protein transporters (biotic ligands) play a central role in these physiological processes that aim to maintain element homeostasis (Kropat *et al.*,

Article 3

2015; Maldonado *et al.*, 2006). In particular, they act as a gate of entry and possibly of exit for trace metals in the cell (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Hennigar & McClung, 2015). To carry out their role and allow the organism to survive in various environmental conditions (along the range of trace elements availabilities in natural systems), ion transporters have been subjected, through evolution, to various inter and/or intra-specific specializations, varying from one element to another (Annett *et al.*, 2008; Blaby-Haas & Merchant, 2012). In *C. reinhardtii*, Cu and Fe uptake has been widely studied and the involved mechanisms to modulate their assimilation are now well documented (Hanikenne, 2003; La Fontaine *et al.*, 2002b; Merchant *et al.*, 2006). Typically, assimilation of most trace elements is mainly ensured by two types of systems; responding according to the ambient element concentration (availability) and/or to the elemental nutritional status of the organisms. High affinity systems use a set of membrane proteins mobilized to meet the needs of the cell in an environment where the element of interest is limited. On the other hand, low affinity systems are used in an environment where this element is abundant (Glaesener *et al.*, 2013; Hanikenne, 2003; Kropat *et al.*, 2015; Lavoie *et al.*, 2016a).

Trace metal bioavailability and toxicity predictive models such as the biotic ligand model (BLM) notably use the affinity constants of metal-ligand interactions as input. Hence, there is importance for better understanding the metal transport mechanisms to adequately predict their uptake and toxicity as pointed out by Lavoie *et al.* (2016a). Several decades of research have led to the modeling of metal bioavailability and toxicity as a function of its free ion, resulting first in the free ion activity model (FIAM) predictive model, then the BLM (Adams *et al.*, 2020; Schlekot *et al.*, 2020). Various improvements have since been made to improve these models, such as accounting for pH and concentrations of major cations (Mebane *et al.*, 2020; Niyogi & Wood, 2004). Despite this progress, several other challenges still remain in order to further improve bioavailability models, in particular by considering the effects of other important factors such as temperature, concentrations of essential elements and macro-nutrients, acclimatization, etc. (Mebane *et al.*, 2020). Our work falls within this overall perspective to improve such models.

Indeed, in previous work (Kochoni & Fortin, 2019) we observed a hypertoxicity of Cu to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* following its abnormal accumulation in

Article 3

a low metal environment which faded when the medium was supplemented in Fe^{3+} , while other essential trace elements (Co, Mn, Zn) had no effect. Based on the BLM, it could be anticipated that both Cu and Fe are using the same uptake systems resulting in a protective effect of Fe^{3+} against the toxicity of Cu^{2+} through competition of these two elements at their uptake sites. The objectives of the present study are therefore, to verify this hypothesis and to gain an overview of the mechanisms triggered from these low metal growth conditions by *C. reinhardtii*. Two methodological approaches were used to characterize membrane transporters involved in the assimilation process of these two elements. First, Cu uptake rates using short-term uptake experiments were determined to quantify the kinetic parameters characterizing the uptake of these metals by the membrane transporters. Second, we examined the transcriptomic response of the cells for known transport systems to gain insight on the cellular coping mechanisms typically when iron deficiency occurs.

We observed an increase in the uptake rates of Cu^{2+} (ϕ_{Cu}) in algal cells acclimated to a Fe-limited medium compared to non-acclimated algal cells. When acclimated cells were exposed to Cu^{2+} in either Fe conditions, there was no significant difference in the affinity constant (K_m) and the maximum internalisation flux (J_{max}). This suggests that there is no competitive inhibition of Cu uptake by Fe in these conditions. At the molecular level, overexpression of ferroxidase FOX1 and permease FTR1 could be responsible for the increase in the Cu^{2+} uptake rate. These enzymes are known to play a role in Fe^{3+} high affinity assimilation pathways. Moreover, FOX1 is an enzyme whose activity strongly depends on its Cu^{2+} cofactor. We conclude that cells acclimated to low iron conditions increase the number of Fe transporters that use Cu as a cofactor, which can be used to internalize Cu.

2. Materials and methods

2.1. Algae culture conditions

The freshwater green microalga *C. reinhardtii* (wild type strain CPCC11, Waterloo University, ON, Canada), was used as a model organism in this work as described in a previous publication (Kochoni & Fortin, 2019). This species is easy to grow and is well suited for controlled studies. In order to better quantify the internalization fluxes of copper during the exposure experiments, cells were grown in media containing only the stable isotope ^{63}Cu (Enrichment 99%, Trace Sciences International Inc) and exposure experiments were carried out in media containing only ^{65}Cu (Enrichment 99%, Trace Sciences International Inc). The $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ ratios inside algae prior to the experiments were 0.22 ± 0.08 and 0.30 ± 0.02 for acclimated and non-acclimated algae, respectively, indicating that most of the Cu was indeed ^{63}Cu . This approach allowed us to differentiate between “pre-existing” and “new” copper inside the algae to facilitate the identification of exposure Cu and to better understand how this element is handled by algal cells. In order to study how iron influences copper uptake and homeostasis, two types of algae were used in this work depending on their culture condition; (i) the acclimated algal cells (L-alga) that were grown in LM1 (Low metal) medium (Lavoie *et al.*, 2012b), that is less concentrated in Fe^{3+} ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} \sim 10^{-19} \text{ M}$) and (ii) the unacclimated algal cells (M-alga), cultivated in the basic MHSM1 medium (Modified High Salt Medium) whose Fe^{3+} content is 10x higher ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} \sim 10^{-18} \text{ M}$) than that in LM1 medium. All culture media were adjusted to pH 7 with concentrated HNO_3 (35%, Trace Metal Grade, Fisher Chemical) and stored at 4°C for later use. Table SI4.1 details the culture media chemical compositions.

Prior to the experiments, algal cells were maintained in a good physiological condition by renewing the axenic culture weekly and by inoculating a fresh culture with cells in mid-exponential growth. For L-alga cells, the acclimation consisted of a minimum of two transfers and eight days of culture in the targeted medium to achieve acclimation and to proceed with exposure experiments. All algal cells were cultured in polycarbonate or glass Erlenmeyer flasks (of 250 mL or 1 L, depending on the amount of algae needed) in a controlled environmental growth chamber (Convion, CMP4030, Controlled Environments Ltd., Canada) under continuous light ($80\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), using 110 ± 10 rpm of agitation at 20°C until they reached the mid-exponential growth phase.

Article 3

All growth media were filtered using filter membranes (0.2 μm polycarbonate membrane filters, Isopore, Merck Millipore) prior to sterilization using an autoclave (121°C, 15 min). To keep cultures axenic, precautions were taken at each step of the experiment. In addition to the use of a sterile laminar flow hood, periodic monitoring of the absence of other living microbes (e.g. bacteria) was carried out on agar with a 48-72 h incubation time at 37°C. To avoid metal cross contamination, all materials used were acid washed (for 24 h in 15%, v/v, HNO_3 , ACS grade, Fisher Chemical), rinsed seven times with Milli-Q water (resistivity $> 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$; $\text{TOC} < 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and sterilized in an autoclave.

2.2. Exposure and sampling conditions

All exposure solutions were left to equilibrate for 24 h prior to their use. Experiments were carried out using both types of algae (acclimated and not), in both the presence (+) and the absence (-) of Fe^{3+} , and using for all samples, 50 mL of exposure solutions in triplicate. At the end of the exposure period the cells were harvested on 2.0 μm polycarbonate filter membranes (Isopore TM, Merck Millipore). Two superimposed filters were used to control for adsorptive losses of Cu by using the bottom filter as background signal indicator. A volume of 10 mL of low metal rinse (LMR) solution supplemented with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 0.1 mM) were added on top of the filters and kept in contact with the cells for 10 min to remove adsorbed metals (Hassler *et al.*, 2004).

2.2.1. Copper uptake kinetics

Copper uptake kinetic experiments were performed in exposure media containing 25.7 nM of free $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ions. The exposure media (Table SI4.2) composition was simplified to improve the control of Cu^{2+} and Fe^{3+} speciation during exposure. Typically, exposure media contained only Cu and/or Fe as source of metal, were buffered with NTA and no phosphorus was added. Algae in culture were harvested during the exponential growth phase by filtration on a 2 μm polycarbonate filter membrane (Isopore, Merck Millipore, vacuum pressure $\leq 10 \text{ cm Hg}$), rinsed three times with LMR medium (Table SI4.2) and suspended again in 20 mL of rinse LMR solution. Cell population density was then determined using an electronic particle counter (Multisizer TM 3 Coulter Counter®; Beckman) and the quantity of algal cells needed to reach 40 000 $\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the exposure

Article 3

media was calculated. Immediately after, cells were introduced in the exposure media, Cu uptake was determined for exposure times of 0, 5, 20, 40, and 60 min. For each time point, metal uptake was stopped, as described above (section 2.2), by rinsing the cells with 10 mL of LMR containing 0.1 mM EDTA for 10 min. For the experiment performed to quantify Cu^{2+} internalization kinetics, algae were harvested as above and exposed for 60 min to different free ion concentrations of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (Table SI4.3). At the end of the exposure time, metal uptake was stopped as described above.

Following the 10 min EDTA contact period, filters were then rinsed three times with 10 mL of LMR solution to remove any residual trace metal present on the filters so that only metals accumulated inside the cells could be determined. The upper filter, containing all the collected algae, and the lower one were recovered separately in 50 mL polypropylene tubes. All samples were then digested by adding 5 mL of HNO_3 (65%, Trace Metal™ Grade, Fisher Chemical) and 1 mL of H_2O_2 (30-32%, Optima™ Grade, Fisher Chemical) on the filters and by heating them at 95°C for 4 h. At the end of digestion process, samples were diluted (with milli-Q water) to 50 mL (10% v/v HNO_3) prior to trace metal analysis.

2.2.2. For the transcriptomic experiments

For gene expression experiments (performed in parallel to the bioaccumulation experiments), the green alga *C. reinhardtii* was exposed for 60 min to 25.7 nM of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (free concentration, Table SI4.2). As above each type of algae were exposed to ^{65}Cu in triplicate, for 60 min, and using 50 mL exposure media in the presence (+) and in the absence (-) of Fe^{3+} . At the end of the exposure time, Cu uptake was stopped by adding EDTA (final concentration 0.1 mM) for 10 min and algae were collected by centrifuging the exposure solutions (10 min, 4500 rpm). Pellets were transferred to an Eppendorf tube and were diluted in 600 μL of RNA later buffer (to avoid RNA degradation) and stored at -80 °C until required for mRNA extraction.

2.3. Metal quantification in algae and media

Total, dissolved, and cellular metal (Fe , ^{63}Cu and ^{65}Cu) concentrations were determined following mineralization by inductively coupled plasma mass spectrometry

Article 3

(ICP-MS; XSeries 2, Thermo Scientific) and atomic emission spectrometry (ICP-AES, Varian Vista AX). Copper content of the algae was corrected by accounting for the passive adsorptive losses of Cu (subtraction of the Cu found on the lower filter). Mass balances were performed by dividing the initial Cu concentration (measured in triplicate) by the sum of the algal filtrate and algal digest. Each experimental point was performed in triplicate and the quality assurance and control was similar as in the work of Kochoni & Fortin (2019). Briefly, for all culture and exposure media prepared, each source of the copper stable isotopes (^{63}Cu and ^{65}Cu) used were 99% pure (Trace Sciences International, Canada). Regarding ICP analysis, Fisher certified reference standards were used, and the ICP measurements repeatability were $\geq 97\%$. The calibration curves, used to quantify metals of both ICP instruments, were prepared using single element standards (SCP Science). As for the quality control, multi-elemental certified standards (900-Q30-100, SCP Science) and a sample from a proficiency testing study for trace elements in water (#TE105-05, Environment and Climate change Canada) were used and the recovery levels of each control material were $99.6 \pm 4.6\%$ and $110.5 \pm 5.1\%$, respectively. The average recovery for copper mass balances after the exposure was $85.2 \pm 0.1\%$. With regards to the acid digestions, the quality control was performed using IAEA-413 algae material (International Atomic Energy Agency) and the average recovery reached for Cu was $96.8 \pm 0.1\%$ (Table SI4.4). Cell densities, sizes, and surface distributions were determined using particle counters (Multisizer TM 3 Coulter Counter®; Beckman).

2.4. Gene expression

2.4.1. Extraction and Reverse Transcription of RNA

RNA extraction and reverse transcription procedures were adapted based on the protocol of Kim Tiam *et al.* (2012). In total, thirty-one genes were studied. Table 4.1 provides a list of the studied genes and the cellular functions in which they would be involved, respectively.

Article 3

Table 4.1. List and functions of genes examined.

Category	Genes
Oxidative stress	<i>cat, sodMn, sodFe, gst, gpx</i>
Mitochondrial metabolism	<i>cox1, nad5, 12S</i>
Photosystem	<i>d1, psaA</i>
Detoxification	<i>pcs1, mdr1</i>
Copper transporter systems	<i>ctr11, ctr2, ctr3, copt, mco</i>
NRAMP transporters	<i>nramp1, nramp2</i>
HMA transporters	<i>ctp1, ctp2, ctp3</i>
Iron transporter systems	<i>fre1, fox1, ftr1, fea1, fea2, fer1, fer2, irt1, irt2</i>

Abbreviations: *cat*: Catalase; *sodMn*: Mn superoxide dismutase; *sodFe*: Fe superoxide dismutase; *gst*: Glutathione S-transferase; *gpx*: glutathione peroxidase; *cox1*: cytochrome C oxidase subunit I; *nad5*: NADH dehydrogenase subunit 5; *12s*: mitochondrial ribosomal RNA 12S; *d1*: D1 protein; *psaA*: PsaA protein; *pcs*: Phytochelatin synthase; *mdr1*: Multidrug-resistance P-glycoprotein; *ctr/copt*: Copper transporters; *nramp1/2*: Natural resistance-associated macrophage proteins subunit 1 and 2; *ctp*: Copper-transporting P-type ATPases; *fre1*: ferric reductase subunit 1; *fox1*: ferroxidase subunit 1; *mco*: multi-copper oxidase; *ftr1*: Fe transporter subunit 1; *fea1/2*: Fe-assimilation protein subunit 1 and 2; *isip2a*: Iron starvation inducible protein subunit 2a; *fer1/2*: Ferritin subunit 1 and 2; *irt*: Involved in Fe assimilation.

2.4.2. Quantitative real-time PCR

Based on the molecular characterization of the target genes, specific q-RT-PCR primer pairs were determined for each gene using Primer3Plus. The detailed primers for each gene are provided in Table SI4.5. The real-time PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche LightCycler 480) following the manufacturer's instructions. Briefly, the pre-incubation lasted 3 min at 95 °C, then the amplification consisted of 45 cycles with 1 cycle at 95 °C for 5 sec and 60 °C for 10 sec. The melting curve continued at 95 °C for 5 sec and at 65 °C for 1 min. Finally, the cooling step was performed at 40 °C for 30 sec. Melting curves of every reaction were analyzed to assess reaction specificity. The data were normalized to the mean of the Ct values for three reference genes, β -act, *elf1a* and *rpl13* and analyzed using the $2^{-\Delta Ct}$ method described by Livak & Schmittgen (2001) (Table SI4.6). The mean values of the level of expression of the genes studied were finally used to calculate the induction (>2) or repression (<0.5) factors (indicating at least a decrease or increase by a factor of 2) (Moisset *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2019) of the genes according to the treatments received by the algae (Table SI4.7). Results are shown as fold changes of exposed to control group.

2.5. Data treatment and analysis

Unless otherwise indicated, all means are expressed with standard deviation ($\pm$ SD) and the experiments were carried out in triplicate ($n=3$). The effects of iron on copper uptake on the acclimated and non-acclimated algae were tested by a one-way ANOVA analysis using JMP Pro 13.0.0 (SAS Institute, Riverside, CA, U.S.A.) followed by a t-test to determine if significant differences among means were observed ($p<0.05$). A nonlinear regression based on the Michaelis-Menten model were applied to the internalization fluxes of Cu^{2+} to determine J_{max} (saturation flux) and K_m (stability constant) parameters which describe the interactions of Cu^{2+} with the biotic ligands (membrane transporters) as described by Slaveykova & Wilkinson (2005).

For gene expression, a two-way ANOVA test was used to evaluate simultaneously the effect of the iron content in both culture and exposure media on the expression of genes involved in copper metabolism (Table SI4.8). These statistical analyses were performed with R software (version 3.5.0) using the packages tidyverse and vegan. The normality and homogeneity were verified prior to ANOVA analysis by the Shapiro-Wilk ($p<0.01$) and the Levene ($p<0.05$) test respectively. If the ANOVA results were significant, a Tukey HSD test was computed to perform multiple pairwise-comparison between the means of groups. If data were not normal, then the non-parametric Kruskal-Wallis test ($p<0.05$) was performed followed by the Wilcoxon test for performing the multiple pairwise-comparison between groups.

All speciation data, free element concentrations, and activities in the media were determined by theoretical calculations using MINEQL 5.0. Graphs, curves and regression models were realized by using mainly Sigma Plot software (version 12.5). Error propagation calculations were performed each time measured values were pooled.

3. Results and discussion

To design the culture and exposure media used in this work, the concentrations of the two metals of interest (Cu and Fe) were set by taking into account their typical environmental levels and to remain coherent with the values used in our previous work (Kochoni & Fortin, 2019). Indeed, iron concentration is often high in freshwater, but its

expected free ion concentration is much lower and varies between 10^{-14} and 10^{-20} M depending on pH (Lofts *et al.*, 2008). As for Cu, its concentration is also relatively high in natural waters and its corresponding free ions can vary from 10^{-12} to 10^{-8} (Mueller *et al.*, 2012). Concentrations of Fe^{3+} and Cu^{2+} in our different study media were in these ranges. Finally, in our experimental conditions, the concentrations of other essential trace elements such as Co, Mn and Zn in our study media were shown not to have effect on Cu^{2+} uptake and toxicity to *C. reinhardtii* (Kochoni & Fortin, 2019).

3.1. Iron effect on copper uptake rate by *C. reinhardtii*

Short-term (60 min) Cu uptake experiments were performed to characterize the transporter system(s) involved in “Cu-biotic ligand” interactions. This allowed for the probing of initial cellular responses with different iron nutritional status and minimal interference by biological feedback mechanisms that could modulate these rates. The accumulation of the stable isotope ^{65}Cu ion ($^{65}\text{Cu}^{2+}$) in the acclimated algal cells (L-algae) increased steadily with time in both Fe-limited (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} \ll 10^{-19}$ M) and Fe-replete (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} \approx 10^{-18}$ M) exposure media (Figure 4.1 and Table SI4.9). This trend is observed with *C. reinhardtii* cells, when exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 27.5$ nM) in both exposure media. Internalization fluxes were determined from the slopes of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake as a function of time and were 1.17 ± 0.34 and 1.15 ± 0.14 $\text{amol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in -LFe and +LFe media, respectively. There is no significant difference in $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake rates, whether the ^{65}Cu exposure medium was Fe^{3+} -limited or not ($p > 0.05$) (see Figure 1). In addition, the use of the stable isotope ^{63}Cu in the growth media prior to exposure to ^{65}Cu allowed us to track Cu export. Since the base level of ^{63}Cu (already present in the algal cells) remained constant over the course of the exposure to ^{65}Cu (Figure SI4.1), this suggests that no significant Cu efflux occurred over the 1-h exposure time frame.

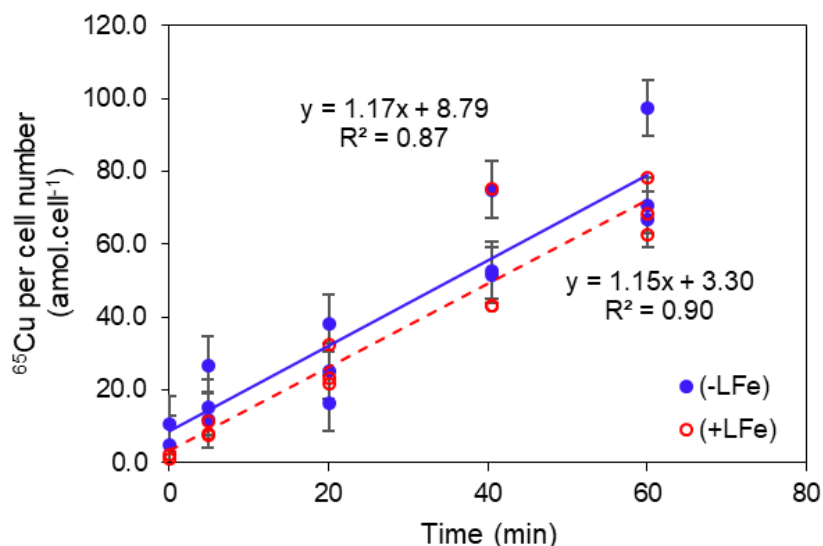


Figure 4.1. Copper uptake kinetics by *C. reinhardtii* previously grown in low iron conditions (L-algae) and exposed to ^{65}Cu (27.5 nM) in Fe^{3+} -replete (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18} \text{ M}$) and Fe^{3+} -depleted media (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$). Each point is the average of 3 replicates per exposure time from two independent experiments. Error bars represent standard deviations ($n = 3$).

Short-term $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake experiments performed with the non-acclimatized algae (M-alga) showed significant accumulation of $^{65}\text{Cu}^{2+}$, whether in -LFe or +LFe exposure media. But it is only after 60 min of exposure that $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake by M-alga became significantly different from the base level (background noise) (Figure SI4.2, A and B). This could be due to few Cu transporters under these experimental conditions for sufficient Cu accumulation to be significantly detectable in the first 60 min, suggesting that the up- and down-regulation of Cu transport is likely taking longer than 60 min to come into play. This assertion regarding the low number of Cu transporters is consistent with the negative feedback regulation mechanism described in the literature (Knauer *et al.*, 1997a; Lavoie *et al.*, 2016a; Sunda & Huntsman, 1998a). In fact, the Cu^{2+} uptake rate is known to be under an inductive and a negative feedback regulation by cellular Cu nutritional state (Burkhead *et al.*, 2009; Merchant *et al.*, 2006) i.e. in the case of Cu-sufficient cells, Cu^{2+} uptake rates will be reduced to a strict minimum, no matter the content of exposure media of Cu^{2+} , mainly in response to the negative feedback control system lowering the synthesis of membrane transporters (Sunda, 2012b; Sunda & Huntsman, 1995). The accumulation of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ increased linearly over a 300 min (5-h) exposure time frame. As previously observed in the case of L-alga, there is no significant difference in the $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake rates for the M-

Article 3

alga, whether the exposure medium is Fe^{3+} -limited or not ($p > 0.05$) (Figure SI4.2, C). According to the slopes of the linear uptake curves, the $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake rates in -LFe and +LFe media were 0.23 ± 0.05 and $0.28 \pm 0.02 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. In addition, the level of $^{63}\text{Cu}^{2+}$ in the M-alga remained unchanged over time (Figure SI4.2, A and B), as previously noticed in the case of L-alga, suggesting that Cu^{2+} export is negligible in our experimental conditions. Furthermore, it should be noted that the observed linearity of Cu^{2+} accumulation (Cu_{acc}^{2+}) as a function of time is also an indication that the metal was not significantly excreted by algae during the duration of the exposures (Crémazy *et al.*, 2013a). Our results suggest the absence of a substantial Cu^{2+} export process in *C. reinhardtii*, no matter the level of Fe in the medium. We can therefore deduce, by using the means of the Cu^{2+} uptake rates obtained from L-algae ($1.159 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) and M-algae ($0.246 \text{ amol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), that the copper uptake rate by L-algae is 4.7-fold greater than those of M-algae (Figure 4.1 and Figure SI4.2).

An increase in the uptake rate of an element (Fe, Cu, Zn, *etc.*) when it is present at a low concentration is well documented in eukaryote cells (Annett *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2013; Merchant *et al.*, 2006). However, low concentrations of one element (e.g. Fe^{3+}) in the medium or organism inducing an increased accumulation of another element (e.g. Cu^{2+}) has rarely been observed (Chen *et al.*, 2004; Lavoie *et al.*, 2012a; Malasarn *et al.*, 2013) and suggests a link with their homeostasis. The fact that the Fe-limited algae were able to accumulate more Cu^{2+} than those non-Fe-limited strongly supports the idea of a common metabolic pathway in Cu and Fe assimilation in *C. reinhardtii* (Herbik *et al.*, 2002; La Fontaine *et al.*, 2002b; Maldonado *et al.*, 2006). Therefore, we hypothesize that the activity and functioning of Cu transporters are strongly modulated by iron content in the growth medium.

3.2. Copper uptake kinetic parameters under iron-limited and replete conditions in *C. reinhardtii*

A series of short-term (60 min) copper uptake experiments were carried out with cells either acclimated to low or high metal concentrations in the growth medium (L-alga and M-alga). These were exposed to a range of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ concentrations (as described in section 2.2.1) to characterize the uptake parameters of membrane transporter(s) involved in the surface binding of copper and its subsequent transmembrane transport. Following these

uptake experiments, the internalization fluxes of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ ions were calculated and plotted as a function of $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}}$ from the exposure medium.

The internalization flux (J_{int}) data were fitted to a Michaelis-Menten model by nonlinear regression. In the case of L-algae, good fits were obtained with coefficients of determination of 0.90 and 0.88 from the exposure media -LFe and + LFe, respectively (Figure 4.2 and Table SI4.10). The stability constants (K_m) and the saturation fluxes (J_{max}) obtained are presented in Table 4.2. There is no significant difference between the $^{65}\text{Cu}^{2+}$ fluxes whether or not the algae were exposed to Cu^{2+} in a medium limited in Fe^{3+} ($p > 0.05$). As for the internalization fluxes of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ obtained with non-acclimated algae (M-algae), they remained generally constant over the whole range of exposure concentrations to $^{65}\text{Cu}^{2+}$, and at least 10 times lower than the maximum flux (J_{max}) reached with the acclimated algae (L-algae). This suggests that, for M-algae, Cu uptake was too low to be quantified with respect to the background levels of Cu present in the cells. Here again, the internalization fluxes of $^{65}\text{Cu}^{2+}$ obtained from the two exposure media were not significantly different ($p > 0.05$; Figure SI4.3). The results obtained with L-algae show that (i) in both exposure media ($\pm\text{Fe}$), copper was likely taken up by the same type of membrane transporters; and (ii) the acclimated algae (L-algae) were predisposed to accumulate more Cu^{2+} ions than the non-acclimated one (M-algae).

Table 4.2. Stability constants ($K_{\text{Cu-Rcell}}$) for the binding of Cu to the acclimated *C. reinhardtii* (L-alga) transport sites and maximum fluxes (J_{max}).

Exposure Media	$K_{\text{Cu-Rcell}}$ (M^{-1})	J_{max} ($\text{amol} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)
-LFe	$10^{11.9} [10^{11.65} - 10^{12.02}]$	$5.02 \pm 0.20\text{E-}02$
+LFe	$10^{11.6} [10^{11.40} - 10^{11.79}]$	$4.98 \pm 0.02\text{E-}02$

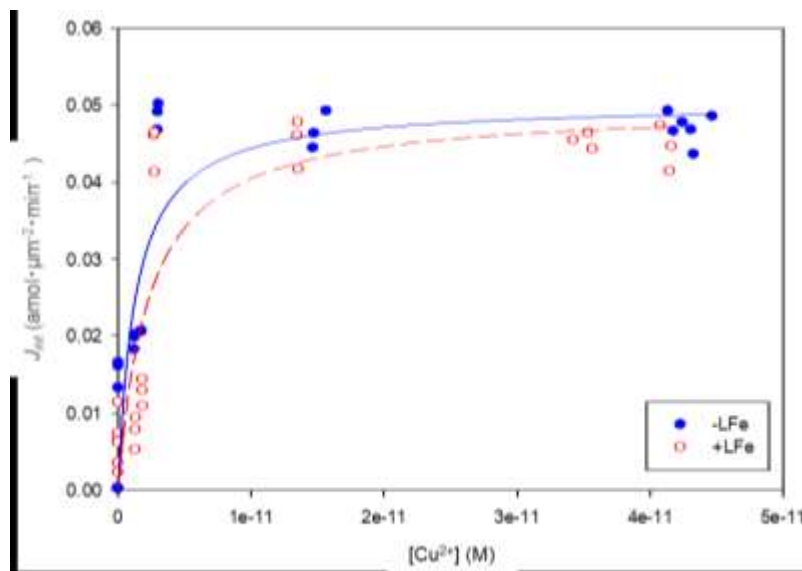


Figure 4.2. Internalization fluxes of free $^{65}\text{Cu}^{2+}$ in *C. reinhardtii* acclimated in Fe^{3+} -limited media (L-algae; $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$) and exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (see the detailed concentrations in Table SI4.3) in +LFe (Fe-replete media, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18} \text{ M}$) and -LFe (Fe-depleted media, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$) for 60 min.

According to our data, the stability constants for the interaction of Cu^{2+} with membrane transporters of the L-algae ($10^{11.9}$ and $10^{11.6} \text{ M}^{-1}$) are five to six orders of magnitude greater than the values reported in the literature for *C. reinhardtii* at namely $10^{5.8}$ (Chen *et al.*, 2010) and $10^{6.7}$ (Hill *et al.*, 1996). This difference in affinity shows that transporters mobilized by *C. reinhardtii* under our experimental conditions would be of different nature or feature from those reported by Chen *et al.* (2010) and Hill *et al.* (1996). Such change in the affinity of an element of interest (i.e. Cu) to ligands following an acclimation to another element (i.e. Fe) limited-medium is not well known in freshwater green algae. However, a similar trend was reported in some marine diatoms that remained for a long time in an Fe limited medium, resulting in a high Cu demand and suggesting a change in its uptake system (Annett *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2006; Schoffman *et al.*, 2016). It has been reported in the literature documented cases of element-ligands affinity change; but usually occurring after a pre-incubation of cells into media limited in the same element (Hassler & Wilkinson, 2003; Lavoie *et al.*, 2016a; Lavoie *et al.*, 2012a; Sunda, 2012b). The mechanism responsible for this change in affinity is poorly understood. It could be (i) an induction, at low concentrations of metal ions, of a high affinity absorption system, undetectable in cells acclimated to high concentrations of ions of the element of interest; or (ii) an affinity change of the same transport system resulting, for example, from

isoforms having different affinities for the elements or from allosteric changes in molecular configuration at the binding sites; or simply (iii) localized changes in charges on the membrane surface (Lavoie *et al.*, 2016a; Sunda & Huntsman, 1992).

There are many feedback mechanisms that can allow cells to regulate the uptake of copper. However, it remains unclear how iron can modulate the uptake of copper. It seems like Cu^{2+} could functionally replace Fe^{3+} as suggested in previous publications (Díaz-Quintana *et al.*, 2003; Marchand *et al.*, 2018; Wood, 1978). Our results on this point seem to support the existence of a very strong link in copper and iron homeostasis in *C. reinhardtii*. Several studies have indeed shown that in *C. reinhardtii*, like other algae, copper-dependent plastocyanin can be substituted by iron-dependent cytochrome c6 and vice versa depending on Cu and Fe medium nutritional status (Hanikenne *et al.*, 2009; Kropat *et al.*, 2015; Malasarn *et al.*, 2013; Merchant & Bogorad, 1987). Further investigation, for instance at the molecular level, is therefore needed to get insight on the mechanisms involved.

3.3. Gene expression profiles in response to the iron nutritive status of the medium

Transcriptomic analyses were carried out to get insight on the metabolic pathway potentially involved in copper homeostasis in algae. Genes known to play an important role in copper and iron metabolism, (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Hanikenne *et al.*, 2009; Merchant *et al.*, 2006), were thus targeted. Results summarized in Figure 4.3 show that the main significant changes in the gene expressions occurred in cells grown in the presence of low metals (L-algae), indicating that acclimation of algal cells to Fe^{3+} -limited culture media is the main factor that could best explain the differences in gene expression. Acclimation effects were indeed significantly different in at least 20 genes (~65%) versus 11 genes (~36%) for which only the exposure conditions effect significantly differentiate gene expression. As for the heatmap, it clearly distinguishes between L-algae and M-algae (Figure 4.3), also based also on the primacy of the acclimation effect on the genes expression level. In addition, a global analysis of the heatmap shows that the expression level of at least 50% of the genes studied could also discriminate between L-algae (in which these genes have been repressed) and M-algae (in which they have been overexpressed). These include genes involved in the handling of oxidative stress (*cat*, *sodMn* and *sodFe*), mitochondrial metabolism (*nad5*, *cox1*, 12S), and photosystems (*psaA*, *d1*), part of iron-

Article 3

transport system (*fer1*, *irt1*, *fea1*, *fea2*), and part of Cu^{2+} transporter system genes (*ctr3*, *ctp1* and *ctp3*). According to the gene induction and repression factors (Table 4.3 and SI4.7), there are more repressed genes (22/31, i.e. ~71%) than overexpressed genes (11 out of 31, i.e. ~36%). The gene expression of *fea1*, *fer2* and *fre1* (3 of the 9 iron transporter genes), *sodMn* and *sodFe* (2 of the 4 oxidative stress gene markers), and *ctp3* (one of the 3 HMA transporter genes, a P-Type ATPase Cu transporters subfamily) were significantly different in all of the experimental conditions compared to the control cells (M-algae). The iron transporter gene expressions were equivocal. The *fea1* gene was inhibited while the *fer2* gene was up-regulated regardless of experimental conditions. The *fre1* gene expression was inhibited in the -LFe and +LFe conditions but up-regulated in the +MFe condition.

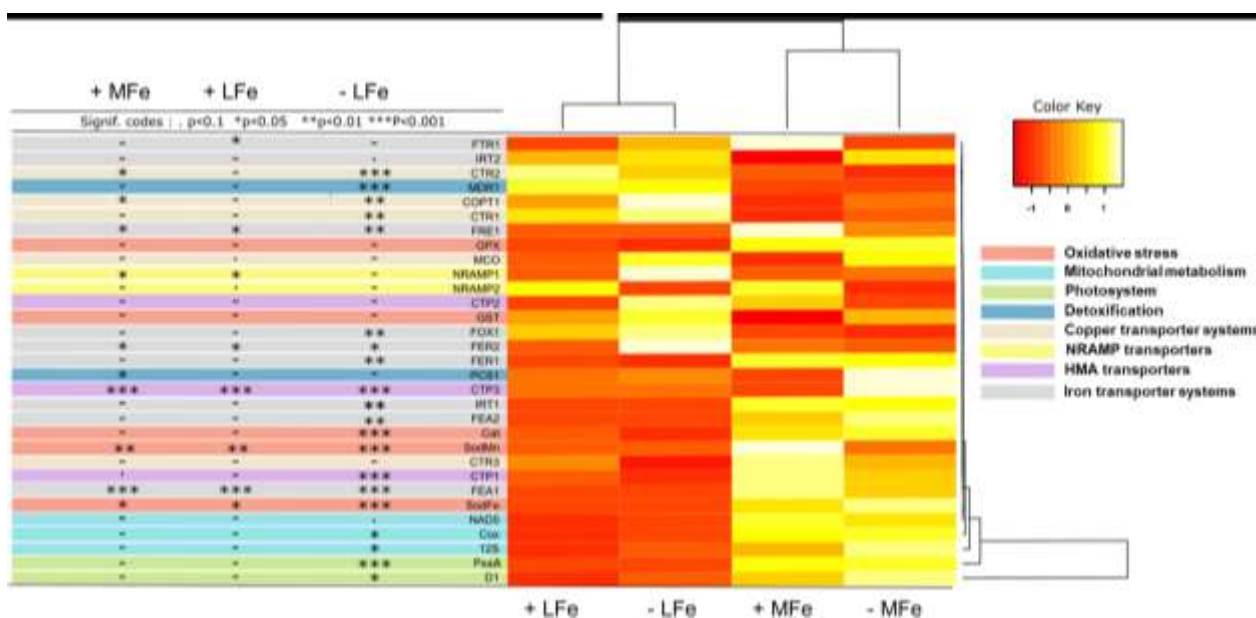


Figure 4.3. Significant differences in gene expression depending on the experimental conditions. L = Acclimated algae; M = Non-acclimated algae; Fe = iron element; ± = addition/absence of Fe^{3+} in the exposure media. Red color means less expression and yellow or white color means high expression levels. The level of significance corresponds to: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.

Article 3

Table 4.3. Gene induction and repression factors in *C. reinhardtii* after 60 min of exposure time to $[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 25.7 \text{ nM}$ in Fe-replete media (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18} \text{ M}$) and Fe-depleted media (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$). L = Acclimated algae; M = Non-acclimated algae; Fe = iron element; $\pm$ = addition/absence of Fe^{3+} in the exposure media. Significant induction (>2 , green) and repression (<0.5 , orange) factors are indicated by values, compared to the respective controls. “/” indicates no changes with respect to control levels. The statistical significance coding is: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘.’ 1.

Ratio Genes	Functions	-LFe/MFe	+LFe/MFe	+MFe/MFe
<i>cat</i>	Oxidative stress	0.27 ***	0.41	/
<i>sodMn</i>		/ ***	0.43 **	5.24 **
<i>sodFe</i>		0.12 ***	0.12 *	/ *
<i>gst</i>		/	/	0.39
<i>gpx</i>		0.31	0.39	/
<i>cox1</i>	Mitochondrial metabolism	/ *	0.44	/
<i>nad5</i>		/ •	0.46	/
<i>12S</i>		0.37 *	0.29	/
<i>d1</i>		/ *	0.48	/
<i>psaA</i>	Photosystem	0.25 ***	0.23	/
<i>pcs1</i>	Detoxification	0.45	0.38	0.23 *
<i>mdr1</i>		17.7 ***	19.89	/
<i>ctr1</i>		2.85 **	2.30	/
<i>ctr2</i>	Copper transporter systems	6.13 ***	10.1	2.12 *
<i>ctr3</i>		0.46	/	/
<i>copt1</i>		3.24 **	/	0.30 *
<i>mco</i>	NRAMP	/	0.49	0.31
<i>nramp1</i>		8.01	0.41 *	0.37 *
<i>nramp2</i>	Transporters	/	2.36	2.52
<i>ctp1</i>	HMA Transporters	/ ***	/	/
<i>ctp2</i>		/	/	/
<i>ctp3</i>		0.16 ***	0.14 ***	0.01 ***
<i>fre1</i>	Iron transporter systems	/ **	0.46 *	3.16 *
<i>fox1</i>		7.42 **	5.07	/
<i>ftr1</i>		187	/ *	419
<i>fea1</i>		0.16 ***	0.16 ***	/ ***
<i>fea2</i>		0.01 **	0.01	/
<i>fer1</i>		0.09 **	0.15	/
<i>fer2</i>		3.98 *	/ *	/ *
<i>irt1</i>		0.06 **	0.03	/
<i>irt2</i>		/ •	/	0.14

Article 3

As pointed out above, Fe addition to the exposure medium would have induced variation in the level expression for only 11 genes (~ 36%). Overall, Fe addition mainly results in repressed genes in L-algae, whereas the pattern of gene expression is not very clear in the case of M-algae.

Figure 4.4 shows the gene expression correlation heatmap performed using the Pearson method (see Table SI4.11). This approach allows for the investigation of co-expression patterns in gene expression data and the highlighting of genes displaying similarity in their expression profiles which would suggest a co-regulation. Then, by analysing the dendrogram, genes can be classified in 9 groups depending on their expression in the different conditions (Table 4.4). The correlation heatmap revealed that the upregulation of the gene groups 1, 2, 3 and 4 were strongly correlated, as were the groups 7, 8 and 9. In contrast, the gene repression of groups 7, 8 and 9 were correlated with the upregulation of gene expression in groups 1, 2, 3 and 4.

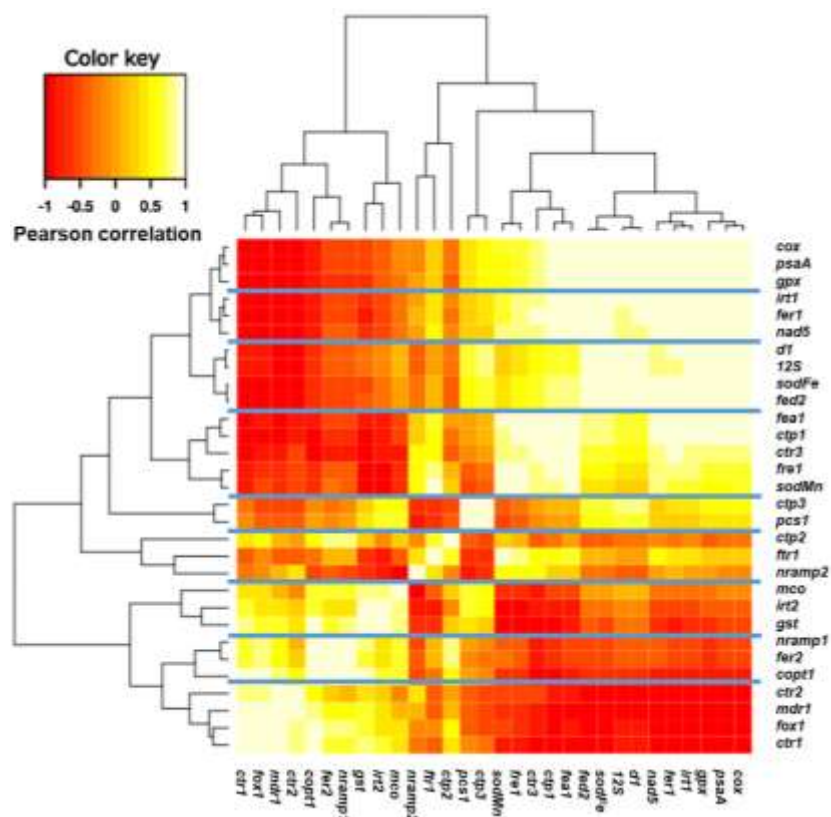


Figure 4.4. Heatmap of gene expression correlation in *C. reinhardtii*. The heatmap was constructed using the Pearson correlation coefficient of genes expression. Positive correlations are marked in yellow and negative ones in red. The blue lines delimit groupings of co-regulated genes. Clusters defined by hierarchical clustering are indicated at top and left.

Article 3

Table 4.4. Groups of genes for which expressions vary together. All the 9 groups of genes were formed from the dendrogram which appears in the heatmap (Figure 4) realized based on the correlation factors of the genes (Table SI4.11).

	Groups								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Genes	<i>cox1</i> <i>psaA</i> <i>gpx</i>	<i>itr1</i> <i>fer1</i> <i>nad5</i>	<i>d1</i> <i>12S</i> <i>sodFe</i> <i>fea2</i>	<i>feal</i> <i>ctp1</i> <i>ctr3</i> <i>fre1</i> <i>sodMn</i>	<i>ctp3</i> <i>pcs1</i>	<i>ctp2</i> <i>ftr1</i> <i>nramp2</i>	<i>mco</i> <i>itr2</i> <i>gst</i>	<i>nramp1</i> <i>fre2</i> <i>copt1</i>	<i>ctr2</i> <i>mdr1</i> <i>fox1</i> <i>ctr1</i>

As pointed out above, acclimation of algae is the factor which best explains differences observed in gene expression. This is a regulating mechanism describing the molecular changes that occur in an organism in response to variations in environmental conditions over the short to medium term (Raven & Geider, 2003). It is thus understandable that, abilities acquired by algal cells during this time frame have governed the expression of the genes studied. This points to the resilience of algae in facing inevitable environmental changes or fluctuations (Bird, 2015; La Fontaine *et al.*, 2002a). Therefore, understanding our results requires studying how the acclimation of algae to Fe-limited environments is conducted. Acclimation is a well-documented process that requires an adapted reaction from the organism to be able to cope with variations in environmental conditions (La Fontaine *et al.*, 2002a; Niyogi & Wood, 2003). Iron assimilation by *C. reinhardtii* is mediated by two main mechanisms specific to Fe^{2+} and Fe^{3+} , respectively (Eckhardt & Buckhout, 1998; Weger, 1999). Ferric iron is taken up by a system of high affinity membrane transporters, the activity of which is subjected to negative feedback in response to the nutrient status of Fe^{3+} in the medium (Blaby-Haas & Merchant, 2012; La Fontaine *et al.*, 2002a; La Fontaine *et al.*, 2002b). This pathway is therefore supposed to become more active when the Fe^{3+} concentration in the medium is low (Eckhardt & Buckhout, 1998; Maldonado *et al.*, 2006; Merchant *et al.*, 2006). We therefore expected to see, at the molecular level, gene expression profiles clearly indicating an activation of the high affinity Fe^{3+} assimilation pathway through the expression or overexpression of genes encoding FRE, FOX1, FEA1, FEA2, FTR1 and possibly FER (Hanikenne *et al.*, 2009; La

Article 3

Fontaine *et al.*, 2002a; La Fontaine *et al.*, 2002b; Merchant *et al.*, 2006). According to our data, the gene expression profile in acclimated algae shows a pattern mainly dominated by significantly repressed genes (Table 4.3), four of which (*fea1*, *fea2*, *fer1* and *irt1*) play a role in iron assimilation in *C. reinhardtii* (Hanikenne *et al.*, 2009; Merchant *et al.*, 2006). However, the overexpression of other genes (*fox1*, *ftr1* and *fer2*) also involved in the same iron assimilation pathway (Allen *et al.*, 2007a; Hanikenne *et al.*, 2009; Merchant *et al.*, 2006) leads us to bring some nuance to our initial conclusions. Gene expression dynamics is indeed a very finely regulated compromise between expression, repression and overexpression (Ritter *et al.*, 2014), the profile of which only reflects an instant response (La Fontaine *et al.*, 2002a; Raven & Geider, 2003). In addition, gene transcription does not always imply its effective translation into protein, and therefore not in a physiological response; the cell having possibly solicit other physiological approaches to address the issue (Halbeisen *et al.*, 2008; Mohler & Ibba, 2017). Our results would therefore reflect an image of a transient physiological effect, probably in favor of Cu^{2+} assimilation, given that algae are exposed to copper. This hypothesis is consistent with our data regarding the expression of genes encoding proteins involved in Cu^{2+} assimilation pathway, that were mostly overexpressed genes (see Table 4.3; *ctr1*, *ctr2*, *copt1*). This eventual physiological transition is most likely in favor of the assimilation or homeostasis of Cu^{2+} via that of Fe^{3+} . This sheds some light on the probable link between iron and copper through their assimilation pathway. Several studies indeed underline metabolic interactions of the two pathways in several species, in particular in *C. reinhardtii* (Annett *et al.*, 2008; La Fontaine *et al.*, 2002b; Maldonado *et al.*, 2006). It is well known that in Cu and Fe assimilation pathways there is a redox step that could be catalyzed by the same enzymes or enzyme systems (Eckhardt & Buckhout, 1998; La Fontaine *et al.*, 2002b), and that the multi-copper ferroxidase (FOX1) and its associated permease (FTR1) are involved in this uptake system (Castruita *et al.*, 2011; Herbig *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2009). The classification of genes studied into 9 different groups (Table 4.4) support our previous observations. Group 9 contains genes coding *ctr1*, *ctr2*, *fox1* and *mdr1*, the first three of which are known to play a very active role in Cu^{2+} assimilation or homeostasis (Blaby-Haas & Merchant, 2017; Merchant *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2009). These correlated genes suggest they were co-regulated, thus supporting our previous conclusions (section 3.2) on the significant increase

Article 3

of Cu^{2+} uptake rate in Fe-limited algae vs Fe-replete ones. The mechanism that governs this whole process is still poorly understood. Nevertheless, the overexpression of the gene encoding the FOX1 and FTR1 enzymes, classified in group 9 and 6 respectively, strongly suggests that the redox step could likely be the most common step in copper and iron assimilation pathways. Knowing that Cu is a cofactor of ferroxidase (FOX1) (Terzulli & Kosman, 2010; Terzulli & Kosman, 2009) and that the overexpression of its gene (*fox1*) is an indicator of stress caused by Fe-limited conditions (Glaesener *et al.*, 2013; Terauchi *et al.*, 2010), the increase in Cu^{2+} uptake rate we noticed could be explained by the requirement in Cu^{2+} for FOX1 activity as mentioned by La Fontaine *et al.* (2002b) and Chen *et al.* (2008). This assertion is also supported by Terzulli & Kosman (2010) who have shown that high-affinity iron uptake is dependent on both the FOX1 and Cu status of the cell. Such a process, also well known in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and marine diatoms (*Thalassiosira spp*) would also be present in eukaryotic cells and transcriptionally induced in response to low iron (Chen *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2006; Rutherford & Bird, 2004). Accordingly, regulation of trace metal uptake by metal-responsive transcription factors is then an important aspect of their homeostasis (Bird, 2015; Rutherford & Bird, 2004). In *C. reinhardtii*, *corr1* (copper response regulator) is a well-known transcription factor that is required as a sensor of Cu homeostasis and is also possibly involved (if only indirectly) in Fe homeostasis (Eriksson *et al.*, 2004; Merchant, 2007; Merchant *et al.*, 2020).

The overexpression of the *mdr1* gene, also classified in group 9 and known to play a role in the cell detoxification systems, could be to prevent plausible Cu stress following the accumulation of Cu^{2+} . Copper stress is known to activate a set of genes coding for, among other things, detoxification systems (Knauer & Knauer, 2008; Ritter *et al.*, 2014). The fact that the other gene (*pcs1*) also involved in the detoxification function was repressed could also be considered as consistent with this Cu stress prevention, in particular if one considers that Cu^{2+} accumulation has not exceeded the regulation capacities of *mdr1*. The profile of oxidative stress genes also finds an explanation in the acclimation of algae to a low Fe concentration medium. Indeed, in *Chlamydomonas*, Fe-limited algal cells generally operate metabolic readjustments to avoid photo-redox damage that may result from FeS residues (Merchant *et al.*, 2006). These readjustments could lead to losses of

Article 3

SODFe activity that could be compensated by an overexpression of the *sodMn* genes, as is the case in marine diatoms and cyanobacteria (Allen *et al.*, 2007b; Hsieh *et al.*, 2013; Merchant *et al.*, 2006). However, with a simple expression of *sodMn*, our results are partially consistent with the profile described above, which nevertheless does not seem sufficient to rule out the idea of a repression of *sodFe* in favor of *sodMn*. The repression of most of the photosystem genes indeed pleads in favor of this readjustment. In fact, to cope with an Fe-limited environment, *C. reinhardtii* tends to reduce its functions to the most essential, such as reducing photosynthesis activity for the benefit of respiration (Blaby-Haas & Merchant, 2017; Kropat *et al.*, 2015). This well-regulated strategy aims to allocate all the available ways to the mobilization of Fe to ensure the transfer of electrons in the mitochondria and thus ensure this vital function that is respiration (Blaby-Haas & Merchant, 2017; Glaesener *et al.*, 2013; Kropat *et al.*, 2015).

Linking gene expressions by comparing the correlation of their transcription factors with ion transport characterization is a promising investigative approach and allowed us to formulate new hypotheses. Many significant correlations were observed, some of them were expected, but most remain to be understood and explained. Thus, they constitute a basis for future research. Our results showed that Cu^{2+} and Fe^{3+} could share the same transporter systems so that when cells acclimated to low iron conditions increase the number of Fe transporters, the latter are in turn used by Cu to be internalized in *C. reinhardtii*; making thus possible the protective effect of iron against copper toxicity, by inhibiting its uptake. But our results have also and above all pointed to a probable physiological link between Cu and Fe within their respective assimilation pathway in the freshwater green algae *C. reinhardtii*. The overexpression of the gene encoding the enzyme FOX1 strongly suggests that the redox step is most likely the common step in the uptake of Cu^{2+} and Fe^{3+} .

4. Implications for environment and BLM development

The BLM is a conceptual model that integrates metal speciation for the prediction of metal uptake and toxicity, particularly in aquatic systems (Paquin *et al.*, 2002). The BLM has gained in complexity and representativeness throughout its development, leading to its current version. (Adams *et al.*, 2020; Paquin *et al.*, 2002). Although important parameters such as pH, organic matter and major cations are now taken into account, several other factors still need to be incorporated into the BLM to better refine it given their impacts on metal bioavailability (Mebane *et al.*, 2020). In this work, we showed that at environmentally relevant concentrations, Fe and Cu do not compete for uptake site but rather that changes in iron growth conditions can modify physicochemical parameters of the copper membrane transporters. Given the importance of these transporters in copper uptake, taking into account factors that may affect them, should help improve copper toxicity predictions by the BLM. Similar to Lavoie *et al.* (2012a) and Mebane *et al.* (2020), our results therefore plead in favor of a BLM that integrates physiological factors such as the one revealed here.

Acknowledgments

Authors acknowledge gratefully S. Hepditch for language assistance as well as K. Racine, F. Liu, S. Prémont, J. Perreault, and M. Couturier for their technical assistance. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Grant (RGPIN-2014-05082) and the Canada Research Chair program (950-231107).

Article 3

Supporting information

Role of iron in gene expression and in the modulation of copper uptake in a freshwater alga: Insights on Cu and Fe assimilation pathways.

Auteurs : Emeric Kochoni^{1,2}, Caroline Doose^{1,2}, Patrice Gonzalez³, Claude Fortin^{1,2*}

¹ Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

² EcotoQ, 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

³ Université de Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

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

Article 3

Table SI4.1. Total and free molar concentrations of the culture media calculated by using MINEQL+ 5.0.

Media Compounds	MHSM1		LM1	
	Total	Free	Total	Free
BO ₃	3.01E-06	2.99E-06	3.01E-06	2.99E-06
Ca	6.80E-05	6.57E-05	3.28E-05	2.03E-05
Cl	5.98E-06	5.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
CO ₃	Atm	3.20E-08	Atm	3.95E-08
Co	1.09E-08	3.59E-09	7.60E-10	1.04E-11
⁶³ Cu	7.04E-08	1.49E-10	1.81E-10	1.04E-14
Fe	5.92E-07	2.25E-18	7.99E-07	1.07E-19
K	4.22E-03	4.21E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.12E-05	7.89E-05	8.12E-05	7.63E-05
Mn	2.10E-06	1.86E-06	6.62E-09	5.15E-09
MoO ₄	3.00E-08	3.00E-08	3.00E-08	2.95E-08
Na	1.02E-04	1.02E-04	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.32E-04	9.37E-04	9.32E-04
NO ₃	5.07E-03	5.06E-03	1.60E-02	1.59E-02
PO ₄	1.37E-04	4.06E-10	1.37E-04	5.27E-10
SO ₄	8.12E-05	7.80E-05	8.12E-05	7.52E-05
Zn	2.33E-07	9.56E-08	5.34E-10	1.04E-11
EDTA	8.06E-07	6.07E-18	8.06E-07	5.11E-16
MOPS	1.00E-02	4.18E-03	1.00E-02	4.31E-03

Table SI4.2. Total and free molar concentrations of exposure media calculated by using MINEQL+ 5.0.

Media Compounds	-LFe		+LFe		LMR	
	Total	Free	Total	Free	Total	Free
Ca	1.67E-04	1.62E-04	1.67E-04	1.62E-04	1.67E-04	1.62E-04
Cl	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06	5.00E-06	4.97E-06
Cu	9.98E-05	2.57E-08	9.98E-05	2.57E-08		
Fe			9.28E-09	4.39E-18		
K	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03	4.72E-03	4.68E-03
Mg	8.39E-05	8.35E-05	8.39E-05	8.35E-05	8.39E-05	8.35E-05
Na	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02	1.67E-02	1.66E-02
NH ₄	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04	9.37E-04
NO ₃	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02	1.60E-02	1.59E-02
SO ₄	8.12E-05	7.43E-05	8.12E-05	7.43E-05	8.12E-05	7.43E-05
NTA	1.00E-04		1.00E-04			
MOPS	1.00E-02	1.23E-04	1.00E-02	1.23E-04	1.00E-02	1.23E-04

Article 3

Table SI4.3. Average concentrations (total and free) of ^{65}Cu in the exposure media designed to obtain the uptake kinetic parameters of Cu^{2+} ions by *C. reinhardtii*. Free ion concentrations were calculated by using MINEQL+ 5.0. All concentrations are in molar (M).

-LFe		+LFe	
Total	Free	Total	Free
2.62E-08	1.15E-14	3.54E-08	1.62E-14
6.82E-08	3.00E-14	3.99E-08	1.82E-14
2.75E-06	1.25E-12	2.78E-06	1.31E-12
3.85E-06	1.77E-12	3.87E-06	1.84E-12
6.37E-06	3.01E-12	5.65E-06	2.75E-12
2.48E-05	1.50E-11	2.24E-05	1.35E-11
4.78E-05	4.30E-11	4.22E-05	3.51E-11
4.75E-05	4.25E-11	4.60E-05	4.13E-11

Table SI4.4. Percent recovery (%) of copper after acid digestion of IAEA-413 algae material.

Mesured concentrations ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Expected concentrations ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Percent recovery (%)
10.4	11.1	92.6
10.5	11.1	94.1
10.4	11.1	93.6
9.9	11.1	88.8
11.4	11.1	102.8
10.7	11.1	96.6
12.0	11.1	107.8
10.9	11.1	98.4
Average recovery		96.8 ± 0.1

Article 3

Table SI4.5. Accession number and specific primer pairs used for *C. reinhardtii*.

Genes	Accession number	Primer (5'-3')	Genes	Accession number	Primer (5'-3')
<i>cat</i>	AF016902	CCACGAGGGCTTCATGAACT ^a GTTCTCCTTGCGGATCACCA ^b	<i>mco</i>	XM_001699983	CCATGCTGCTTAACGTGCTG ^a TACGGACATCCCAAGAACGC ^b
<i>sodMn</i>	U24500	GACAAGTTCCCCGAGCTCAA ^a TTGGCCTTCATCTCGTCCAC ^b	<i>nramp1</i>	XM_001691650	GCTGACATCACTGACGCCTA ^a AAGCTGAGGAAACCCTCCAT ^b
<i>sodFe</i>	GQ413964	GCACACGGTTCTTTGACCAC ^a CCCACGACTGAACCCTACC ^b	<i>nramp2</i>	XM_001700998	ATACGCATGGTGACGGACAG ^a AGGATGGCGCTGTTGATGAA ^b
<i>gst</i>	XM_001690142	CCATCCCCAACACCAACTAC ^a TGTCAATGAGCCAGTTGAGG ^b	<i>ctp1</i>	XM_001699215	GGTGGTCGTTTCCAGTTCCT ^a CGGTATTGCATTGCTGGTG ^b
<i>gpx</i>	AY051144	AGACATGAACGTCCCCTCAC ^a ACACCTCGACCGAAACAAAG ^b	<i>ctp2</i>	XM_001702519	AAAGTAGGTTGCGGACAGGG ^a AGGCTAGAGCACACGGACTA ^b
<i>cox1</i>	U03843	CTTGAGTATGGGTGCCGTTT ^a TACCAGCCAAACCCAAGAAG ^b	<i>ctp3</i>	XM_001697624	ATGGTCATTGAGGACGAGGC ^a GCTGTGGATGTTGTGCAGAC ^b
<i>nad5</i>	U03843	TAACGGTGGTAACCAGCAC ^a AATAGCGGCCAAGTTCAAGA ^b	<i>fre1</i>	EF042874	TTTGGATCACCTGCATCCCC ^a CAGCACCACATCGAGAAGGT ^b
<i>12S</i>	U03843	GGAGGATCGGTCAAATGAGA ^a GCATCTCTATCGCTGCCAAT ^b	<i>fox1</i>	AF450137	CGACTCCATCCAGATCAGCC ^a GTGTCGGTGCACTTCTGGTA ^b
<i>dl</i>	FJ458214	ATCCTTATGCACCCATTCCA ^a TTCTTCTTCTTGGCCGAAAC ^b	<i>ftr1</i>	AF478411	TGGTGGGCATGTTCCCTGTAC ^a CGAGCAGTAGCCAAACATGC ^b
<i>psaA</i>	AB044419	TGGGGTACGGTTACAGCTTC ^a CGAGAATGCCCATACGAAGT ^b	<i>fea1</i>	XM_001693912	AGAAGGTGGGTAATGCCACG ^a CCGCCTTTGTGCATATGAGC ^b
<i>pcs1</i>	XM_001700969	GACCGGCTTCTTCAAACCTGA ^a ATGCCCTCCTCCTTCACAG ^b	<i>fea2</i>	XM_001693913	ACAACACCCTGACCAACCTG ^a GTAGCTCTGGCCAGAAAGG ^b
<i>mdr1</i>	XM_001697188	CGAAGGAGAAGCCGTACAAG ^a GCAGTAGAAAGACGCCTTGG ^b	<i>fer1</i>	XM_001694481	GCTGTGAAGAAGGTGTCCGA ^a CGCAGAATCACATGCTGAGC ^b
<i>ctr1</i>	XM_001693674	TGGAAACTACGGAGCCATC ^a TCCTCCTCTTCTCCTCCTC ^b	<i>fer2</i>	EU223296	TTGTGCCCTGTGACAGTTGT ^a TTTCCGTGGTGATGCCGTTA ^b
<i>ctr2</i>	XM_001702418	GTAGTGCGAGCAAGTGGTCA ^a GTTTGGTGGCACATGACAAG ^b	<i>irt1</i>	EU155062	CCAGGCATTTTTCCAGGCAC ^a CAAACACACGCACGGTTGAT ^b
<i>ctr3</i>	XM_001702598	GTGAAACAAACGCATCATGG ^a CCGCACAGTATCCACATCAC ^b	<i>irt2</i>	XM_001692994	TTTGGTGATCTTCTCCTCCCGC ^a CTGATGCCAGGAGGTACGAC ^b
<i>copt1</i>	DQ646487	TGGCCTACTGTCTCATGCTG ^a ATCCCCCTCATTTCTCCATC ^b			

a Upstream primer

b Forward primer

Article 3

Table SI4.6. Mean of expression levels ($2^{-\Delta Ct}$) of the genes studied compared to the reference genes.

Genes studied	-M	SD	+M	SD	-L	SD	+L	SD
<i>cat</i>	3.97E-02	3.51E-03	3.53E-02	3.51E-03	1.09E-02	2.99E-03	1.63E-02	9.10E-03
<i>sodMn</i>	4.02E-02	5.57E-02	2.10E-01	5.57E-02	2.29E-02	1.15E-02	1.73E-02	8.43E-03
<i>sodFe</i>	5.03E+00	7.46E-01	3.57E+00	7.46E-01	6.03E-01	1.88E-01	6.05E-01	8.19E-02
<i>gst</i>	7.49E-04	1.88E-04	2.95E-04	1.88E-04	1.02E-03	8.44E-04	7.12E-04	4.63E-04
<i>gpx</i>	2.62E-06	1.44E-06	2.39E-06	1.44E-06	8.05E-07	4.51E-07	1.03E-06	9.61E-07
<i>cox1</i>	8.58E+01	4.02E+01	8.24E+01	4.02E+01	4.28E+01	7.98E+00	3.81E+01	7.67E+00
<i>nad5</i>	6.75E+00	4.13E+00	7.54E+00	4.13E+00	3.74E+00	4.78E-01	3.09E+00	1.39E-01
<i>l2S</i>	3.07E+02	1.34E+02	2.08E+02	1.34E+02	1.14E+02	1.52E+01	8.76E+01	2.12E+01
<i>d1</i>	6.79E+03	3.09E+03	5.31E+03	3.09E+03	3.71E+03	4.89E+02	3.24E+03	9.17E+02
<i>psaA</i>	7.63E+02	1.95E+02	6.74E+02	1.95E+02	1.88E+02	3.05E+01	1.74E+02	1.87E+01
<i>pcs1</i>	3.72E-03	3.97E-04	8.37E-04	3.97E-04	1.67E-03	6.14E-04	1.43E-03	6.03E-04
<i>mdr1</i>	1.87E-03	1.29E-03	2.63E-03	1.29E-03	3.32E-02	3.09E-03	3.71E-02	4.60E-03
<i>ctr1</i>	3.80E-03	1.74E-03	2.42E-03	1.74E-03	1.08E-02	4.62E-03	8.72E-03	2.35E-04
<i>ctr2</i>	3.54E-03	1.18E-03	7.50E-03	1.18E-03	2.17E-02	3.49E-03	3.58E-02	8.59E-03
<i>ctr3</i>	6.13E-02	4.48E-02	8.56E-02	4.48E-02	2.83E-02	7.99E-03	5.21E-02	3.24E-02
<i>copt1</i>	2.87E-03	7.99E-04	8.61E-04	7.99E-04	9.30E-03	1.78E-03	4.71E-03	2.80E-03
<i>nramp1</i>	4.29E-05	5.47E-06	1.58E-05	5.47E-06	3.44E-04	4.92E-04	1.75E-05	1.71E-05
<i>nramp2</i>	1.46E-04	1.70E-04	3.68E-04	1.70E-04	1.77E-04	1.26E-04	3.45E-04	2.94E-04
<i>ctp1</i>	8.48E-02	6.11E-03	1.04E-01	6.11E-03	5.11E-02	3.55E-03	6.02E-02	5.85E-03
<i>ctp2</i>	1.15E-03	1.02E-03	1.46E-03	1.02E-03	1.69E-03	3.79E-04	1.15E-03	2.45E-04
<i>ctp3</i>	6.19E-03	6.20E-05	8.33E-05	6.20E-05	1.01E-03	5.10E-04	8.91E-04	4.84E-04
<i>fre1</i>	4.15E-03	2.54E-03	1.31E-02	2.54E-03	2.37E-03	1.06E-03	1.90E-03	3.53E-04
<i>fox1</i>	1.90E-04	4.26E-04	3.22E-04	4.26E-04	1.41E-03	3.82E-04	9.66E-04	3.00E-04
<i>mco</i>	8.80E-05	3.09E-05	2.76E-05	3.09E-05	9.69E-05	5.87E-05	4.30E-05	1.85E-05
<i>ftr1</i>	7.34E-04	8.67E-02	3.07E-01	8.67E-02	1.37E-01	8.71E-03	3.84E-04	1.86E-04
<i>fea1</i>	1.18E+00	1.18E-01	1.98E+00	1.18E-01	1.92E-01	8.18E-02	1.91E-01	9.83E-02
<i>fea2</i>	3.08E-02	1.13E-02	2.03E-02	1.13E-02	4.10E-04	1.81E-04	3.74E-04	3.93E-05
<i>fer1</i>	3.74E-03	2.25E-03	4.30E-03	2.25E-03	3.34E-04	1.40E-04	5.48E-04	1.06E-04
<i>Ffer2</i>	4.25E-04	2.65E-04	4.98E-04	2.65E-04	1.69E-03	7.32E-04	4.41E-04	2.53E-04
<i>irt1</i>	1.79E-02	6.59E-03	1.98E-02	6.59E-03	1.07E-03	8.03E-04	5.56E-04	1.61E-04
<i>irt2</i>	4.27E-02	2.34E-03	5.93E-03	2.34E-03	4.24E-02	4.54E-03	3.60E-02	1.75E-02

Article 3

Table SI4.7. Gene induction and repression factors showing standard deviations (SD) of each factor. L = Acclimated algae; M = Non-acclimated algae; Fe = iron element; $\pm$ = addition/absence of Fe^{3+} in the exposure media.

Ratio	-LFe/MFe	SD	+LFe/MFe	SD	+MFe/MFe	SD
Genes						
<i>cat</i>	0.27	0.09	0.41	0.24	0.89	0.16
<i>sodMn</i>	0.57	0.52	0.43	0.39	5.24	4.20
<i>sodFe</i>	0.12	0.04	0.12	0.02	0.71	0.16
<i>gst</i>	1.36	1.77	0.95	1.13	0.39	0.47
<i>gpx</i>	0.31	0.40	0.39	0.59	0.91	1.21
<i>cox1</i>	0.50	0.24	0.44	0.22	0.96	0.64
<i>nad5</i>	0.55	0.33	0.46	0.27	1.12	0.90
<i>12S</i>	0.37	0.06	0.29	0.07	0.68	0.44
<i>d1</i>	0.55	0.14	0.48	0.17	0.78	0.49
<i>psaA</i>	0.25	0.07	0.23	0.06	0.88	0.32
<i>pcs1</i>	0.45	0.30	0.38	0.27	0.23	0.16
<i>mdr1</i>	17.71	7.78	19.79	8.84	1.40	0.91
<i>ctr1</i>	2.85	2.06	2.30	1.34	0.64	0.59
<i>ctr2</i>	6.13	1.84	10.10	3.52	2.12	0.63
<i>ctr3</i>	0.46	0.20	0.85	0.60	1.40	0.87
<i>copt1</i>	3.24	1.92	1.64	1.34	0.30	0.33
<i>nramp1</i>	8.01	11.68	0.41	0.41	0.37	0.16
<i>nramp2</i>	1.22	1.07	2.36	2.36	2.52	1.75
<i>ctp1</i>	0.60	0.16	0.71	0.20	1.22	0.33
<i>ctp2</i>	1.46	0.57	0.99	0.38	1.27	0.97
<i>ctp3</i>	0.16	0.09	0.14	0.08	0.01	0.01
<i>frel</i>	0.57	0.61	0.46	0.45	3.16	3.14
<i>fox1</i>	7.42	2.50	5.07	1.88	1.69	2.26
<i>mco</i>	1.10	0.93	0.49	0.36	0.31	0.40
<i>ftr1</i>	186.86	66.37	0.52	0.31	418.62	188.03
<i>fea1</i>	0.16	0.07	0.16	0.09	1.68	0.30
<i>fea2</i>	0.01	0.02	0.01	0.01	0.66	0.89
<i>fer1</i>	0.09	0.06	0.15	0.09	1.15	0.90
<i>fer2</i>	3.98	3.24	1.04	0.93	1.17	1.02
<i>irt1</i>	0.06	0.04	0.03	0.01	1.10	0.37
<i>irt2</i>	0.99	0.33	0.84	0.49	0.14	0.07

Article 3

Table SI4.8. p-values of the ANOVAs for the studied gene expression, obtained from *C. reinhardtii* acclimated (L-algae) or not (M-algae) to low Fe media and exposed to $[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}} = 25.7 \text{ nM}$ in Fe-replete media (+LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-18} \text{ M}$) and Fe-depleted media (-LFe, $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{free}} = 1.00 \times 10^{-19} \text{ M}$).

Genes studied	L-alga in -LFe		M-algae in +LFe		L-algae in +LFe	
	p-value	Signif. codes:	p-value	Signif. codes:	p-value	Signif. codes:
<i>cat</i>	0.0001075	***	0.89117		0.188052	
<i>sodMn</i>	0.0005086	***	0.0023283	**	0.0015737	**
<i>sodFe</i>	3.78E-07	***	0.01788	*	0.01773	*
<i>gst</i>	0.3635		0.3165		0.8416	
<i>gpx</i>	0.1615		0.9967		0.8313	
<i>cox1</i>	0.02897	*	0.81066		0.96856	
<i>nad5</i>	0.05462	.	0.96517		0.67599	
<i>12S</i>	0.03737	*	0.2002		0.1129	
<i>d1</i>	0.03874	*	0.37475		0.64002	
<i>psaA</i>	9.64E-05	***	0.5083		0.6272	
<i>pcs1</i>	0.3002		0.04417	*	0.07993	
<i>mdr1</i>	4.41E-08	***	0.1978		0.3705	
<i>ctr1</i>	0.002732	**	0.296975		0.822051	
<i>ctr2</i>	2.65E-05	***	0.01042	*	0.09878	
<i>ctr3</i>	0.08899		0.19995		0.98942	
<i>copt1</i>	0.001502	**	0.016334	*	0.269063	
<i>nramp1</i>	0.5218		0.006485	*	0.04148	*
<i>nramp2</i>	0.9708		0.1056		0.8045	
<i>ctp1</i>	0.0005474	***	0.0789614	.	0.5010242	
<i>ctp2</i>	0.7527		0.7391		0.2471	
<i>ctp3</i>	0.0001343	***	1.04E-05	***	1.40E-05	***
<i>frel</i>	0.001804	**	0.017304	*	0.010466	*
<i>fox1</i>	0.001065	**	0.424464		0.160269	
<i>mco</i>	0.63778		0.05073	.	0.89919	
<i>ftr1</i>	0.2002		0.8728		0.01879	*
<i>fea1</i>	9.03E-08	***	0.0008214	***	0.0008057	***
<i>fea2</i>	0.003948	**	1		0.0396	*
<i>fer1</i>	0.0043	**	0.6823		0.8545	
<i>fer2</i>	0.04217	*	0.04636	*	0.02959	*
<i>irt1</i>	0.003948	**	1		1	
<i>irt2</i>	0.05156	.	0.01063	*	0.04742	*

Table SI4.9. The raw data used to plot Figure 4.1.

	-LFe	+LFe
Time (min)	⁶⁵ Cu ²⁺ accumulation (amol/cell)	
0	5.086	1.128
0	10.621	2.256
4.83	15.258	7.771
4.83	26.762	11.405
4.83	11.746	7.520
20.03	38.266	21.808
20.03	25.188	23.187
20.03	16.348	32.587
40.45	52.797	42.989
40.45	51.465	75.325
40.45	74.957	42.989
60.08	66.844	68.432
60.08	97.360	62.667
60.08	70.598	78.083

Table SI4.10. The raw data used to plot Figure 4.2.

-LFe		+LFe	
$[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}}$ (M)	J_{int} ($\text{amol}\cdot\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)	$[^{65}\text{Cu}^{2+}]_{\text{free}}$ (M)	J_{int} ($\text{amol}\cdot\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)
7.395E-15	2.743E-04	1.496E-14	1.137E-02
1.209E-14	2.722E-04	1.644E-14	7.284E-03
1.509E-14	1.347E-04	1.706E-14	6.439E-03
2.860E-14	1.328E-02	1.787E-14	2.315E-03
3.043E-14	1.609E-02	1.810E-14	3.556E-03
3.101E-14	1.658E-02	1.869E-14	6.096E-03
1.236E-12	1.829E-02	1.304E-12	7.830E-03
1.244E-12	2.018E-02	1.349E-12	9.404E-03
1.267E-12	1.982E-02	1.281E-12	5.230E-03
1.767E-12	2.055E-02	1.834E-12	1.437E-02
1.763E-12	2.068E-02	1.843E-12	1.293E-02
1.776E-12	2.070E-02	1.854E-12	1.090E-02
3.054E-12	5.020E-02	2.716E-12	4.604E-02
3.001E-12	4.914E-02	2.764E-12	4.642E-02
2.987E-12	4.678E-02	2.768E-12	4.133E-02
1.567E-11	4.925E-02	1.358E-11	4.171E-02
1.475E-11	4.634E-02	1.352E-11	4.781E-02
1.466E-11	4.446E-02	1.348E-11	4.606E-02
4.467E-11	4.856E-02	3.424E-11	4.551E-02
4.135E-11	4.927E-02	3.534E-11	4.643E-02
4.309E-11	4.681E-02	3.568E-11	4.435E-02
4.175E-11	4.665E-02	4.079E-11	4.733E-02
4.245E-11	4.775E-02	4.161E-11	4.467E-02
4.327E-11	4.364E-02	4.147E-11	4.145E-02

Article 3

Table SI4.11. Pearson correlation coefficient data used to build the gene expression correlation.

	sodMn	sodFe	gst	gpx	cox1	nad5	12S	d1	psaA	pcs1	mdr1	ctr1	ctr2	ctr3	copt1	nramp1	nramp2	ctp1	ctp2	ctp3	mco	ftr1	fea1	fre1	fox1	fea2	fer2	fer1	irt1	irt2
sodMn	1	0.43	-0.89	0.57	0.62	0.76	0.29	0.32	0.57	-0.48	-0.65	-0.74	-0.53	0.84	-0.7	-0.39	0.57	0.85	0.22	-0.37	-0.67	0.88	0.89	1	-0.54	0.42	-0.31	0.73	0.71	-0.97
sodFe	0.43	1	-0.47	0.98	0.97	0.91	0.98	0.99	0.99	0.58	-0.96	-0.89	-0.91	0.67	-0.73	-0.51	-0.23	0.81	-0.36	0.67	0	0.09	0.79	0.5	-0.93	1	-0.56	0.93	0.94	-0.24
gst	-0.89	-0.47	1	-0.63	-0.59	-0.69	-0.31	-0.33	-0.58	0.39	0.62	0.82	0.37	-0.97	0.9	0.76	-0.73	-0.88	0.22	0.26	0.86	-0.6	-0.85	-0.89	0.7	-0.46	0.69	-0.74	-0.7	0.92
gpx	0.57	0.98	-0.63	1	0.98	0.95	0.93	0.94	0.99	0.42	-0.98	-0.96	-0.88	0.8	-0.84	-0.62	-0.04	0.91	-0.37	0.54	-0.2	0.21	0.88	0.63	-0.97	0.98	-0.64	0.98	0.98	-0.41
cox1	0.62	0.97	-0.59	0.98	1	0.98	0.93	0.94	1	0.39	-1	-0.94	-0.95	0.75	-0.77	-0.48	-0.11	0.9	-0.2	0.5	-0.12	0.32	0.9	0.68	-0.92	0.97	-0.5	0.98	0.99	-0.43
nad5	0.76	0.91	-0.69	0.95	0.98	1	0.84	0.86	0.96	0.2	-0.99	-0.94	-0.93	0.81	-0.78	-0.45	0.03	0.95	-0.07	0.31	-0.23	0.5	0.96	0.81	-0.87	0.9	-0.45	0.99	0.99	-0.59
12S	0.29	0.98	-0.31	0.93	0.93	0.84	1	1	0.95	0.69	-0.92	-0.8	-0.92	0.52	-0.6	-0.38	-0.41	0.7	-0.33	0.77	0.18	0	0.69	0.37	-0.86	0.99	-0.44	0.85	0.88	-0.08
d1	0.32	0.99	-0.33	0.94	0.94	0.86	1	1	0.96	0.67	-0.93	-0.81	-0.93	0.54	-0.61	-0.38	-0.39	0.72	-0.3	0.75	0.16	0.03	0.71	0.4	-0.86	0.99	-0.44	0.87	0.89	-0.11
psaA	0.57	0.99	-0.58	0.99	1	0.96	0.95	0.96	1	0.44	-0.99	-0.94	-0.93	0.75	-0.78	-0.52	-0.13	0.89	-0.28	0.55	-0.11	0.24	0.88	0.63	-0.94	0.99	-0.55	0.97	0.98	-0.38
pcs1	-0.48	0.58	0.39	0.42	0.39	0.2	0.69	0.67	0.44	1	-0.36	-0.17	-0.44	-0.15	-0.02	-0.05	-0.81	0	-0.46	0.99	0.67	-0.66	-0.04	-0.41	-0.38	0.59	-0.17	0.23	0.27	0.65
mdr1	-0.65	-0.96	0.62	-0.98	-1	-0.99	-0.92	-0.93	-0.99	-0.36	1	0.94	0.94	-0.77	0.77	0.47	0.08	-0.91	0.18	-0.47	0.14	-0.35	-0.92	-0.7	0.91	-0.96	0.49	-0.98	-0.99	0.46
ctr1	-0.74	-0.89	0.82	-0.96	-0.94	-0.94	-0.8	-0.81	-0.94	-0.17	0.94	1	0.78	-0.93	0.94	0.72	-0.22	-0.98	0.35	-0.31	0.44	-0.37	-0.95	-0.78	0.97	-0.89	0.72	-0.98	-0.97	0.63
ctr2	-0.53	-0.91	0.37	-0.88	-0.95	-0.93	-0.92	-0.93	-0.93	-0.44	0.94	0.78	1	-0.53	0.52	0.17	0.34	-0.76	-0.05	-0.52	-0.15	-0.36	-0.8	-0.59	0.75	-0.91	0.2	-0.88	-0.91	0.3
ctr3	0.84	0.67	-0.97	0.8	0.75	0.81	0.52	0.54	0.75	-0.15	-0.77	-0.93	-0.53	1	-0.98	-0.81	0.56	0.96	-0.34	-0.01	-0.74	0.48	0.91	0.86	-0.86	0.66	-0.78	0.87	0.83	-0.82
copt1	-0.7	-0.73	0.9	-0.84	-0.77	-0.78	-0.6	-0.61	-0.78	-0.02	0.77	0.94	0.52	-0.98	1	0.9	-0.48	-0.92	0.53	-0.16	0.68	-0.27	-0.85	-0.73	0.92	-0.72	0.88	-0.86	-0.83	0.68
nramp1	-0.39	-0.51	0.76	-0.62	-0.48	-0.45	-0.38	-0.38	-0.52	-0.05	0.47	0.72	0.17	-0.81	0.9	1	-0.55	-0.66	0.8	-0.17	0.71	0.08	-0.53	-0.41	0.78	-0.5	0.99	-0.59	-0.53	0.45
nramp2	0.57	-0.23	-0.73	-0.04	-0.11	0.03	-0.41	-0.39	-0.13	-0.81	0.08	-0.22	0.34	0.56	-0.48	-0.55	1	0.33	-0.12	-0.73	-0.97	0.45	0.28	0.52	-0.1	-0.25	-0.45	0.09	0.02	-0.76
ctp1	0.85	0.81	-0.88	0.91	0.9	0.95	0.7	0.72	0.89	0	-0.91	-0.98	-0.76	0.96	-0.92	-0.66	0.33	1	-0.2	0.13	-0.53	0.53	0.99	0.89	-0.9	0.8	-0.64	0.97	0.95	-0.76
ctp2	0.22	-0.36	0.22	-0.37	-0.2	-0.07	-0.33	-0.3	-0.28	-0.46	0.18	0.35	-0.05	-0.34	0.53	0.8	-0.12	-0.2	1	-0.52	0.25	0.65	-0.04	0.19	0.54	-0.37	0.86	-0.23	-0.19	-0.17
ctp3	-0.37	0.67	0.26	0.54	0.5	0.31	0.77	0.75	0.55	0.99	-0.47	-0.31	-0.52	-0.01	-0.16	-0.17	-0.73	0.13	-0.52	1	0.57	-0.61	0.08	-0.3	-0.5	0.69	-0.28	0.35	0.39	0.55
Mco	-0.67	0	0.86	-0.2	-0.12	-0.23	0.18	0.16	-0.11	0.67	0.14	0.44	-0.15	-0.74	0.68	0.71	-0.97	-0.53	0.25	0.57	1	-0.45	-0.47	-0.63	0.34	0.01	0.62	-0.31	-0.25	0.83
ftr1	0.88	0.09	-0.6	0.21	0.32	0.5	0	0.03	0.24	-0.66	-0.35	-0.37	-0.36	0.48	-0.27	0.08	0.45	0.53	0.65	-0.61	-0.45	1	0.64	0.86	-0.12	0.08	0.17	0.41	0.41	-0.85
fea1	0.89	0.79	-0.85	0.88	0.9	0.96	0.69	0.71	0.88	-0.04	-0.92	-0.95	-0.8	0.91	-0.85	-0.53	0.28	0.99	-0.04	0.08	-0.47	0.64	1	0.93	-0.84	0.78	-0.5	0.96	0.95	-0.78
fre1	1	0.5	-0.89	0.63	0.68	0.81	0.37	0.4	0.63	-0.41	-0.7	-0.78	-0.59	0.86	-0.73	-0.41	0.52	0.89	0.19	-0.3	-0.63	0.86	0.93	1	-0.6	0.49	-0.34	0.79	0.76	-0.94
fox1	-0.54	-0.93	0.7	-0.97	-0.92	-0.87	-0.86	-0.86	-0.94	-0.38	0.91	0.97	0.75	-0.86	0.92	0.78	-0.1	-0.9	0.54	-0.5	0.34	-0.12	-0.84	-0.6	1	-0.93	0.8	-0.94	-0.93	0.43
fea2	0.42	1	-0.46	0.98	0.97	0.9	0.99	0.99	0.99	0.59	-0.96	-0.89	-0.91	0.66	-0.72	-0.5	-0.25	0.8	-0.37	0.69	0.01	0.08	0.78	0.49	-0.93	1	-0.55	0.92	0.94	-0.23
fer2	-0.31	-0.56	0.69	-0.64	-0.5	-0.45	-0.44	-0.44	-0.55	-0.17	0.49	0.72	0.2	-0.78	0.88	0.99	-0.45	-0.64	0.86	-0.28	0.62	0.17	-0.5	-0.34	0.8	-0.55	1	-0.59	-0.54	0.36
fer1	0.73	0.93	-0.74	0.98	0.98	0.99	0.85	0.87	0.97	0.23	-0.98	-0.98	-0.88	0.87	-0.86	-0.59	0.09	0.97	-0.23	0.35	-0.31	0.41	0.96	0.79	-0.94	0.92	-0.59	1	1	-0.59
irt1	0.71	0.94	-0.7	0.98	0.99	0.99	0.88	0.89	0.98	0.27	-0.99	-0.97	-0.91	0.83	-0.83	-0.53	0.02	0.95	-0.19	0.39	-0.25	0.41	0.95	0.76	-0.93	0.94	-0.54	1	1	-0.55
irt2	-0.97	-0.24	0.92	-0.41	-0.43	-0.59	-0.08	-0.11	-0.38	0.65	0.46	0.63	0.3	-0.82	0.68	0.45	-0.76	-0.76	-0.17	0.55	0.83	-0.85	-0.78	-0.94	0.43	-0.23	0.36	-0.59	-0.55	1

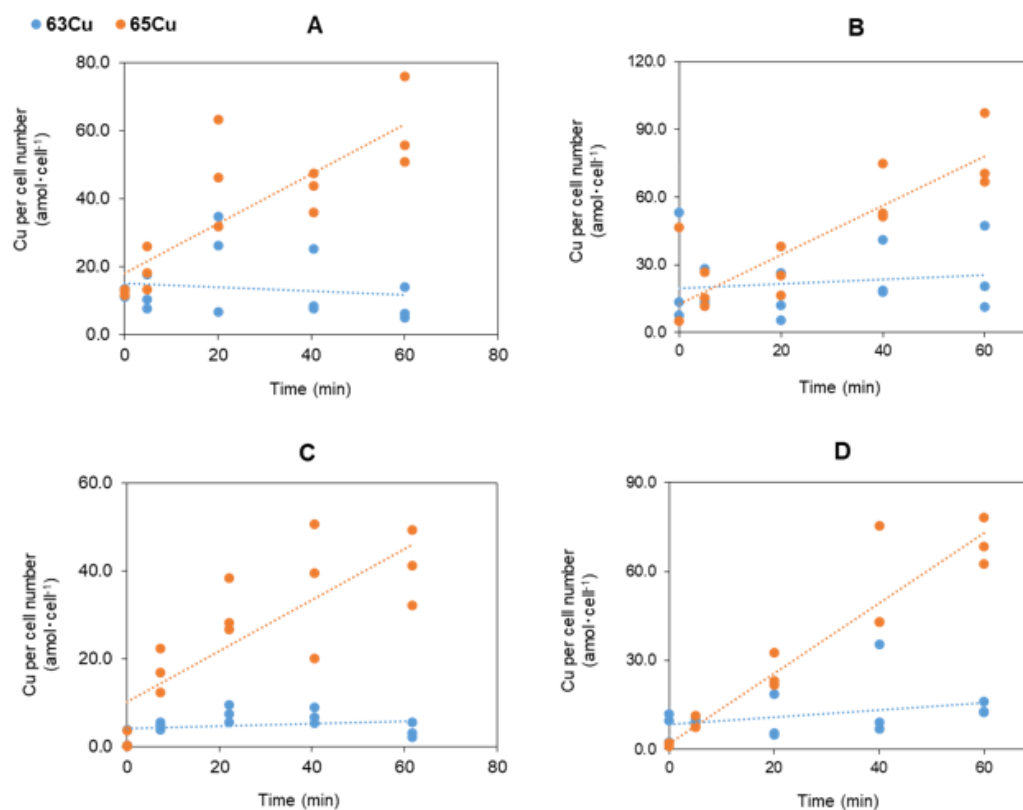


Figure SI4.1. Copper uptake kinetics by *C. reinhardtii* (L-algae) exposed to ^{65}Cu (27.5 nM) in Fe^{3+} -depleted (A and B) and Fe^{3+} -replete (C and D) media. Results show no change in $^{63}\text{Cu}^{2+}$ uptake rate over time while $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptake rate increased over time.

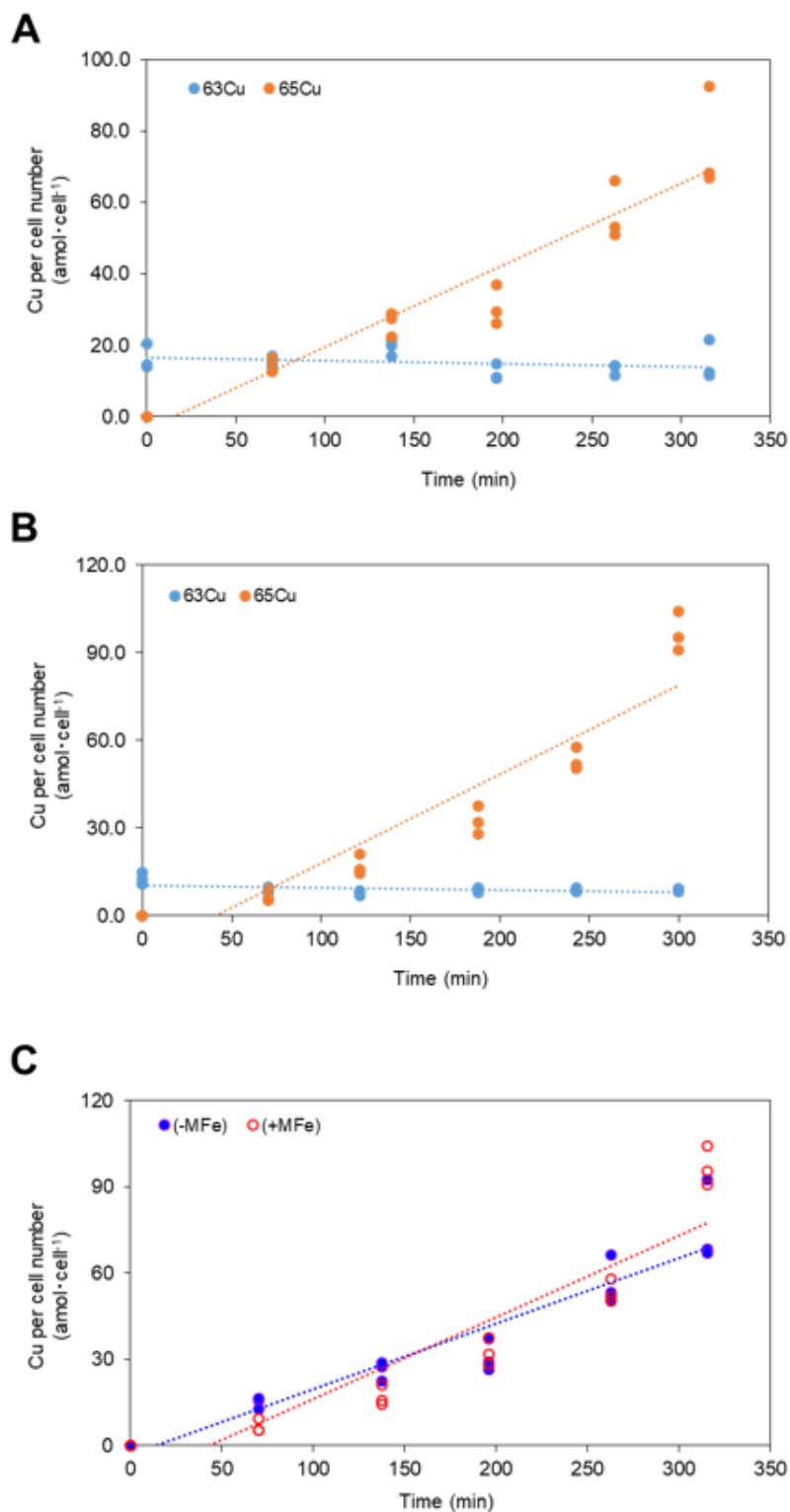


Figure SI4.2. Copper uptake kinetics for non-acclimated algal cells (M-algae) exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (27.5 nM) in Fe^{3+} -depleted (-MFe) (A) and Fe^{3+} -replete (+MFe) (B) media showing there is no change in $^{63}\text{Cu}^{2+}$ uptake rate over time. The $^{65}\text{Cu}^{2+}$ uptakes were plotted together in (C) for comparison.

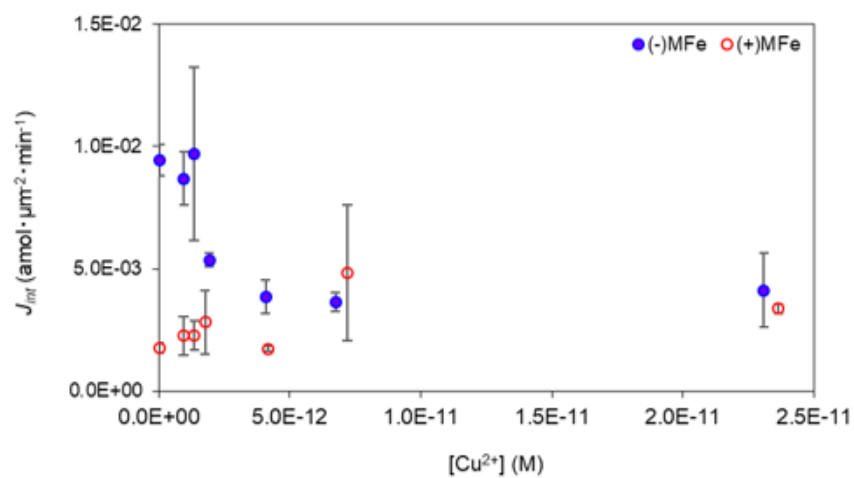


Figure SI4.3. Copper internalization flux for non-acclimated algal cells (M-algae) exposed to $^{65}\text{Cu}^{2+}$ (27.5 nM) in Fe^{3+} -depleted (-MFe) and Fe^{3+} -replete (+MFe) media. When $[\text{Cu}^{2+}]$ was varied, the internalized flux observed over 60 min showed no clear trends whether the exposure media were Fe^{3+} replete (+MFe) or depleted (-MFe).

Discussion générale

Partie III : Discussion générale

Comprendre les interactions des métaux avec les organismes aquatiques est une étape clé pour répondre aux nombreuses questions sur leur importance nutritionnelle, leur accumulation et leur toxicité (Lavoie *et al.*, 2016a; McIntyre & Guéguen, 2013). Le modèle de ligand biotique (MLB ou BLM en anglais) est un outil couramment utilisé aujourd'hui pour prédire la biodisponibilité des métaux pour les organismes aquatiques. Selon ce paradigme, la prise en charge et la toxicité des métaux sont déterminées par la fixation des ions métalliques aux sites clés de liaison (ligands biotiques) présents sur la surface membranaire et qui conduisent à leur internalisation (Adams *et al.*, 2020; Paquin *et al.*, 2002). L'importance de la liaison des métaux aux ligands biotiques dépend de la spéciation des métaux (les ligands dissous entrent en compétition avec les ligands biotiques pour la liaison des métaux) et de la présence de cations majeurs tels que le calcium, le magnésium et les protons (les cations et les métaux sont en compétition pour la liaison avec les ligands biotiques). Ces dernières années, des mélanges de métaux ont fait l'objet de plusieurs études pour identifier des effets antagonistes ou synergiques. Ces études examinent généralement l'impact de deux ou plusieurs éléments non essentiels. Cependant, peu d'attention a été accordée au rôle des micronutriments essentiels sur la toxicité d'un autre élément. Sur la base de diverses approches méthodologiques et en utilisant comme modèle biologique l'algue verte d'eau douce *C. reinhardtii*, nous avons examiné si l'utilisation de faibles concentrations d'éléments essentiels (Co, Mn, Zn et Fe) modifiait la réponse des microalgues au Cu. Ci-dessous, nous faisons une discussion synthétique des différentes questions examinées et des principaux résultats obtenus dans le cadre de ces travaux.

3.1 Hypertoxicité du cuivre : Influence du statut nutritif du milieu en fer chez *C. reinhardtii*

Le cuivre est un élément trace essentiel pour tous les organismes vivants à cause de ses propriétés redox qui en font un des cofacteurs métalliques les plus importants (Hill *et al.*, 1996). C'est l'un des éléments essentiels les plus étudiés en écotoxicologie en raison de son importance physiologique. Les travaux de Lavoie *et al.* (2012b) sur les effets, des oligo-éléments (Cu, Co, Zn, Mn, Fe) dans la toxicité des métaux chez *C. reinhardtii*, ont révélé une toxicité anormalement élevée du Cu^{2+} dans une solution faiblement concentrée

Discussion générale

en oligo-éléments, suggérant ainsi un rôle de ces éléments dans la biodisponibilité du cuivre. Il était donc nécessaire d'investiguer davantage pour mieux comprendre cet effet notamment dans un contexte où peu de travaux scientifiques sont consacrés au rôle que jouent les micronutriments dans la biodisponibilité des métaux chez le phytoplancton d'eau douce, car présumé négligeable.

Suite aux observations de Lavoie *et al.* (2012b), la principale question est de savoir quels sont les mécanismes qui président la prise en charge et la toxicité du cuivre chez l'algue verte d'eau douce *C. reinhardtii* notamment dans des conditions de croissance limitées en oligo-éléments dans le milieu de culture. Les mécanismes de prise en charge des métaux varient non seulement d'une espèce d'algue à une autre, mais aussi d'un métal à un autre ainsi qu'en fonction de la concentration du métal d'intérêt (Burkhead *et al.*, 2009; Hanikenne *et al.*, 2009; Herbiik *et al.*, 2002). Le métabolisme du cuivre chez les algues est bien documenté et son homéostasie est connue comme un processus très étroitement contrôlé (Burkhead *et al.*, 2009; Hanikenne *et al.*, 2009; Herbiik *et al.*, 2002). Les travaux de Lavoie *et al.* (2012b) nous incitent donc à explorer plus profondément les questions que ses observations soulèvent.

Les expériences de toxicité qui ont donc été réalisées ont confirmé les observations de Lavoie *et al.* (2012b), avec une inhibition significative de la croissance survenue chez les cellules algales en présence d'aussi peu que 10^{-12} M de Cu^{2+} libre. On peut donc faire l'hypothèse, comme ces auteurs, qu'en raison d'une diminution de la compétition entre métaux traces essentiels dans le milieu d'exposition, il serait possible qu'une concentration aussi faible de 10^{-12} M de Cu^{2+} libre soit plus toxique dans une solution très faiblement concentrée en métaux traces que dans une autre plus richement concentrée. Certains travaux précurseurs ont évoqué l'existence d'effets antagonistes ou protecteurs des métaux traces sur la prise en charge et la toxicité des métaux chez certaines algues unicellulaires (Sunda & Huntsman, 1996; Sunda & Huntsman, 1998a; Töpperwien *et al.*, 2007). Ainsi, à l'instar de certains cations majeurs (Ca^{2+} et Mg^{2+}) et du proton H^+ (Deleebeeck *et al.*, 2007; Deleebeeck *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2007), les micronutriments ("cations mineurs") pourraient aussi entrer en compétition avec les métaux par antagonisme au niveau des sites de prise en charge des métaux réduisant ainsi leur toxicité pour la cellule comme c'est le cas chez certaines microalgues marines (Foster & Morel, 1982; Harrison & Morel, 1983)

Discussion générale

et dulcicoles (dont *C. reinhardtii*) (Ferrante *et al.*, 2008). La toxicité du cuivre serait donc due à une absence ou un défaut d'antagonisme du cuivre avec les autres éléments traces d'intérêt (Co, Fe, Mn et Zn) au niveau des sites de fixation sur la membrane cellulaire ce qui aurait conduit à une forte accumulation du Cu dans la cellule. Ce raisonnement suppose donc implicitement que le Cu partagerait avec au moins un des quatre autres micronutriments d'intérêt un même système de transport. Toutefois après investigations, seul le fer (Fe^{3+}) aurait finalement une contribution significative à la toxicité du Cu chez la microalgue (Kochoni & Fortin, 2019). En effet, les concentrations de Cu^{2+} libre nécessaires pour inhiber la croissance cellulaire de 50% (CE50) sur 72 h ont diminué de 2 nM en milieu Fe de base ($10^{-17,6}$ M Fe^{3+}) à 4 pM dans un milieu faiblement concentré en Fe ($10^{-19,0}$ M Fe^{3+}) soit une augmentation de la toxicité de 500 fois. En revanche, cette toxicité n'est plus enregistrée lorsque la concentration de Fe^{3+} est normale soit autour de 10^{-18} M. De même, lorsque Fe^{3+} est faiblement concentré dans la solution ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{libre}} = 10^{-19}$ M), l'accumulation du Cu peut croître et atteindre $150 \text{ amol.cell}^{-1}$ entre $10^{-13,0}$ et $10^{-10,5}$ M Cu^{2+} (Figure 2.4). En revanche, dans la même gamme de Cu^{2+} , l'accumulation du Cu devient indétectable lorsque le milieu n'est plus limité en Fe^{3+} . Le fer joue donc un rôle protecteur contre l'accumulation et la toxicité du cuivre chez *C. reinhardtii*. Cette conclusion est d'autant plus plausible que les deux éléments ont un métabolisme cellulaire très imbriqué et une homéostasie coréglée (La Fontaine *et al.*, 2002a; Merchant *et al.*, 2006; Schoffman *et al.*, 2016). On rapporte aussi que Fe^{3+} agirait pareillement contre l'effet d'autres métaux chez la microalgue verte dulcicole *Pseudokirchneriella subcapitata* (Lavoie, 2012; Maloney, 2007), chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* (Foster & Morel, 1982; Harrison & Morel, 1983) et chez les plantes supérieures (Krämer *et al.*, 2007; Thomine *et al.*, 2000).

Par ailleurs, d'un point de vue nutritionnel, on peut également faire valoir que si les cellules sont maintenues dans des conditions limitées en Fe, elles pourraient devenir plus sensibles à la toxicité du cuivre malgré une croissance normale à $[\text{Cu}^{2+}] \leq 3 \times 10^{-13}$ M. C'est pourquoi il importe de comprendre les mécanismes qui gouvernent cet effet toxique du Cu en étudiant notamment son destin intracellulaire et son homéostasie.

Discussion générale

Pour déterminer quels mécanismes expliquent le mieux nos observations et comprendre le mécanisme d'action du cuivre dans un contexte nutritif défavorable, nous avons aussi réalisé des expériences à court terme suivant plusieurs scénarii d'expositions.

3.2 Gestion interne du cuivre

L'étude du destin intracellulaire et des mécanismes de gestion interne du Cu chez *C. reinhardtii* a eu pour objectifs de (i) comprendre les mécanismes mis en œuvre par les microalgues pour une gestion intracellulaire du Cu en lien notamment avec la concentration du milieu en Fe ($\pm$ Fe) et (ii) caractériser les biomolécules (bioligands) impliquées dans sa détoxification.

Dès leur entrée dans la cellule, les métaux (essentiels) sont normalement pris en charge par des protéines chaperons qui se charge de les conduire vers leur destination finale (Robinson & Winge, 2010; Rosenzweig, 2002). Le fractionnement subcellulaire est une approche qui permet généralement de faire le lien entre un métal donné et ses mécanismes de toxicité et de détoxification (Crémazy *et al.*, 2013b). C'est ce qui justifie le recours à cette méthode pour examiner notamment la capacité de cellules algales à détoxifier les métaux tandis que l'approche métallomique a permis plus spécifiquement de mettre en évidence les biomolécules potentiellement utilisées pour complexer le Cu et par conséquent réduire ses effets. Le fractionnement subcellulaire est en effet un processus qui consiste en une homogénéisation des cellules, suivie d'une série de centrifugations différentielles et de dénaturations thermiques produisant en bout de ligne, cinq fractions que sont : les débris cellulaires (DB)⁴, les granules (GR) riches en métaux, les organites (ORG), les protéines cytosoliques dénaturées à la chaleur (HDP) et les peptides ou protéines thermostables (HSP). Après 2 et 72 h d'exposition de *C. reinhardtii* à 3,54 nM de $^{65}\text{Cu}^{2+}$ dans les milieux -LFe et +LFe, l'analyse des données d'accumulation du Cu^{2+} a d'abord permis de discriminer significativement les deux milieux d'exposition notamment après 72 h d'exposition. Ce résultat reste en effet cohérent avec nos précédentes observations (Kochoni & Fortin, 2019) et confirme l'assertion que le statut nutritif du milieu en Fe^{3+} peut modifier la gestion interne du Cu chez les algues. Aussi les études comparées du fractionnement subcellulaire du Cu dans les algues ne différencient significativement les

⁴ Les données sur les débris ne sont pas analysées ni prises en compte dans les calculs

Discussion générale

deux traitements (–LFe vs +LFe) qu’après deux heures d’exposition ce qui témoigne à la fois d’une évolution temporelle de la distribution du Cu dans les différents compartiments cellulaires et d’un effet du fer sur cette distribution. En somme, nos résultats ont montré que la distribution intracellulaire de Cu^{2+} dans les différents compartiments cellulaires de *C. reinhardtii* n’est pas homogène, ce qui peut s’entendre si on considère le caractère essentiel de cet élément et surtout le statut nutritif en Fe^{3+} du milieu de culture et d’exposition. Les algues acclimatées semblent plus sensibles au Cu^{2+} lorsque le milieu est limité en Fe^{3+} toutefois cette sensibilité ne serait pas irréversible, puisque les algues accumulent moins de Cu^{2+} dès lors que le milieu est à nouveau enrichi en Fe^{3+} . Même si les interactions métaboliques fer-cuivre sont bien connues chez les microalgues (Burkhead *et al.*, 2009; Hanikenne *et al.*, 2009; La Fontaine *et al.*, 2002b), les effets homéostatiques de l’un sur l’autre ne sont pas bien élucidés au niveau subcellulaire. C’est dans cette perspective qu’il convient d’inscrire l’une des observations majeures de cette expérience, celle relative à l’augmentation inattendue de l’accumulation du Cu^{2+} dans les organites. Toutefois, il se dégage clairement de nos résultats que l’effet du Fe sur la distribution subcellulaire du Cu^{2+} est d’autant plus marqué que le séjour des algues dans des conditions limitées en Fe^{3+} est plus prononcé. En attendant de procéder à des investigations plus poussées pour élucider toutes les questions soulevées par l’accumulation du Cu^{2+} dans les organites, il convient d’analyser le contenu de la fraction HSP (*heat stable peptides and proteins*), connue pour contenir de nombreux ligands pouvant complexer le Cu^{2+} et nos résultats montrent que la proportion de Cu dans cette fraction est souvent supérieure à 20%. Ainsi, après fractionnement la fraction HSP a d’abord été analysée par SEC-ICP-MS (approche métallomique) puis par LC-MS/MS (approche protéomique et peptidomique).

L’analyse des résultats montre principalement que, quel que soit le traitement, ce sont les mêmes biomolécules qui fixent le Cu et qui demeurent dans la fraction HSP tout au long de l’expérience. On observe toutefois que leur concentration (intensité du signal observé) aurait tendance à augmenter non seulement avec le temps, mais aussi avec la présence de Fe^{3+} dans le milieu. Même si cet effet du Fe^{3+} n’est pas cohérent avec nos attentes, il semble clair que le système de séquestration du Cu apparaît très tôt (ou il y est déjà au préalable) dans les cellules algales exposées au Cu. Par ailleurs, ces biomolécules qui sont constituées de protéines et de peptides couvrent une large gamme de tailles et de

Discussion générale

poids moléculaires. Au total, 25 protéines différentes ont été détectées dans cette fraction sans que nous puissions établir avec certitude le lien direct ou indirect que la plupart ont avec le Cu ou un autre métal. Néanmoins, outre deux d'entre elles qui sont déjà connues comme ayant des sites fixateurs de métaux, cinq autres ont été annotées aussi comme ayant des dispositions fixatrices de métaux. Quant aux peptides, il s'agit notamment de glutathion et de phytochélatines (PC2 à PC5) qui ont été détectées. Leur capacité à fixer les métaux est non seulement bien documentée, mais elles sont connues pour participer à la détoxification des métaux dans les cellules des algues et des plantes supérieures (Cobbett, 2000b; Navarrete *et al.*, 2018). Les investigations devraient se poursuivre pour répondre à toutes les questions que soulèvent nos résultats sur le destin interne du Cu chez *C. reinhardtii*. En attendant d'y répondre, exposons nos trouvailles sur l'autre question que nous nous sommes posée plus haut à savoir quels sont les mécanismes qui gouvernent la prise en charge de Cu chez *C. reinhardtii*.

3.3 Mécanisme de prise en charge du cuivre

La problématique reste ici celle des mécanismes qui gouvernent la prise en charge du Cu par *C. reinhardtii* dans un milieu soumis à une fluctuation de sa concentration en Fe^{3+} . Puisque ces conditions nutritives du milieu en Fe^{3+} ont induit une hypersensibilité des algues au Cu^{2+} , la question se pose de savoir si les deux éléments ont en partage (au moins partiellement) un même système de transport membranaire qui aurait fait qu'une faible concentration en Fe^{3+} peut faciliter une forte accumulation de Cu^{2+} par les cellules. Il s'agirait clairement là d'un effet compétitif entre le Cu^{2+} et le Fe^{3+} pour être internalisés par les microalgues, comme nous le suggérons dans nos précédents travaux (Kochoni & Fortin, 2019). Les objectifs étaient donc de vérifier l'existence d'un tel effet et d'avoir une vue d'ensemble des mécanismes mis en œuvre dans ces conditions par *C. reinhardtii*. Il fallait donc caractériser les transporteurs impliqués dans l'assimilation et l'homéostasie de ces deux éléments et pour ce faire, deux approches méthodologiques ont été utilisées. La première (l'approche biophysique) est faite d'expériences de prise en charge à court terme et vise à déterminer les paramètres cinétiques caractérisant la prise en charge du Cu^{2+} par les transporteurs membranaires suivant différents scénarii d'exposition au Cu^{2+} . En effet, la détermination du flux maximal d'internalisation du Cu (J_{max}) et de la constante de demi-

Discussion générale

saturation K_m (concentration de Cu^{2+} pour laquelle le flux de prise en charge est la moitié du flux maximal) devrait permettre de savoir, après comparaison des valeurs, l'existence ou non de processus de compétition ou d'antagonisme entre le Cu^{2+} et le Fe^{3+} pour les sites de transport présents à la surface membranaire des cellules. La deuxième approche quant à elle consiste à examiner la réponse transcriptomique de la cellule pour certains gènes codant pour des transporteurs et protéines connus pour leur implication dans l'homéostasie du Cu et du Fe. Il s'agit spécifiquement de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation que déploient les microalgues lorsque le milieu devient limité en Fe. L'analyse des résultats obtenus montre une augmentation jusqu'à 4,7 fois du taux de prise en charge de Cu^{2+} (ϕCu) dans les cellules d'algues acclimatées à un milieu limité en Fe^{3+} comparées aux cellules d'algues non acclimatées (Figure 4.1 et Figure SI4.2). Ces données confirment donc l'hypersensibilité des algues acclimatées au Cu^{2+} , toutefois il n'y avait pas de différence significative dans la constante d'affinité (K_m) et le flux maximal d'internalisation (J_{max}), que les milieux d'exposition des microalgues au Cu^{2+} soient ou non limités en Fe^{3+} . Ce qui semble indiquer que les microalgues acclimatées au milieu -LFe auraient recours aux mêmes systèmes de transporteurs membranaires pour importer le Cu^{2+} indépendamment de statut nutritif du milieu d'exposition en Fe^{3+} . Ce qui laisse croire à priori que le séjour des algues dans un milieu limité en Fe^{3+} les aurait irréversiblement affectées au point qu'elles ne seraient plus en mesure, lorsque le milieu n'est plus limité en Fe^{3+} , de retrouver ses potentialités d'avant acclimatation à maintenir l'homéostasie du Cu. Mais dans nos précédents travaux, nous avons pu montrer que ce processus serait plutôt réversible et que les algues étaient capables de récupérer leur habilité dans les 72 h après leur exposition au Cu^{2+} dans un milieu non limité en Fe^{3+} . Par ailleurs les données sur l'affinité du Cu avec les transporteurs membranaires des cellules acclimatées sont différentes de celles reportées dans la littérature pour *C. reinhardtii*. Les valeurs de K_m ($10^{11,9}$ et $10^{11,6} \text{ M}^{-1}$) obtenues sont en effet cinq à six ordres de grandeur supérieurs aux valeurs rapportées par Chen *et al.* (2010) et Hill *et al.* (1996) soit respectivement $10^{5,8}$ et $10^{6,7}$. Cette différence d'affinité suggère que les transporteurs utilisés ici par *C. reinhardtii* sont de nature différente de ceux rapportés par Chen *et al.* (2010) et Hill *et al.* (1996). Un tel changement d'affinité d'un élément pour son transporteur suite à une période d'acclimatation à un autre élément n'est pas bien connu chez les microalgues vertes d'eau douce. Les seuls changements d'affinité

Discussion générale

rapportés sont ceux induits à la suite d'une pré-incubation des cellules dans des milieux limités au même élément (Hassler & Wilkinson, 2003; Lavoie, 2012; Lavoie *et al.*, 2016a; Sunda, 2012a). Le mécanisme responsable de ce changement d'affinité n'est pas bien connu et pourrait avoir diverses explications. Il existe divers mécanismes de rétroaction (feedback) qui peuvent permettre aux cellules de réguler la prise en charge du Cu^{2+} . Cependant, comment le fer peut moduler la prise en charge du Cu n'est toujours pas élucidé. Il se pourrait que Cu^{2+} remplace fonctionnellement Fe^{3+} comme le suggèrent certains auteurs (Díaz-Quintana *et al.*, 2003; Marchand *et al.*, 2018; Wood, 1978). Toutefois, nos données ont clairement établi l'existence d'un lien entre l'homéostasie du Cu et du Fe. Quant aux données issues des analyses transcriptomiques, elles indiquent notamment qu'il y a au total, en prenant en compte toutes les conditions, plus de gènes réprimés (~71%) que de gènes surexprimés (~36%). Par ailleurs, l'ajout de Fe au milieu d'exposition aurait induit une variation du niveau d'expression pour seulement 11 gènes (~ 36%) et s'est traduit dans l'ensemble principalement par des gènes réprimés dans les microalgues acclimatées, alors que le modèle d'expression génique n'est pas très clair chez les microalgues non acclimatées. L'acclimatation des microalgues demeure donc le facteur qui explique le mieux les différences observées dans l'expression des gènes. Il s'agit d'un mécanisme de régulation décrivant les changements moléculaires qui se produisent dans un organisme en réponse aux variations des conditions environnementales à court et moyen terme (Raven 2003). Il est donc compréhensible que les capacités acquises par les cellules algales au cours de cette période aient régi l'expression des gènes étudiés. Plus spécifiquement, l'analyse de l'expression de ses gènes nous a montré que la ferroxidase FOX1 et la perméase FTR1 pourraient être une explication plausible de l'augmentation du taux de prise en charge de Cu^{2+} . Ces enzymes sont connues pour jouer un rôle dans les voies d'assimilation du Fe^{3+} à haute affinité. De plus, FOX1 est une enzyme dont l'activité dépend fortement de son cofacteur Cu^{2+} .

À l'instar de certaines diatomées océaniques (Annett *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2006), nos résultats montrent que la demande en Cu du phytoplancton d'eau douce comme *C. reinhardtii* pourrait s'accroître et atteindre un niveau toxique si le milieu devient déficient en Fe et que leur séjour dans ce dernier milieu se poursuit. C'est ce qui pourrait se passer dans les systèmes aquatiques continentaux, très souvent vulnérables aux

Discussion générale

perturbations externes et dont la composition en micronutriments peut donc subir des variations dont l'ampleur dépend non seulement de la source de perturbation, mais aussi du pouvoir tampon du système. Les concentrations testées au laboratoire étant pertinentes d'un point de vue environnemental, on s'attend donc à obtenir des tendances similaires sur le terrain. Dans les Grands Lacs où la concentration en Cu est souvent stable (entre 6 et 12 nM), celle du Fe a une grande amplitude de variation (entre 3 et 300 nM) (Twiss *et al.*, 2005; Twiss *et al.*, 2004). Un changement qui affecterait la spéciation du Fe de sorte à le rendre moins biodisponible aboutirait donc à une forte accumulation du Cu dans les organismes aquatiques qui mobiliseront leurs propres mécanismes pour y faire face. Nos résultats apportent donc une nouvelle compréhension sur le cycle biogéochimique de ces deux éléments dans les eaux naturelles dont la portée réelle reste à appréhender notamment en y intégrant les impacts des changements globaux en cours. D'autres investigations sur les questions restées en suspens apporteront plus de lumière sur les interactions entre le Fe et le Cu dans les phytoplanctons d'eau douce.

3.4 Conclusion générale

Le BLM est un outil en constante amélioration et gagne davantage en complexité et en pertinence au fil du temps. Bien que des paramètres importants tels que le pH, la matière organique et les cations majeurs soient désormais pris en compte, plusieurs autres facteurs doivent encore y être intégrés pour mieux l'affiner compte tenu de leurs impacts sur la biodisponibilité des métaux (Mebane *et al.*, 2020). La présente thèse vise à contribuer à cet objectif en démontrant plus spécifiquement que le fer peut moduler l'homéostasie du cuivre. Nous avons montré qu'un changement des conditions du milieu en fer peut modifier les paramètres des transporteurs membranaires du cuivre de même que son destin intracellulaire. Compte tenu de l'importance de ces transporteurs dans l'homéostasie du cuivre, la prise en compte des facteurs (comme les micronutriments) susceptibles de les affecter devrait contribuer à améliorer les prévisions de toxicité du cuivre par le MLB. C'est le cas du fer dont l'abondance dans les eaux douces est toujours importante, contrairement aux eaux marines, mais les concentrations de fer libre attendues dans les eaux de surface peuvent varier selon le pH (par exemple, lorsque le pH augmente de 6 à 8) entre 10^{-14} et 10^{-20} M (Lofts *et al.*, 2008). Il est donc pertinent de conclure que la toxicité

Discussion générale

du cuivre dans les eaux naturelles peut être modulée par la géochimie du fer. Le MLB devra donc, dans certaines conditions, être davantage développé pour tenir compte de l'influence d'autres paramètres du milieu comme la biogéochimie des micronutriments comme le Fe.

Références bibliographiques

4. Références bibliographiques

- Ablain J & Zon LI (2013) Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biol.* 23(12):584-586. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.09.009.
- Adams W, Blust R, Dwyer R, Mount D, Nordheim E, Rodriguez PH & Spry D (2020) Bioavailability assessment of metals in freshwater environments: A historical review. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(1):48-59. DOI: 10.1002/etc.4558.
- Adediran SA & Kramer JR (1987) Copper adsorption on clay, iron-manganese oxide and organic fractions along a salinity gradient. *Appl. Geochem.* 2(2):213-216. DOI: 10.1016/0883-2927(87)90035-7.
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle GUY, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW & Taylor MFJR (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(5):399-451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Aharchaou I, Rosabal M, Liu F, Battaglia E, Vignati DAL & Fortin C (2017) Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 182:49-57. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.11.004.
- Ahner BA, Kong S & Morel FM (1995) Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol. Oceanogr.* 40(4):649-657. DOI: 10.4319/lo.1995.40.4.0649.
- Aitchison L (1960) *A history of metals*. MacDonald & Evans ; Interscience Publishers. Inc. , London and New York, United Kingdom and United States
- Allen AE, LaRoche J, Maheswari U, Lommer M, Schauer N, Lopez PJ, Finazzi G, Fernie AR & Bowler C (2008) Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(30):10438-10443. DOI: 10.1073/pnas.0711370105.
- Allen HE & Hansen DJ (1996) The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research* 68(1):42-54.
- Allen MD, del Campo JA, Kropat J & Merchant SS (2007a) FEA1, FEA2, and FRE1, encoding two homologous secreted proteins and a candidate ferrireductase, are expressed

Références bibliographiques

- coordinately with FOX1 and FTR1 in iron-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 6(10):1841–1852. DOI: 10.1128/EC.00205-07.
- Allen MD, Kropat J, Tottey S, Del Campo JA & Merchant SS (2007b) Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiol.* 143(1):263. DOI: 10.1104/pp.106.088609.
- Angel BM, Simpson SL, Granger E, Goodwyn K & Jolley DF (2017) Time-averaged concentrations are effective for predicting chronic toxicity of varying copper pulse exposures for two freshwater green algae species. *Environ Pollut* 230:787-797. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.07.013.
- Annett AL, Lapi S, Ruth TJ & Maldonado MT (2008) The effects of Cu and Fe availability on the growth and Cu:C ratios of marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 53(6):2451-2461. DOI: 10.4319/lo.2008.53.6.2451.
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE & Bechner M (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306(5693):79-86. DOI: 10.1126/science.1101156.
- Arnon DI & Stout PR (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 14(2):371-375. DOI: 10.1104/pp.14.2.371.
- Arredondo M & Núñez MT (2005) Iron and copper metabolism. *Mol. Asp. Med.* 26(4):313-327. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.010.
- Asada K, Yoshikawa K, Takahashi M, Maeda Y & Enmanji K (1975) Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* 250(8):2801-2807. DOI: 1975 Apr 25;250(8):2801-7.
- Axelsen KB & Palmgren MG (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126(2):696-706. DOI: 10.1104/pp.126.2.696.
- Balamurugan K & Schaffner W (2006) Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta* 1763(7):737-746. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.001.
- Balzano S, Sardo A, Blasio M, Chahine TB, Dell'Anno F, Sansone C & Brunet C (2020) Microalgal metallothioneins and phytochelatins and their potential use in bioremediation. *Front. Microbiol.* 11(517):517-517. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00517.
- Banci L, Bertini I, Cantini F & Ciofi-Baffoni S (2010) Cellular copper distribution: A mechanistic systems biology approach. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(15):2563-2589. DOI: 10.1007/s00018-010-0330-x.

Références bibliographiques

- Batley GE, Apte SC & Stauber JL (2004) Speciation and bioavailability of trace metals in water: progress since 1982. *Aust. J. Chem.* 57(10):903-919. DOI: 10.1071/CH04095.
- Berry LG & Mason B (1961) *Mineralogy: Concepts, descriptions, determinations*. W.H. Freeman, San Francisco and London. 612 p
- Bervoets L & Blust R (2003) Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ. Pollut.* 126(1):9-19. DOI: 10.1016/S0269-7491(03)00173-8.
- Bird AJ (2015) Cellular sensing and transport of metal ions: implications in micronutrient homeostasis. *J. Nutr. Biochem.* 26(11):1103-1115. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.002.
- Blaby-Haas CE & Merchant SS (2012) The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1823(9):1531-1552. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.010.
- Blaby-Haas CE & Merchant SS (2013) Iron sparing and recycling in a compartmentalized cell. *Curr. Opin. Microbiol.* 16(6):677-685. DOI: 10.1016/j.mib.2013.07.019.
- Blaby-Haas CE & Merchant SS (2017) Regulating cellular trace metal economy in algae. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39(Supplement C):88-96. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.06.005.
- Blaby-Haas CE, Padilla-Benavides T, Stübe R, Argüello JM & Merchant SS (2014) Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(50):E5480-E5487. DOI: 10.1073/pnas.1421545111.
- Blanchard J & Grosell M (2005) Effects of salinity on copper accumulation in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24(6):1403-1413. DOI: 10.1897/04-373r.1.
- Bopp SK, Abicht HK & Knauer K (2008) Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* 86(2):197-204. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.10.014.
- Bossuyt BTA & Janssen CR (2004) Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquat. Toxicol.* 68(1):61-74. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.02.005.
- Boullemant A, Lavoie M, Fortin C & Campbell PGC (2009) Uptake of hydrophobic metal complexes by three freshwater algae: Unexpected influence of pH. *Environ. Sci. Technol.* 43(9):3308-3314. DOI: 10.1021/es802832u.
- Bouyssiere B, Lobinski R & Szpunar J (2003) Hyphenated techniques in environmental speciation analysis. *Spectroscopy*, Vol 8. p 391-410.
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F & Otillar RP (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456:239–244. DOI: 10.1038/nature07410.

Références bibliographiques

- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D & Asada K (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13(3):199-218. DOI: 10.1080/07352689409701914.
- Bradl H (2005) *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation*. Academic Press, First edition 2005. 282 p
- Brix KV, DeForest DK, Tear L, Peijnenburg W, Peters A, Middleton ET & Erickson R (2020) Development of empirical bioavailability models for metals. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(1):85-100. DOI: 10.1002/etc.4570.
- Brix KV, Tellis MS, Crémazy A & Wood CM (2017) Characterization of the effects of binary metal mixtures on short-term uptake of Cd, Pb, and Zn by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 193:217-227. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.10.015.
- Brouwer M, Brouwer TH, Grater W & Brown-Peterson N (2003) Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem. J.* 374(1):219-228. DOI: 10.1042/BJ20030272.
- Brown PL & Markich SJ (2000) Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: Extension of the conceptual model. *Aquat. Toxicol.* 51(2):177-194.
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM & Pilon M (2009) Copper homeostasis. *New Phytol.* 182(4):799-816. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x.
- Campbell PGC (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Tessier A & Turner DR (Édit.) John Wiley & Sons, New York, NY, U.S.A. p 45-102.
- Campbell PGC, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP & Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 133(1–2):189-206. DOI: 10.1016/S1532-0456(02)00104-7.
- Campbell PGC, Giguère A, Bonneris E & Hare L (2005) Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms—the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat. Toxicol.* 72(1):83-97. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.11.023.
- Campbell PGC & Hare L (2009) Metal detoxification in freshwater animals. Roles of metallothioneins. *Metallothioneins and Related Chelators: Metal Ions in Life Sciences*, Sigel A, Sigel H & Sigel RKO (Édit.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge Vol 5. p 239-277. DOI: 10.1039/9781847559531-00239.

Références bibliographiques

- Campbell PGC, Kraemer LD, Giguère A, Hare L & Hontela A (2008) Subcellular distribution of cadmium and nickel in chronically exposed wild fish: Inferences regarding metal detoxification strategies and implications for setting water quality guidelines for dissolved metals. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14(2):290-316. DOI: 10.1080/10807030801935009.
- Campbell PGC & Stokes PM (1985) Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42(12):2034-2049. DOI: 10.1139/f85-251.
- Cardon P-Y, Triffault-Bouchet G, Caron A, Rosabal M, Fortin C & Amyot M (2019) Toxicity and subcellular fractionation of yttrium in three freshwater organisms: *Daphnia magna*, *Chironomus riparius*, and *Oncorhynchus mykiss*. *ACS Omega* 4(9):13747-13755. DOI: 10.1021/acsomega.9b01238.
- Castruita M, Casero D, Karpowicz SJ, Kropat J, Vieler A, Hsieh SI, Yan W, Cokus S, Loo JA, Benning C, Pellegrini M & Merchant SS (2011) Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell* 23(4):1273-1292. DOI: 10.1105/tpc.111.084400.
- Chan ACK, Lin H, Koch D, Grass G, Nies DH & Murphy MEP (2020) A copper site is required for iron transport by the periplasmic proteins P19 and FetP. *Metallomics* 12(10):1530-1541. DOI: 10.1039/D0MT00130A.
- Chen J-C, Hsieh SI, Kropat J & Merchant SS (2008) A ferroxidase encoded by FOX1 contributes to iron assimilation under conditions of poor iron nutrition in *Chlamydomonas*. *Eukaryot. Cell* 7(3):541-545. DOI: 10.1128/EC.00463-07.
- Chen Y, Shi J, Tian G, Zheng S & Lin Q (2004) Fe deficiency induces Cu uptake and accumulation in *Commelina communis*. *Plant Sci.* 166(5):1371-1377. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.01.018.
- Chen Z, Zhu L & Wilkinson KJ (2010) Validation of the biotic ligand model in metal mixtures: bioaccumulation of lead and copper. *Environ. Sci. Technol.* 44(9):3580-3586. DOI: 10.1021/es1003457.
- Chowdhury MJ & Blust R (2001) A mechanistic model for the uptake of waterborne strontium in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Sci. Technol.* 35(4):669-675. DOI: 10.1021/es000142t.
- Cobbett C & Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53(1):159-182. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154.

Références bibliographiques

- Cobbett CS (1999) A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci.* 4(9):335-337. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01465-X.
- Cobbett CS (2000a) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3(3):211-216. DOI: 10.1104/pp.123.3.825.
- Cobbett CS (2000b) Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123(3):825-832. DOI: 10.1104/pp.123.3.825.
- Cobbett CS, Hussain D & Haydon MJ (2003) Structural and functional relationships between type 1B heavy metal-transporting P-type ATPases in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 159(2):315-321. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00785.x.
- Connon RE, Geist J & Werner I (2012) Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12(9):12741-12771. DOI: 10.3390/s120912741.
- Cramb AW (1996) *A short history of metals*. Carnegie Mellon University, Department of Materials Science and Engineering. <http://www.cdagro.com/history/metals.html>
- Crémazy A, Campbell P & Fortin C (2013a) The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: Possible role of hydroxo-species. *Environ. Sci. Technol.* 47:2408-2415. DOI: 10.1021/es3038388.
- Crémazy A, Levy JL, Campbell PGC & Fortin C (2013b) Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: Comparison between Al and Sc. *BioMetals* 26(6):989-1001. DOI: 10.1007/s10534-013-9675-6.
- Crist RH, Oberholser K, Schwartz D, Marzoff J, Ryder D & Crist DR (1988) Interactions of metals and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.* 22(7):755-760. DOI: 10.1021/es00172a002.
- Croot PL, Karlson B, van Elteren JT & Kroon JJ (1999) Uptake of ⁶⁴Cu-oxine by marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* 33(20):3615-3621. DOI: 10.1021/es9807901.
- Cuss CW, Glover CN, Javed MB, Nagel A & Shotyk W (2020) Geochemical and biological controls on the ecological relevance of total, dissolved, and colloidal forms of trace elements in large boreal rivers: review and case studies. *Environ. Rev.* 28(2):138-163. DOI: 10.1139/er-2019-0014.
- Dameron CT & Harrison MD (1998) Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(5):1091S-1097S.
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J & Klausner RD (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected

Références bibliographiques

- role for copper in iron transport. *Cell* 76(2):393-402. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90345-X.
- de Romaña DL, Olivares M, Uauy R & Araya M (2011) Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25(1):3-13. DOI: 10.1016/j.jtemb.2010.11.004.
- De Schamphelaere KAC & Janssen CR (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(1):48-54. DOI: 10.1021/es000253s.
- De Schamphelaere KAC & Janssen CR (2006) Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 40(14):4514-4522. DOI: 10.1021/es0525051.
- De Schamphelaere KAC, Stauber JL, Wilde KL, Markich SJ, Brown PL, Franklin NM, Creighton NM & Janssen CR (2005) Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu^{2+} -ion activity when pH is varied. *Environ. Sci. Technol.* 39(7):2067-2072. DOI: 10.1021/es049256l.
- De Schamphelaere KAC, Vasconcelos FM, Heijerick DG, Tack FMG, Delbeke K, Allen HE & Janssen CR (2003) Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(10):2454-2465. DOI: 10.1897/02-499.
- Decker H & Terwilliger N (2000) Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* 203(12):1777-1782. DOI: 10.1242/jeb.203.12.1777.
- Deleebeeck NME, De Schamphelaere KAC & Janssen CR (2007) A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(1):1-13. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.10.001.
- Deleebeeck NME, De Schamphelaere KAC & Janssen CR (2009) Effects of Mg^{2+} and H^{+} on the toxicity of Ni^{2+} to the unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Model development and validation with surface waters. *Sci. Total Environ.* 407(6):1901-1914. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.052.
- Di Bonito M, Lofts S & Groenenberg JE (2018) Models of geochemical speciation: Structure and applications. *Environmental Geochemistry*, Vivo BD, Belkin HE & Lima A (Édit.) Elsevier, 2nd Ed. p 237-305. DOI: 10.1016/B978-0-444-63763-5.00012-4.

Références bibliographiques

- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR & Santore RC (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(10):2383-2396. DOI: 10.1002/etc.5620201034.
- Díaz-Quintana A, Navarro JA, Hervás M, Molina-Heredia FP, De la Cerda B & De la Rosa MA (2003) A comparative structural and functional analysis of cyanobacterial plastocyanin and cytochrome c6 as alternative electron donors to photosystem I. *Photosynthesis Res.* 75(2):97-110. DOI: 10.1023/A:1022841513592.
- Docampo R (2006) Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules. *Inclusions in Prokaryotes*, Shively JM (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p 53-70. DOI: 10.1007/3-540-33774-1_3.
- Doerr LH (2018) Cu in biology: Unleashed by O₂ and now irreplaceable. *Inorg. Chim. Acta* 481:4-24. DOI: 10.1016/j.ica.2017.11.051.
- Duval JFL (2016) Coupled metal partitioning dynamics and toxicodynamics at biointerfaces: A theory beyond the biotic ligand model framework. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18(14):9453-9469. DOI: 10.1039/C5CP07780J.
- Eckhardt U & Buckhout TJ (1998) Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to strategy I higher plants. *J. Exp. Bot.* 49(324):1219-1226. DOI: 10.1093/jxb/49.324.1219.
- Egorova KS & Ananikov VP (2017) Toxicity of metal compounds: Knowledge and myths. *Organometallics* 36(21):4071-4090. DOI: 10.1021/acs.organomet.7b00605.
- Ellingsen DG, Horn N & Aaseth JAN (2007) Copper. *Handbook on the Toxicology of Metals*, Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M & Friberg LT (Édit.) Academic Press, Burlington 3rd Ed. p 529-546. DOI: 10.1016/B978-012369413-3/50081-1.
- Eriksen RS, Mackey DJ, van Dam R & Nowak B (2001) Copper speciation and toxicity in Macquarie Harbour, Tasmania: An investigation using a copper ion selective electrode. *Mar. Chem.* 74(2-3):99-113. DOI: 10.1016/S0304-4203(00)00117-1.
- Eriksson M, Moseley JL, Tottey S, del Campo JA, Quinn J, Kim Y & Merchant S (2004) Genetic dissection of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* distinguishes regulatory and target genes. *Genetics* 168(2):795-807. DOI: 10.1534/genetics.104.030460.
- Errecalde O, Seidl M & Campbell PGC (1998) Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model. *Water Res.* 32(2):419-429. DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00282-0.

Références bibliographiques

- Fein JB (2017) Advanced biotic ligand models: Using surface complexation modeling to quantify metal bioavailability to bacteria in geologic systems. *Chem. Geol.* 464:127-136. DOI: 10.1016/j.chemgeo.2016.10.001.
- Ferrante P, Catalanotti C, Bonente G & Giuliano G (2008) An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLOS One* 3(9):e3200. DOI: 10.1371/journal.pone.0003200.
- Festa RA & Thiele DJ (2011) Copper: An essential metal in biology. *Curr. Biol.* 21(21):R877-R883. DOI: 10.1016/j.cub.2011.09.040.
- Flemming CA & Trevors JT (1989) Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water Air Soil Pollut.* 44(1):143-158. DOI: 10.1007/bf00228784.
- Florence TM, Stauber JL & Ahsanullah M (1994) Toxicity of nickel ores to marine organisms. *Sci. Total Environ.* 148(2):139-155. DOI: 10.1016/0048-9697(94)90391-3.
- Fogg GE & Westlake DF (1953) The importance of extracellular products of algae in freshwater. *SIL Proceedings, 1922-2010* 12(1):219-232. DOI: 10.1080/03680770.1950.11895289.
- Fortin C & Campbell PGC (2000) Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(11):2769-2778. DOI: 10.1002/etc.5620191123.
- Fortin C & Campbell PGC (2001) Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.* 35(11):2214-2218. DOI: 10.1021/es0017965.
- Fortin C, Denison FH & Garnier-Laplace J (2007) Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(2):242-248. DOI: 10.1897/06-298R.1.
- Foster PL & Morel FMM (1982) Reversal of cadmium toxicity in a diatom: An interaction between cadmium activity and iron. *Limnol. Oceanogr.* 27(4):745-752. DOI: 10.4319/lo.1982.27.4.0745.
- François L, Fortin C & Campbell PGC (2007) pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* 84(2):123-132. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.02.019.
- Franklin NM, Stauber JL, Apte SC & Lim RP (2002) Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(4):742-751. DOI: 10.1002/etc.5620210409.

Références bibliographiques

- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ & Lim RP (2000) pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquat. Toxicol.* 48(2-3):275-289. DOI: 10.1016/S0166-445X(99)00042-9.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z & Jore D (2003) Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique* :91-96.
- Gaur JP & Rai LC (2001) Heavy metal tolerance in algae. *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*, Rai LC & Gaur JP (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p 363-388. DOI: 10.1007/978-3-642-59491-5_12.
- Gayomba S, Zhai Z, Jung H-i & Vatamaniuk O (2015) Local and systemic signaling of iron status and its interactions with homeostasis of other essential elements. *Front. Plant Sci.* 6(716). DOI: 10.3389/fpls.2015.00716.
- Gensemer RW, Naddy RB, Stubblefield WA, Hockett JR, Santore R & Paquin P (2002) Evaluating the role of ion composition on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia* in very hard waters. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 133(1):87-97. DOI: 10.1016/S1532-0456(02)00086-8.
- Genter RB (1996) Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. *Algal Ecology*, Stevenson RJ, Bothwell ML & Lowe RL (Édit.) Academic Press, San Diego. p 403-468. DOI: 10.1016/B978-012668450-6/50043-6.
- Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS & Alexandraki D (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272(21):13786-13792. DOI: 10.1074/jbc.272.21.13786.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L & Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 77(2):178-189. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.12.001.
- Glaesener AG, Merchant SS & Blaby-Haas CE (2013) Iron economy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Plant Sci.* 4(337):1-12. DOI: 10.3389/fpls.2013.00337.
- Gray HB, Malmström BG & Williams R (2000) Copper coordination in blue proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5(5):551-559. DOI: 10.1007/s007750000146.
- Grill E, Winnacker E-L & Zenk MH (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84(2):439-443.

Références bibliographiques

- Grosell MH, Hogstrand C & Wood CM (1997) Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 38(4):257-276. DOI: 10.1016/S0166-445X(96)00843-0.
- Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO & Winge DR (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 275(41):32310-32316. DOI: 10.1074/jbc.M005946200.
- Grotz N & Guerinot ML (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1763(7):595-608. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.014.
- Gulec S & Collins JF (2014) Molecular mediators governing iron-copper interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 34:95-116. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071812-161215.
- Guo J, Annett AL, Taylor RL, Lapi S, Ruth TJ & Maldonado MT (2010) Copper-uptake kinetics of coastal and oceanic diatoms. *J. Phycol.* 46(6):1218-1228. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00911.x.
- Habashi F (2008) The seven metals of antiquity. *Miner. Process. Extr. Metall.* 117(3):190-191. DOI: 10.1179/174328508X361200.
- Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T & Gerber AP (2008) Post-transcriptional gene regulation: From genome-wide studies to principles. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(5):798. DOI: 10.1007/s00018-007-7447-6.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53(366):1-11. DOI: 10.1093/jexbot/53.366.1.
- Handing KB, Niedzialkowska E, Shabalin IG, Kuhn ML, Zheng H & Minor W (2018) Characterizing metal-binding sites in proteins with X-ray crystallography. *Nat. Protoc.* 13(5):1062-1090. DOI: 10.1038/nprot.2018.018.
- Hanikenne M (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol.* 159(2):331-340. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00788.x.
- Hanikenne M, Merchant SS & Hamel P (2009) Transition metal nutrition: a balance between deficiency and toxicity. *The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes*, 2, Stern DB & Witman GB (Édit.) Academic Press, London, Second Ed Vol 2, p 333-399. DOI: 10.1016/B978-0-12-370873-1.00018-6.
- Haraguchi H (2017) Metallomics: The history over the last decade and a future outlook. *Metallomics* 9(8):1001-1013. DOI: 10.1039/C7MT00023E.

Références bibliographiques

- Haraguchi H, Ishii A, Hasegawa T, Matsuura H & Umemura T (2008) Metallomics study on all-elements analysis of salmon egg cells and fractionation analysis of metals in cell cytoplasm. *Pure Appl. Chem.* 80(12):2595-2608. DOI: 10.1351/pac200880122595.
- Harris EH (2009) *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. Elsevier Science. <https://books.google.ca/books?id=xTjJGV5GWY0C>
- Harris ZL & Gitlin JD (1996) Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63(5):836S-841S. DOI: 10.1093/ajcn/63.5.836.
- Harrison GI & Morel FMM (1983) Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Phycol.* 19(4):495-507. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1983.00495.x.
- Hassler C, Slaveykova V & Wilkinson K (2004) Discriminating between intra-and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2(7):237 - 247. DOI: 10.4319/lom.2004.2.237.
- Hassler CS & Wilkinson KJ (2003) Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(3):620-626. DOI: 10.1002/etc.5620220322.
- Hennigar SR & McClung JP (2015) Homeostatic regulation of trace mineral transport by ubiquitination of membrane transporters. *Nutr. Rev.* 74(1):59-67. DOI: 10.1093/nutrit/nuv060.
- Herbik A, Bölling C & Buckhout TJ (2002) The involvement of a multicopper oxidase in iron uptake by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 130(4):2039-2048. DOI: 10.1104/pp.013060.
- Hill CH & Matrone G (1970) Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Fed. Proc.* 29(4):1474-1481.
- Hill KL, Hassett R, Kosman D & Merchant S (1996) Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant Physiol.* 112(2):697-704. DOI: 10.1104/pp.112.2.697.
- Hodgson E (2004) *A Textbook of Modern Toxicology*. Wiley, 3. <https://books.google.com/books?id=lr0s5OSkCrkC>
- Hodgson E & Dow RE (2015) *Dictionary of toxicology*. Macmillan Reference London, UK, Elsevier Science, Academic Press
- Hong-Hermesdorf A, Miethke M, Gallaher SD, Kropat J, Dodani SC, Chan J, Barupala D, Domaille DW, Shirasaki DI, Loo JA, Weber PK, Pett-Ridge J, Stemmler TL, Chang CJ & Merchant SS (2014) Subcellular metal imaging identifies dynamic sites of Cu

Références bibliographiques

- accumulation in *Chlamydomonas*. *Nat. Chem. Biol.* 10(12):1034-1042. DOI: 10.1038/nchembio.1662.
- Hsieh SI, Castruita M, Malasarn D, Urzica E, Erde J, Page MD, Yamasaki H, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS & Loo JA (2013) The proteome of copper, iron, zinc, and manganese micronutrient deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Proteomics* 12(1):65-86. DOI: 10.1074/mcp.M112.021840.
- Huang Z, Li L, Huang G, Yan Q, Shi B & Xu X (2009) Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquat. Toxicol.* 91(1):54-61. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.10.003.
- Janssen CR, Heijerick DG, De Schamphelaere KAC & Allen HE (2003) Environmental risk assessment of metals: Tools for incorporating bioavailability. *Environ. Int.* 28(8):793-800. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00126-5.
- Johnsson L (2005) Essential trace elements and food quality. *Essential trace elements for plants, animals and humans. NJF Seminar.* p 15-17.
- Jones GJ, Palenik BP & Morel FMM (1987) Trace metal reduction by phytoplankton: The role of plasmalemma redox enzymes. *J. Phycol.* 23:237-244. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1987.tb04131.x.
- Kamunde C, Grosell M, Higgs D & Wood CM (2002) Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Interactions between dietary and waterborne copper uptake. *J. Exp. Biol.* 205(Pt2):279-290.
- Kathir P, LaVoie M, Brazelton WJ, Haas NA, Lefebvre PA & Silflow CD (2003) Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. *Eukaryot. Cell* 2(2):362-379. DOI: 10.1128/EC.2.2.362-379.2003.
- Kim JK, Lee C, Lim SW, Adhikari A, Andring JT, McKenna R, Ghim C-M & Kim CU (2020) Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis. *Nat. Commun.* 11(1):4557. DOI: 10.1038/s41467-020-18425-5.
- Kim Tiam S, Feurtet-Mazel A, Delmas F, Mazzella N, Morin S, Daffe G & Gonzalez P (2012) Development of q-PCR approaches to assess water quality: Effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*. *Water Res.* 46(4):934-942. DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.005.
- Klaassen CD (2013) *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill Professional, New York, 8th Ed. 1454 p
- Kleczkowski M & Garncarz M (2012) The role of metal ions in biological oxidation-the past and the present. *Pol. J. Vet. Sci.* 15(1):165-173. DOI: 10.2478/v10181-011-0130-8.

Références bibliographiques

- Klee RJ & Graedel TE (2004) Elemental Cycles: A status report on human or natural dominance. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 29(1):69-107. DOI: 10.1146/annurev.energy.29.042203.104034.
- Knauer K, Behra R & Sigg L (1997a) Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (chlorophyta). *J. Phycol.* 33(4):596-601. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1997.00596.x.
- Knauer K, Behra R & Sigg L (1997b) Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(2):220-229. DOI: 10.1002/etc.5620160218.
- Knauert S & Knauer K (2008) The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *J. Phycol.* 44(2):311-319. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2008.00471.x.
- Koch KA, Peña MMO & Thiele DJ (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem. Biol.* 4(8):549-560. DOI: 10.1016/S1074-5521(97)90241-6.
- Kochoni E & Fortin C (2019) Iron modulation of copper uptake and toxicity in a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*). *Environ. Sci. Technol.* 53(11):6539-6545. DOI: 10.1021/acs.est.9b01369.
- Krämer U, Talke IN & Hanikenne M (2007) Transition metal transport. *FEBS Lett.* 581(12):2263-2272. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.010.
- Kropat J, Gallaher SD, Urzica EI, Nakamoto SS, Strenkert D, Tottey S, Mason AZ & Merchant SS (2015) Copper economy in *Chlamydomonas*: Prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(9):2644-2651. DOI: 10.1073/pnas.1422492112.
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P & Merchant S (2005) A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(51):18730-18735. DOI: 10.1073/pnas.0507693102.
- Kulakovskaya T (2018) Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34(9):139. DOI: 10.1007/s11274-018-2523-7.
- Küpper H, Jie Zhao F & McGrath SP (1999) Cellular Compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 119(1):305-312. DOI: 10.1104/pp.119.1.305.

Références bibliographiques

- La Fontaine S, Quinn J & Merchant S (2002a) Comparative analysis of copper and iron metabolism in photosynthetic eukaryotes vs yeast and mammals. *Handbook of copper pharmacology and toxicology*, E.J. M (Édit.) Springer, Humana Press, Totowa, NJ. p 481-502. DOI: 10.1007/978-1-59259-288-3_30.
- La Fontaine S, Quinn JM, Nakamoto SS, Page MD, Göhre V, Moseley JL, Kropat J & Merchant S (2002b) Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 1(5):736-757. DOI: 10.1128/EC.1.5.736-757.2002.
- Labbé S & Thiele DJ (1999) Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiol.* 7(12):500-505. DOI: 10.1016/S0966-842X(99)01638-8.
- Laliberte J & Labbe S (2008) The molecular bases for copper uptake and distribution: Lessons from yeast. *Med. Sci.* 24(3):277-283. DOI: 10.1051/medsci/2008243277.
- Lane ES, Jang K, Cullen JT & Maldonado MT (2008) The interaction between inorganic iron and cadmium uptake in the marine diatom *Thalassiosira oceanica*. *Limnol. Oceanogr.* 53(5):1784-1789. DOI: 10.4319/lo.2008.53.5.1784.
- Lanno RP, Slinger SJ & Hilton JW (1985) Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 49(3-4):257-268. DOI: 10.1016/0044-8486(85)90084-5.
- Lavoie M (2012) *Effets des métaux traces essentiels et du calcium sur l'accumulation et la toxicité du cadmium chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii: inclusion des interactions physiologiques algales dans le modèle du ligand biotique*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec). 150 p.
<http://espace.inrs.ca/1826/>
- Lavoie M, Bernier J, Fortin C & Campbell PGC (2009a) Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: Implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7(4):277-286. DOI: 10.4319/lom.2009.7.277.
- Lavoie M, Campbell P & Fortin C (2016a) Importance de mieux connaître les mécanismes de transport des métaux pour la prédiction de l'accumulation et de la toxicité des métaux dissous chez le phytoplancton : Récentes avancées et défis pour le développement du modèle du ligand biotique. *Rev. Sci. l'Eau* 29(2):119-147. DOI: 10.7202/1036544ar.
- Lavoie M, Campbell PGC & Fortin C (2012a) Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga. *Environ. Sci. Technol.* 46(21):12129-12136. DOI: 10.1021/es302512r.

Références bibliographiques

- Lavoie M, Fortin C & Campbell PGC (2012b) Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 31(7):1445-1452. DOI: 10.1002/etc.1855.
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell PGC (2009b) Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.* 92(2):65-75. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.12.007.
- Lavoie M, Raven JA, Jones OAH & Qian H (2016b) Energy cost of intracellular metal and metalloid detoxification in wild-type eukaryotic phytoplankton. *Metallomics*. DOI: 10.1039/C6MT00049E.
- Lee D-Y, Fortin C & Campbell PG (2005a) Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 75(2):127-135. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.06.011.
- Lee J, Adle D & Kim H (2005b) Molecular mechanisms of copper homeostasis in yeast. *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification*, Springer. p 1-36.
- Lee J & Thiele DJ (2000) Regulation and function of the copper ion transport machinery. *Trace Elements in Man and Animals 10*, Roussel AM, Anderson RA & Favrier AE (Édit.) Springer US, Boston, MA. p 15-20. DOI: 10.1007/0-306-47466-2_3.
- Lewis AG (1995) The biological importance of copper in the sea. A literature review.), p 106.
- Li Z-S, Lu Y-P, Zhen R-G, Szczypka M, Thiele DJ & Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(1):42-47. DOI: 10.1073/pnas.94.1.42.
- Linder MC (1991) *Biochemistry of copper*. Springer Science & Business Media, New York, 1. XIV, 526 p. <https://www.springer.com/gp/book/9780306436581>
- Liu Q, Zhou L, Liu F, Fortin C, Tan Y, Huang L & Campbell PGC (2019) Uptake and subcellular distribution of aluminum in a marine diatom. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169:85-92. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.095.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25(4):402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lloyd DR & Phillips DH (1999) Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: Evidence for site-specific mechanisms in the formation of

Références bibliographiques

- double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res.* 424(1-2):23-36. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00005-6.
- Lofts S, Tipping E & Hamilton-Taylor J (2008) The chemical speciation of Fe(III) in freshwaters. *Aquat. Geochem.* 14(4):337-358. DOI: 10.1007/s10498-008-9040-5.
- Lombardi AT, Hidalgo TMdR, Vieira AAH & Sartori AL (2007) Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia* 46(1):74-78. DOI: 10.2216/06-40.1.
- Lommer M, Specht M, Roy A-S, Kraemer L, Andreson R, Gutowska MA, Wolf J, Bergner SV, Schilhabel MB, Klostermeier UC, Beiko RG, Rosenstiel P, Hippler M & LaRoche J (2012) Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biol.* 13(7):R66-R66. DOI: 10.1186/gb-2012-13-7-r66.
- Macfie SM, Tarmohamed Y & Welbourn PM (1994) Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27(4):454-458. DOI: 10.1007/BF00214835.
- Magnus KA, Ton-That H & Carpenter JE (1994) Recent structural work on the oxygen transport protein hemocyanin. *Chem. Rev.* 94(3):727-735. DOI: 10.1021/cr00027a009.
- Malasarn D, Kropat J, Hsieh SI, Finazzi G, Casero D, Loo JA, Pellegrini M, Wollman F-A & Merchant SS (2013) Zinc deficiency impacts CO₂ assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 288(15):10672-10683. DOI: 10.1074/jbc.m113.455105.
- Maldonado MT, Allen AE, Chong JS, Lin K, Leus D, Karpenko N & Harris SL (2006) Copper-dependent iron transport in coastal and oceanic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 51(4):1729–1743. DOI: 10.4319/lo.2006.51.4.1729.
- Malkin R & Malmström BG (1970) The state and function of copper in biological systems. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 33:177-244. DOI: 10.1002/9780470122785.ch4.
- Maloney F (2007) *Influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce Pseudokirchneriella subcapitata*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec). 138 p. <http://espace.inrs.ca/447/>
- Manahan SE (1993) *Fundamentals of environmental chemistry*. CRC Press, 1st Ed. 864 p
- Mangal V, Phung T, Nguyen TQ & Guéguen C (2019) Molecular characterization of mercury binding ligands released by freshwater algae grown at three photoperiods. *Front. Environ. Sci.* 6(155). DOI: 10.3389/fenvs.2018.00155.

Références bibliographiques

- Marchand J, Heydarizadeh P, Schoefs B & Spetea C (2018) Ion and metabolite transport in the chloroplast of algae: Lessons from land plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 75(12):2153-2176. DOI: 10.1007/s00018-018-2793-0.
- Marchetti A & Maldonado MT (2016) Iron. *The Physiology of Microalgae*, 6), Borowitzka MA, Beardall J & Raven JA (Édit.) Springer International Publishing, Cham. p 233-279. DOI: 10.1007/978-3-319-24945-2_11.
- Mason AZ & Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Tessier A & Turner DR (Édit.) John Wiley & Sons, Chichester Vol 3. p 479-578.
- Matsumura H, Kai A, Maeda T, Tamoi M, Satoh A, Tamura H, Hirose M, Ogawa T, Kizu N, Wadano A, Inoue T & Shigeoka S (2011) Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity via the intrinsically disordered protein CP12. *Structure* 19(12):1846-1854. DOI: 10.1016/j.str.2011.08.016.
- McIntyre AM & Guéguen C (2013) Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions. *Chemosphere* 90(2):620-626. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.08.057.
- McIntyre JK, Baldwin DH, Meador JP & Scholz NL (2008) Chemosensory deprivation in juvenile coho salmon exposed to dissolved copper under varying water chemistry conditions. *Environ. Sci. Technol.* 42(4):1352-1358. DOI: 10.1021/es071603e.
- Mebane CA, Chowdhury MJ, De Schamphelaere KAC, Lofts S, Paquin PR, Santore RC & Wood CM (2020) Metal bioavailability models: Current status, lessons learned, considerations for regulatory use, and the path forward. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(1):60-84. DOI: 10.1002/etc.4560.
- Mehta SK, Tripathi BN & Gaur JP (2000) Influence of pH, temperature, culture age and cations on adsorption and uptake of Ni by *Chlorella vulgaris*. *Eur. J. Protistol.* 36(4):443-450. DOI: 10.1016/S0932-4739(00)80050-4.
- Merchant S & Bogorad L (1987) Metal ion regulated gene expression: Use of a plastocyanin-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* to study the Cu(II)-dependent expression of cytochrome c-552. *EMBO J.* 6(9):2531-2535.
- Merchant SS (2007) Trace metal utilization in chloroplasts. *The Structure and Function of Plastids*, 23), Wise RR & Hooper JK (Édit.) Springer Netherlands, Dordrecht. p 199-218. DOI: 10.1007/978-1-4020-4061-0_10.

Références bibliographiques

- Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S & Terauchi AM (2006) Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim. Biophys. Acta* 1763(7):578-594. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.04.007.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, Marshall WF, Qu L-H, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen C-L, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernández E, Ferris P, Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral J-P, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen C-J, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WCA, Otiillar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS & Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318(5848):245-250. DOI: 10.1126/science.1143609.
- Merchant SS, Schmollinger S, Strenkert D, Moseley JL & Blaby-Haas CE (2020) From economy to luxury: Copper homeostasis in *Chlamydomonas* and other algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1867(11):118822. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118822.
- Messori L & Merlino A (2017) Protein metalation by metal-based drugs: X-ray crystallography and mass spectrometry studies. *Chem. Comm.* 53(85):11622-11633. DOI: 10.1039/C7CC06442J.
- Miao A-J & Wang W-X (2007) Predicting copper toxicity with its intracellular or subcellular concentration and the thiol synthesis in a marine diatom. *Environ. Sci. Technol.* 41(5):1777-1782. DOI: 10.1021/es0613963.
- Miller A-F (2012) Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 586(5):585-595. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.048.

Références bibliographiques

- Misra KC (2000) *Understanding mineral deposits*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, 1st Ed. XV, 845 p. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-011-3925-0#about>
- Moffett JW & Zika RG (1988) Measurement of copper (I) in surface waters of the subtropical Atlantic and Gulf of Mexico. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52(7):1849-1857.
- Mohler K & Ibba M (2017) Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress. *Nat. Microbiol.* 2:17117-17117. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.117.
- Moisset S, Tiam SK, Feurtet-Mazel A, Morin S, Delmas F, Mazzella N & Gonzalez P (2015) Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environmental Science and Pollution Research* 22(6):4046-4055. DOI: 10.1007/s11356-014-3523-2.
- Moore JW & Ramamoorthy S (1984) Copper. *Heavy Metals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment*, (Springer Series on Environmental Management: Springer-Verlag, New York, NY, 1st Ed. p 77-99. DOI: 10.1007/978-1-4612-5210-8_5.
- Morel FMM (1983) *Principles and applications of aquatic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, N.J. 446 p. <https://books.google.ca/books?id=Rs31PfkeBaIC>
- Morelli E & Scarano G (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci.* 167(2):289-296. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.04.001.
- Morris CG (1992) *Academic press dictionary of science and technology*. Gulf Professional Publishing. 2464 p
- Mounicou S, Szpunar J & Lobinski R (2009) Metallomics: The concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* 38(4):1119-1138. DOI: 10.1039/B713633C.
- Mueller KK, Lofts S, Fortin C & Campbell PGC (2012) Trace metal speciation predictions in natural aquatic systems: Incorporation of dissolved organic matter (DOM) spectroscopic quality. *Environ. Chem.* 9(4):356-368. DOI: 10.1071/EN11156.
- Murr LE (2015) A brief history of metals. *Handbook of Materials Structures, Properties, Processing and Performance*, Springer International Publishing, Cham. p 3-9. DOI: 10.1007/978-3-319-01815-7_1.
- Nagai T & De Schampelaere KAC (2016) The effect of binary mixtures of zinc, copper, cadmium, and nickel on the growth of the freshwater diatom *Navicula pelliculosa* and comparison with mixture toxicity model predictions. *Environ. Toxicol. Chem.* 35(11):2765-2773. DOI: 10.1002/etc.3445.

Références bibliographiques

- Nagai T & Kamo M (2014) Comparative modeling of the effect of metal mixtures on algal growth using biotic ligand model, concentration additive, and independent action. *Jpn. J. Environ. Toxicol.* 17(2):57-68. DOI: 10.11403/jset.17.57.
- Nakajima A, Horikoshi T & Sakaguchi T (1979) Uptake of copper ion by green microalgae. *Agric. Biol. Chem.* 43(7):1455-1460. DOI: 10.1080/00021369.1979.10863659.
- Navarrete A, González A, Gómez M, Contreras RA, Díaz P, Lobos G, Brown MT, Sáez CA & Moenne A (2018) Copper excess detoxification is mediated by a coordinated and complementary induction of glutathione, phytochelatins and metallothioneins in the green seaweed *Ulva compressa*. *Plant Physiol. Biochem.* DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.019.
- Neupane KP, Aldous AR & Kritzer JA (2014) Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *Journal of Inorganic Biochemistry* 139:65-76. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.06.004.
- Nieboer E & Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Poll. Series B, Chem. Physic.* 1(1):3-26. DOI: 10.1016/0143-148X(80)90017-8.
- Nies HD (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(6):730-750. DOI: 10.1007/s002530051457.
- Niyogi S & Wood CM (2003) Effects of chronic waterborne and dietary metal exposures on gill metal-binding: Implications for the biotic ligand model. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9(4):813-846. DOI: 10.1080/713610011.
- Niyogi S & Wood CM (2004) Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.* 38(23):6177-6192. DOI: 10.1021/es0496524.
- Outten FW, Huffman DL, Hale JA & O'Halloran TV (2001) The independent cue and cys Systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276(33):30670-30677. DOI: 10.1074/jbc.M104122200.
- Pacyna JM, Scholtz MT & Li Y-F (1995) Global budget of trace metal sources. *Environ. Rev.* 3(2):145-159. DOI: doi:10.1139/a95-006.
- Page MD, Kropat J, Hamel PP & Merchant SS (2009) Two *Chlamydomonas* CTR copper transporters with a novel cys-met motif are localized to the plasma membrane and function in copper assimilation. *Plant Cell* 21(3):928-943. DOI: 10.1105/tpc.108.064907.
- Pagenkopf GK (1983) Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17(6):342-347. DOI: 10.1021/es00112a007.

Références bibliographiques

- Palmgren MG & Axelsen KB (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1365(1–2):37–45. DOI: 10.1016/S0005-2728(98)00041-3.
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM & Wu KB (2002) The biotic ligand model: A historical overview. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 133(1):3–35. DOI: 10.1016/S1532-0456(02)00112-6.
- Parent L, Twiss MR & Campbell PGC (1996) Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: A test of the free-ion model of trace metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 30(5):1713–1720. DOI: 10.1021/es950718s.
- Peers G, Quesnel S-A & Price NM (2005) Copper requirements for iron acquisition and growth of coastal and oceanic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 50(4):1149–1158. DOI: 10.4319/lo.2005.50.4.1149.
- Peña MMO, Lee J & Thiele DJ (1999) A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129(7):1251–1260. DOI: 10.1093/jn/129.7.1251.
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM & Cañizares-Villanueva RO (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64(1):1–10. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.11.024.
- Pérez-Pérez ME, Mauriès A, Maes A, Tourasse NJ, Hamon M, Lemaire SD & Marchand CH (2017) The deep thioredoxome in *Chlamydomonas reinhardtii*: New insights into redox regulation. *Mol. Plant* 10(8):1107–1125. DOI: 10.1016/j.molp.2017.07.009.
- Peterson HG, Healey FP & Wagemann R (1984) Metal toxicity to algae: A highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41(6):974–979. DOI: 10.1139/f84-111.
- Phinney JT & Bruland KW (1997a) Effects of dithiocarbamate and 8-hydroxyquinoline additions on algal uptake of ambient copper and nickel in South San Francisco Bay water. *Estuaries* 20(1):66–76. DOI: 10.2307/1352720.
- Phinney JT & Bruland KW (1997b) Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(10):2046–2053. DOI: 10.1002/etc.5620161009.
- Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE & Gaymard F (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(3):347–357. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.04.011.

Références bibliographiques

- Pourret O & Bollinger J-C (2018) "Heavy metal" - What to do now: To use or not to use? *Sci. Total Environ.* 610-611:419-420. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.043.
- Pretzler M & Rompel A (2018) What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorg. Chim. Acta* 481:25-31. DOI: 10.1016/j.ica.2017.04.041.
- Priyadarshini E, Priyadarshini SS & Pradhan N (2019) Heavy metal resistance in algae and its application for metal nanoparticle synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103(8):3297-3316. DOI: 10.1007/s00253-019-09685-3.
- Pröschold T, Harris EH & Coleman AW (2005) Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170(4):1601-1610. DOI: 10.1534/genetics.105.044503.
- Puig S & Thiele DJ (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(2):171-180. DOI: 10.1016/S1367-5931(02)00298-3.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC & V. O'Halloran T (1999) Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284(5415):805-808. DOI: 10.1126/science.284.5415.805.
- Rainbow PS (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so what? *Environ. Pollut.* 120(3):497-507.
- Rausser WE (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* 109(4):1141-1149. DOI: 10.1104/pp.109.4.1141.
- Raven JA (1981) Nutrient transport in microalgae. *Adv. Microb. Physiol.*, Rose AH & Morris JG (Édit.) Academic Press, New York, NY, U.S.A. Vol 21. p 47-226. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60356-2.
- Raven JA & Geider RJ (2003) Adaptation, acclimation and regulation in algal photosynthesis. *Photosynthesis in Algae*, (Advances in Photosynthesis and Respiration: 14), Larkum AWD, Douglas SE & Raven JA (Édit.) Springer Netherlands, Dordrecht. p 385-412. DOI: 10.1007/978-94-007-1038-2_17.
- Ravet K & Pilon M (2013) Copper and iron homeostasis in plants: The challenges of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 19(9):919-932. DOI: 10.1089/ars.2012.5084.
- Rees EM, Lee J & Thiele DJ (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *J. Biol. Chem.* 279(52):54221-54229.
- Ritter A, Dittami SM, Goulitquer S, Correa JA, Boyen C, Potin P & Tonon T (2014) Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol.* 14(1):116. DOI: 10.1186/1471-2229-14-116.

Références bibliographiques

- Robinson NJ & Winge DR (2010) Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 79:537-562. DOI: 10.1146/annurev-biochem-030409-143539.
- Ronga-Pezeret S (2014) Métaux toxiques - Métaux essentiels. *Environ. Risque Sante* 13(2):153-156. DOI: 10.1684/ers.2014.0692.
- Rosabal M, Hare L & Campbell PGC (2012) Subcellular metal partitioning in larvae of the insect *Chaoborus* collected along an environmental metal exposure gradient (Cd, Cu, Ni and Zn). *Aquat. Toxicol.* 120-121:67-78. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.05.001.
- Rosenzweig AC (2002) Metallochaperones: Bind and deliver. *Chem. Biol.* 9(6):673-677. DOI: 10.1016/S1074-5521(02)00156-4.
- Rubino JT & Franz KJ (2012) Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* 107(1):129-143. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024.
- Ruiz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee & Docampo R (2001) The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* 276(49):46196-46203. DOI: 10.1074/jbc.M105268200.
- Rutherford JC & Bird AJ (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell* 3(1):1-13. DOI: 10.1128/ec.3.1.1-13.2004.
- Sabolić I, Breljak D, Škarica M & Herak-Kramberger CM (2010) Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *BioMetals* 23(5):897-926. DOI: 10.1007/s10534-010-9351-z.
- Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE & Meyer JS (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(10):2397-2402. DOI: 10.1002/etc.5620201035.
- Santos SW, Cachot J, Gourves P-Y, Clérandeau C, Morin B & Gonzalez P (2019) Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170:778-788. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.045.
- Sarkar B (1995) Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Ntr.* 11(5 Suppl):646-649.

Références bibliographiques

- Schade S, Butler E, Gutsell S, Hodges G, Colbourne JK & Viant MR (2019) Improved algal toxicity test system for robust omics-driven mode-of-action discovery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metabolites* 9(5):94. DOI: 10.3390/metabo9050094.
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J & Bleeker PM (2002) The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* 53(379):2381–2392. DOI: 10.1093/jxb/erf107.
- Scheiber IF, Pilátová J, Malych R, Kotabova E, Krijt M, Vyoral D, Mach J, Léger T, Camadro J-M, Prášil O, Lesuisse E & Sutak R (2019) Copper and iron metabolism in *Ostreococcus tauri* – the role of phytotransferrin, plastocyanin and a chloroplast copper-transporting ATPase. *Metallomics* 11(10):1657-1666. DOI: 10.1039/C9MT00078J.
- Scheidegger C, Behra R & Sigg L (2011) Phytochelatin formation kinetics and toxic effects in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon short-and long-term exposure to lead (II). *Aquat. Toxicol.* 101(2):423-429. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.11.016.
- Schlekat C, Stubblefield W & Gallagher K (2020) State of the science on metal bioavailability modeling: introduction to the outcome of a society of environmental toxicology and chemistry technical workshop. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(1):42-47. DOI: 10.1002/etc.4561.
- Schmidt W, Bartels M, Tittel J & Fuhner C (1997) Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol.* 135(4):659-666. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00691.x.
- Schoffman H, Lis H, Shaked Y & Keren N (2016) Iron–nutrient interactions within phytoplankton. *Front. Plant Sci.* 7:1223. DOI: 10.3389/fpls.2016.01223.
- Segner H & Baumann L (2016) What constitutes a model organism in ecotoxicology? *Integr. Environ. Assess. Manage.* 12(1):199-200. DOI: 10.1002/ieam.1727.
- Semeniuk DM, Taylor RL, Bundy RM, Johnson WK, Cullen JT, Robert M, Barbeau KA & Maldonado MT (2016) Iron–copper interactions in iron-limited phytoplankton in the northeast subarctic Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 61(1):279-297. DOI: doi:10.1002/lno.10210.
- Seregin IV & Kozhevnikova AD (2020) Low-molecular-weight ligands in plants: Role in metal homeostasis and hyperaccumulation. *Photosynthesis Res.* 145(1). DOI: 10.1007/s11120-020-00768-1.
- Shin L-J, Lo J-C & Yeh K-C (2012) Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol.* 159(3):1099-1110. DOI: 10.1104/pp.112.195974.

Références bibliographiques

- Simmons DBD, Benskin JP, Cosgrove JR, Duncker BP, Ekman DR, Martyniuk CJ & Sherry JP (2015) Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 34(8):1693-1704. DOI: 10.1002/etc.3002.
- Simon DF, Domingos RF, Hauser C, Hutchins CM, Zerges W & Wilkinson KJ (2013) Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(16):4774-4785. DOI: 10.1128/aem.00998-13.
- Slaveykova VI, Guignard C, Eybe T, Migeon H-N & Hoffmann L (2009) Dynamic NanoSIMS ion imaging of unicellular freshwater algae exposed to copper. *Anal. Bioanal. Chem.* 393(2):583-589. DOI: 10.1007/s00216-008-2486-x.
- Slaveykova VI & Wilkinson KJ (2005) Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environ. Chem.* 2(1):9-24. DOI: 10.1071/EN04076.
- Smith CL, Steele JE, Stauber JL & Jolley DF (2014) Copper-induced changes in intracellular thiols in two marine diatoms: *Phaeodactylum tricornutum* and *Ceratoneis closterium*. *Aquat. Toxicol.* 156:211-220. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.08.010.
- Smith KS, Balistrieri LS & Todd AS (2015) Using biotic ligand models to predict metal toxicity in mineralized systems. *Appl. Geochem.* 57:55-72. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2014.07.005.
- Solomon EI, Heppner DE, Johnston EM, Ginsbach JW, Cirera J, Qayyum M, Kieber-Emmons MT, Kjaergaard CH, Hadt RG & Tian L (2014) Copper active sites in biology. *Chem. Rev.* 114(7):3659-3853. DOI: 10.1021/cr400327t.
- Staehlin BM, Gibbons JG, Rokas A, O'Halloran TV & Slot JC (2016) Evolution of a Heavy Metal Homeostasis/Resistance Island Reflects Increasing Copper Stress in Enterobacteria. *Genome Biol. Evol.* 8(3):811-826. DOI: 10.1093/gbe/evw031.
- Stauber JL (1995) Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Australas. J. Ecotoxicol.* 1:15-24.
- Stauber JL & Florence TM (1985) The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom, *Nitzschia closterium* (ehrenberg) W. Smith. *Aquat. Toxicol.* 6(4):297-305. DOI: 10.1016/0166-445X(85)90025-6.
- Stohs SJ & Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.* 18(2):321-336. DOI: 10.1016/0891-5849(94)00159-H.

Références bibliographiques

- Stoiber TL, Shafer MM & Armstrong DE (2010) Differential effects of copper and cadmium exposure on toxicity endpoints and gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29(1):191-200. DOI: 10.1002/etc.6.
- Stoiber TL, Shafer MM & Armstrong DE (2012) Relationships between surface-bound and internalized copper and cadmium and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Toxicol Chem* 31(2):324-335.
- Stumm W & Morgan JJ (1996) *Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural Waters*. John Wiley & Sons, New York, 3 rd. 1040 p
- Sun J & Luo L (2018) Subcellular distribution and chemical forms of Pb in corn: Strategies underlying tolerance in Pb stress. *J. Agric. Food Chem.* 66(26):6675-6682. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03605.
- Sunda W (2012a) Feedback Interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.* 3(204). DOI: 10.3389/fmicb.2012.00204.
- Sunda WG (1989) Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.* 6(5-6):411-442. DOI: 10.1080/01965581.1988.10749543.
- Sunda WG (2012b) Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front Microbiol* 3(204). DOI: 10.3389/fmicb.2012.00204.
- Sunda WG & Huntsman SA (1992) Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 37(1):25-40. DOI: 10.4319/lo.1992.37.1.0025.
- Sunda WG & Huntsman SA (1995) Regulation of copper concentration in the oceanic nutricline by phytoplankton uptake and regeneration cycles. *Limnol. Oceanogr.* 40(1):132-137. DOI: 10.4319/lo.1995.40.1.0132.
- Sunda WG & Huntsman SA (1996) Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnol. Oceanogr.* 41(3):373-387. DOI: 10.4319/lo.1996.41.3.0373.
- Sunda WG & Huntsman SA (1998a) Interactions among Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} in controlling cellular Mn, Zn, and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.* 43(6):1055-1064. DOI: 10.4319/lo.1998.43.6.1055.
- Sunda WG & Huntsman SA (1998b) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* 219(2):165-181. DOI: 10.1016/S0048-9697(98)00226-5.
- Tabbì G, Magrì A & Rizzarelli E (2019) The copper(II) binding centres of carbonic anhydrase are differently affected by reductants that ensure the redox intracellular environment. *J. Inorg. Biochem.* 199:110759. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110759.

Références bibliographiques

- Tapiero H, Townsend DM & Tew KD (2003) Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* 57(9):386-398. DOI: 10.1016/S0753-3322(03)00012-X.
- Taylor AB, Stoj CS, Ziegler L, Kosman DJ & Hart PJ (2005) The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(43):15459-15464. DOI: 10.1073/pnas.0506227102.
- Terauchi AM, Peers G, Kobayashi MC, Niyogi KK & Merchant SS (2010) Trophic status of *Chlamydomonas reinhardtii* influences the impact of iron deficiency on photosynthesis. *Photosynthesis Res.* 105(1):39-49. DOI: 10.1007/s11120-010-9562-8.
- Terzulli A & Kosman DJ (2010) Analysis of the high-affinity iron uptake system at the *Chlamydomonas reinhardtii* plasma membrane. *Eukaryot. Cell* 9(5):815-826. DOI: 10.1128/EC.00310-09.
- Terzulli AJ & Kosman DJ (2009) The Fox1 ferroxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*: A new multicopper oxidase structural paradigm. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14(2):315-325. DOI: 10.1007/s00775-008-0450-z.
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM & Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(9):4991-4996.
- Tipping E, Rey-Castro C, Bryan SE & Hamilton-Taylor J (2002) Al(III) and Fe(III) binding by humic substances in freshwaters, and implications for trace metal speciation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66(18):3211-3224. DOI: 10.1016/S0016-7037(02)00930-4.
- Töpperwien S, Behra R & Sigg L (2007) Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(3):483-490. DOI: 10.1897/06-181R.1.
- Tripathi S & Poluri KM (2021) Metallothionein-and phytochelatin-assisted mechanism of heavy metal detoxification in microalgae. *Approaches to the Remediation of Inorganic Pollutants*, M. H (Édit.) Springer, Singapore. p 323-344. DOI: 10.1007/978-981-15-6221-1_16.
- Tusseau-Vuillemin M-H, Uher E & Gourlay-Francé C (2018) *Biodisponibles: Une histoire entre le vivant et son exposome*. ISTE Group,
- Twiss M, Errecalde O, Fortin C, Campbell P, 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. Bioavail.* 13(1):9-24. DOI: 10.3184/095422901782775462.

Références bibliographiques

- Twiss MR, Gouvêa SP, Bourbonniere RA, McKay RML & Wilhelm SW (2005) Field investigations of trace metal effects on Lake Erie phytoplankton productivity. *J. Great Lakes Res.* 31:168-179. DOI: 10.1016/S0380-1330(05)70312-9.
- Twiss MR & Nalewajko C (1992) Influence of phosphorus-nutrition on copper toxicity to 3 strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 28(3):291-298. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1992.00291.x.
- Twiss MR, Rattan KJ, Sherrell RM & McKay RML (2004) Sensitivity of phytoplankton to copper in Lake Superior. *J. Great Lakes Res.* 30:245-255. DOI: 10.1016/S0380-1330(04)70389-5.
- van der Voet E, Salminen R, Eckelman M, Norgate T, Mudd G, Hisschier R, Spijker J, Vijver M, Selinus O & Posthuma L (2013) *Environmental challenges of anthropogenic metals flows and cycles*. United Nations Environment Programme.
https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/54666484/Environmental_Challenges_Metals_Full_Report.pdf
- VanBriesen JM, Small M, Weber C & Wilson J (2010) Modelling chemical speciation: Thermodynamics, kinetics and uncertainty. *Modelling of Pollutants in Complex Environmental Systems*, Hanrahan G (Édit.) ILM Publishers, Hertfordshire, UK Vol 2. p 135-151.
- Vasconcelos MTSD & Leal MFC (2008) Exudates of different marine algae promote growth and mediate trace metal binding in *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Environ. Res.* 66(5):499-507. DOI: 10.1016/j.marenvres.2008.07.002.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP & Rea PA (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase - Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* 275(40):31451-31459. DOI: 10.1074/jbc.M002997200.
- Vighi M, Barsi A, Focks A & Grisoni F (2019) Predictive models in ecotoxicology: Bridging the gap between scientific progress and regulatory applicability—Remarks and research needs. *Integr. Environ. Assess. Manage.* 15(3):345-351. DOI: 10.1002/ieam.4136.
- Wallace WG, Lee B-G & Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249:183-197. DOI: 10.3354/meps249183.
- Wallace WG & Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257:125-137. DOI: 10.3354/meps257125.

Références bibliographiques

- Walsh MJ, Goodnow SD, Vezeau GE, Richter LV & Ahner BA (2015) Cysteine enhances bioavailability of copper to marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* 49(20):12145-12152. DOI: 10.1021/acs.est.5b02112.
- Watanabe T, Kiron V & Satoh S (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151(1–4):185-207. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01503-7.
- Wedepohl KH (1995) The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59(7):1217-1232. DOI: 10.1016/0016-7037(95)00038-2.
- Weger HG (1999) Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Experiments using iron-limited chemostats. *Planta* 207(3):377-384. DOI: 10.1007/s004250050495.
- Whitacre DM (2011) *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer-Verlag, New York, 1st Ed. X, 182 p. <https://www.springer.com/gp/book/9781461414629>
- Wikipedia c (2016) Zinc finger
- Wilde K, Stauber J, Markich S, Franklin N & Brown P (2006) The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51(2):174-185. DOI: 10.1007/s00244-004-0256-0.
- Winge DR, Jensen LT & Srinivasan C (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(2):216-221. DOI: 10.1016/S1367-5931(98)80063-X.
- Wood GE (1975) Copper. *Canadian minerals yearbook*, Department of Energy MaR (Édit.) Department of Energy, Mines and Resources, Ottawa (1976).
- Wood PM (1978) Interchangeable copper and iron proteins in algal photosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 87(1):9-19. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12346.x.
- Wright DA & Welbourn P (2002) *Environmental toxicology*. Cambridge University Press. 630 p
- Xie L & Jakob U (2019) Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic protein scaffold. *J. Biol. Chem.* 294(6):2180-2190. DOI: 10.1074/jbc.REV118.002808.
- Xue H-B & Sigg L (1990) Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Res.* 24(9):1129-1136. DOI: 10.1016/0043-1354(90)90176-7.
- Yruela I (2005) Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(1):145-156. DOI: 10.1590/S1677-04202005000100012
- Zhu Z, Labbé S, Peña MMO & Thiele DJ (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 273(3):1277-1280.