Université du Québec INRS-Eau, Terre et Environnement

SYNTHÈSE DE PEPTIDES THIOLÉS ET DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DU CADMIUM CHEZ DEUX ALGUES VERTES (CHLAMYDOMONAS REINHARDTII ET PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA)

Par Michel Lavoie (B. Sc. Biologie)

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examinateur externe

Laura Sigg EAWAG, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology

Examinateur interne

Directeur de recherche

Codirecteur de recherche

INRS-Eau, Terre et Environnement

Jean-Christian Auclair

Claude Fortin INRS-Eau, Terre et Environnement

Peter G.C. Campbell INRS-Eau, Terre et Environnement

Mai 2008

[©] Droits réservés de Michel Lavoie, 2008

We're gonna make a memory, we wanna steal a piece of time and write a couple lines, trying to solve life's mysteries

John Bongiovi

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de type « par articles » comporte deux parties distinctes. La première partie est constituée d'une synthèse de l'état des connaissances liées au sujet de recherche ; cette partie comprend également une description de la problématique et des objectifs de la recherche effectuée, de même qu'un aperçu des méthodes, résultats et conclusions. La deuxième partie du mémoire est constituée de deux manuscripts : un premier « soumis » pour publication dans la revue *Limnology and Oceanography : Methods* et le deuxième en préparation pour soumission dans la revue *Aquatic Toxicology*. La contribution des auteurs des articles s'établit comme suit :

1) Lavoie M., Bernier J., Fortin C. et Campbell P.G.C. 2007. Subcellular fractionation and thiolated-peptides quantification in phytoplankton. *Limnology and Oceanography : Methods* (soumis)

Michel Lavoie:

- Planification et conception du projet

- Réalisation des expériences

- Traitement des données

- Rédaction de la première ébauche du manuscrit

Jonathan Bernier

- Planification et conception des dosages enzymatiques
- Mesure des activités enzymatiques par spectrophotométrie
- Traitement et analyse des activités enzymatiques
- Participation à la rédaction de la première ébauche du manuscrit

Claude Fortin	- Conception du projet
et	- Encadrement hebdomadaire
Peter G.C. Campbell	- Aide à la prise de décision

- Révision du manuscrit

2) Lavoie M., Fortin C., Campbell P.G.C. et Le Faucheur S. 2007. Metal detoxification strategies, thiolated peptides synthesis and Cd sequestration in granules, in two phytoplanktonic species. (en préparation)

Michel Lavoie:

- Planification et conception du projet

- Réalisation des expériences
- Traitement des données
- Rédaction de la première ébauche du manuscrit

Severine Le Faucheur

Aide aux dosages des phytochélatines
Révision du manuscrit

Claude Fortin et Peter G.C. Campbell

- Conception du projet
- Encadrement hebdomadaire
- Aide à la prise de décision
- Révision du manuscrit



REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement mon directeur de recherche, Claude Fortin, pour ses conseils à la fois géniaux et judicieux, la confiance qu'il m'a témoigné et son énorme souci du détail. Je me dois aussi de souligner les précieux commentaires constructifs de mon codirecteur, Peter Campbell, soutenus par son expertise internationale, qui m'ont aidé à cheminer vers l'atteinte de mes objectifs. Jean-Christian Auclair a aussi su m'indiquer des pistes à explorer lors de nos fréquentes discussions au sujet de l'homogénéisation des cellules algales.

Pour leur soutien technique indispensable, leur grande disponibilité et leur grand sens de l'humour tout au long de ce séjour « INRSien », je tiens à remercier l'ensemble du personnel des laboratoires de l'INRS-ETE soit, Sébastien Duval, Lise Rancourt, René Rodrigue, Michelle Bordeleau, Pauline Fournier, Stéfane Prémont et Pierre Marcoux. Merci Sébastien pour ton optimisme lorsque nous avons fait face aux nombreux problèmes d'HPLC.

Je remercie aussi l'ensemble de mes collègues de travail et amis m'ayant fait part de leur connaissance en phycotoxicologie soit, Amiel Boullemant, Frédéric Boily, Frédéric Maloney, Jonathan Bernier, Laura François, Nathalie Paquet et Sophie Cooper. Je veux aussi remercier spécialement Séverine Le Faucheur pour avoir accepté de m'expliquer soigneusement la technique de dosage des thiols par HPLC et pour avoir répondu à mes mille et une questions.

Je ne saurais oublier de remercier mes parents pour leur soutien financier et moral tout au long de mes études. Ils ont été un élément clé dans la réussite de mes objectifs académiques. Je voudrais aussi remercier particulièrement ma copine Vicky Tremblay pour son sourire, son enthousiasme et son appui inconditionnel avec qui j'ai vécu des moments inoubliables.

Enfin, ce projet de recherche a été rendu possible grâce au support financier du « Metals in the Human Environment Strategic Network », du Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies, la Chaire de recherche du Canada en écotoxicologie des métaux et le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada.

RÉSUMÉ

Les cellules algales ont développé plusieurs mécanismes de détoxication des métaux. Elles peuvent notamment séquestrer les ions métalliques à l'aide de peptides riches en groupements thiols ou encore à l'intérieur de granules. Même si ces stratégies de détoxication existent chez les algues, leur importance relative chez différentes espèces et leur modulation en réponse aux métaux ne demeurent que peu abordées dans la littérature. Deux algues unicellulaires présentant une tolérance et une capacité à bioaccumuler le Cd contrastantes furent choisies, soit Chlamydomonas reinhardtii et Pseudokirchneriella subcapitata. C. reinhardtii serait plus résistante au Cd que P. subcapitata, mais accumulerait davantage de Cd, suggérant un rôle important des mécanismes de détoxication intracellulaire dans la résistance au Cd chez cette espèce. Les objectifs de cette recherche consistaient à : (i) mesurer l'impact des peptides détoxifiants et des granules sur la séquestration du Cd intracellulaire par rapport au niveau de liaison du Cd par des structures intracellulaires sensibles à ce métal telles les enzymes et d'autres organites (mitochondries, microsomes) chez ces deux espèces d'algues ; (ii) déterminer si l'utilisation des mécanismes de détoxication (séquestration du Cd dans les granules et par les protéines thermorésistantes ainsi que la synthèse de peptides thiolés) pourrait expliquer la plus grande résistance au Cd chez C. reinhardtii que chez P. subcapitata.

Pour ce faire, les deux espèces d'algue choisies furent exposées séparément à une gamme de concentration de Cd^{2+} sous létale (< CE_{75}) à l'intérieur de culture en lots dans des milieux d'exposition inorganiques simples jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance. Cinq compartiments intracellulaires furent isolés (organites, débris, granules, protéines thermosensibles ou « HDP » et protéines thermorésistantes ou « HSP ») par centrifugation différentielle avec homogénéisation préalable par sonification. La répartition subcellulaire du Cd fut déterminée par spectrométrie gamma à l'aide d'un radio-isotope du Cd (¹⁰⁹Cd) comme traceur. L'efficacité de l'homogénéisation cellulaire par sonification fut optimisée pour les deux espèces et évaluée à l'aide de différentes techniques (assimilation au ¹⁴C et compteur de particules). L'efficacité à briser les cellules de P. subcapitata (26 %) était beaucoup plus faible que chez C. reinhardtii (> 98%). La distribution intracellulaire du Cd fut corrigée en fonction des efficacités d'homogénéisation. Parallèlement aux mesures de la répartition intracellulaire du Cd, la synthèse de peptides thiolés, dont les phytochélatines ($[\gamma$ -Glu-Cys]_nGly où n = 2 à 6) et leurs précurseurs (GSH : glutathion ; γ -EC : γ -glutamylcystéine), fut mesurée par HPLC performance *liquid chromatography*) avec dérivatisation pré-colonne (High au monobromobimane en tenant compte de l'efficacité de la dérivatisation des différents peptides. L'extraction des peptides était maximale après un chauffage dans l'acide et l'ajout d'une étape de sonification n'était pas nécessaire. Les concentrations de peptides furent corrigées en fonction du pourcentage de récupération obtenu après la première extraction par rapport à la quantité totale extraite après trois extractions (> 88%).

Pour un gradient de Cd^{2+} variant entre 0,7 et 221 nM, une augmentation de la proportion de Cd séquestrée par les « HSP » chez *P. subcapitata* et aussi, dans le cas de *C. reinhardtii*, par les granules semblait conférer une protection partielle de certains sites intracellulaires sensibles tels les mitochondries et les microsomes (fraction « organites ») ainsi que les enzymes (fraction « HDP ») puisqu'une diminution et une stabilisation de la *proportion* de Cd

dans la fraction « organites » et « HDP » furent mesurée. Cependant, la concentration de Cd dans ces dernières fractions augmentait en fonction du Cd^{2+} présent dans le milieu.

Les deux espèces étudiées synthétisaient de fortes concentrations de phytochélatines canoniques en réponse au Cd et pouvait séquestrer jusqu'à 70 % du Cd intracellulaire dans la fraction « HSP ». La séquestration du Cd par les « HSP » semblait donc être un important mécanisme de détoxication chez les deux espèces. Cependant, l'efficacité des mécanismes de détoxication chez *C. reinhardtii* se démarquait par trois facteurs : 1) Capacité de synthétiser de beaucoup plus fortes quantités de peptides thiolés de structure indéterminée, n'étant pas des PCn canoniques ou des hydroxyméthyl-PCn, que chez *P. subcapitata* ; 2) Habileté à produire davantage de phytochélatines plus polymérisées formant des complexes plus stables avec les métaux à partir d'une concentration extracellulaire de 149 nM Cd²⁺ ; 3) Augmentation de la proportion de Cd dans la fraction « granules » pour l'exposition à 43 nM Cd²⁺ (concentration inhibant la croissance chez *P. subcapitata* seulement) comparativement à celle à 0,7 nM Cd²⁺.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOSi	ii
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ v	ii
TABLE DES MATIÈRESi	ix
LISTE DES TABLEAUX xi	ii
LISTE DES FIGURESx	V
LISTE DES ABRÉVIATIONSxi	ix
1. INTRODUCTION	.1
1.1 PROBLÉMATIQUE DU CADMIUM	.1
1.1.1 Spéciation	2
1.1.2 Biodisponibilité	3
1.1.3 Toxicité	4
1.2 SPÉCIATION INTRACELLULAIRE	.5
1.2.1 Distribution intracellulaire	6
1.2.2 Aspects méthodologiques	6
1.2.3 Fractions reliées à la détoxication	7
1.2.3.1 Granules de polyphosphate	,8
1.2.3.2 Granules d'azote/soufre1	0
1.2.3.3 Protéines thermorésistantes1	0
1.2.4 Facteurs affectant la distribution intracellulaire1	1
1.2.4.1 Taux de croissance1	1
1.2.4.2 Le métal et sa concentration1	2
1.2.4.3 L'espèce1	2
1.3 LES MÉTALLOTHIONÉINES1	3
1.3.1 Les phytochélatines1	4
1.3.1.1 Mécanisme de synthèse enzymatique1	5
1.3.1.2 Induction1	9
1.3.1.3 Complexation des métaux et destin	!1
1.4 RÔLE DES PHYTOCHÉLATINES2	:2
1.4.1 Détoxication des métaux2	:3
1.4.1.1 Évolution de l'enzyme phytochélatine synthase (PCS)2	:5
1.4.2 Détoxication des espèces d'oxygène réactives (ROS)2	:6
1.4.3 Rôle dans l'homéostasie2	27
1.5 ROLE DU GSH2	28
1.5.1 Détoxication des métaux2	28
1.5.2 Détoxication des espèces d'oxygène réactives (ROS)	0
1.5.3 Détoxication des xénobiotiques	1
1.6 PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE	1
2. EVALUATION ET OPTIMISATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DES	
PHYTOCHELATINES PAR HPLC ET D'UNE METHODE DE	
FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE PAR CENTRIFUGATION	
DIFFERENTIELLE	3

2.1 OBJECTIFS	33
2.2 MÉTHODOLOGIE	34
2.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	35
2.4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
3. MESURE DE PEPTIDES THIOLÉS EN RELATION AVEC LA RÉPAR'	ΓΙΤΙΟΝ
INTRACELLULAIRE DU Cd CHEZ DEUX ALGUES VERTES :	
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII et PSEUDOKIRCHNERIELLA	
SUBCAPITATA	
3.1 OBJECTIFS	
3.2 MÉTHODOLOGIE	40
3.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	41
3.4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	45
4. RÉFÉRENCES	
5. ARTICLE 1	67
6. ARTICLE 2	123
7. LES ANNEXES	179
7.1 SOUSTRACTION DE DISTRIBUTION DE TAILLES	
7.2 TESTS DE SONIFICATION	180
7.2.1 Objectif	180
7.2.2 Utilisation du sonificateur Branson 250	
7.2.3 Manipulation	181
7.2.4 Résultats et discussion.	
7.3 TESTS D'HOMOGÉNÉISATION AVEC AZOTE LIOUIDE	185
7.3.1 Objectif	185
7.3.2 Manipulation	185
7.3.3 Résultats et discussion	186
7.4 SÉPARATION DE DÉBRIS PAR CENTRIFUGATION	188
7.4.1 Objectif	188
7.4.2 Manipulation	188
7.4.3 Résultats et discussion	189
7.5 PROTOCOLE DE LA PRISE EN CHARGE DU CARBONE-14	194
7.6 COLORATIONS AU BLEU DE MÉTHYLÈNE	196
7.6.1 <i>Objectif</i>	196
7.6.2 <i>Matériel</i>	196
7.6.3 <i>Protocole</i>	196
7.6.4 Résultats et discussion	196
7.7 ACIDIFICATION ET EFFICACITÉ D'HOMOGÉNÉISATION	201
7.7.1 <i>Objectif</i>	201
7.7.2 Manipulation	201
7.7.3 Résultats et discussion	202
7.8 PROTOCOLE POUR L'EFFICACITÉ DE DÉRIVATISATION	205
7.9 PROTOCOLE DU DOSAGE DE LA CYTOCHROME C OXYDASE	207
7.9.1 Préparation des solutions	207
7.9.2 Mesure de l'activité enzymatique	208
7.10 PROTOCOLE DU DOSAGE DE LA CITRATE SYNTHASE	210
7.10.1 Préparation des solutions	210
7.10.2 <i>Procédure</i>	210

7.10.3 Principe du dosage enzymatique	211
7.11 PROTOCOLE POUR MANIPULATION ARTICLE 2	212
7.11.1 Préparation des milieux d'exposition	212
7.11.2 Exposition au cadmium	212
7.11.3 Caculs de radioactivité	213
7.11.4 Récolte des algues et mesure de la répartition subcellulaire du	
cadmium	214
7.11.4.1 Mesure de la densité cellulaire	214
7.11.4.2 Mesure de la répartition subcellulaire du cadmium	215
7.11.5 Mesure des peptides thiolés	215
7.11.5.1 Récolte des cellules et extraction des thiols	215
7.11.5.2 Dérivatisation au monobromobimane	216
7.11.5.2.1 Préparation des solutions	216
7.11.5.2.2 Protocole de dérivatisation	218
7.12 RÉPÉTABILITÉ DE LA DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE	220
7.13 RATIOS THIOLS INDUITS :Cd	222
7.14 CALCUL DE L'AIRE ET BIOVOLUME MOYEN	225
7.14.1 <i>Objectif</i>	225
7.14.2 Manipulation	225
7.14.3 Résultats et discussion	226
7.15 RÉFÉRENCES	228



LISTE DES TABLEAUX

Tableau 7.1 :	Puissance en Watts (W) des ultrasons délivrés par la sonde du sonificateur
	pour différentes valeurs de « Output ». 5 mL de milieu de culture
	MHSM-1 fut utilisé comme matrice
Tableau 7.2 :	Efficacité à briser les cellules de C. pyrenoidosa selon différent paramètres
	de sonification ainsi que la température atteinte après sonification (N=1).
Tableau 72	Efficacité à brigge les cellules de Consinhenduit celles différents normalités
Tableau 7.5 :	Efficacité à briser les centules de C. reinnarain selon différents parametres
	de sonification ainsi que la température atteinte après sonification (N=1).
Tableau 7.4 :	Efficacité à briser les cellules de <i>P. subcapitata</i> selon différents paramètres
	de sonification (N=1) 183
	ue sommeation (IV-1)
Tableau 7.5 :	Efficacité à briser les cellules par sonification après congélation à l'azote
	liquide ou sans congélation
Tableau 7.6 :	Pourcentage de cellules algales restante dans le surnageant des eppendorfs
1 401044 710 1	$\frac{1}{2} \frac{1}{2} \frac{1}$
	apres differentes centrifugations $(N - 3)$
Tableau 7.7 :	Quotas intracellulaires de Cd (amol Cd/cell) mesurés chez P. subcapitata
	exposé à 43 nM Cd ²⁺ pendant 96 heures pour trois expériences réalisées
	séparément à une ou deux semaines d'intervalles. L'erreur pour chaque
	evnérience représente l'écart type calculé à partir de trois evpositions
	experience represente recart-type calcule a partir de trois expositions
	réalisées avec des cultures d'algues indépendantes
Tableau 7.8 :	Ratios thiols induits : Cd (amol SH/amol Cd) chez C. reinhardtii exposé à
	différentes concentrations de Cd ²⁺ libre pendant 72 heures. [SH(PCn) _{total}] :

 $[PC_{1-6}] ; [SH(PCn)_{total}+X_n] = [PC_{1-6}] + [X_{1-6}] ; Cd_{intr} = Cadmium$ intracellulaire ; HSP Cd = Cd associé à la fraction HSP......224

LISTE DES FIGURES

- Figure 7.5 : Nombre de particules dans le surnageant des eppendorfs après différentes centrifugations en fonction du diamètre des particules comparativement au nombre de particules présentes dans la solution d'algues initiale avant centrifugation. La distribution de taille en rouge représente les particules dans la suspension d'algues avant centrifugation (témoin). La distribution de taille en rose indique le nombre de particules présentes dans le surnageant des eppendorfs après une centrifugation à 500 g pendant 5 minutes avec le rotor HB-6. Les autres distributions de tailles apparaissant tous en vert sur cette figure ont été obtenues après les centrifugations décrites à la figure 7.4.

Figure 7.8 : Cellules de *P. subcapitata* colorées au bleu de méthylène avec le protocole de Markelova *et al.* (2000) après une simple (A) et triple (B) extraction (chauffage à 90 °C pendant 2 minutes dans une solution HCl 0,1 M / DTPA 5 mM) (1000 X).

xvii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acétyl-CoA :	Acétyl-CoenzymeA
ACN :	Acétonitrile
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANOVA :	Analyse de variance à une voie
AIRC :	Agence internationale de la recherche sur le cancer
ARN :	Acide ribonucléique
BLM :	Modèle du ligand biotique
CE ₃₀ :	Concentration effective sur 30 % de la population testée
CE ₅₀ :	Concentration effective sur 50 % de la population testée
CE ₇₅ :	Concentration effective sur 75 % de la population testée
CPM :	Comptes par minute
CS:	Citrate synthase
Cys:	Cystéine
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole
Des-Gly PCn	
	Phytochélatines de structure (γ -Glu-Cys) _n , n = 2 à 11
DPM :	Désintégrations par minute
DTPA :	Acide diéthylènetriamine-pentaacétique
DTNB :	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
DTT :	Dithiothréitol
EDAX :	Energy dispersive X-ray analysis
EDTA :	Acide éthylènediamine-tétraacétique
ESI-MS :	Electrospray ionization mass spectroscopy
Glu :	Glutamate
Gly:	Glycine
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
HCl :	Acide chlorydrique
HDP :	Heat-denaturable proteins
HDPE :	Polyéthylène à haute densité
HEPES :	Acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
HEPPS :	Acide 3-[4-(2-Hydroxyéthyl)-1-piperazinyl]propanesulfonique
HMW :	High molecular weight
H_2O_2 :	Peroxyde d'hydrogène
Homo-PCn :	Phytochélatines de structure (γ -Glu-Cys) _n - β -Ala, n = 2 à 11
HSM :	High salt medium
Hsp :	Heat-shock proteins
HSP :	Heat-stable proteins
Hydroxyméth	yl-PCn :
	Phytochelatines de structure (γ -Glu-Cys) _n -Ser, n = 2 à 11
Iso-PCn :	Phytochelatines de structure (γ -Glu-Cys) _n -Glu n = 2 à 11
KH_2PO_4 :	Dihydrogénophosphate de potassium
K_2HPO_4 :	Potassium hydrogénophosphate

$K_3Fe(CN)_6$:	Hexacyanoferrate (III) de potassium
LMW :	Low molecular weight
Me :	Ion métallique
MHSM :	Modified high salt medium
MET :	Microscope électronique à transmission
MIL :	Modèle de l'ion libre
MOD :	Matière organique dissoute
MSA :	Acide méthanesulfonique
MTs :	Métallothionéines
NaHSO3 :	Bisulfite de sodium
NADPH :	Nicotinamide adénide dinucléotide phosphate
NaOH :	Hydroxyde de potassium
NIST :	National Institute of Standards and Technology
O_2 :	Anion superoxyde
$O_2(^1\Delta_g)$:	Oxygène singlet
OH:	Radical hydroxyl
PCn :	Phytochélatines
PCn canoniq	ue :
	Phytochélatine de structure $(\gamma$ -Glu-Cys) _n -Gly où n = 2 à 11
PCS :	Phytochélatine synthase
PP:	Polypropylène
ROS :	Reactive oxygen species
TCEP :	Tris(2-carboxyéthyl)-phosphine
UTCC :	University of Toronto Culture Collection
W :	Watt
γEC :	γ-glutamylcystéine ou γ-Glu-Cys

1. Introduction

Les métaux et métalloïdes sont naturellement présents dans la croûte terrestre ainsi que dans l'ensemble de la biosphère. Ceux-ci, à l'instar des composés organiques, ne sont pas dégradés dans l'environnement. Une fois que l'homme ou des procédés naturels ont enrichi le milieu naturel avec ces éléments potentiellement toxiques, ceux-ci persistent dans l'environnement et se déplacent d'une matrice à une autre (Moore, 2004). Les organismes vivants ont évolué en fonction de la concentration et de la nature des différents métaux ou métalloïdes présents dans l'environnement. Ils ont développé différents mécanismes afin de réguler la concentration des éléments essentiels (ex. : Cu, Zn, Mn, Co, Fe, Ni, Cr, V, Mo, Si) à leur développement et d'exclure ou de détoxifier le plus possible les métaux non essentiels tels le Cd, l'As, le Hg, le Pb et le Tl. Cependant, les stratégies développées tout au long de l'histoire de la vie peuvent parfois ne pas faire le poids devant un trop important débalancement de l'homéostasie cellulaire. À partir d'une certaine concentration, ces métaux, notamment le cadmium, peuvent mener à des effets toxiques. Ce métal ainsi que les ingénieux moyens de défense existant pour diminuer ses dommages seront étudiés dans ce mémoire.

1.1 Problématique du cadmium

Le cadmium est retrouvé dans la croûte terrestre à de faible concentration (0,16 mg/kg en moyenne) et surtout sous forme de Cd(S). Un certains nombre de processus naturels contribuent à mobiliser le Cd dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Ces processus comprennent majoritairement les éruptions volcaniques, l'érosion par le vent et l'eau, les feux de forêts, les sources hydrothermales ainsi que l'émission de composés biogéniques formant des complexes stables avec les métaux. Cependant, les activités humaines, surtout depuis l'industrialisation, ont considérablement augmenté le flux de cadmium dans l'environnement. L'exploitation minière du Zn, du Cu et du Pb représente la principale source d'émissions anthropiques de Cd. La combustion de charbon et d'huile, la production d'appareils électriques, l'application de fertilisants à base de phosphate ainsi que les effluents industriels

et domestiques contribuent aussi fortement à l'enrichissement du milieu en cadmium (Nriagu et Pacyna, 1988).

Plusieurs études ont été réalisées afin de connaître le niveau de contamination en cadmium de nos écosystèmes d'eau douce. En milieu contaminé, comme par exemple près des régions minières, le Cd peut atteindre des concentrations largement supérieures à celles retrouvées naturellement dans nos lacs et rivières. Ainsi, la concentration en cadmium dissous dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda et de Sudbury varie entre 0,9 et 19,5 nM (Kraemer *et al.*, 2006 ; Croteau *et al.*, 1998) tandis qu'en milieu d'eau douce non contaminé, la concentration est typiquement inférieure à 0,1 nM (Xue et Sigg, 1998).

Depuis les dernières années, le cadmium est traité avec de plus en plus de considération dû à sa grande accessibilité et sa toxicité inhérente pour les organismes vivants (Campbell, 2006). Il fut donc considéré par Environnement Canada (1997) comme un élément d'intérêt prioritaire au même titre que l'As, le Hg et le Pb. Son accessibilité ne vient pas seulement de sa présence et de sa persistance dans l'environnement. D'autres caractéristiques inhérentes à ce métal font en sorte de rendre sa présence problématique. Par exemple, en plus d'être bioaccumulé chez plusieurs organismes aquatiques de part la phase aqueuse ou leur nourriture, des études récentes réalisées autant en laboratoire (Seebaugh *et al.*, 2005) qu'en nature (Croteau *et al.*, 2005) démontrent que le cadmium peut parfois être biomagnifié dans la chaîne alimentaire, c'est-à-dire que sa concentration augmente à chaque stade du réseau trophique. Cette caractéristique est plutôt rare chez les métaux et s'ajoute à la problématique du cadmium. En outre, la chimie de complexation du cadmium décrit à la section suivante en milieu d'eau douce est aussi un facteur important à considérer afin d'évaluer le risque potentiel de ce métal.

1.1.1 Spéciation

Le cadmium dissous est retrouvé dans les eaux naturelles sous sa forme ionique stable, Cd^{2+} , mais peut former des complexes avec une variété de ligands inorganiques (ions hydroxyle et carbonates à pH > 8) et organiques (MOD : matière organique dissoute autochtone et

allochtone) formant différentes espèces chimiques. En eau douce, le Cd aurait relativement peu d'affinité envers les ligands inorganiques et organiques comparativement à plusieurs autres métaux. Ainsi, on le retrouve souvent en grande proportion sous sa forme libre Cd^{2+} . En effet, 71 ± 16 % du Cd dissous total présent dans 14 lacs de la région de Rouyn-Noranda, fut mesuré sous sa forme libre (Fortin *et al.*, en préparation). Toutefois, la tendance du Cd à apparaître sous forme de complexes serait fortement reliée à la productivité primaire des lacs (présence de ligands de nature biologiques) et donc à la proportion de métal par rapport aux ligands. L'étude de Xue et Sigg (1998) à partir de différents lacs suisses a montré que l'espèce Cd^{2+} pouvait représenter 80 % du Cd total dissous dans le lac Orta de faible productivité biologique tandis qu'elle était seulement de 1 % dans le lac Greifen fortement eutrophe.

La solubilité des complexes formés avec les ligands de nature inorganique serait plus élevée pour le cadmium que pour des métaux trivalents, tels l'Al, le Cr, le Fe et l'As. Ainsi, le cadmium aurait moins tendance à précipiter que certains autres métaux et pourrait demeurer davantage en solution. La présence de Cd de même que l'Al, le Pb et le Hg sous forme dissoute dans les écosystèmes d'eau douce serait aussi exacerbée par l'acidification (Nelson et Campbell, 1991). En outre, le Cd possèderait une affinité relativement faible pour s'adsorber aux surfaces des particules telles de oxyhydroxydes de fer comparativement aux autres métaux tels que le Cu, le Pb, le Hg, le Sn, le Pd, le Be (Dzombak et Morel, 1990 ; Tessier *et al.*, 1993). Ce facteur fera aussi en sorte de favoriser la phase dissoute du Cd et d'augmenter son temps de résidence dans la colonne d'eau des écosystèmes aquatiques en diminuant son transfert vers les sédiments.

1.1.2 Biodisponibilité

La biodisponibilité des métaux ou encore leur potentiel à être bioaccummulé est intimement liée à leur spéciation chimique. Plusieurs études ont démontré que la biodisponibilité des métaux était fonction de l'activité de l'ion libre plutôt que de leur concentration totale. Cela a inspiré la création du modèle de l'ion libre (MIL) (Morel, 1983) stipulant que la prise en charge, la nutrition et la toxicité des métaux traces cationiques varient en fonction de la concentration de l'ion métallique libre. Ce modèle sous-entend que les principaux processus

de transport des métaux dans les cellules sont spécifiques à des transporteurs membranaires, et que ce transport, étant lent comparativement à la diffusion du métal à travers la paroi cellulaire et la couche diffuse entourant la cellule, est limitant pour la prise en charge. Il fut ensuite démontré que certains complexes métal-ligand pouvaient être internalisés dans la cellule par diffusion (complexes lipophiles, ex. : HgCl₂, MeHgCl, Cd(DDC)₂ ou dithiocarbamate de cadmium) ou encore via d'autres transporteurs que ceux spécifiques aux métaux (complexes avec ligands assimilable, ex. : AgS₂O₃⁻, CdS₂O₃, CdCitrate⁻). La prise en charge des métaux pouvait aussi être inhibée par d'autres ions (Mg²⁺, Ca²⁺, H⁺). Un modèle plus précis pour prédire la biodisponibilité des métaux fut donc développé, soit le modèle du ligand biotique (MLB) prenant en compte les effets d'inhibition de ces ions (Campbell *et al.*, 2002).

Même si certains facteurs, autres que la concentration de l'ion libre, peuvent influencer la biodisponibilité du Cd, la prise en charge ainsi que la toxicité des métaux demeurent fortement dépendante de la présence de l'ion libre. Ainsi, la grande tendance du cadmium à être présent sous forme libre en eau douce décrite à la section 1.1.2 rend ce métal encore plus menaçant et problématique.

1.1.3 Toxicité

Le cadmium est l'un des métaux les plus toxiques quoique chez les algues, le cuivre serait généralement beaucoup plus toxique. De nombreux effets toxiques ont été documentés dans la littérature chez plusieurs organismes. Le cadmium interfèrerait avec les acides nucléiques et les protéines intracellulaires, principalement à cause de sa grande affinité pour les groupements SH, et altèrerait un bon nombre de fonctions cellulaires telles que la division cellulaire, les signaux intra ou intercellulaire, l'expression des gènes (Deckert, 2005) et la photosynthèse (Faller *et al.*, 2005).

De plus, l'agence internationale de la recherche sur le cancer (AIRC) a classifié cet élément chimique comme substance cancérigène chez l'humain en 1993. Toutefois, le cadmium n'interfère pas directement avec l'ADN (acide désoxyribonucléique). Il provoque la production d'espèces d'oxygènes réactives (ROS, *reactive oxygen species*) ayant un potentiel

génotoxique en inhibant la synthèse d'antioxydants cellulaires. Il peut aussi déplacer certains cofacteurs enzymatiques tels que le Cu et le Fe étant capable de générer directement des ROS par des réactions d'oxydo-réduction (Rea *et al.*, 2004). De plus, il inhiberait multiples mécanismes de réparation d'ADN présents chez tous les organismes vivants. Par ces derniers processus, le cadmium pourrait indirectement mener à l'apparition de cellules cancéreuses et à la production de ROS (Bertin et Averbeck, 2006 ; Deckert, 2005 ; Giaginis *et al.*, 2006). Chez les algues, la production de ROS pourrait mener à la peroxydation des lipides, à des mutations génétiques et à l'apoptose des cellules.

1.2 Spéciation intracellulaire

Une fois à l'intérieur des cellules, le cadmium, comme les autres métaux, va rapidement être séquestré par les ligands intracellulaires qui sont présents à fortes concentrations dans la cellule (ex. : [GSH] $\sim 1 - 10$ mM, Inzé et Van Montagu, 1995). Il devrait donc y avoir une fraction négligeable de métal libre à l'intérieur de la cellule comme il l'a été démontré pour le Cu²⁺ et le Zn²⁺ (Rae *et al.*, 1999 ; Finney et O'Halloran, 2003). Ces ligands intracellulaires peuvent être situés dans différents compartiments cellulaires.

1.2.1 Distribution intracellulaire

La figure 1.1 montre les structures intracellulaires d'une cellule phytoplanctonique type où les métaux pourront être stockés dans la cellule. Le terme « cytoplasme » utilisé dans ce mémoire désigne la totalité du matériel intracellulaire contenu par la membrane et la paroi cellulaire. Le terme « cytosol » représente quant à lui la phase liquide de la cellule où baignent les organites (mitochondries, vacuoles, chloroplastes, noyau, peroxysome, réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) et est composé de substances solubles comme les protéines, les enzymes et l'ARN (acide ribonucléique). Une seule vacuole est représentée à la figure 1.1, normalement nommée vacuole centrale, principale ou contractile, mais il est possible qu'il existe d'autres vacuoles de plus petits volumes. L'ensemble des organites de très faibles densités comprenant le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les petites vacuoles peuvent aussi être

nommés microsomes. Des corps denses granulaires peuvent aussi être présents dans les vacuoles ainsi que dans le cytosol.



Figure 1.1 : Ultrastructure d'une algue unicellulaire eucaryote type. 1 : Paroi cellulaire ; 2 : Membrane plasmique ; 3 : Cytosol ; 4 : Noyau ; 5 : Réticulum endoplasmique ;
6 : Mitochondrie; 7 : Appareil de Golgi; 8 : Chloroplaste; 9 : Grain d'amidon;
10 : Vacuoles. Figure tirée de : <u>http://perso.orange.fr/gonzales.manuel/textes/la%</u>
20mer/Algues marines benthiques/caract%E8res cytologiques algues.html

1.2.2 Aspects méthodologiques

La localisation précise des métaux à l'intérieur des nombreux compartiments intracellulaires fut étudiée principalement par microscopie électronique à transmission (MET) couplée à une analyse des métaux à l'aide d'une micro-sonde aux rayons X (EDAX : *Energy dispersive X-ray analysis*). Cependant, cette technique soufre d'un manque de sensibilité et ne parvient à déterminer quantitativement la présence de métaux que dans les organelles très riches en métaux (Heuillet *et al.*, 1986). Elle demande aussi beaucoup de temps d'analyse et de préparation des échantillons.

Des méthodes par centrifugation différentielle ont donc été développées afin d'étudier la répartition des métaux à l'intérieur de différentes fractions ou compartiments cellulaires des cellules phytoplanctoniques (Nagel et al., 1996; Wang et Rainbow, 2006). Ces méthodes font subir à un homogénat de cellules plusieurs centrifugations successives à différentes vitesses et pendant différents temps afin d'isoler certaines fractions intracellulaires à l'intérieur du culot ou du surnageant obtenu après centrifugations. Ces techniques de centrifugation permettent une analyse quantitative des métaux présents dans ces fractions et sont relativement plus simples et moins longues à utiliser que la microscopie électronique. Cependant, les fractions subcellulaires isolées par ces techniques comportent un amalgame d'organites et/ou de structures cellulaires et il demeure difficile de séparer finement un ou même plusieurs compartiments cellulaires d'intérêt. L'ensemble de la procédure de centrifugation ainsi que d'homogénéisation peuvent aussi briser certains organites et entraîner la fuite de leur contenu (Nagel et al., 1996). En dépit de tous ces désavantages, la centrifugation différentielle demeure une technique très utilisée pour l'étude de la distribution intracellulaire des métaux chez plusieurs organismes aquatiques (Vijver et al., 2004; Wang et Rainbow, 2006) quoique relativement peu d'études furent réalisées chez le phytoplancton.

Chez le phytoplancton, les études réalisées à ce jour isolent principalement deux fractions (Joux-Arab *et al.*, 1998 ; Perrein-Ettajani *et al.*, 1999 ; Ettajani *et al.*, 2001 ; Miao et Wang, 2006 ; 2007). Une première fraction insoluble comporte les noyaux, les membranes, les parois cellulaires, les organites ainsi que des granules tandis que la deuxième fraction soluble est composée du cytosol. Le cytosol comprend notamment de l'eau, des protéines thermosensibles ou enzymes (HDP : *Heat-denaturable proteins*) et des peptides thermorésistants (HSP : *Heat-stable proteins*) tels des peptides détoxifiants (GSH: glutathion, MTs : métallothionéines). Cependant, certains travaux ont aussi isolés les organites de la fraction insoluble en ajoutant une étape de centrifugation (Fisher *et al.*, 1983 ; Reinfelder et Fisher, 1994).

1.2.3 Fractions reliées à la détoxication des métaux

Certaines fractions subcellulaires telles les granules (voir sections 1.2.3.1 et 1.2.3.2) et les HSP (voir sections 1.2.3.3 et 1.3) peuvent nous renseigner sur l'habileté de différentes espèces

phytoplanctoniques à détoxiquer les métaux et, ainsi, à protéger des structures intracellulaires hautement sensibles à une trop grande concentration de métaux telles que les enzymes cytosoliques et différents organites (microsomes, mitochondries, chloroplastes).

L'existence de granules chez plusieurs organismes allant des bactéries aux animaux fut révélée par l'observation de structures de haute densité électronique au microscope électronique si bien qu'il est désormais admis que ces structures sont ubiquistes dans la nature (Nishikawa *et al.*, 2006). Ces granules ont considérablement attiré l'attention des scientifiques du domaine de l'écotoxicologie à cause de leur potentiel à complexer les métaux à l'intérieur des cellules. Une revue de la littérature a permis de retracer deux types de granules chez le phytoplancton, soit des granules de polyphosphates et d'azote/soufre.

1.2.3.1 Granules de polyphosphate

Les granules de polyphosphate, aussi appelées granules métachromatiques ou granules de volutines (« *volutin granules* »), sont celles qui ont été les plus étudiées chez le phytoplancton et ont été rapportées chez plusieurs espèces d'algues. Ce sont des polymères de centaines ou de milliers d'orthophosphates (P_i) liés par des liens phosphoanhydrides de haute énergie. Les résidus (ou monomères) de P_i forment des complexes avec le calcium et le magnésium, ces derniers étant présents en fortes concentrations dans le cytoplasme. Ces phosphato-complexes sont d'une solubilité limitée et ont une forte tendance à précipiter (Ruiz *et al.*, 2001). Des complexes avec des métaux « durs » tels que le Ba, le Mn et le Zn sont aussi présents conformément à leur grande affinité pour l'oxygène. Cependant, des métaux « moyennement durs » (Cu, Co, Pb) ainsi que certains métaux « mous » (Cd et Hg) sont aussi retrouvés dans les granules de polyphosphate. Le degré de complexation entre ces métaux et les polyphosphates n'a cependant été que peu étudié (Jensen *et al.*, 1982).

Les polyphosphates sont présents dans de petites vacuoles à l'intérieur du cytosol ainsi que dans les vacuoles contractiles des cellules algales (Komine *et al.*, 2000). Ces petites vacuoles cytoplasmiques furent ensuite dénommées acidocalcisomes par Ruiz *et al.* (2001) à cause de leur forte concentration de Ca et leur faible pH. Ce nom permettait ainsi de bien établir leur

statut d'organite. Ruiz *et al.* (2001) ont aussi observé par microscopie confocale et coloration des granules au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) que ces acidocalcisomes pouvaient fusionner avec la vacuole contractile indiquant un lien entre les deux organites. Cette fusion amènerait un stockage et une isolation des granules riches en métaux à l'intérieur de la vacuole centrale et pourrait servir de mécanisme de détoxication. L'exocytose des acidocalcisomes a aussi été observée chez *C. reinhardtii* et pourrait aussi contribuer à la détoxication des métaux (Davies et Plaskitt, 1971 ; Komine *et al.*, 1996 ; Hoober *et al.*, 1998).

Plusieurs espèces d'algues tolérantes aux métaux provenant d'environnements lourdement contaminés synthétisent de grandes quantités de granules de polyphosphate, suggérant que ces polymères jouent un rôle dans la détoxication des métaux. Par exemple, les diatomées colonisatrices de peinture d'oxyde de cuivre des genres Amphora et Navicula (Daniel et Chamberlain, 1981), de même que différentes souches de Chlamydomonas sp. provenant de rivières et de lacs hautement contaminés (Nishikawa et al., 2003 ; Aguilera et Amils, 2005) en métaux, possèdent toutes la capacité d'accumuler une grande quantité de polyphosphate notamment dans leurs vacuoles lors d'un stress métallique. Les mécanismes de séquestration des métaux et de dégradation des polyphosphates sont par contre peu connus. L'étude d'Aguilera et Amils (2005) a montré une augmentation de la synthèse de granules et de leur transport vers la vacuole principale en réponse à une augmentation de Cd dans le milieu. La gamme de concentration de Cd comprenait toutefois des concentrations de Cd total nettement plus élevées (100 à 800 µM) que celles retrouvées dans l'environnement. À partir d'une certaine concentration de Cd, la quantité totale de granules commençait à diminuer. Nishikawa et al. (2003) ont aussi observé une baisse de la quantité de polyphosphates cellulaire chez C. acidophila lors d'expositions à de fortes concentrations de Cd (20 µM Cd total) par rapport aux cellules témoins. Parallèlement, ces auteurs ont noté un dépôt de Cd et de Pi dans la vacuole centrale suggérant une séquestration du Cd cytosolique suivi d'un transfert du métal dans la vacuole couplé à une dégradation des polyphosphates.

1.2.3.2 Granules d'azote/soufre

Peu d'études, chez le phytoplancton, ont mis en évidence la présence de granules différentes de celles composées de polyphosphates. À notre connaissance, seule l'étude de Nassiri *et al.* (1997) rapporte l'existence de granules composées majoritairement d'éléments légers, soit H, C, N et O à l'intérieur du cytosol d'une diatomée marine, *Skeletonema costatum.* Ces inclusions sphériques devenaient enrichies en N, S, Cd et Cu lors d'une exposition au Cd ou au Cu et leur volume augmentait lors d'une augmentation de la concentration de métaux, suggérant l'existence d'un mécanisme de détoxication impliquant la synthèse de granules. Ce mécanisme pouvait même être complété par le transfert des granules dans la vacuole contractile et l'expulsion de ces inclusions dans le milieu de culture lors de la division cellulaire. Les cellules mères et filles deviendraient donc exemptes de ces granules riches en métaux potentiellement toxiques. La présence importante d'azote et de soufre dans ces granules lors de l'exposition au Cd suggère la co-séquestration par des peptides détoxifiants. Ces peptides seraient cependant retrouvés principalement dans la fraction des protéines thermorésistantes.

1.2.3.3 Protéines thermorésistantes

Plusieurs peptides ou protéines résistantes à un traitement thermique sont retrouvés tout naturellement chez le phytoplancton et sont induits par certains stress. Certains peptides riches en groupement thiols de la classe des métallothionéines ainsi que leurs précurseurs peuvent représenter une fraction importante de ces protéines particulièrement lors d'un stress métallique étant donné qu'ils peuvent être fortement induits par les métaux. La structure précise de ces peptides ainsi que leurs rôles cellulaires sont expliqués en profondeur à la section 1.3 de ce mémoire.

Une classe de protéines chaperonnes (protéines participant à la maturation d'autres protéines) appelée protéines de choc thermiques (Hsp : *Heat-shock proteins*) sont aussi présentes dans la fraction subcellulaire nommée « protéines thermorésistantes ou HSP ». Elles diffèrent surtout par leur poids moléculaire passant de quelques milliers de Dalton à environ 100 000 Dalton.

La présence des Hsp est ubiquiste chez les organismes vivants. Gerloff-Elias *et al.* (2006) démontre notamment la présence de quelques types de Hsp dans des cultures témoins et exposées à de haute température chez deux espèces phytoplanctoniques, *Chlamydomonas acidophila* et *Chlamydomonas reinhardtii*. La présence de Hsp fut aussi notée chez la macroalgue marine, *Enteromorpha intestinalis* (Lewis *et al.*, 2001).

Quelques unes de ces protéines Hsp (e.g. Hsp60, Hsp70) sont essentielles à la stabilisation de la structure des protéines ainsi qu'au transfert et à la dégradation des protéines à l'intérieur des cellules. Toutefois, d'autres de ces protéines, notamment celles de faibles poids moléculaires, sont induites par différents stress afin de protéger et même de restaurer la fonction de certaines protéines (Hall *et al.*, 2002). En plus d'être induites par une augmentation soudaine de la température, comme leur nom le suggère, la synthèse de ces protéines est aussi activée par d'autres stress, tels le choc osmotique, le manque de nutriments, une lumière intense, le stress oxydant et une forte prise en charge de métaux (Feder et Hoffmann, 1999 ; Wang *et al.*, 2004 ; Gulli *et al.*, 2005). Il est possible que les Hsp participent à la séquestration des métaux. Cependant, aucune étude ne fut répertoriée dans la littérature à ce sujet.

1.2.4 Facteurs affectant la distribution intracellulaire

La distribution intracellulaire des métaux chez le phytoplancton est dynamique et varie selon plusieurs facteurs tels que le taux de croissance de l'organisme (Reinfelder et Fisher, 1994), le métal en question (Fisher *et al.*, 1983) et sa concentration (Miao et Wang, 2006 ; 2007) ainsi que l'espèce utilisée (Miao et Wang, 2006). Les trois derniers facteurs influenceraient la distribution intracellulaire des métaux par le biais de mécanismes de détoxication décrits plus haut.

1.2.4.1 Taux de croissance

Tout dépendant de la nature des métaux et de leurs implications dans les processus métaboliques des algues, le taux de croissance aurait un impact différent sur la répartition subcellulaire des métaux selon l'étude de Reinfelder et Fisher (1994). Ceux-ci ont noté que la

proportion de certains métaux tels le Se, le Zn et le Cd dans la fraction cytoplasmique de la diatomée marine, *Isochrysis galbana* était plus grande chez les cellules se divisant plus lentement (taux de croissance plus faible) que les cellules croissant rapidement (taux de croissance plus élevé). Cependant, la proportion cytoplasmique d'Ag, de Pb et d'Am restait inchangée indépendamment du taux de croissance, suggérant que l'association de ces métaux non essentiels avec les cellules phytoplanctoniques résulte grandement de procédés abiotiques tels l'adsorption sur la membrane cellulaire (paroi cellulaire absente chez cette espèce). Par contre, les métaux tels le Zn et le Se participeraient davantage au métabolisme cellulaire à cause de leur nature essentiel, et le Cd participerait aussi à la manière du Zn à cause de sa nature chimique similaire, mais souvent en tant que leurre.

1.2.4.2 Le métal et sa concentration

La capacité de différents métaux à se répartir de diverses façons à l'intérieur de la cellule pourrait être intimement liée aux différents mécanismes ou moyens de détoxication disponible telle la synthèse de peptides détoxifiants. Par exemple, la proportion de Cd (Miao et Wang, 2006) et de Cu (Miao et Wang, 2007) présente à l'intérieur de la fraction soluble d'une diatomée marine, *Thalassiosira weissflogii*, augmentait et diminuait respectivement lors d'une augmentation de la concentration de métal dans le milieu d'exposition. Or, cette espèce est réputée pour synthétiser de fortes concentrations de peptides détoxifiants en réponse au Cd tandis que le Cu induirait très peu leur synthèse (Ahner et Morel, 1995), ce qui expliquerait la tendance différentielle pour la répartition subcellulaire des deux métaux.

1.2.4.3 L'espèce

L'utilisation des mécanismes de détoxication tel la synthèse de corps denses (granules) ou de peptides détoxifiants expliquerait en grande partie les variations de la répartition subcellulaire des métaux chez différentes espèces d'algues. En fait, deux microalgues marines, *Tetraselmis suecica* et *Skeletonema costatum*, séquestreraient une grande proportion du Cu intracellulaire dans la fraction insoluble (> 90%) comparativement à la fraction soluble (Perrein-Ettajani *et al.*, 1999 ; Amiard-Triquet *et al.*, 2006) tandis qu'une autre algue marine, *Haslea ostrearia*,

accumulerait plutôt une plus grande proportion de Cu dans la fraction soluble (> 75%) que celle insoluble (Amiard-Triquet *et al.*, 2006). Or, Joux-Arab *et al.* (1998) ont montré que le Cu intracellulaire pourrait être associé grandement à des peptides thermorésistants présents dans la fraction soluble chez *Haslea ostrearia*. La séquestration considérable du Cu dans les compartiments intracellulaires insolubles de *S. costatum* et de *T. suecica* pourrait être attribuable à la présence de granules. En effet, *S. costatum* séquestrerait le Cd et le Cu à l'intérieur de granules riches en N et en S comme spécifié à la section 1.2.3.2, tandis que *T. suecica* possède la capacité de séquestrer plusieurs métaux à l'aide de granules de polyphosphate (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991).

1.3 Les métallothionéines : types et distribution dans le règne animal et végétal

L'ensemble des organismes eucaryotes et procaryotes semblent posséder la capacité de synthétiser des polypeptides (chaîne de moins de 100 acides aminés) riches en cystéines appelés métallothionéines (MTs) et ayant une forte affinité pour lier les métaux (Binz et Kägi, 2007). Pendant plus de 40 ans de recherche sur ces biomolécules, un grand nombre de formes de MTs chez plusieurs organismes fut découvert. Cela ouvra la porte à la venue d'une classification rigoureuse de ces polypeptides comprenant plusieurs niveaux hiérarchiques étant basés sur les similarités de leur séquence en acides aminés ainsi que sur les relations phylogénétiques entre celles-ci (Binz et Kägi, 2007). En somme, il est possible de distinguer deux types de MTs en fonction de la façon dont elles sont synthétisées. Un premier groupe de MTs est codé directement à partir du génome tandis que le deuxième type est synthétisé enzymatiquement. Les deux groupes de MTs montrent une séquence répétée d'acides aminés Cys-X-Cys, où X est un acide aminé différent de la cystéine quoiqu'il est parfois possible de noter la séquence Cys-X-X-Cys chez les MTs du premier groupe. Les MTs du premier groupe sont en général composées d'un plus grand nombre d'acide aminés (60-80) que celles du deuxième groupe (5-20) et ont donc un plus grand contenu en cystéine permettant de complexer plus efficacement les métaux (Romero-Isart et Vasak, 2002).

Les MTs du premier groupe ont surtout été séquencées chez plusieurs animaux vertébrés et invertébrés. Elles sont aussi synthétisées par certaines plantes (Rauser, 1995) et macroalgues (Morris *et al.*, 1999). Ce type de polypeptides fut aussi isolé chez les bactéries ainsi que les cyanobactéries (Blindauer *et al.*, 2007).

Les MTs du deuxième groupe sont produites majoritairement par les plantes supérieures, les algues et certains champignons (Rauser, 1990). Cependant, la séquence génétique de l'enzyme catalysant leur synthèse a été isolée chez plusieurs animaux (protistes, nématodes, oligochètes, chironomes) (Cobbett, 2000). Chez une espèce de nématode, *Caenorhabditis elegans*, cette séquence code même pour une enzyme fonctionnelle puisque son insertion à l'intérieur d'une souche de la levure, *Schizosaccharomyces pombe*, (dont l'enzyme PCS fut désactivée) confère la tolérance au Cd.(Clemens *et al.*, 2001 ; Vatamaniuk *et al.*, 2002). À ce jour, la présence de ces MTs n'a pas été observée chez aucune espèce de cyanobactérie, quoique ces organismes peuvent exprimer une enzyme primitive analogue à celle retrouvée normalement, mais incapable de catalyser la synthèse de polypeptides (Harada *et al.*, 2004 ; Tsuji *et al.*, 2004). Dans la littérature, les MTs de ce groupe sont appelées cadystines, γ -glutamyl peptide, MT de classe III et, de façon plus populaire, phytochélatines (Rauser, 1990). C'est de ce groupe de peptides dont il sera principalement question dans ce mémoire.

1.3.1 Les phytochélatines

Cinq types de phytochélatines (PCn) furent découverts à ce jour. Ces molécules présentent la formule général (γ -Glu-Cys)_nX, (n varie de 2 à 11) où X est un des quatre acides aminés, Gly (PCn canoniques), Glu (*iso*-PCn), Ser (*hydroxyméthyl*-PCn) ou β -Ala (*homo*-PCn). La chaîne peptidique peut aussi ne pas posséder d'acide aminé terminal dans le cas des des-Gly PCn ou (γ -Glu-Cys)_n. (Rauser, 1995 ; Rea *et al.*, 2004). Les PCn canoniques et possiblement les *des*-Gly PCn seraient probablement ubiquistes chez les organismes synthétisant des PCn (Rea *et al.*, 2004). Cependant, en plus de synthétiser ces deux types de PCn, certaines espèces de graminées telles que le riz, le blé, le seigle et l'avoine produiraient aussi les *hydroxyméthyl*-PCn (Klapheck *et al.*, 1994), le maïs synthétiserait aussi les *iso*-PCn (Meuwly *et al.*, 1995) et

certains membres de la famille des Fabales produiraient aussi les *homo*-PCn (Grill *et al.*, 1986 ; Klapheck *et al.*, 1995).

Les PCn canoniques sont les principales phytochélatines retrouvées chez les microalgues eucaryotes (Gekeler *et al.*, 1988 ; Ahner *et al.*, 1995). Cependant, Pawlik-Skowrońska (2003) rapporte la synthèse d'un polypeptide thiolé atypique qui diffère des phytochélatines par seulement une cystéine additionnelle chez *Stigeoclonium* tandis que d'autres études rapportent l'existence de peptides thiolés de structure inconnues (Wikfors *et al.*, 1991 ; Le Faucheur *et al.*, 2005b ; 2006). Les phytochélatines semblent donc ne pas être les seules molécules impliquées dans la séquestration des métaux chez le phytoplancton.

1.3.1.1 Mécanisme de synthèse enzymatique

Le mécanisme complet expliquant la synthèse des phytochélatines n'est pas encore élucidé (Clemens, 2006). En fait, la première phase de la réaction enzymatique dans laquelle il y a rupture d'une sous-unité γ -Glu-Cys (γ -EC ou γ -glutamylcystéine) à partir du substrat donneur fut démontrée sans équivoque par des expériences *in vitro* à l'aide de l'enzyme phytochélatine synthase (PCS) d'*Arabidopsis thaliana* (AtPCS1). Cependant, aucune donnée dans la littérature ne permet de réfuter un mécanisme de synthèse enzymatique par un transfert tripeptidique (GSH) (Rea *et al.*, 2004). La deuxième partie de la réaction enzymatique permettant l'activation du transfert du γ -EC et la synthèse de phytochélatines ainsi que le mécanisme de rétro-inhibition restent encore obscures (Clemens, 2006).

Le GSH, étant un important substrat pour la synthèse de PCn, doit tout d'abord être synthétisé à l'aide de deux réactions enzymatiques. Premièrement, deux acides aminés, le glutamate (Glu) et la cystéine (Cys) forment le γ -glutamylcystéine (γ -Glu-Cys ou γ -EC) à l'aide de l'enzyme γ -EC synthétase. Deuxièmement, le GSH est synthétisé par la ligation du γ -Glu-Cys avec un autre acide aminé, la glycine (Gly) de part la réaction de la glutathion synthétase (Xiang et Olivier, 1998). Voici en détail le mécanisme hypothétique menant à la synthèse enzymatique des phytochélatines. Il est possible de suivre chaque étape sur la figure 1.2.

1) Par une réaction d'acylation, le GSH se lie au groupement SH d'une cystéine située sur le site 1 de la PCS. Cette cystéine serait conservée à 100 % chez tous les PCS connues ainsi que les « *PCS-like proteins* » des bactéries (Vatamaniuk *et al.*, 2000).

2) Le GSH perd ensuite un de ses acides aminés, la glycine (Vatamaniuk et al., 2000).



Figure 1.2 : Mécanisme hypothétique de la synthèse des phytochélatines. Schéma tiré de Clemens (2006).
3) L'activation de la synthèse finale des PCn pourrait être réalisée de deux façons selon l'école de pensée à laquelle on adhère. Pour la première école, le γ -EC provenant du GSH ayant perdu son acide aminé terminal (Gly) lors de l'étape 2 pourrait être transféré à une autre molécule de GSH ou de PCn, mais seulement si ces derniers peptides ont complexé des ions activateurs (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Selon la deuxième école, le dipeptide, γ -EC, serait transféré à une autre molécule de GSH (non complexée aux ions activateurs), de PCn, de *des*Gly-PCn, de γ -Glu-Cys ou de homo-GSH. Ce transfert se ferait seulement avec l'aide d'un complexe Cd-GS₂, L-cystéine-Cd ou γ -Glu-Cys-Cd (les complexes Cd-PCn n'ont pas été testés et pourraient peut-être servir d'activateurs) activant la réaction d'une façon inconnue mais ne participant pas à celle-ci (Oven *et al.*, 2002). Ces derniers complexes pourraient par exemple activer la réaction enzymatique par un transfert d'ions Cd²⁺ vers la PCS ou par la simple liaison du complexe avec la PCS.

4) Il y aurait donc comme produit final une molécule de PCn avec 2 à 11 sous unités γ -Glu-Cys. Le deuxième mécanisme d'activation sous-entend une plus faible complexation par le Cd des PCn produites que le premier mécanisme puisque le substrat présent au site 2 de l'enzyme ne serait pas obligatoirement lié aux ions de Cd²⁺. En fait, dans le cas où le GSH servirait de substrat au site 2 de l'enzyme, Oven *et al.* (2002) ont montré que seulement les molécules de GSH et non les complexes Cd-GS₂ pouvaient servir de substrats de la réaction (Oven *et al.*, 2002). Ainsi, il y aurait formation d'apo-PC₂ (molécule de PC₂ ne formant pas de complexe avec les métaux) si l'on suppose que le groupement SH du GSH qui était lié au site 1 de l'enzyme lors de la première étape de la réaction et devenant un constituant de la PC₂ formée n'était pas lié au Cd. Il faut cependant noter que plusieurs autres substrats sont capables d'accepter les unités γ -ECs au site 2 de l'enzyme (voir étape 3) et il est fort probable que les PCn faisant office de substrat au site 2 de l'enzyme possèdent des atomes de Cd liés à leurs groupements SH. Pour ce qui est du premier mécanisme proposé, les PCn produites possèderait cette fois au moins un atome de Cd lié à leurs groupements thiols puisque le complexe Cd-GS₂ servirait de substrat au site 2 de l'enzyme.

Le mécanisme de rétro-inhibition de la synthèse des PCn n'est pas encore connu précisément. On ne peut que proposer quelques hypothèses à ce sujet. Premièrement, l'épuisement des substrats de la réaction ou des complexes activateurs Cd-GS₂, L-cystéine-Cd et γ -Glu-Cys-Cd pourrait contribuer à ralentir la réaction. Deuxièmement, la compétition entre les apo-PCn produites et le GSH pour la liaison avec le groupement SH de la PCS pourrait empêcher la réalisation de la première étape de la réaction lors d'un excès d'apo-PCn produites. Troisièmement, les PCs synthétisées enzymatiquement pourraient être converties en des formes de poids moléculaire plus élevées telles des complexes de haut poids moléculaires (HMW : *High molecular weight complex*) qui seraient incapables de servir de substrat de la réaction. Finalement, le transport des complexes Cd-PCn du cytosol vers la vacuole pourrait aussi contribuer à ralentir la réaction (Rea *et al.*, 2004).

Le mécanisme d'inhibition de la synthèse des PCn ne serait pas associé à une auto-terminaison de la réaction due à la séquestration du Cd par les produits afin de ne plus rendre disponible les ions Cd²⁺ pour l'activation de la PCS. Ce mécanisme d'inhibition fut en fait proposé par Löffler *et al.* (1989). À cette époque, l'activation de la synthèse des PCn était présumément réalisée par la liaison d'ions Cd²⁺ avec la PCS. Oven *et al.* (2002) ont cependant montré que des molécules de PCn possédant des métaux liés à leurs groupements SH, à l'exception des complexes Cd-GS₂, pouvaient servir de substrat de la réaction en acceptant les unités γ -EC afin de former un oligomère plus long. Ainsi, les produits de la réaction ayant séquestré des atomes de Cd peuvent servir de substrat par la suite et donc ne seraient pas impliqués dans l'inhibition de la synthèse des PCn comme l'avait crû Löffler *et al.* (1989).

Le modèle de la synthèse des PCn stipulant que les complexes Cd-GS₂, L-cystéine-Cd ou γ -Glu-Cys-Cd serviraient à activer la synthèse des PCn, mais ne seraient pas impliqués comme substrat de la réaction (Oven *et al.*, 2002), laisse entendre que la quantité de PCn produite pourrait dépasser rapidement la quantité de Cd internalisée dans la cellule puisqu'un complexe thiol-Cd permettrait la synthèse de plusieurs molécules de phytochélatines. Le Cd activant la réaction ne serait pas « piégé » par les PCn produites. Ce mécanisme permettrait une réponse plus rapide à une entrée d'ions métalliques accrue afin que la cellule prévienne les effets toxiques potentiels de métaux non essentiels et essentiels.

Preuves existantes à l'appui du mécanisme d'activation par un complexe thiol-Cd n'étant pas un substrat de la réaction

L'activation de la synthèse des PCn à l'aide de différents complexes thiol-Cd (enzyme peu spécifique aux substrats) ne faisant pas office de substrat de la réaction (Oven et al., 2002) semble plus plausible que l'activation avec ce même complexe jouant le rôle de substrat. En effet, Vatamaniuk et al. (2000) ainsi que Oven et al. (2002) ont montré que la synthèse de PCn in vitro pouvait procéder, quoique à des vitesses variables tout dépendant des tampons utilisés, seulement en présence de GSH avec les groupements thiols bloqués (CH₃-S-GSH) afin de former des peptides de la forme CH₃-S-PCn. De plus, plusieurs études ont prouvé que la PCS pouvait lier les métaux. Par exemple, la tolérance au Cd a pu être augmentée chez une souche mutante de Saccharomyces cerevisiae, une levure sensible au Cd capable d'exprimer un gène (AtPCS1) d'une espèce de plante, Arabidopsis thaliana, codant pour un type de PCS tronqué incapable de catalyser la synthèse de PCn (Ruotola et al., 2004). La tolérance au Cd, dans ce cas, pourrait être due au fait que ce métal serait séquestré efficacement par l'enzyme PCS même en présence d'un vaste excès d'autres ligands intracellulaires. Cela empêcherait le Cd d'induire ses effets toxiques par la liaison avec les structures sensibles intracellulaires. Une forte expression du gène AtPCS2 chez Schizosaccharomyces pombe, une levure, confèrerait une tolérance au cuivre même en l'absence de synthèse de PCn (Cazale et Clemens, 2001). La présence de métaux associés à la PCS comme activateur de l'enzyme et non comme partie essentielle des substrats de la réaction pourrait aussi expliquer pourquoi plusieurs métaux activant la PCS ont peu ou pas de tendance à former des complexes avec les PCn (Maitani et al., 1996). Finalement, la synthèse de PCn où l'inducteur ne participerait pas à la réaction pourrait aussi expliquer pourquoi certaines espèces de phytoplancton synthétisent des quantités de PCn largement en excès par rapport au métal pris en charge à l'intérieur de leurs cellules (Ahner et al., 2002).

1.3.1.2 Induction

Un vaste étendu de métaux et de métalloïdes stimulent la synthèse de PCn à différents degrés chez les plantes et le phytoplancton, mais, dans la quasi-totalité des cas, le cadmium induirait

le plus fortement leur synthèse. En fait, le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le zinc (Zn), l'antimoine (Sb), l'argent (Ag), le mercure (Hg), l'arsenic (As), le cuivre (Cu), le sélénium (Se), l'étain (Sn), l'or (Au), le bismuth (Bi), le tungstène (W), le tellure (Te), le gallium (Ga), l'indium (In) et le palladium (Pd) peuvent tous induire la synthèse de PCn chez les plantes supérieures (Grill et al., 1987; Maitani et al., 1996; Zenk, 1996). Chez le phytoplancton, l'ensemble de ces éléments qui ont été testés jusqu'à maintenant, c'est-à-dire tous les éléments exceptés les huit derniers de la série, activent aussi la synthèse des PCn (Gekeler et al., 1988 ; Ahner et Morel, 1995 ; Knauer et al., 1998 ; Le Faucheur et al., 2006). Les complexes entre les métaux et le GSH activeraient la réaction enzymatique de la PCS et non seulement le métal seul. Ainsi, tous les métaux pouvant former des complexes avec le GSH aurait le potentiel d'activer la synthèse de PCn. Les métaux présents majoritairement sous forme anionique dans le milieu aqueux (e.g. As, Se, Te et W) pourraient être réduits à l'intérieur des cellules. Cela permetterait leur complexation avec les groupements thiols des phytochélatines. Par exemple, Schmöger et al. (2000), ont démontré par ESI-MS (electrospray ionization mass spectroscopy) l'existence d'un complexe formé in vitro impliquant deux molécules de PC2 et coordinant un ion As via trois groupements thiols ($[\gamma$ -Glu-Cys- γ -Glu-Cys-Gly]₂As). De plus, des extraits de suspension de cellules d'une plante supérieure, Rauvolfia serpentina, exposée à l'arsenite (As(III)) présentaient une co-élution de l'As avec les phytochélatines après chromatographie d'exclusion.

Curieusement, même si la synthèse de PCn peut être activée par plusieurs métaux, la présence de complexes PCn-Me (Me : métal) fut démontrée seulement pour quelques métaux. En effet, seulement les complexes entre les PCn et le Cd (Yen *et al.*, 1999), l'Ag, le Cu (Maitani *et al.*, 1996) et l'As (Schmöger *et al.*, 2000) ont été observés *in vivo* chez différentes espèces de plante jusqu'à maintenant. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les métaux peuvent ne servir que d'activateur de la réaction et ne pas participer nécessairement à la réaction en tant que substrat.

1.3.1.3 Complexation des métaux et destin

Plusieurs molécules de PCn peuvent complexer ensemble les métaux afin de former transitoirement des complexes de faibles poids moléculaires (LMW ; *Low molecular weight*) qui serviront à former ultérieurement des complexes de haut poids moléculaires (HMW : *High molecular weight*). Les complexes LMW serait synthétisés présumément dans le cytosol. Cependant, des PCn furent mesurées dans le chloroplaste de *C. reinhardtii* (Nagel *et al.*, 1996) et d'*Euglena gracilis* (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002) et pourraient aussi être associées à des granules vacuolaires ou cytosoliques riches en soufre (Nassiri *et al.*, 1997 ; Belleghem *et al.*, 2006).



Figure 1.3 : Modèle structural des complexes PCn-Cd de haut poids moléculaires avec comme exemple le complexe Cd₃(PC₃)₄. Des complexes analogues seraient aussi possibles tels le Cd₂(PC₂)₄ ou le Cd₃(PC₄)₃. Les groupements carboxyliques (-COO⁻) sont représentés par des cercles pleins. Figure tirée de Strasdeit *et al.* (1991).

Les complexes LMW seraient par la suite transférés dans la vacuole où il y aurait transformation vers des complexes HMW (Hu *et al.*, 2001 ; Perales-Vela *et al.*, 2006). Les complexes HMW diffèrent des complexes LMW par la présence de sulfures stabilisant les complexes Me-SH (figure 1.3). En fait, plusieurs molécules de PCn sont superposées entourant les complexes HS-Me-S-Me-SH comme représenté à la figure 1.3 de sorte que leurs groupements carboxyliques hydrophiles soient situés vers l'extérieur du complexe (Strasdeit *et al.*, 1991). Par conséquent, cette conformation facilite la mobilité des complexes incluant des sulfures de métaux ayant normalement une forte tendance à s'agréger et à précipiter (Hu *et al.*, 2001). La présence de sulfures permet la séquestration de plus d'ions métalliques que ce qui pourrait être séquestré par les PCn elles-mêmes. Le ratio SH :Cd est donc plus faible pour les

complexes HMW que les complexes LMW (Hu *et al.*, 2001). Ce transport des complexes LMW à l'intérieur de la vacuole fut démontré chez *C. reinhardtii* (Wang et Wu, 2006), chez une espèce de levure (Ortiz *et al.*, 1995) ainsi que chez une espèce de plante (Salt et Rauser, 1995). En fait, des mutants de ces trois espèces déficients d'un gène codant pour un transporteur vacuolaire ne pouvaient accumuler de complexes HMW.

Les complexes HMW pourraient être simplement stockés dans la vacuole comme la forme finale de détoxication. Pour ce qui est des complexes LMW, ils peuvent être dégradés lorsque les conditions du milieu redeviennent normales. En effet, des expériences de transferts d'algues préalablement exposées aux métaux dans un milieu de culture standard ont montré une diminution des concentrations intracellulaires de PCn chez une algue d'eau douce, *Stichococus bacillaris* (Pawlik-Skowrońska, 2000) ainsi que chez deux algues marines, *Thalassiosira weissflogii* (Ahner *et al.*, 1995) et *Phaeodactylum tricornutum* (Morelli et Scarano, 2001). Cette diminution était accompagnée d'une augmentation des concentrations de GSH chez *S. bacillaris* et *P. tricornutum*, suggérant une possible dégradation des PCn en GSH.

Il est également possible que les complexes LMW soient exportés à l'extérieur des cellules comme il a été montré chez *T. weissflogii* (Lee *et al.*, 1996). Tang *et al.* (2005) ont aussi observé chez la même espèce phytoplanctonique une expulsion de GSH en réponse à une augmentation de cuivre dans le milieu. Cependant, l'exportation était reliée de près aux dommages membranaires et n'était probablement pas une réponse spécifique de l'algue pour contrôler la spéciation du cuivre dans le milieu.

1.4 Rôle des phytochélatines

La présence de PCn chez l'ensemble des plantes et des algues et même chez certains champignons souligne leur grande importance au niveau physiologique. Grâce aux recherches réalisées au cours des 20 dernières années sur les PCn, il est maintenant établi que ces peptides jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux, dans la protection du stress oxydant, mais sont

surtout essentiels pour la détoxication du Cd et de l'As chez certains organismes (Zenk, 1996 ; Clemens, 2006).

1.4.1 Détoxication et tolérance aux métaux

Plusieurs études chez le phytoplancton suggèrent une implication importante des PCn dans la détoxication et la tolérance aux métaux. Le niveau de résistance au Cd ou la quantité de Cd bioaccumulé s'est avéré être corrélé au niveau de synthèse de PCn chez différentes souches de *P. tricornutum* (Wikfors *et al.*, 1991) et de *C. reinhardtii* (Hu *et al.*, 2001) résistantes à ce métal. En outre, des souches résistantes de *Scenedesmus acutus* (Torricelli *et al.*, 2004) et de *Chlorella* sp. (Kaplan *et al.*, 1995) synthétisaient davantage de PCn que les souches sensibles pour une même concentration de Cd total dans le milieu de culture (sans tenir compte de la quantité de Cd bioaccumulé).

L'habilité à synthétiser des PCn en réponse aux variations de la concentration de certains métaux permettrait aussi aux microalgues d'acquérir une co-tolérance à d'autres métaux. Ainsi, une souche de *S. acutus* tolérante au Cr(VI) (CrO_4^{2-}) (Torricelli *et al.*, 2004) ainsi qu'une autre souche de *C. reinhardtii* tolérante au Cd (Kobayashi *et al.*, 2005) étaient aussi co-tolérante respectivement au Cd et à l'arsenate (As(V), AsO4³⁻). Cette co-tolérance de *S. acutus* était reliée à une plus forte synthèse de PCn chez les cellules tolérantes. Pour *C. reinhardtii*, la co-tolérance était aussi reliée à la synthèse de PCn puisqu'un traitement à la BSO (buthionine sulfoximine), un inhibiteur de la synthèse de PCn, enlevait la co-tolérance acquise chez cette espèce. Le niveau de complexation entre ces métaux/métalloïdes et les phytochélatines n'a cependant pas été évalué.

Le type de complexe formé aurait aussi un impact sur le potentiel détoxifiant de ces peptides. Ainsi, une souche mutante de *C. reinhardtii* résistante au Cd produisait presque exclusivement des complexes HMW tandis que la souche autochtone produisait une plus grande proportion de complexes LMW. La résistance de la souche mutante pourrait être liée au fait que le Cd a moins tendance à se dissocier à l'intérieur des complexes HMW que dans les complexes LMW (Hu *et al.*, 2001). De plus, un mutant de la levure, *S. pombe*, capable de synthétiser normalement des PCn, mais incapable de synthétiser les complexes HMW, serait hypersensible au Cd (Ortiz et al., 1992).

L'augmentation de la longueur de la chaîne polypeptidique des PCn permettrait aussi d'augmenter la stabilité des complexes SH-Cd (Kneer et Zenk, 1997 ; Fortin et Campbell, 1997). Cette caractéristique des PCn plus polymérisées pourrait même jouer un rôle dans la résistance aux métaux. Ainsi, Kaplan *et al.* (1995) ont trouvé que la souche de *Chlorella* sp. résistante au Cd ne synthétisait pas seulement davantage de PCn que la souche sensible, mais la longueur des chaînes peptidiques produites était plus grande chez la souche tolérante. En outre, *P. tricornutum* ainsi que *T. suecica*, deux microalgues marines, seraient parmi les espèces phytoplanctoniques les plus résistantes au Cd et synthétiserait aussi de longues chaînes de PCn. En fait, *P. tricornutum* et *T. suecica* produirait majoritairement des PCn avec, respectivement, quatre et cinq sous-unités γ -Glu-Cys (Torres *et al.*, 1997 ; Pérez-Rama *et al.*, 2001).

Récemment, le séquençage des gènes codant pour la PCS et la manipulation génétique des levures et des plantes ont permis de fournir des preuves irréfutables du potentiel détoxifiant des phytochélatines pour certains métaux et métalloïdes chez ces organismes. En effet, des mutants déficients du gène de la PCS (AtPCS1) chez *A. thaliana* sont beaucoup plus sensibles au Cd (Howden *et al.*, 1995) et à l'arseniate (AsO4²⁻) tout en étant légèrement plus sensibles au Cu, au Hg et à l'Ag (Ha *et al.*, 1999). D'une façon similaire, les mutants du gène de la PCS (SpPCS) chez *S. pombe* deviennent hypersensibles au Cd, à l'arseniate et, dans une plus faible mesure, au Cu (Ha *et al.*, 1999 ; Clemens *et al.*, 1999). Finalement, l'insertion du gène AtPCS1 dans la levure, *S. cerevisiae*, rendait cette espèce tolérante au Cd proportionnellement au niveau d'expression du gène ou à la synthèse de PCn (Vatamaniuk *et al.*, 1999).

Même si la production de PCn représente un important mécanisme de détoxication pouvant expliquer la tolérance aux métaux de plusieurs espèces, d'autres processus intracellulaires peuvent contribuer à augmenter la résistance aux métaux des organismes expliquant le fait que certaines études n'ont pu relier la production de PCn à la tolérance aux métaux. Par exemple, la tolérance au Cd d'une souche mutante de *C. reinhardtii* isolée par Nagel et Voigt (1989)

serait due à une altération du métabolisme, présumément des processus photosynthétiques, puisqu'elle synthétisait moins de chlorophylle que la souche autochtone. La complexation des ions cadmium par les PCn serait cependant moins importante chez la souche tolérante que la souche autochtone, indiquant que l'acquisition de la tolérance au cadmium n'est pas reliée à la production de PCn. Chez la plante, *Silene vulgaris*, la tolérance au Cd serait aussi due à d'autres processus physiologiques que la synthèse de PCn puisqu'une souche sensible à ce métal synthétisait plus de PCn même plus polymérisées, à un rythme plus rapide que la souche tolérante. De plus, la quantité de sulfure incorporé dans les complexes PCn-Cd était semblable chez les deux souches (De Knecht *et al.*, 1994).

1.4.1.1 Évolution de la phytochélatine synthase comme mécanisme de détoxication

Tout au long de leur histoire évolutive, la plupart des organismes terrestres et aquatiques ne doivent pas avoir eu à faire face à d'importantes concentrations en métaux ou métalloïdes (e.g. Cd ou As) dans leur milieu. L'augmentation considérable de ces éléments, étant attribuable majoritairement à l'industrialisation, n'est survenue que récemment à l'échelle géologique. Il est donc difficile de concevoir de quelle façon un tel mécanisme de détoxication des métaux et métalloïdes a pu évoluer étant donné la présence relativement rare de ces éléments non essentiels dans l'environnement (Clemens, 2006).

On peut quand même poser quelques hypothèses afin d'expliquer l'évolution d'un tel mécanisme (Clemens, 2006): 1) la régulation des éléments essentiels, 2) l'activité biochimique accidentelle de la PCS ; 3) la participation des PCn à l'intérieur d'autres fonctions métaboliques.

Le Cd peut servir de micronutriment lorsque présent en faible concentration autant chez les algues (Lane et Morel, 2000) que les plantes (Roosens *et al.*, 2003). Premièrement, nous pourrions spéculer que ces organismes ont appris à séquestrer efficacement ce métal généralement « non essentiel » par une forte induction de la synthèse de PCn dans le but de combler un éventuel déficit en Zn. Deuxièmement, la forte stimulation de la synthèse des PCn

par le Cd pourrait seulement être due à des facteurs chimiques/biochimiques, tels la très forte affinité du Cd pour former des complexes stables avec les groupements thiols, sans nécessairement avoir été acquis au cours de l'évolution. Cependant, le Cu (I) possède aussi une haute affinité pour les groupements thiols, mais stimule habituellement beaucoup moins la synthèse de PCn. Cette dernière observation va à l'encontre de l'hypothèse voulant que la grande stimulation de la PCS par le Cd soit purement reliée à la chimie de complexation entre les thiols et ce métal. Par conséquent, d'autres interactions encore inconnus entre le Cd et le milieu intracellulaire pourraient peut-être jouer un rôle. Troisièmement, la PCS pourrait avoir d'autres rôles encore inconnus qui pourraient expliqués sa grande activité en présence de Cd. Par exemple, la PCS purifiée à partir d'*Arabidopsis* (AtPCS1) serait impliquée dans la dégradation du GSH *in vitro* lors d'un ajout de Cd, car elle pourrait catalyser la formation de γ -EC à partir du GSH (Beck *et al.*, 2003).

1.4.2 Détoxication des espèces d'oxygène réactives (ROS)

En plus de leur potential détoxifiant en présence de métaux, les PCn possèdent aussi un fort potentiel antioxydant étant donnée leur richesse en cystéine. En effet, comme pour les autres types de métallothionéines, ils ont une beaucoup plus forte capacité à inactiver les espèces réactives oxygénées telles le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'anion superoxyde (O_2^-) que le GSH. Ainsi, une molécule de PC₃ pourrait réduire environ quatre fois plus de H_2O_2 qu'une autre de GSH ou d'acide ascorbique (Tsuji *et al.*, 2002). Il n'est donc pas surprenant que l'induction des PCn par certains métaux comme le Zn chez l'algue *Dunaliella tertiolecta* amène une tolérance aux agents oxydants tels un pesticide, le paraquat ou d'autres molécules oxydantes (H_2O_2).

Le stress oxydatif pourrait aussi contribuer à augmenter la production de PCn par la stimulation de la synthèse du GSH médiée par une plus grande expression des deux enzymes (γ -EC synthétase et glutathion synthétase) impliquées dans sa biosynthèse. La réaction enzymatique de la PCS menant à la synthèse de PCn serait donc stimulée par une accélération du flux de production de son substrat, le GSH (Tsuji *et al.*, 2003).

1.4.3 Rôle dans l'homéostasie

Les PCn pourraient jouer un rôle important dans l'homéostasie des ions métalliques (Rauser, 1995 ; Perales-Vela *et al.*, 2006). En fait, même sans la présence de Cd ajouté aux milieux, plusieurs espèces de phytoplancton marin cultivées en laboratoire (Ahner *et al.*, 1995 ; Rijstenbil *et al.*, 1998) synthétisent de faibles concentrations de PCn. Leur synthèse serait fonction de la quantité d'azote disponible dans le milieu (Rijstenbil *et al.*, 1998). De plus, certaines espèces de plantes synthétisent de faibles concentrations de PCn à l'intérieur d'organes, tels que les feuilles, étant la plupart du temps épargnées par les stress métalliques (Clemens, 2006).

Bien qu'il soit bien établi que les PCn soient constitutivement synthétisées, le potentiel inducteur de la synthèse de PCn par les micronutriments tels que le Cu et le Zn en l'absence de stress métalliques ne fut que peu abordé dans la littérature. Quelques éléments de preuves appuyant l'implication des PCn dans la régulation des métaux essentiels furent amenés par Grill et al. (1988). Cette équipe de recherche mesura une augmentation de la synthèse de PCn concomitante à un appauvrissement du milieu en Cu et Zn lors d'expériences de croissance de cellules de différentes espèces de plantes dans un milieu de culture non contaminé. La concentration de PCn atteignait un maximum juste avant le début de la phase stationnaire, ce qui coincidait avec la disparition totale des micronutriments du milieu. La concentration des PCn pour les cellules en phase stationnaire diminuait ensuite progressivement présumément par dégradation de celles-ci. Même si le degré de complexation entre ces peptides et les micronutriments ne fut pas évalué, ces résultats suggèrent un contrôle de la concentration intracellulaire de Cu et de Zn par les PCn en conditions de surplus suivi par un relarguage de ces métaux lors de la dégradation des PCn. Des expériences in vitro ont, par après, démontré que le Cu ou le Zn pouvaient effectivement être transféré des PCn aux apoenzymes, ayant comme cofacteurs enzymatiques ces micronutriments, afin de les réactiver (Thumann et al., 1991). Il semble donc que les PCn jouent un rôle dans deux processus cellulaires. Elles permettent premièrement la mise en réserve de métaux essentiels en condition de surplus et, deuxièmement, elles jouent le rôle de molécule chaperone pour l'activation des enzymes.

1.5 Rôle du GSH

Le GSH est le peptide thiolé le plus abondant dans la plupart des cellules végétales. Il joue un rôle central pour la protection de plusieurs organismes contre les stress environnementaux tels que les métaux, le stress oxydatif et les xénobiotiques (Xiang et Olivier, 1998). Sa grande concentration ainsi que son rôle dans de nombreux processus cellulaires font de lui une molécule idéale pour la régulation de l'homéostasie cellulaire. En effet, il sert de cofacteur enzymatique pour plusieurs réactions enzymatiques et contribue à rétablir les ponts disulfures des protéines intracellulaires. Il est aussi très important pour le maintien d'un environnement intracellulaire réducteur de part son potentiel antioxydant.

1.5.1 Détoxication des métaux

Le GSH est essentiel à la synthèse des PCn et, de ce fait, il contribue indirectement à la détoxication des métaux. La concentration de GSH serait généralement bien régulée chez les microalgues marines (Rijstenbil et Wijnholds, 1996; Morelli et Scarano, 2001; Ahner et al., 2002) ou d'eau douce (Le Faucheur et al., 2005a) exposées à certains métaux (Cd, Cu) dans des milieux tamponnés et à l'état d'équilibre. En effet, la concentration de GSH demeure constante malgré une exposition aux métaux. Cependant, Le Faucheur et al. (2006) ont noté, chez Scenedesmus vacuolatus, une stimulation de la synthèse de GSH après exposition à long terme au plomb, à l'argent, à l'arsenite et à l'arseniate ainsi qu'une inhibition pour l'exposition à l'antimoine (Sb(III)). Les concentrations libres de Pb²⁺ étaient tamponnées avec l'EDTA tandis que celles des autres métaux ou métalloïdes ne l'étaient pas. Ces métaux n'étant pas tamponnés étaient cependant présents en fortes concentrations et on peut supposer que leurs concentrations totales ne devaient que varier faiblement en fonction du temps d'exposition. La régulation complexe du GSH (Xang et Olivier, 1998) à plusieurs niveaux pourrait peut-être expliquée que, dans certains cas, les concentrations de GSH cellulaires ne sont pas maintenues constantes tout au long de l'exposition et à l'état d'équilibre. En fait, les métaux peuvent affecter les processus cellulaires par plusieurs mécanismes tels la production de ROS, la liaison non-spécifique à plusieurs biomolécules importantes dont les acides nucléiques, les enzymes et les protéines (Fahey et al., 1987 ; Rennenberg, 1982).

Une stimulation de la synthèse de GSH en réponse ou non à une exposition aux métaux pourrait jouer un rôle dans leur détoxication en stimulant la synthèse de PCn. En effet, une augmentation des niveaux intracellulaires de GSH chez des cultures cellulaires de plants de tomate peut stimuler l'accumulation de PC_2 (Mendum *et al.*, 1990). Torricelli *et al.* (2004) ainsi que Hu *et al.* (2001) ont exposé au Cd des souches mutantes de *S. acutus* et de *C. reinhardtii* résistantes au Cr et au Cd, et ont noté une plus grande capacité à synthétiser le GSH ainsi qu'à rétablir le pool intracellulaire de GSH chez les souches mutantes que chez les souches autochtones. Ceci pourrait expliquer la stimulation de la synthèse des PCn chez les souches mutantes plus résistantes à ces métaux.

Le rôle direct du GSH dans la détoxication aux métaux par leur complexation n'a pas été beaucoup étudié in vivo chez les microalgues, les champignons et les plantes. À notre connaissance, seul Howe et Merchant (1992) font l'hypothèse qu'une grande proportion de Hg²⁺ pourrait être complexée par le glutathion chez C. reinhardtii exposé à ce métal étant donné la grande stabilité du complexe Hg(GSH)₂ à pH physiologique ($K_d = 10^{-41}$) (Howe et Merchant, 1992). De plus, le Hg stimulait la production de GSH, mais induisait seulement faiblement la synthèse de PC2. Il est donc possible que des métaux tels l'Ag et le Hg stimulant peu la synthèse de PCn, mais présentant une grande affinité pour le GSH soient détoxifiés principalement par ce tripeptide. Puisque les complexes Cd-GSH (constantes de formation : log K CdGSH⁻¹ = 8,5 et log β Cd(GSH)₂⁻⁴ = 12,4 ; Leverrier *et al.*, 2007) sont, par plusieurs ordres de grandeurs, moins stables que les complexes Ag-GSH (log K AgGSH⁻² = 12,3 et log β Ag(GSH)₂⁻⁵ = 14,3 ; IUPAC, 2001) ou Hg-GSH (log K HgGSH⁻¹ = 26 et log β Hg(GSH)₂⁻⁴ = 33,4 ; NIST, 2004), Howe et Merchant (1992) spécule que l'unique potentiel du Cd à induire la synthèse de phytochélatines pourrait représenter une adaptation du phytoplancton pour pallier à la relativement faible capacité du GSH à complexer le Cd et à détoxifier cet ion efficacement.

1.5.2 Détoxication des espèces d'oxygènes réactives (ROS)

Quelques espèces d'oxygène réactives telles que l'anion superoxyde (O_2^{-}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singlet (O_2^{-} ($^{1}\Delta_{g}$)) et le radical hydroxyl (OH) sont naturellement produites transitoirement chez les organismes aérobies. Ces molécules sont hautement toxiques pour les organismes aérobies, car elles peuvent oxyder les protéines, les lipides et les acides nucléiques menant souvent à une altération des structures cellulaires. Bien que leur production soit lente en condition normale, certains stress environnementaux (lumière intense, UV, métaux avec activité redox comme le Fe et le Cu, xénobiotiques) peuvent accélérer leur production (Pinto *et al.*, 2003).

Plusieurs systèmes enzymatiques et d'oxydo-réductions existent pour désactiver ces ROS. Lorsque les niveaux de ROS excèdent la capacité de ces systèmes antioxydants à les désactiver, des dommages cellulaires apparaissent. Le glutathion peut participer à la détoxication d'un de ces ROS, le H_2O_2 , par sa réduction en eau à l'aide de deux mécanismes : 1) la glutathion peroxydase (Pinto *et al.*, 2003) et 2) le cycle ascorbate/GSH (Fahey *et al.*, 1987).

1) Le GSH peut simplement réduire le H_2O_2 en eau à l'aide de la glutathion peroxydase (Pinto *et al.*, 2003) :

 $2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Glutathion peroxydase}} \text{GSSG} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

2) La détoxication du H_2O_2 peut aussi être assurée par le cycle ascorbate/GSH dans lequel l'ascorbate réagit avec le H_2O_2 pour former de l'eau et du déhydroascorbate. Ensuite, le GSH régénère l'ascorbate en réduisant le déhydroascorbate, ce qui mène à la formation de GSSG (glutathion oxydé) (Fahey *et al.*, 1987) :

ascorbate + $H_2O_2 \rightarrow$ dehydroascorbate + 2 H_2O

2 GSH + dehydroascorbate \rightarrow GSSG + ascorbate

Finalement, la régénération du GSH à partir du GSSG à l'aide du NADPH (nicotinamide adénide dinucléotide phosphate) et de l'enzyme glutathion réductase permet la continuité de ces mécanismes en boucle (Fahey *et al.*, 1987 ; Pinto *et al.*, 2003) :

 $GSSG + NADPH \xrightarrow{-Glutathion réductase} NADP + 2 GSH$

1.5.3 Détoxication des xénobiotiques

Le GSH peut participer indirectement à la détoxication des xénobiotiques (composés exogènes tels des pesticides ou des médicaments) par la réduction des ROS produites par ces xénobiotiques (Tsuji *et al.*, 2002), mais ce tripeptide peut aussi contribuer à complexer directement ces xénobiotiques. En fait, l'acide aminé cystéine du GSH contient un groupement thiol nucléophile pouvant facilement réagir avec plusieurs xénobiotiques ou leurs métabolites électrophiles. Par exemple, le GSH peut conjuguer différents xénobiotiques par déplacement nucléophile de groupements chlorés ou azotés de l'atrazine ou du métolachlore ou par le bris nucléophile de la liaison diphenyl-ether des herbicides comme le fluorodifène. La conjugaison entre les xénobiotiques et le GSH est catalysée par une enzyme, la glutathion S-transférase (GST) et permet de former des molécules hydrophiles de GSH conjugués aux xénobiotiques. La détoxication de ces molécules exogènes peut donc être complétée par l'exportation des contaminants dans le milieu due à la plus grande solubilité des xénobiotiques conjugués ou encore par un simple stockage intracellulaire dans les vacuoles (Rennenberg et Lamoureux, 1990 ; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005).

1.6 Problématique de recherche

La distribution intracellulaire des métaux ainsi que la production de peptides thiolés chez le phytoplancton ont été grandement étudiées pendant les 20 dernières années. En plus d'être intimement liées au transfert trophique des métaux (Reinfelder et Fisher, 1994), ces recherches ont contribué à l'avancement des connaissances des mécanismes de détoxication des métaux chez le phytoplancton (Ahner *et al.*, 1995 ; Wang et Rainbow, 2006). Malgré l'intérêt marquée portée à ces sujets d'actualité en écotoxicologie, très peu d'études ont évalué et optimisé les

protocoles de dosage des peptides thiolés par HPLC (Sneller *et al.*, 2000) et de séparation subcellulaire par centrifugation différentielle chez le phytoplancton (Nagel *et al.*, 1996). Ces méthodes sont donc souvent utilisées sans optimisation préalable des conditions expérimentales et des organismes cibles. La validation et l'optimisation de différentes étapes clés de ces méthodes chez deux algues vertes, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, permettrait d'évaluer les différents biais possibles lors de l'utilisation de ces méthodes.

Ces deux espèces phytoplanctoniques sont utilisées extensivement dans les recherches écotoxicologiques. Les mécanismes de détoxication intracellulaire tels la séquestration dans des corps denses (granules) ou la synthèse de peptides détoxifiants pourraient permettre d'expliquer les différentes tolérances au Cd chez les deux espèces puisqu'il a été rapporté dans la littérature que C. reinhardtii est plus résistante que P. subcapitata au Cd²⁺ dans le milieu ainsi qu'au Cd intracellulaire (Macfie et al., 1994 ; Maloney, 2007). Malgré plusieurs études de ces stratégies de détoxication chez différentes espèces phytoplanctoniques, l'importance relative de ces différentes stratégies dans la protection de ces deux espèces aux effets toxiques et leur modulation lors d'une variation de la concentration de Cd²⁺ dans le milieu de culture n'ont pas été évaluées jusqu'à maintenant. Ces mécanismes de détoxication ne sont souvent étudiés que pour une espèce d'algue dont C. reinhardtii. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux mécanismes de détoxication utilisés chez P. subcapitata en réponse à un stress métallique. Seulement quelques études récentes intégratrices se sont attardées à la fois à la distribution intracellulaire des métaux et à la synthèse de peptides détoxifiants (Ettajani et al., 2001; Miao et Wang, 2007). Cependant, l'interprétation des résultats furent compliqués par la séparation plus ou moins fine entre les différents compartiments subcellulaires. L'étude de la répartition des métaux dans un plus grand nombre de fractions subcellulaires couplée au dosage de différents peptides thiolés chez les deux espèces d'algues présentées permettrait d'évaluer le rôle des mécanismes de détoxication intracellulaire dans la sensibilité relative au Cd des deux espèces d'algues choisies.

2. Évaluation et optimisation d'une méthode de dosage des phytochélatines par HPLC et d'une méthode de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle

2.1 Objectifs

Quatre principaux objectifs étaient poursuivis dans le cadre de ce volet du projet:

- 1. Tester différentes méthodes d'homogénéisation des cellules et les optimiser
 - 1.1 Déterminer l'efficacité de sonification chez les deux espèces
 - 1.2 Vérifier la faible efficacité de sonification chez *P. subcapitata* par une technique d'assimilation au ¹⁴C
- Évaluer et optimiser la sélectivité de la séparation d'organites types, les mitochondries, et leur intégrité après fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle à l'aide de marqueurs enzymatiques.
 - 2.1 Effets du tampon d'homogénéisation
 - 2.2 Effet du temps de sonification
- 3. Optimiser l'extraction du GSH en testant différents traitements (chauffage, sonification)
 - 3.1 Vérifier l'efficacité du traitement d'extraction optimisé par une triple extraction
 - 3.2 Vérifier l'effet de la densité cellulaire sur l'extraction du GSH
- 4. Mesurer l'efficacité de dérivatisation de PC_{2-4} et de γ -EC empiriquement.

2.2 Méthodologie

Des cultures en lot de deux espèces phytoplanctoniques, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* furent réalisées séparément dans un milieu de culture MHSM-1 (Modified high salt medium). Les algues furent cultivées à l'intérieur d'une chambre environnementale (Conviron) et récoltées au début de la phase stationnaire de croissance.

Trois différentes méthodes d'homogénéisation furent testées chez l'algue *P. subcapitata* soit un sonificateur, un vortex-agitateur à micro-billes et un homogénéisateur rotatif. L'efficacité à briser les cellules fut mesurée principalement à l'aide d'un compteur de particules. Elle fut validée pour le traitement le plus efficace (sonification) à l'aide d'une technique d'assimilation au ¹⁴C et d'une inoculation de l'homogénat dans un milieu de culture frais afin de vérifier la viabilité des cellules après traitement.

Un protocole de centrifugation différentielle pour le fractionnement subcellulaire, adapté de Giguère *et al.* (2006), fut évalué et optimisé à l'aide de différents marqueurs enzymatiques en fonction de différents tampons d'homogénéisation et de différents temps de sonification chez *C. reinhardtii.* Les mitochondries furent choisies comme organites types. L'efficacité de leur séparation et l'intégrité de ces organites après isolation furent étudiées respectivement à l'aide de dosages de la cytochrome c oxydase (Storrie et Madden, 1990) et de la citrate synthase (Srere, 1969).

Pour ce qui est de l'optimisation et de l'évaluation de la méthode de dosage des peptides par HPLC avec dérivatisation pré-colonne au monbromobimane (Morelli et Scarano, 2001 ; Le Faucheur *et al.* 2005a), l'extraction du GSH fut premièrement optimisée en testant différents traitements d'extraction (chauffage ou non, aucune sonification ou sonification de différents temps) chez les deux espèces d'algues. Ensuite, l'efficacité d'extraction du GSH à l'aide d'un traitement d'extraction optimisé fut ensuite testée par une triple extraction pour différentes densités cellulaires.

L'efficacité de la dérivatisation au monobromobimane fut aussi mesurée pour les PCn (n = 2 à 4) et le γ -EC par rapport à celle obtenue pour le GSH seul ou encore à celle du GSH et du γ -EC. Pour ce faire, des solutions étalons des cinq peptides ayant la même concentration furent préparées et analysées par HPLC. Les efficacités de dérivatisation furent calculées à l'aide des formules décrites dans la section « Material and procedures » présentée au chapitre 5.

2.3 Résultats et discussion

La sonification fut très efficace pour briser les cellules de *C. reinhardtii* (> 98%) tandis qu'une grande proportion des cellules de *P. subcapitata* (environ 76 %) résistait à la sonification d'après le calcul de l'efficacité d'homogénéisation au compteur de particules. L'efficacité d'homogénéisation au ¹⁴C (tableau 1 ; Chapitre 5) chez *P. subcapitata* n'était pas significativement différente de celle obtenue au compteur de particules (p > 0,05). De plus, les cellules sonifiées étaient capables de croître aussi bien que les cellules témoins lors d'un repiquage dans un milieu de culture frais. Les résultats suggéraient fortement que les cellules de *P. subcapitata* étaient beaucoup plus difficiles à briser que celles de *C. reinhardtii*. Cette observation serait probablement reliée à la composition différente de la paroi cellulaire chez les deux espèces. En fait, la paroi cellulaire de *C. reinhardtii* ne contient pas de cellulose ou d'autres polysaccharides contrairement à celle de *P. subcapitata* (Hoek *et al.*, 1995). La paroi cellulaire de *C. reinhardtii* est plutôt composée de plusieurs couches de glycoprotéines riches en hydroxyproline (Voigt, 1988).

Ni l'homogénéisateur rotatif, ni le vortex-agitateur à micro-billes n'a pu permettre d'augmenter significativement l'efficacité d'homogénéisation obtenue par sonification chez *P. subcapitata*. La sonification fut donc sélectionnée comme technique d'homogénéisation pour sa rapidité et son efficacité.

Pour ce qui est de la validation du protocole de fractionnement subcellulaire, la sélectivité de la séparation des mitochondries dans la fraction « organites » était très élevée (> 90 %) avec le tampon MHSM-1, mais diminuait avec le tampon sucrose (< 80 %) pour des sonifications de 4 ou 6 minutes. L'intégrité des mitochondries était aussi plus élevée avec le tampon MHSM-1

que le tampon sucrose. Ces résultats pourraient être liés à la plus haute densité du tampon sucrose. L'état physiologique des algues affectait, quant à elle, l'intégrité des mitochondries isolées sans changer, toutefois, la sélectivité de leur séparation (Figure 3 ; Chapitre 5).

Du côté de la méthode de dosage des peptides, l'extraction du GSH était maximisée par une resuspension dans une matrice acide suivie d'un chauffage à 90 °C chez les deux espèces. L'ajout d'une étape de sonification n'augmentait pas significativement l'efficacité d'extraction (Figure 4 ; Chapitre 5). L'absence d'amélioration de l'extraction du GSH par sonification nous a surpris puisque plusieurs études ont utilisé une étape de sonification préalable à l'extraction des peptides thiolés (Morelli and Scarano, 2001 ; Kawakami *et al.*, 2006 ; Rijstenbil *et al.*, 1994).

Des triples extractions ont montré que l'extraction du GSH n'était pas complète après une seule extraction chez les deux espèces (> 88 % de récupération à la première extraction). De plus, cette efficacité d'extraction diminuait faiblement, mais significativement, lorsque la densité cellulaire de l'homogénat augmentait (Figure 5 ; Chapitre 5). Ainsi, les concentrations de GSH obtenues après une simple extraction devraient être corrigées en prenant en considération l'efficacité de l'extraction à la densité cellulaire des échantillons analysés.

L'efficacité de la dérivatisation au monobromobimane pour les PCn et le γ -EC était plus faible que celle du GSH (Tableau 2 ; Chapitre 5). Sneller *et al.* (2000) ont aussi observé une diminution de l'efficacité de dérivatisation pour les PCn comparativement au GSH, d'une façon similaire à celle obtenue dans cette étude. Des études antérieures réalisées à partir du protocole de dérivatisation utilisé ici, comme pour celui de Sneller *et al.* (2000) où les courbes de calibration des PCn et de γ -EC furent extrapolées à partir de celle du GSH présumant une efficacité de dérivatisation semblable pour chaque peptide, ont donc pu sous-estimer grandement les concentrations de PCn et de γ -EC.

2.4 Conclusion et perspectives

L'évaluation et l'optimisation des protocoles de dosage des peptides thiolés par HPLC et de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle ont permis de souligner l'importance de vérifier la validité de ces protocoles pour les conditions expérimentales et les organismes spécifiques utilisés. En fait, plusieurs paramètres pouvaient affecter fortement la performance de ces protocoles et se doivent donc d'être optimisés pour un usage éclairé et rigoureux de ces procédures d'analyses.

Pour ce qui est de la méthode de dosage des peptides par HPLC, l'efficacité de la procédure d'extraction des peptides était influencée par les conditions expérimentales utilisées, telles l'espèce d'algue étudiée, la densité cellulaire de l'homogénat et la présence ou non d'une étape de sonification. De plus, même avec une procédure d'extraction optimisée, celle-ci demeurait incomplète quoiqu'elle était très efficace. Un facteur de correction semble donc être de mise pour calculer précisément les concentrations de peptides obtenues. L'efficacité de dérivatisation se doit aussi d'être prise en considération lors de la quantification des concentrations de PCn et de γ -EC à partir de la courbe de calibration du GSH puisqu'elle variait largement en fonction des peptides.

Les performances de séparation du protocole de fractionnement subcellulaire dépendaient aussi des conditions expérimentales et des organismes utilisés. L'efficacité d'homogénéisation pouvait varier grandement en fonction de l'espèce utilisée, ce qui pouvait mener à une contamination de la fraction « débris » par des cellules intactes. La nature des différentes fractions subcellulaires se doit donc d'être bien évaluée en fonction des espèces utilisées. Le tampon d'homogénéisation affectait aussi d'une façon importante le degré de sélectivité de la séparation des mitochondries et leur intégrité. L'état physiologique des algues avait aussi un impact important sur l'intégrité des mitochondries isolées par centrifugation. L'utilisation du tampon MHSM-1 avec les algues en fin de phase exponentielle permettait d'obtenir une bonne séparation des mitochondries tout en préservant leur intégrité. Toutefois, une proportion quand même non négligeable des mitochondries étaient brisées (environ 10-20 %).

D'importantes évaluations et optimisations de ces protocoles furent réalisées dans cette étude. Cependant, un examen plus en profondeur de certains aspects du protocole de séparation subcellulaire pourrait être réalisé à l'aide d'autres méthodes (e.g. microscopie électronique à balayage, dosage d'ADN nucléaire et chloroplastique, mesure de l'activité enzymatique de la lysosyme et du NADP-dépendante glycéraldéhyde-3P-déhydrogénase, respectivement spécifique aux vacuoles et aux chloroplastes). Ces analyses des différentes fractions obtenues permettraient d'évaluer plus en profondeur la performance du schéma de centrifugation différentielle.

3. Mesure de peptides thiolés en relation avec la répartition intracellulaire du Cd chez deux algues vertes : *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.1 Objectifs

Cinq objectifs principaux furent accomplis pour ce volet du projet:

- 1. Mesurer la concentration de Cd^{2+} inhibant de 50 % la croissance relative par rapport au témoin (IC₅₀) chez les deux espèces. Est-ce que *C. reinhardtii* est plus résistante au Cd que *P. subcapitata*?
- 2. Mesurer la prise en charge du Cd normalisée en fonction du nombre de cellules ou de la surface moyenne cellulaire chez les deux espèces. Pour une concentration externe donnée, est-ce que C. reinhardtii bioaccumule davantage de Cd que P. subcapitata?
- Déterminer la répartition subcellulaire du Cd parmi différentes fractions (protéines thermorésistantes et thermosensibles, organites, granules et débris) chez les deux espèces d'algues, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*, exposées à des concentrations de Cd²⁺ toxiques ou non.
 - 3.1 Vérifier l'effet de l'initiation des mécanismes de détoxication (séquestration du Cd dans les granules et les protéines thermorésistantes) sur l'accumulation du Cd dans les fractions intracellulaires sensibles au Cd (protéines thermosensibles, organites) chez les deux espèces.

- 4. Mesurer l'impact du Cd sur la synthèse de peptides thiolés dont, les PCn et leurs précurseurs (GSH, γ -EC), normalisée par rapport au nombre de cellules ou à la quantité de Cd bioaccumulée pour la même étendue de concentration de Cd²⁺ et chez les deux espèces.
- 5. Déterminer si la différence de résistance au Cd chez les deux espèces pourrait être expliquée par une meilleure efficacité des mécanismes de détoxication intracellulaire comme la séquestration du Cd dans les fractions subcellulaires dédiées à la détoxication (granules, protéines thermorésistantes) ou la synthèse de peptides thiolés.

3.2 Méthodologie

Les deux espèces phytoplanctoniques furent cultivées et récoltées tel qu'il a été décrit précédemment au chapitre 2 dans la section « méthodologie ». Cependant, une certaine quantité de Cd non radioactif (pour la mesure des peptides thiolés) ou radioactif (pour la mesure de la répartition subcellulaire) fut ajoutée aux milieux afin d'exposer les algues à une gamme de concentration de Cd^{2+} variant entre 10^{-10} et 10^{-7} M. Les cultures témoins contenaient une concentration de 10^{-13} M Cd^{2+} . Les valeurs de Cd libre furent calculées à l'aide du logiciel MINEQL⁺ (Schecher et McAvoy, 1992) dont la base de données a été mise à jour (NIST, 2004). Les concentrations en Cd visées dans les milieux d'exposition ainsi que la concentration de Cd dans les cultures témoins furent mesurées par ICP-MS (*Inductively coupled plasma-mass spectrometry*).

Au début de la phase stationnaire de croissance, le rendement relatif des cultures exposées au Cd par rapport aux cultures témoins fut utilisé comme paramètre révélateur de la toxicité de ce métal. Les algues exposées au Cd non radioactif furent utilisées pour l'extraction, la dérivatisation et le dosage par HPLC des peptides thiolés. La procédure d'extraction optimisée au chapitre 5 fut utilisée tandis que le protocole de dérivatisation et de dosage des peptides par HPLC fut tiré de Morelli et Scarano (2001) en tenant compte des optimisations de Le Faucheur *et al.* (2005a). Les algues exposées au Cd radioactif furent homogénéisées par

sonification et soumises à une procédure de centrifugation différentielle (Figure 1 ; Chapitre 6). La distribution intracellulaire du Cd dans les différentes fractions subcellulaires fut déterminée par spectrométrie gamma à l'aide de l'activité spécifique du ¹⁰⁹Cd validée par ICP-MS.

3.3 Résultats et discussion

Tel que nous l'anticipions par la comparaison des résultats de Boily (2004) et de Maloney (2007), le Cd inhibe moins la croissance chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata* et est donc moins toxique sur la croissance. En effet, dans notre étude, la concentration de Cd²⁺ inhibant le rendement relatif de 50 % (IC₅₀) était environ deux fois plus élevée chez *C. reinhardtii* (273 nM Cd²⁺ [244 – 333 nM Cd²⁺ CI_{95%}]) que chez *P. subcapitata* (127 nM Cd²⁺ [111 – 143 nM Cd²⁺ CI_{95%}]). Ces IC₅₀ sont similaires à celles obtenus par Boily (2004) chez *C. reinhardtii* (IC_{50 72h milieu MHSM-1} = 300 à 400 nM) et Maloney (2007) chez *P. subcapitata* (IC_{50 96h milieu CEAEQ} = 70 nM). Certaines différences dans les conditions expérimentales telles la composition des milieux de culture ou les concentrations de micronutriments pourraient expliquer les différences observées. Par exemple, les concentrations des micronutriments demeuraient stables dans l'étude de Maloney (2007) et augmentaient dans le cas de Boily (2004) lors d'une augmentation de la concentration de Cd²⁺ tandis que, dans notre étude, la concentrations de Cd²⁺ tandis que, dans notre étude, la concentrations de Cd²⁺ plus faibles ou égales à 43 nM.

Les quotas intracellulaires de Cd variaient aussi en fonction des espèces. *C. reinhardtii* accumulait plus de Cd par cellule et par surface moyenne que *P. subcapitata* pour toute la gamme de concentrations de Cd^{2+} . (Figure 3 et SI.2 ; Chapitre 6). *C. reinhardtii* ne serait donc pas seulement plus résistante au Cd extracellulaire, mais aussi au Cd intracellulaire. Khoshmanesh *et al.* (1997) ont aussi montré une plus grande prise en charge de Cd par unité de surface cellulaire chez *C. reinhardtii* que chez deux autres algues, *Chlorella vulgaris* et *Chlorella pyrenoidosa*. De plus, en comparant les travaux de Boily (2004) et de Maloney (2007) on observe aussi des concentrations de Cd intracellulaire (exprimées par cellule) plus élevées chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata*.

La variation de la concentration de Cd^{2+} dans le milieu affectait la distribution intracellulaire de ce métal (Figure 5 ; Chapitre 6). La concentration de Cd absolue dans chacune des cinq fractions isolées était reliée positivement à la concentration de Cd^{2+} dans le milieu chez les deux espèces. Cependant, la proportion de Cd intracellulaire accumulée dans chacune des fractions variait de façon plus complexe.

La contribution relative au Cd intracellulaire des fractions « organites » et « HDP » (comportant des structures sensibles au Cd comme les enzymes, les mitochondries et les microsomes) diminuait et demeurait stable respectivement lors d'un ajout de Cd. Le pourcentage de Cd séquestré dans les fractions « débris » et « granules » chez *C. reinhardtii* augmentait et diminuait par la suite lorsque la concentration de Cd²⁺ augmentait dans le milieu. La proportion de Cd intracellulaire dans la fraction « HSP » augmentait quant à elle chez les deux espèces. La proportion de Cd intracellulaire dans la fraction « HSP » augmentait abruptement pour atteindre environ 70-80 % pour les expositions de 149 ou 221 nM Cd²⁺ chez les deux espèces. Ce résultat indique que des peptides thermorésistants peuvent jouer un rôle important dans la séquestration du Cd chez ces espèces phytoplanctoniques. Howe et Merchant (1992) rapportent aussi que 70 % du Cd cytosolique est séquestré par les phytochélatines (des peptides thermorésistants) chez *C. reinhardtii* (souche autochtone) exposé à une concentration de Cd menant à une baisse de 30 % de la concentration de chlorophylle.

L'ensemble de ces observations sur la répartition subcellulaire relative du Cd suggère une protection partielle de certains sites intracellulaires sensibles au Cd tels les mitochondries et les microsomes (fraction « organites ») et enzymes (HDP) par l'initiation de certains mécanismes de détoxication comme la séquestration de Cd dans les granules et des peptides thermorésistants. Des études chez le poissons (Giguère *et al.*, 2006) et chez les bivalves (Bonneris *et al.*, 2005) suggèrent aussi une protection partielle de la cellule envers le Cd par une diminution de la proportion de Cd intracellulaire dans la fraction « HDP » concomitante à une augmentation dans la fraction « HSP » lors d'une augmentation de la concentration de Cd intracellulaire.

Le Cd induisait fortement la synthèse de phytochélatines canoniques chez les deux espèces (Figures 6a et b ; Chapitre 6). Le Cd serait en effet l'inducteur le plus efficace de la synthèse des phytochélatines chez le phytoplancton (Gekeler *et al.*, 1988 ; Howe et Merchant, 1992 ; Ahner et Morel, 1995). En revanche, la concentration de GSH n'était pas affectée par une hausse du Cd²⁺ en solution chez les deux espèces (Figures 6a et b ; Chapitre 6). Ce tripeptide serait en effet très bien régulé chez le phytoplancton lors d'un stress en Cd (Le Faucheur *et al.*, 2005a ; Ahner *et al.*, 2002). Cependant, la synthèse de l'autre précurseur des PCn, γ -EC, était stimulée jusqu'à une concentration de Cd²⁺ de 187 nM et diminuait par la suite (Figures 6a et b ; Chapitre 6). Une tendance similaire fut répertoriée chez une autre espèce d'algue verte, *Scenedesmus vacuolatus* (Le Faucheur *et al.*, 2005a) et chez quelques algues marines (Ahner *et al.*, 2002) exposées au Cd, mais dans leur étude, la synthèse de γ -EC diminuait moindrement à forte concentration de Cd faisant en sorte que la concentration de γ -EC plafonnait au lieu de diminuer.

C. reinhardtii synthétisait un plus grand nombre et de beaucoup plus fortes quantités de peptides non identifiés que *P. subcapitata* (Figures 6c et d ; Chapitre 6). Ces peptides thiolés n'étaient pas des PCn canoniques ou des hydroxyméthyl-PCn et pourraient jouer un rôle important dans la résistance de cette espèce au Cd. De plus, *C. reinhardtii* synthétisait davantage de PCn plus polymérisées que *P. subcapitata* à partir d'une concentration de 149 nM Cd²⁺ inhibant la croissance d'environ 25 % et 50 % chez, respectivement, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*. Puisque la stabilité des complexes Cd-PCn augmente lors d'une augmentation de la longueur de la chaîne polypeptidique (Fortin et Campbell, 1997 ; Kneer et Zenk, 1997) et puisque ce facteur peut jouer un rôle important dans la tolérance aux métaux chez les microalgues (Torres *et al.*, 1997 ; Pérez-Rama *et al.*, 2001), la capacité à synthétiser des oligomères plus polymérisés chez *C. reinhardtii* pourraient aussi expliquer, du moins en partie, la plus grande résistance au Cd chez cette espèce.

P. subcapitata synthétisait davantage de PCn par Cd intracellulaire (ratios PCn :Cd_{intr} plus élevés) ou par Cd lié aux HSP (ratios PCn :Cd_{HSP} plus élevés) pour les expositions aux concentrations de Cd²⁺ plus petites ou égales à 149 nM (Figures 8a et c ; Chapitre 6). En

ajoutant les peptides inconnus (X_n) aux PCn, les ratios PCn+X_n:Cd_{intr} était significativement plus élevés chez *P. subcapitata* que chez *C. reinhardtii* à 6,1 et 43 nM Cd²⁺ et les ratios PCn+X_n:Cd_{HSP} l'était pour les concentrations de 6,1, 43 et 149 nM Cd²⁺ (Figures 8b et d ; Chapitre 6). Toutefois, les cellules témoins de *C. reinhardtii* synthétisaient de plus fortes quantités de PCn et de peptides X_n que celles de *P. subcapitata*. Cette situation a pu faire en sorte de rendre les différences moins significatives pour les ratios calculés à 0,7 nM Cd²⁺ entre les deux espèces et il est probable que l'induction des peptides thiolés soit tout de même supérieure chez *P. subcapitata* pour cette faible concentration d'exposition.

Cette plus grande capacité d'induction des PCn chez l'espèce la plus sensible au Cd peut sembler paradoxale au premier regard. Cependant, une plus forte production de PCn et donc un plus faible ratio PC-SH :Cd ne serait pas toujours liée à une plus grande tolérance aux métaux puisque les PCn peuvent former des complexes HMW caractérisés par des plus faibles ratios SH :Cd (Kneer et Zenk, 1997 ; Hu *et al.*, 2001). La présence de ces complexes HMW chez les algues pourrait jouer un rôle plus important dans la résistance aux métaux que la simple habilité à synthétiser des PCn (Hu *et al.*, 2001).

Même si une séquestration plus efficace des ions Cd (moins de groupements SH par atome de Cd) par une plus grande proportion de complexes HMW chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata* est possible, une plus faible proportion de Cd intracellulaire dans la fraction « HSP » fut mesurée chez *C. reinhardtii* comparativement à *P. subcapitata* (Figure 5 ; Chapitre 6). Cette proportion plus faible de Cd dans la fraction HSP pourrait être due à un transport des complexes PCn-Cd important chez *C. reinhardtii* dans des organites demeurés intacts après l'homogénéisation et les centrifugations tels les vacuoles ou le chloroplaste. Il est aussi possible que *C. reinhardtii* séquestre bel et bien une moins grande proportion de Cd intracellulaire que *P. subcapitata* et que d'autres mécanismes de détoxication soient impliqués dans la résistance au Cd de cette espèce. En effet, une plus grande proportion de Cd fut mesurée dans la fraction « granules » chez *C. reinhardtii* exposé à 43 nM Cd²⁺ (une concentration de Cd toxique pour *P. subcapitata* et non toxique pour *C. reinhardtii*) comparativement à l'exposition à 0,7 nM Cd²⁺ (Figure 5 ; Chapitre 6). Les résultats suggèrent donc une implication des granules dans la protection contre des effets toxiques du Cd chez *C.*

reinhardtii. L'impact des granules demeurerait cependant peu important quantitativement puisque la quantité *absolue* de Cd n'était pas augmentée pour l'exposition à 43 nM Cd²⁺ comparativement aux concentrations plus faibles ou plus élevées de Cd²⁺. La séquestration du Cd dans les granules synthétisées chez *C. reinhardtii* serait donc un troisième facteur qui pourrait être relié à la plus grande résistance au Cd de cette espèce.

3.4 Conclusion et perspectives

L'application des protocoles optimisés au chapitre 2 a permis de mener à bien ce volet du projet. Il a été possible de raffiner les connaissances concernant l'implication des différents mécanismes de détoxication chez deux espèces phytoplanctoniques, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*, mises en présence d'un métal très toxique et problématique au niveau environnemental.

C. reinhardtii et *P. subcapitata* possèdent différentes stratégies permettant de séquestrer le Cd potentiellement toxique qui entre dans les cellules. Ces espèces peuvent notamment synthétiser des peptides thiolés ainsi que séquestrer le Cd à l'aide de composés granulaires. L'augmentation de la séquestration du Cd avec les protéines thermorésistantes chez *P. subcapitata* et aussi, dans le cas de *C. reinhardtii*, avec des composés granulaires conféraient une protection partielle de certains sites intracellulaires sensibles au Cd tels les mitochondries et les microsomes (fraction « organites ») ainsi que les enzymes (fraction « HDP ») en empêchant l'augmentation de la *proportion* mais non de la *concentration* de Cd intracellulaire dans ces structures.

Cette étude montre le lien entre les mécanismes de détoxication intracellulaire et la différence de sensibilité au Cd entre les espèces. *C. reinhardtii* bioaccumule plus de Cd mais est plus résistante à ce métal que *P. subcapitata*. Cette observation suggère que l'implication des différents mécanismes de détoxication intracellulaire chez différentes espèces pourrait permettre d'expliquer les différences de sensibilité entre celles-ci. En effet, trois facteurs pouvant être reliés à la résistance/sensibilité au Cd furent mis en évidence lors de cette étude.

1) *C. reinhardtii* produit de beaucoup plus grandes quantités de peptides thiolés non identifiés comparativement à *P. subcapitata*. Ces peptides, n'étant pas des PCn canoniques ni des hydroxyméthyl-PCn, pourraient jouer un rôle important encore inconnu dans la détoxication du Cd chez *C. reinhardtii*.

2) *C. reinhardtii* synthétise davantage de PCn plus polymérisées que *P. subcapitata* à partir d'une concentration de 149 nM Cd^{2+} inhibant la croissance d'environ 20 % et 60 % chez, respectivement, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*. Or, il a été montré que les oligomères plus polymérisés formaient des complexes plus stables avec les métaux et qu'ils sont souvent synthétisés préférentiellement par des espèces très résistantes au Cd.

3) Chez *C. reinhardtii*, une augmentation de la séquestration du Cd dans la fraction « granules » fut observée pour une exposition intermédiaire de Cd^{2+} , soit 43 nM (concentration de Cd étant toxique pour *P. subcapitata* et non pour *C. reinhardtii*) comparativement à la plus faible concentration testée (0,7 nM). Cette observation suggère donc que les granules jouent un rôle dans la protection contre les effets toxiques du Cd chez *C. reinhardtii*.

À la lumière des résultats obtenus, il est possible de proposer des pistes futures de projets de recherche permettant de comprendre plus en profondeur la résistance différentielle aux métaux chez différentes espèces phytoplanctoniques. Premièrement, une étude de la cinétique de la synthèse des phytochélatines et de leur transport dans différents organites de même qu'une caractérisation plus poussée des complexes chez les deux espèces permettraient de mieux comprendre l'implication de ces importants peptides détoxifiants dans la résistance acquise chez différentes espèces phytoplanctoniques. De plus, le séquençage des peptides thiolés inconnus mais présents très majoritairement chez *C. reinhardtii* pourrait amener des informations clés pour la compréhension globale de la synthèse et de l'induction de peptides liant les métaux chez cette espèce. Finalement, la caractérisation plus précise de la nature chimique des granules, de leur emplacement et de leur possible translocation à l'intérieur des cellules de *C. reinhardtii* préciseraient leur rôle détoxifiant suggéré par cette étude.

Comme il semble être le cas, il est fort probable que de multiples processus cellulaires mènent conjointement à la tolérance au Cd chez différentes espèces phytoplanctoniques. Une approche davantage pluridisciplinaire alliant la génétique et la biochimie moléculaire en plus de la biologie, de la chimie de complexation et de la cytologie permettrait peut-être de percer davantage les mystères des mécanismes de détoxication et de la tolérance acquise aux métaux.

4. RÉFÉRENCES

- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Joux, L., Perrein-Ettajani, H. 2006. Significance of physicochemical forms of storage in microalgae in predicting copper transfer to filterfeeding oysters (*Crassostrea gigas*). Environ Toxicol 21, 1-7
- Aguilera, A., Amils, R. 2005. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). Aquat Toxicol 75, 316-329
- Ahner, B.A., Kong, S., Morel, F.M.M. 1995. Phytochelatin production in marine algae.
 1. An interspecies comparison. Limnol Oceanogr 40, 649-657
- Ahner, B.A., Morel, F.M.M. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. Limnol Oceanogr 40, 658-665
- 5. Ahner, B.A., Lee, J.G., Price, N.M., Morel, F.M.M. 1998. Phytochelatin concentrations in the equatorial Pacific. Deep-Sea Res 45, 1779-1796
- Ahner, B.A., Wei, L.P., Oleson, J.R., Ogura, N. 2002. Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. Mar Ecol Prog Ser 232, 93-103
- 7. Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C., Amiard-Triquet, C. 1991. Response of the phytoplanctonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. Bio Cell 72, 103-112
- Beck, A., Lendzian, K., Oven, M., Christmann, A., Grill, E. 2003. Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. Phytochem 62, 423-431
- Belleghem, F.V., Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., d'Haen, J., Valcke, R. 2006. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. New Phytol 173, 495-508

- Bertin G., Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie 88, 1549-1559
- Bhargava, P., Srivastava, A.K., Urmil, S., Rai, L.C. 2005. Phytochelatin plays a role in UV-B tolerance in N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. J Plant Physiol 162, 1220-1225
- 12. Binz, P.-A., Kägi, J.H.R. 2007. Classification of metallothionein. http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/classif.html [consulté le 22 octobre 2007]
- 13. Blindauer, C.A., Razi, M.T., Campopiano, D.J., Sadler, P.J. 2007. Histidine ligands in bacterial metallothionein enhance cluster stability. J Biol Inorg Chem 12, 393-405
- Boily, F. 2004. Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise. Université du Québec, INRS – Eau, Terre et Environnement. 118 p.
- Bonneris, E., Perceval, O., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C. 2005. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. Environ Pollut 135, 195-208
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B. 2002. Metal bioavailablity to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. Comp Biochem Phys C 133, 189-206
- 17. Campbell, P.G.C. 2006. Cadmium A priority pollutant. Environ Chem 3, 387-388
- Cazalé, A., Clemens, S. 2001. Arabidopsis thaliana expresses a second functional phytochelatin synthase. FEBS Lett 507, 215-229
- Clark N.W., Walsh S.R., Smith J.V. 2001. The distribution of heavy metals in an abandoned mining area; a case study of Strauss Pit, the Drake mining area, Australia: implications for the environmental management of mine sites. Environ Geol 40, 655-663

- Clemens, S. 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. J Plant Physiol 163, 319-332
- 21. Clemens, S., Schroeder, J.I., Degenkolb, T. 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. Eur J Biochem 268, 3640-3643
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. EMBO J 18, 3325-3333
- 23. Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. Curr Opin Plant Biol 3, 211-216
- 24. Croteau, M.-N., Hare, L., Tessier, A. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. Environ Sci Technol 32, 1348-1353
- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., Stewart, A.R. 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnifications in nature. Limnol Oceanogr 50, 1511-1519
- Daniel, G.F., Chamberlain, A.H.L. 1981. Copper immobilization in fouling diatoms. Bot Mar 24, 229-243
- 27. Davies, D.R., Plaskitt, A. 1971. Genetic and structural analysis of cell-wall formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Genet Res 17, 33-43
- 28. Deckert J. 2005. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? BioMetals 18, 475-481
- De Knecht, J.A., van Dillen, M., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O. 1994. Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Physiol 104, 255-261
- Dzombak, D.A., Morel, F.M.M. 1990. Surface complexation modeling: Hydrous ferric oxide. John Wiley & Sons, Inc., USA, Chapter 10, 299-314

- Environnement Canada. 1997. Environmental assessments of priority substances under the Canadian environmental protection act, Guidance manual version 1.0, EPS/2/CC/3E:1-1 à 8-10, xvii + 86 p.
- 32. Ettajani, H., Berthet, B., Amiard, J.C., Chevolot, L. 2001. Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters: contribution to the assessment of trophic transfer. Arch Environ Contam Toxicol 40, 209-221
- 33. Fahey, R.C., Buschbacher, R.M., Newton, G.L. 1987. The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. J Mol Evol 25, 81-88
- 34. Faller P., Kienzler K. et Krieger-Liszkay A. 2005. Mechanism of Cd²⁺ toxicity : Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. Biochim Biophys Acta 1706, 158-164
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol 61, 243-282
- Finney, L.A., O'Halloran, T.V. 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. Science 300, 931-936
- Fisher, N.S., Cherry, B.R.D., Heyraud, M. 1983. Accumulation and cellular distribution of ²⁴¹Am, ²¹⁰Po, and ²¹⁰Pb in two marine algae. Mar Ecol Progr Ser 11, 233-237

 Fortin, C., Campbell, P.G.C. 1997. Détermination de constantes conditionnelles de formation entre le Cd et les phytochélatines Hm-PC₂ et Hm-PC₃. Rapport RI-141. Université du Québec, INRS – Eau. Terre et Environnement. 28 p.

- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch Microbiol 150, 197-202
- 40. Gerloff-Elias, A., Barua, D., Mölich, A., Spijkerman, E. 2006. Temperature-and pHdependant accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila* FEMS Micobiol Ecol 56, 345-354
- 41. Giaginis C., Gatzidou E., Theocharis S. 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. Toxicol Appl Pharm 213, 282-290
- 42. Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P. 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. Aquat Toxicol 77, 178-189
- 43. Grill, E., Thumann, J., Winnacker, E.-L. Zenk, M.H. 1988. Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. Plant Cell Reports. 7, 375-378
- 44. Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metalbinding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. Proc Natl Acad Sci USA 84, 439-443
- Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. 1986. Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. FEBS 205, 47-50
- 46. Gulli, M., Lupotto, E., Marmiroli, N., Perrota, C. 2005. The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small *hsp* gene in barley and maize. J Cereal Sci 42, 25-31
- Ha, S.-B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connel, M.J., Goldsbrought, P.B., Cobbett, C.S. 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell 11, 1153-1164
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J Exp Bot 53, 1-11
- 49. Harada, E., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S. 2004. A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyses the conversion of glutathione to γ-EC and lacks phytochelatin synthase activity. Phytochem 65, 3179-3185
- 50. Harris, E. 1989. The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, Inc. San Diego, California 780 p.

- 51. Heuillet, E., Moreau, A., Halpern, S., Jeanne, N., Puiseaux-Dao, S. 1986. Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. Biol Cell 58, 79-86
- 52. Hoek, C. V. D., Mann, D.G., Jahns, H.M. 1995. Algae: an introduction to phycology. University Press. Cambridge, 623 p.
- Hoober, J.K., Park, H., Wolfe, G.R., Komine, Y., Eggink, L.L. 1998. Assembly of light-harvesting systems. In: Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. (eds). The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands, pp.363-376
- 54. Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S. 1995. Cadmiumsensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. Plant Physiol 107, 1059-1066
- 55. Howe, G., Merchant, S. 1992. Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 98, 127-136
- 56. Hu, S., Lau, K.W.K., Wu, M. 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas* reinhardtii. Plant Sci 161, 987-996
- 57. Inouhe, M., Ito, R., Ito, S., Sasada, N., Tohoyama, H., Joho, M. 2000. Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins. Plant Physiol 123, 1029-1036
- Inzé, D., Van Montagu, M., 1995. Oxidative stress in plants. Curr Opin Biotechnol 6, 153-158
- 59. IUPAC Stability Constants Database, 2001. Powell, K.J., version 5.15, Academic Software, Otley, Yorkshire, UK
- 60. Jensen, T.E., Baxter, M., Rachlin, J.W., Jani, V. 1982. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophycea) into cellular components, especially polyphosphate bodies: An X-ray energy dispersive study. Environ Pollut Ser A 27, 119-124

- 61. Joux-Arab, L., Berthet, B., Robert, J.M. 1998. Distribution of copper in the diatom Haslea ostrearia Simonsen. Mar Environ Res 46, 555-558
- 62. Kaplan, D., Heimer, Y.M., Abeliovich, A., Goldsbrough, P.B. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. Plant Sci 109, 129-137
- 63. Kawakami, S.K., Gledhill, M., Achterberg, E.P. 2006. Effects of metal combinations on the production of phytochelatins and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. BioMetals 19, 51-60
- Khoshmanesh, A., Lawson, F., Prince, I.G. 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. Chem Eng J 65, 13-19
- 65. Klapheck, S., Fliegner, W., Zimmer, I. 1994. Hydroxymethyl-phytochelatins [(γ-glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. Plant Physiol 104, 1325-1332
- 66. Klapheck, S., Schlunz, S., Bergmann, L. 1995. Synthesis of phytochelatins and homophytochelatins in *Pisum sativum* L. Plant Physiol 107, 515-521
- 67. Knauer, K., Ahner, B., Xue, H.B., Sigg, L. 1998. Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. Environ Toxicol Chem 17, 2444-2452
- 68. Kneer, R. and Zenk, M.H., 1997. The formation of Cd-Phytochelatin complexes in plant cell cultures. Phytochem 44, 69-74
- 69. Komine, Y., Park, H., Wolfe, G.R., Hoober, J.K. 1996. Granules in the cytoplasm of *Chlamydomonas reinhardtii* contain processed light-harvesting complex apoproteins and Hsp70. J Photoch Photobio B 36, 301-306
- Kobayashi, I., Fujiwara, S., Saegusa, H., Inouhe, M., Matsumoto, H., Tsuzuki, M.
 2005. Relief of arseniate toxicity by Cd-stimulated phytochelatin synthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Mar Biotechnol 8, 94-101

- Komarek, J., Gonzalez, A.C. 1982. Taxonomical definition of the genera and several species of *Ankistrodesmus* and *Selenastrum* (Chlorococcales). Arch Hydrobiol Suppl 63, 259-277
- 72. Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., Auclair, J.C. 2006. A field study examining the relative importance of food and water as sources of cadmium for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Can J Fish Aquat Sci 63, 549-557
- Lane, T., Morel, F. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc Natl Acad Sci USA 97, 4627-4631
- 74. Lee, J.G., Ahner, B.A., Morel, F.M.M. 1996. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. Environ Sci Technol 30, 1814-1821
- 75. Le Faucheur, S., Behra, R., Sigg, L., 2005a. Phytochelatin induction, cadmium accumulation and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. Environ Toxicol Chem 24, 1731-1737
- 76. Le Faucheur, S., Behra, R., Sigg, L., 2005b. Thiol and metal contents in periphyton exposed to elevated copper and zinc concentrations: a field and microcosm study. Environ Sci Technol 39, 8099-8107
- 77. Le Faucheur, S., Schildknecht, F., Behra, R., Sigg, L., 2006. Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. Aquat Toxicol 80, 355-361
- 78. Leverrier, P., Montigny, C., Garrigos, M., Champeil, P., 2007. Metal binding to ligands: Cadmium complexes with glutathione revisited. Anal Biochem 371, 215-238
- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H. 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha* intestinalis (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. Aquat Toxicol 51, 277-291
- Löffler, S., Hochberger, A., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. FEBS Lett 258, 42-46

- 81. Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. Arch Environ Contam Toxicol 27, 454-458
- 82. Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. 1996. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. Plant Physiol 110, 1145-1150
- 83. 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*. Mémoire de maîtrise. Université du Québec, INRS – Eau. Terre et Environnement. 133 p.
- Mendoza-Cózatl D., Loza-Tavera H., Hernández-Navarro A., Moreno-Sánchez R.
 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. FEMS Microbiol Rev 29: 653-671
- Mendoza-Cózatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., Moreno-Sánchez, R. 2002.
 Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol Plantarum 115, 276-283
- 86. Mendum, M.L., Gupta, S.C., Goldsbrough, P.B. 1990. Effect of glutathione on phytochelatin synthesis in tomato cells. Plant Physiol 93, 484-488
- 87. Meuwly, P., Thibault, P., Schwan, A.L., Rauser, W.E. 1995. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. Plant J 7, 391-400
- Miao, A.-J., Wang, W-X. 2006. Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions. Aquat Toxicol 78, 114-126
- 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, 1777-1782
- 90. Moore, M.R. 2004. A commentary on the impacts of metals and metalloids in the environment upon the metabolism of drugs and chemicals. Toxicol Lett 148, 153-158

- 91. Morel F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 446 p.
- 92. Morelli, E., Scarano, G. 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Sci 167, 289-296
- Morelli, E., Scarano, G. 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Mar Environ Res 52, 383-395
- 94. Morris, C.A., Nicolaus, B., Sampson, V., Harwood, J.L., Kille, P. 1999. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. Biochem J 338, 553-560
- 95. Mutoh, N., Hayashi, Y. 1988. Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides. Biochem Biophys Res Commun 151, 32-39
- 96. Nagel, K., Adelmeier, U., Voigt, J. 1996. Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. J Plant Physiol 149, 86-90
- 97. Nagel, K., Voigt, J. 1989. In vitro evolution and preliminary characterization of a cadmium-resistant population of *Chlamydomonas reinhardtii*. Appl Environ Microb 55, 526-528
- 98. Nassiri, Y., Mansor, J.L., Wéry, T., Ginsburger-Vogel, Amiard, J.C. 1997. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. Arch Environ Contam Toxicol 33, 147-155
- 99. Nelson, W.O., Campbell, P.G.C. 1991. The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments: A literature review. Environ Pollut 71, 91-130

- 100. Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N. 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. FEMS Microb Ecol 44, 253-259
- 101. Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M., Tominaga, N. 2006. Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas* acidophila KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. Plant Sci 170, 307-313
- 102. NIST, 2004. NIST Critical stability constants of metal complexes database. In: Martell, A.E., Smith, R.M. and Motekaitis, R.J. (Eds). National Institute of Standards and Tehnology, Standard Reference Database 46, Gaithersburg, MD
- 103. Nriagu, J.O. 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals.
 Nature 338, 47-49
- 104. Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature 333, 134-139
- 105. Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G., Ow, D.W. 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. EMBO J 11, 3491-3499
- 106. Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.F., Ow, D.W. 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-Type vacuolar membrane protein. J Biol Chem 270, 4721-4728
- Oven, M., Page, J.E., Zenk, M.H., Kutchan, T.M., 2002. Molecular Characterization of the Homo-phytochelatin Synthase of Soybean *Glycine max*. J Biol Chem 277, 4747-4754
- 108. Pawlik-Skowrońska, B. 2003. When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga *Stigeoclonium* tenue produces high amounts of novel phytochelatin-related peptides. Aquat Toxicol 62, 155-163
- 109. Pawlik-Skowrońska, B. 2000. Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga *Stichococcus bacillaris*. Aquat Toxicol 50, 221-230

- 110. Pérez-Rama, M., Lopez, C.H., Alonso, J. A., Vaamonde, E.T. 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. Environ Toxicol Chem 20, 2061-2066.
- 111. Perales-Vela, H., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 1-10
- 112. Perrein-Ettajani, H., Amiard, J.C., Haure, J., Renaud, C. 1999. Effets des métaux (Ag, Cd, Cu) sur la composition biochimique et compartimentation de ces métaux chez deux microalgues Skeletonema costatum et Tetraselmis suecica. Can J Fish Aquat Sci 56, 1757-1765
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P. 2003. Review: Heavy metal-induced oxidative stress in algae. J Phycol 39, 1008-1018
- 114. Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufhal, R.A., Culotta, V.C., O Halloran, T.V. 1999. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. Science 284, 805-808
- 115. Rauser, W.E. 1990. Phytochelatins. Annu Rev Biochem 59, 61-86
- 116. Rauser, W.E. 1995. Phytochelatins and related peptides. Plant Physiol 109, 1141-1149
- 117. Rea, P.A., Vatamaniuk, O.K., Rigden, D.J. 2004. Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. Plant Physiol 136, 2463-2474
- 118. Reinfelder, J.R., Fisher, N.S. 1994. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. Limnol Oceanogr 39, 12-20
- 119. Rennenberg, H., Lamoureux, G.L. 1990. Dans: Sulfur nutrition and sulphur assimilation, Rennenberg, H., Ed., SPB Academic Publishing, The Hague, p.53-65
- Rennenberg, H., 1982. Glutathione metabolism and possible roles in higher plants. Phytochem 21, 2771-2781

- 121. Rijstenbil, J.W., Dehairs, F., Ehrlich, R., Wijnholds, J.A. 1998. Effect of the nitrogen status on copper accumulation and pools of metal-binding peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. Aquat Toxicol 42, 187-209
- 122. Rijstenbil, J.W., Wijnholds, J.A. 1996. HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms: pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. Mar Biol 127, 45-54
- 123. Rijstenbil, J. W., Derksen, J.W.M., Gerringa L.J.A., Poortvliet, T.C.W., Sandee, A., van den Berg, M., van Drie, J., Wijnholds, J.A. 1994. Oxidative stress induced by copper: defence and damage in the marine planktonic diatom *Dytilum brightwelli*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. Mar Biol 119, 583-590.
- 124. Romero-Isart, N., Vasak, M. 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. J Inorg Biochem 88, 388-396
- 125. Roosens, N., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximenez-Embun, P., Smith, J.A.C. 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. Plant Cell Environ 26, 1657-1672
- 126. Ruiz, F.A., 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, 46196-46203
- 127. Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A., Ottonello, S., 2004. Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. J Biol Chem 279, 14686-14693
- 128. Salt, D.E., Rauser, W.E. 1995. MgATP-dependant transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. Plant Physiol 107, 1293-1301
- 129. Schecher, W.D., McAvoy, D.C. 1992. MINEQL⁺: a software environment for chemical equilibrium modeling. Comput. Environ. Urban Systems 16, 65-76

- 130. Schmöger, M.E.V., Oven, M., Grill, E. 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. Plant Physiol 122, 793-801
- Seebaugh, D.R., Goto, D., Wallace, W.G. 2005. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. Mar Environ Res 59, 473-491
- 132. Sneller, F.E.C., Heerwaarden L.M.V., Koevoets, P.L.M., Vooijs, R., Schat, H., Verkleij, J.A.C. 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris* induced upon to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. J Agric Food Chem 48, 4014-4019.
- 133. Srere, P.A. 1969. Citrate synthase. Method Enzymol 13, 3-11.
- Storrie, B., Madden, E.A. 1990. Cytochrome c oxidase. Method Enzymol 182, 214-215.
- 135. Strasdeit, H., Duhme, A.-K., Kneer, R., Zenk, M.H., Hermes, C., Nolting, H.-F. 1991. Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. J Chem Soc Chem Commun 16, 1129-1130
- 136. Tang, D., Shafer, M.M., Karner, D.A., Armstrong, D.E. 2005. Response of nonprotein thiols to copper stress and extracellular release of glutathione in the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Limnol Oceanogr 50, 516-525
- 137. Tessier, A. Carignan, R., Belzile, N. 1994. Reactions of trace elements near the sediment-water interface in lakes. In: Transport and transformation of contaminants near sediment-water interface (eds), J.V. De Pento, W. Lick, and J.F. Paul, Lewis, 129-152
- 138. Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. 1991. Reactivation of metalrequiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS 284, 66-69
- 139. Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1997. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Aquat Toxicol 39, 231-246

- 140. Torricelli, E., Gorbi, G., Pawlik-Skowrońska, B., di Toppi, L.S., Corradi, M.G. 2004. Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromiumtolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). Aquat Toxicol 68, 315-323
- 141. Tsuji, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M.H., Miyamoto, K. 2002. Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. Biochem Bioph Res Co 293, 653-659
- 142. Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K., Miyamoto, K. 2003. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. Phytochem 62, 453-459
- 143. Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K., Miyamoto, K. 2004. Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. Biochem Bioph Res Co 315, 751-755
- 144. Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lang, A., Chalasani, S., Demkiv, L.O., Rea, P. 2004. Phytochelatin synthase, a dipeptidyl transferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis. Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of AtPCS1-catalysed phytochelatin synthesis. J Biol Chem 279, 22449-60
- 145. Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., Rea, P.A. 2002. Worms take the « phyto » out of « phytochelatins ». Trends Biotechnol 20, 61-64
- 146. Vatamaniuk, O., Mari, S., Lu, Y., Rea, P.A, 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalysed. J Biol Chem 275, 31451-31459
- 147. Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P.A. 1999. AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. Proc Natl Acad Sci USA 96, 7110-7115

- 148. Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg,
 W.J.G.M. 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. Environ Sci Technol 38, 4705-4712
- 149. Voigt, J. 1988. The lithium-chloride-soluble cell-wall layers of *Chlamydomonas* reinhardtii contain several immunologically related glycoproteins. Planta 173, 373-384.
- 150. Wallace, W.G., Lee, B.-G., Luoma, S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biological detoxified metal (BDM). Mar Ecol Prog Ser 249, 183-197
- 151. Wang, W.-X., Rainbow, P.S. 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. Environ Chem 3, 395-399
- 152. Wang, T., Wu, M. 2006. An ATP-binding cassette transporter related to yeast vacuolar ScYCF1 is important for Cd sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Environ 29, 1901-1912
- 153. Wang, W., Vinocur, B., Shoseyow, O., Altman, A. 2004. Role of heat-shock proteins and molecular chaperone in the abiotic stress response. Trends Plant Sci 9, 244-252
- 154. Wehr, J.D., Shealth, R.G. 2003. Freshwater algae of North America: Ecology and classification. Academic Press. 752 p.
- 155. Wikfors, G.H., Neeman, A., Jackson, P.J. 1991. Cadmium-binding polypeptides in microalgal strains with laboratory-induced cadmium tolerance. Mar Ecol Progr Ser 79, 163-170
- Xiang, C., Olivier, D.J. 1998. Glutathione metabolic genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 1539-1550
- Xue, H.B., Sigg, L. 1998. Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in freshwater. Anal Chim Acta 363, 249-259
- 158. Yen, T.-Y., Villa, J.A., DeWitt, J.G. 1999. Analysis of phytochelatin cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray inonization tandem mass

spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Mass Spectrom 34, 930-941

- 159. Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants a review. Gene 179, 21-30
- 160. Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarum, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry, N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. Plant Physiol 121, 1169-1177

5. ARTICLE 1

Title: Subcellular metal fractionation and quantification of thiolated peptides in phytoplankton

Authors: Michel Lavoie, Jonathan Bernier, Claude Fortin and Peter G.C. Campbell

Address: Institut national de la recherche scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), 490 de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Canada.

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

Corresponding author: <u>fortincl@ete.inrs.ca</u>

Running head: Intracellular metal speciation in algae

Keywords: Homogenization, subcellular fractionation, thiolated-peptides analysis, phytoplankton

Word count: 9888

Acknowledgement

We acknowledge the technical assistance provided by S. Duval, M. Bordeleau and R. Rodrigue. We are also grateful to S. Le Faucheur, for her HPLC expertise and her helpful comments. This work was supported the Metals in the Human Environment (MITHE) Research Network. ML and JB held scholarships from the *Fonds Québecois de recherche sur la nature et les technologies* (FQRNT) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) respectively. PGCC is supported by the Canada Research Chair programme.

Abstract

Metal-phytoplankton interactions are of interest both from an ecotoxicological point of view and from the perspective of metal trophic transfer in aquatic food webs. Recent studies in this area have looked at the distribution of metals within cells and their links to the synthesis of thiolated peptides. Subcellular fractionation by differential centrifugation and assays of thiolated peptides by high performance liquid chromatography (HPLC), following pre-column monobromobimane (mBrB) derivatization, are two methods frequently used in such studies. Using two contrasting species of green algae (Chlamydomonas reinhardtii and *Pseudokirchneriella subcapitata*), we evaluated and optimized different critical steps of these protocols, such as cell homogenization and fractionation and the extraction and derivatization of thiolated-peptides. Contrasting cell disruption efficiencies were obtained by sonication of the two species used. Homogenization conditions, homogenization buffers and algal physiological state affected the selectivity of the mitochondria separation step and the integrity of these organelles after differential centrifugation. With respect to the thiolated-peptides assay, glutathione (GSH) was extracted with high efficiency from both algal species after heating at 90 °C in an acidic matrix; preliminary sonication did not significantly improve the extraction efficiencies. The derivatization efficiencies of phytochelatins (PC_n; glu(cys)_ngly; n=2-4) and γ -glutamylcysteine (γ -EC) were lower than for GSH; previous studies where the calibration curves of PC_n and γ -EC were extrapolated from the plot for GSH, assuming similar derivatization efficiencies for each peptide, may thus have severely underestimated the concentrations of PC_n and γ -EC. This study highlights the importance of assessing these methods in the specific conditions they are to be used for.

Résumé

Les interactions métaux-phytoplancton sont d'un intérêt majeur sous un point de vue écotoxicologique ainsi que sous une perspective d'étude du transfère des métaux dans la chaîne trophique aquatique. Des études récentes ont regardées le lien entre la distribution intracellulaire des métaux à l'intérieur des cellules avec la synthèse de peptides thiolés. Le fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle et le dosage de peptides thiolés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec dérivatisation pré-colonne au monobromobimane (mBrB) sont deux methodes fréquemment utilisées dans de telles études. À l'aide de deux espèces d'algue verte (Chlamydomonas reinhardtii et Pseudokirchneriella subcapitata), nous avons évalué et optimisé différentes étapes importantes de ces protocoles, tel que l'homogénéisation des cellules et leur fractionnement ainsi que l'extraction et la dérivatisation des peptides thiolés. L'efficacité d'homogénéisation obtenue par sonification variait grandement en fonction des espèces. Les conditions et les tampons d'homogénéisation ainsi que l'état physiologique des algues affectaient la sélectivité de la séparation des mitochondries et leur intégrité après centrifugation différentielle. Pour ce qui est du dosage de peptides thiolés, l'extraction du glutathion (GSH) était très efficace chez les deux espèces d'algues après un chauffage à 90 °C dans une matrice acide et une sonification préalable n'augmentait pas significativement les efficacités d'extraction. Les efficacités de dérivatisation des phytochélatines (PC_n; glu(cys)_ngly; n=2-4) et du γ -glutamylcystéine (γ -EC) étaient plus faibles que celle du GSH. Par conséquent, les études préalables où les courbes de calibration des PC_n et du γ -EC furent extrapolées à partir de celle du GSH en assumant une efficacité de dérivatisation semblable pour chaque peptide peuvent avoir sous-estimées

grandement les concentrations des PC_n et du γ -EC. Cette étude démontre l'importance d'évaluer ces méthodes pour les conditions spécifiques dans lesquelles elles sont utilisées.

Introduction

The study of metal subcellular distribution and thiolated-peptides synthesis in aquatic organisms has been of primary interest in limnological and ecotoxicological studies over the last two decades. Metal subcellular distribution has been shown to be intimately linked to the assimilation efficiencies of metals during metal trophic transfer in aquatic food webs (Reinfelder and Fisher, 1994), and in addition, at least for non-essential metals, it should help differentiate between those metals that are bound to putative metal-sensitive sites and those that have been detoxified (Wang and Rainbow, 2006). Similarly, the synthesis of thiolated peptides by phytoplankton and higher plants is a well-recognized response to exposure to many metals and metalloids (Gekeler et al., 1988; Rauser, 1990; Steffens, 1990). The study of these peptides has led to a better understanding of their role in metal detoxification in phytoplankton cells (Ahner et al., 1995; Ahner and Morel, 1995; Le Faucheur et al., 2005, 2006; Morelli et al., 2002, 2005; Rijstenbil et al., 1994). However, despite this obvious link between subcellular metal distribution and the synthesis of thiolated peptides, only a few studies have simultaneously examined these two topics for phytoplanktonic algae (Ettajani et al., 2001; Miao and Wang, 2007). Note too that protocols used to evaluate metal subcellular distribution and thiolated peptides synthesis are often not validated and optimized for each target organism.

Protocols for determining the subcellular distribution of metals typically involve an initial cell homogenization step, followed by a differential centrifugation approach designed to separate at least three fractions: cellular debris; organelles; cytosol (e.g., Figure 1). Cell disruption can be achieved by using various homogenization techniques, such as sonication

(Joux-Arab et al., 1998; Mendoza-Cozatl et al., 2002), pressure (Wong et al., 2001), osmotic stress (Reinfelder and Fisher, 1994), grinding with a pestle (Nagel et al., 1996), rotor-stator agitation with beads (Le Faucheur et al., 2006) or without beads (Simon et al., 2005), and enzymatic treatments (Klein et al., 1983; Lin et al., 1985). Although these techniques are relatively old and are frequently used, information in the literature about the efficiency of cell disruption using these homogenization techniques is surprisingly scarce. Poor homogenization efficiency could lead to a contamination of the pellet of the first fraction (Figure 1: cell walls, membranes, granules and nuclei, commonly called "debris") with intact cells. For the assessment of metal subcellular distribution, this contamination could artificially increase the metal content in the debris fraction. On the other hand, although it is clearly important to maximize cell disruption, damage to organelles must also be minimized.

After homogenization, the fractionation of different intracellular compartments can be attempted using various techniques. The isolation methods include simple differential centrifugation (Miao and Wang, 2007), density gradient centrifugation with sucrose (Klein et al., 1983), Percoll (Nagel et al., 1996) or silicone oil (Hampp et al., 1982), membrane filtration (Lilley et al., 1982) and centrifugal elutriation (Lin et al., 1985). Although gradient density centrifugation and centrifugal elutriation lead to subcellular fractions containing fewer impurities and contaminants than simple differential centrifugation (Lin et al., 1985), the latter remains the most widely used technique in metal partitioning studies, probably due to its simplicity and its quantitative recovery of subcellular fractions. The traditional fractionation procedures by centrifugation are based on differences in the size and density of organelles (Howell et al., 1989). The subcellular fractions obtained by using these procedures can vary

with the cells or tissues analysed, as well as with the homogenization conditions (De Duve, 1975; Graham, 2001).

Thiolated peptides are usually extracted into an acidic matrix after cell homogenization, prior to peptide separation and quantification. The extraction efficiency or the proportion of peptide extracted must be optimized to maximize the concentration of extracted peptides and evaluated on a per cell basis to normalize the peptide concentration as a function of truly extracted cells. Even though normalization of the peptide concentrations could in principle also be made with other parameters such as chlorophyll and extracted protein concentrations, these types of normalization can add another bias since the chlorophyll and proteins concentrations are themselves affected by the metals taken up by the cells (Miao et al., 2005; Thompson and Couture, 1991). Such normalization did not give satisfactory results in previous studies (Rijstenbil et al., 1994). Furthermore, normalization of the thiolated peptides on a per cell basis allows one to relate the total intracellular metal or the metal subcellular distribution to thiolated peptide synthesis.

The fluorescent detection of peptides requires the binding of thiol groups to a fluorescent probe, e.g., monobromobimane (mBrB). However, many previous studies using the mBrB derivatization technique assumed a constant binding efficiency of mBrB, regardless of the number of thiol groups per peptide. In this approach, a single calibration curve is prepared with the easily available and low cost peptide glutathione (GSH) and the concentration of all thiolated peptides is then determined using this calibration curve for GSH. Sneller et al. (2000) showed, for the plant *Silene vulgaris,* that this efficiency could vary widely as a function of the peptide used. Moreover, the mBrB derivatization efficiency could

well change when a different derivatization protocol is used. It is thus important to study this parameter as well.

Our target phytoplankton species, Chlamydomonas reinhardtii and Pseudokirchneriella subcapitata, are present in freshwater ecosystems, C. reinhardtii being less important than P. subcapitata in undisturbed freshwater lakes. The species belonging to the Chlamydomonas genus are abundant in several eutrophic lakes during spring blooms (Olsen et al, 1983). However, recent molecular studies indicate that C. reinhardtii is not as cosmopolitant as it was previously thought (Fawley et al., 2004). Pseudokirchneriella subcapitata (aka Selenastrum capricornutum) is a common alga in oligotrophic freshwater lakes (Komarek and Gonzalez, 1982). The Selenastrum genus is widespread in the general flora from regions of North and Central America, together with other non motile Chlorophyte species (Wehr and Shealth, 2003). These latter species become abundant usually at the end of the summer in oligotrophic lakes of temperate regions and constitute an important feeding source for the benthic and planktonic herbivores (Sorokin, 1999; Wehr and Shealth, 2003). Both C. reinhardtii and P. subcapitata are often used in studies of metal transfers from freshwater phytoplankton to herbivorous organisms. As an example, Fournier et al. (2006) studied the transfer of selenium from C. reinhardtii to the Asiatic clam Corbicula fluminea whereas Sofyan et al. (2006; 2007) monitored Cd and Cu transfer from P. subcapitata to the cladoceran Ceriodaphnia dubia.

The aim of the present study was to evaluate and optimize the key variables affecting the performance of an algal subcellular fractionation scheme involving differential centrifugation coupled to the separation and quantification of thiolated peptides by high

performance liquid chromatography (HPLC). Homogenization methods were tested with a resistant green alga, *P. subcapitata*, and the optimized disruption efficiency was determined using different methods. The selectivity of the mitochondria separation step and the integrity of the mitochondria after subcellular fractionation were assessed using marker enzymes and optimized for *C. reinhardtii* with respect to different homogenization buffers and sonication treatments. The impact of different extraction treatments and changes in homogenate cell density on the efficiency of the thiolated peptides extraction step was assessed. Finally, mBrB derivatization efficiencies of purified phytochelatins (PC_n; glu(cys)_ngly; n=2-4) and γ -glutamylcysteine (γ -EC) were calculated empirically. This study highlights the importance of assessing the subcellular fractionation by differential centrifugation and the thiolated peptides measurements methods for phytoplankton before relying on them for limnological and ecotoxicological studies.

Materials and procedures

Phytoplankton cultures maintenance – The two unicellular algal species used, *Pseudokirchneriella subcapitata* (UTCC 37) and *Chlamydomonas reinhardtii* (UTCC 11, walled wild type), were obtained from the University of Toronto Culture Collection (UTCC, Ontario, Canada). Both species were grown separately in MHSM-1 (Modified High Salt Medium) culture media described in Table SI1 and derived from the HSM medium found in Macfie et al. (1994). Algae were kept in an incubation chamber (Conviron, CMP3023) at $20 \pm$ 0.2 °C, under a continuous light regime (100 µmol m⁻² s⁻¹) with rotary shaking at about 50 rpm. For the culture maintenance, 1 mL of culture was transferred to 100 mL of fresh and sterile MHSM-1 medium every week. Axenicity of the stock culture was monitored regularly

by plating the culture onto BHI nutrient broth 1/10 (Difco, Detroit, Michigan). For all the experiments, exponentially growing cells were inoculated into a sterile culture medium to give an initial cell density of 40 000 cell/mL. After 3 days (*C. reinhardtii*) or 4 days (*P. subcapitata*) of growth, corresponding to the end-exponential growth phase, algae were harvested by centrifugation (20 000 g, 15 min).

Homogenization methods – We tested three different homogenization devices: a sonicator, a beadbeater and a rotor-stator homogenizer. Preliminary experiments were performed to determine optimal operating conditions for each device to maximize cell disruption efficiency (data not shown). Algae harvested by centrifugation were resuspended in MHSM-1 medium and concentrated to reach a cell density of 10^6 cell/mL except for the beadbeater tests which were done at cell densities of 10^6 to 10^7 cell/mL.

The Disruptor GenieTM beadbeater (Scientific industries, model SI-D236) consisted of a vortex-agitator that holds up to twelve 1.5 mL Eppendorf centrifuge tubes in one run. Cell disruption results from the collision between the added beads and the suspended algae. Concentrated algae samples (0.6 mL) were added to 1.998 g of zirconia-silica beads (0.5 mm diameter) in Eppendorf tubes to reach a final volume of 1.14 mL (bead's specific gravity=3.7 g/cm³) and a 90% beads/solution ratio. The Eppendorf tubes were kept on ice before homogenization and after each minute of disruption for a total agitation time of 3 min.

A sonicator (Branson 250, with a 4.8 mm diameter micro-tip probe) was also tested to break cells. This device generates intense sonic pressure waves in liquid media that cause the formation of microbubbles, which grow and collapse violently. During this latter process, called cavitation, the implosion creates a shock wave with enough energy to break membranes and cell walls (Hopkins, 1991). Samples (5 mL) in polypropylene tubes (12 mm diameter) were kept and sonicated on ice for 4 min to disrupt the cells. Throughout this study, all samples were sonicated at a power level of 22 W and at a frequency of 0.2 sec/sec.

The ability of a rotor-stator homogenizer (Polytron, Labortechnik Ultra-turrax T25) to break algal cells was also tested. Samples of algae (5 mL) were put in 8 mL glass test-tubes and were homogenized for 15 min at 24 000 rpm.

Homogenization efficiency – <u>Particle counter</u>. Homogenization efficiencies were first determined with an electronic particle counter (MultisizerTM 3 Coulter Counter®, with a 70 μ m aperture; Beckman, Miami, Florida, USA). Size distributions of algae before and after homogenization were obtained in the size range 2.5-10 μ m or 2-10 μ m for *C. reinhardtii* (Fig. 2a) and *P. subcapitata* (Fig. 2b) respectively after a 10-fold dilution in Isoton III electrolyte. The size distribution after cell disruption (white area; Fig. 2a and 2b) was subtracted from the initial size distribution with the MultisizerTM 3 software providing the size distribution of the disrupted cells (black area; Fig. 2a and 2b). Homogenization efficiencies (% broken cells) were computed from the ratio of the remaining cell density divided by the total initial cell density, providing a conservative estimate.

<u>¹⁴C uptake</u>. Cell disruption efficiencies were confirmed independently by incubating the intact algae with a spike of NaH¹⁴CO₃ (10 μCi / 100 μg) (Amersham: Oakville, Ontario, Canada). After 3 to 4 days of growth for *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* respectively, both species were exposed to ¹⁴C (10 nCi/mL) for several exposure times (7, 25, 49, 68 min). After

each exposure time and for each species, six 2 mL samples were filtered onto two superimposed polycarbonate membranes (2 μm; Isopore). The second or background filter was used to assess ¹⁴C adsorbed to or embedded within the membrane. Algae and filters were rinsed five times using 10 mL of non-labelled NaHCO₃ 10⁻³ M diluted in MHSM-1 medium. A first set of three filters were used to assess the ¹⁴C taken up by algae before sonication. For the three other filters, the cells were resuspended in MHSM-1 medium and sonicated for 4 min and re-filtered to assessed the ¹⁴C remaining in sonicated algae. ¹⁴C activities of all filter membranes were determined with a scintillation counter (Wallac 1414, Turku, Finland) using Ecolume scintillation cocktail (ICN, Montreal, Québec, Canada). Bottom or background filter activities were subtracted from top filters on which algae were harvested. Relative ¹⁴C activity between the top filters before and after sonication yielded estimates of algal homogenization efficiencies.

Influence of sonication on growth. After 4 days of growth, 5 mL triplicate samples of *P. subcapitata* cells were removed and sonicated for 4 min while a second set of 5 mL triplicate samples was used as control. Sonication efficiency was assessed with the particle counter as described above. Sonicated algae and control algae were inoculated into triplicate fresh culture media to give an initial density of 40 000 cell/mL. Growth rates of the sonicated and control *P. subcapitata* algae, as an indicator of algal integrity, were calculated as the slope of the linear portion of the algae growth curves: Ln (density) as a function of time (12 hours intervals). These slopes were calculated by Sigma-Plot (Version 10) software and were expressed in doublings $h^{-1} \pm$ standard error.

Evaluation of the subcellular fractionation method using mitochondria as markers for organelles – Separation of algal organelles by ultracentrifugation. C. reinhardtii cells harvested by centrifugation were resuspended in sucrose buffer (250 mM sucrose, 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4) or MHSM-1 medium to reach a cell density of 10⁷ cell/mL. The effect of the algal growth phase was also assessed by using algae in end-exponential (3 days) and stationary (5 days) growth phase. They were subsequently homogenized by continuous sonications for 4 or 6 min. Preliminary experiments showed that disruption efficiency increased with time up to 4 min and then levelled off at ~98%. The homogenized samples were submitted to a differential centrifugation protocol (Fig. 1) adapted from Giguère et al. (2006). The homogenate was first centrifuged at 1500 g for 15 min to yield a pellet (P1) composed mainly of membranes, cell walls, granules and nuclei. The supernatant was further centrifuged at 100 000 g for 60 min to yield a pellet (P2: organelles and microsomes) and a supernatant (S2: cytosol). Enzymatic tests described below were performed on these three fractions to validate and optimize the subcellular fractionation protocol, using mitochondria as a typical organelle. The two pellets were resuspended in MHSM-1 medium with a 10 sec sonication prior to an enzymatic activity analysis.

Cytochrome c oxidase enzymatic assay. Cytochrome c oxidase (CCO) (EC 1.9.3.1), located in the inner mitochondrial membrane, was measured according to Storrie and Madden (1990) with a few modifications. The reaction mixture was composed of a phosphate buffer 0.1 M (pH=7), K₃Fe(CN)₆ 10 mM (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) (only in reference samples) and reduced (by addition of sodium dithionite) cytochrome c 0.07 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) as the reaction substrate. To assay the CCO activity, 200 µL of each subcellular fraction were added to 800 µL of the reaction mixture.

The decrease in absorbance at 550 nm of ferrocytochrome c caused by its oxidation to ferricytochrome c by CCO was monitored (spectrophotometer Cary 100 Bio, Varian) for 5 min at 20 °C. The enzyme activity was calculated on the basis of an extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

<u>Citrate synthase assay</u>. Citrate synthase (CS) (EC 4.1.3.7) activity, as an exclusive marker of the mitochondrial matrix, was assayed by measuring sulphydryl group transfer from acetyl-CoA-SH (CoASH) (Sigma) to 5,5'-dithio-bis(2-nitro-benzoic acid (DTNB) (Fisher) according to the method of Srere (1969). The reaction mixture was composed of Tris-HCl buffer 92 mM (pH=8.0), CoASH 0.27 mM and DTNB 0.13 mM. To assay the CS activity, 200 μ L of each subcellular fraction were added to 750 μ L of reaction mixture. The control samples (water used instead of algal samples) were allowed to stabilize for 2 min before measurements. The reaction was then started by adding 50 μ L of the substrate oxaloacetate 6 mM (Sigma). The enzyme activity was obtained by monitoring the increase of DTNB-SH formation with time for 5 min at 20 °C, using an extinction coefficient of 13.6 mM⁻¹ cm⁻¹.

Thiolated peptides quantification method by HPLC – Peptides extraction. Algal cells were centrifuged (4 °C, 10 min, 15 000 g), rinsed with MHSM-R medium (Table SI1) and harvested after a second centrifugation (4 °C, 5 min, 10 000 g). The algal pellet was then resuspended in 500 μ L HCl/DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) (0.1 M/5 mM). Different treatments (heating and sonication) combined with acidification were tested to optimize the extraction and, for these experiments, cells were resuspended in 3 mL HCl/DTPA (0.1 M/5 mM). The pellet was resuspended a second and a third time in HCl/DTPA for multiple extraction tests.

<u>Derivatization</u>. Thiols and blank samples were derivatised with mBrB as a fluorescent tag following the procedure described in Morelli and Scarano (2001) and optimized by Le Faucheur et al. (2005).

Thiolated peptide elution and quantification by HPLC. The chromatographic separation was processed on a Dionex SummitTM HPLC system and chromatographic data were compiled using the Chromeleon software. Thiols were separated on a reversed-phase Alltech Econosphere C-18 column (length, 250 mm; inner diameter, 4.6 mm; particle size, 5 µm) and detected by fluorescence at 380 nm excitation and 470 nm emission wavelengths using 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid in aqueous solution) (Supelco, Oakville, Ontario, Canada) as solvent A and 100% acetonitrile (Fisher) as solvent B. A linear gradient from 5 to 11% for 30 min and from 11 to 31% of solvent B for another 50 min was used at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The column was cleaned between each measurement with 100% acetonitrile for 5 min, followed by 10 min at 5% acetonitrile for equilibration. The use of a 50 µl injection loop gave a detection limit of 0.3, 0.5 and 0.2 pmol of peptides per injection for, respectively, GSH, γ -EC and PC₂₋₄. Retention times of the five thiols were verified with purified standards (GSH: 32.0 min, γ -EC=34.0 min, PC₂=55.6 min, PC₃=64.7 min and PC₄=70.3 min). GSH (purity=99.5%) and γ -EC (purity=88.0%) were obtained from Fisher and Sigma respectively. PC₂₋₄ were purchased from Anaspec (San Jose, California, USA) and had purities of 92.7%, 96.4% and 93.1% respectively. A calibration curve of GSH peak area versus concentration was done for GSH quantification.

Derivatization efficiency. Standards solutions (10 μ M each) of the five peptides analysed were done gravimetrically in the HCl/DTPA (0.1 M/5 mM) matrix using an experimentally determined density of 1.005 g/mL and taking into consideration peptide purities. These five standards as well as 2 to 40 fold dilutions of them were derivatized and analysed by HPLC. Firstly, thiol fluorescence was used in order to determine empirically γ -EC, PC₂, PC₃ and PC₄ derivatization efficiencies based on the SH fluorescence level of GSH (Eff_{GSH}) (Eq. 1). Secondly, derivatization efficiencies of PC_n based on the SH fluorescence levels of GSH and γ -EC were also calculated (Eff_{GSH; γ EC) (Eq. 2), given that PC_n molecules are not constituted only of GSH units. Rather, they are peptide chains of γ -EC units terminated by one GSH unit. These derivatization efficiencies were:}

$$Eff_{GSH} = \frac{F_{thiol}}{F_{GSH} \times N}$$
(1)

$$Eff_{GSH;\gamma EC} = \frac{F_{thiol}}{F_{GSH} + [(N-1)(F_{\gamma EC})]}$$
(2)

where F_{thiol} is the fluorescence area in mV min of one of either γ -EC, PC₂, PC₃ or PC₄, F_{GSH} represents the GSH fluorescence area, $F_{\gamma EC}$ is the γ -EC fluorescence area and N is the number of thiol groups of the thiolated peptides.

Statistics – Significant differences among the data were identified using one or twoway analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey pairwise comparison test. A t-test for independent sample was used to compare only two means. Statistical analyses were performed using Systat software (Version 10.0) except for the linear regressions which were plotted and tested statistically with Sigma-Plot software (Version 10.0). Results were considered to be significant if p<0.05. Preliminary conditions for parametric statistical tests were always verified using raw and, if needed, log-transformed data.

Assessment

Cell disruption efficiency for different homogenization methods calculated with a particle counter –A large and extremely significant difference in sonication efficiency was measured for the two species (98.0 ± 0.7% for *C. reinhardtii* and 27.8 ± 1.8% for *P. subcapitata*; (t=62.7, df=4, p<0.001). Homogenization of *P. subcapitata* was thus further tested with two other methods (beadbeater, rotor-stator homogenizer). The rotor-stator homogenizer was clearly inefficient, with a disruption efficiency of only 0.2 ± 0.1 %. On the other hand, 18.0 ± 1.5 % of the cells were disrupted with the beadbeater but this result was still significantly lower than that obtained with the sonicator (p<0.001). Moreover, the use of the beadbeater is less convenient than the sonicator because it requires costly beads, which can rupture and make the separation of the beads from the algal components difficult; the ruptured beads also provide a potential surface for adsorption of dissolved metals. Sonication was thus the most convenient and most efficient method to disrupt algal cells, based on the particle counter estimation of cell homogenization efficiency.

Investigation of the integrity of the remaining sonicated P. subcapitata cells – Given that the "apparent" unexpectedly low homogenization efficiency calculated with the particle counter for P. subcapitata, ¹⁴C radiolabelled cells were used to confirm this low efficiency. No significant difference between the cell homogenization estimates by the particle counter or the ¹⁴C uptake techniques was found (t=-1.312, df=4, p=0.26) (Table 1). Several ¹⁴C exposure

time steps were also tested (7, 25, 49 and 68 min) and compared to the particle counter approach, confirming that only about a quarter of the P. subcapitata cells could be ruptured with the sonicator (p>0.05) (Table SI2). These results suggest that the membranes and/or cell walls of the remaining cells are still intact or maybe poorly perforated after sonication. To further verify the integrity of these remaining P. subcapitata sonicated cells, the growth rate of sonicated and control cells were compared by inoculating the cells in fresh culture media. The growth rate of sonicated cells (0.059 ± 0.002) was equal to that obtained for the control cells (0.059 ± 0.003) (t=0.000, df=4, p=1.000). Furthermore, the lag growth phase was even shorter for the sonicated cells than for the control cells, indicating that sonication did not affect the remaining cells' physiology and suggesting that the disruption efficiency was not underestimated. Moreover, microscopic examination confirmed that a large proportion of P. subcapitata cells remained after sonication. For C. reinhardtii, we were not able to observe any non-disrupted cells under the microscope (Fig. SI.1). The same homogenization efficiency obtained for *P. subcapitata* with both techniques tested (particle counts; ¹⁴C labelling), as well as the strong potential of growth of the sonicated cells and microscopic examination, suggested that the remaining P. subcapitata cells were still intact. All of this evidence supports our conclusion that a simple estimation with the particle counter technique is sufficient to assess the homogenization efficiency of sonication for the unicellular green alga P. subcapitata.

Differences in homogenization efficiencies between species – As seen in Table 1, *C. reinhardtii* cells are much easier to break than *P. subcapitata* cells. This observation is likely linked to the cell wall composition of the two species. The cell wall of *C. reinhardtii* does not contain cellulose or other polysaccharides, in contrast to *P. subcapitata* cell wall (Hoek et al., 1995). The cell wall of *C. reinhardtii* is instead composed of several layers of hydroxyprolinerich glycoproteins (Voigt, 1988).

Many green algae are resistant to mechanical or chemical treatments. According to Burnison (1980), freshwater chlorophytes are the most difficult algae from which to extract chlorophyll a (chl a). Traditional extraction methods underestimate chl a concentration and harsher extraction methods must be used to break the resistant cell wall of these species. Indeed, Burnison found that the chl a extraction in acetone 90% was 20% less efficient than an extraction in DMSO:acetone 1:1 at 65 °C for 10 min. Similarly, Sartory and Grobbelaar (1984), testing chl a extraction methods in ethanol or methanol for three freshwater algae species, found that P. subcapitata was the most difficult species from which to extract chl a. Even after a 20 h extraction in 95% ethanol, the recovery of chl a was incomplete in P. subcapitata whereas all chl a had been extracted in the two other species. Sonication was also tested by Eixler et al. (2005) to extract total polyphosphate granules and total cellular phosphorus from *Chlorella vulgaris*, a green alga with cellulose-rich cell walls. A sonicator equipped with a probe was used at full power during 5 min. Epifluoresence microscopic analysis of DAPI stained algae showed a high proportion of intact cells with yellow fluorescencing granules (at 526 nm under UV excitation) remaining inside the cells. Only 33% of the total cellular phosphorus could be measured after the sonication. Thus, the relatively high resistance of the cell walls of some green algae could well explain the low sonication efficiency that we obtained for *P. subcapitata*.

Evaluation and optimization of the subcellular fractionation protocol – <u>Efficiency of</u> <u>mitochondria separation</u>. The CCO assay of different subcellular fractions (Fig. 3a) allowed us to optimize the sonication parameters and the selection of the buffer medium, based on the mitochondria separation. Mitochondria separation into the organelles fraction was very efficient with the MHSM-1 culture medium (>90% of the mitochondria reported to the organelles fraction), but decreased for the sucrose buffer (<80% mitochondria in the organelles fraction), likely due to the higher density of the sucrose medium. Shorter sonication time significantly increased the mitochondria separation efficiency for the sucrose buffer (4 min vs. 6 min, p=0.004), but not for the MHSM-1 medium (4 min vs. 6 min, p=0.06). Reductions of CCO activity in the organelles fraction when using a more intense sonication could be due to the disintegration of the mitochondria membrane, such that membrane debris remained in suspension and failed to pellet during the 100,000 g centrifugation. The culture age did not influence the mitochondria separation efficiency for the MHSM-1 medium (6 min MHSM-1 3 days vs. 6 min MHSM-1 5 days, p=0.36) neither the use of discontinuous sonication (1 min stop for each minute of sonication) (data not shown).

<u>Mitochondria integrity</u>. Assays of CS activity in the same three subcellular fractions were used to assess mitochondrial integrity after the sonication step and the differential centrifugation steps (Fig. 3b). Mitochondrial integrity was better preserved in MHSM-1 medium than in sucrose medium at all tested conditions. Shorter sonication time improved the conservation of mitochondrial integrity for the sucrose medium (4 min vs. 6 min, p=0.01), but not for the MHSM-1 medium (4 min vs. 6 min, p=0.07). Unlike the mitochondria separation efficiency, the physiological state of algae did influence mitochondria integrity. Indeed, a decline was observed in cells from the older culture (6 min MHSM-1 3 days vs. 6 min MHSM-1 5 days, p=0.007). Cell structure fragility of aging algae could explain this result.

However, even the softest sonication conditions did not prevent mitochondria damage (maximum integrity of 80 %).

Mechanical breakage by a mortar and pestle, as in the case of the sonicator, can also damage some algal organelles (Klein et al., 1983). As mentioned by Nagel et al. (1996), who used *C. reinhardtii* (wall-less strain), about 40% of the chloroplasts isolated by simple or gradient differential centrifugation after a gentle homogenization method with a Potter-Elvejham glass homogenizer were disrupted. The large size of the chloroplasts could contribute to this phenomenon. Cell lysis with more gentle method such as enzymatic and digitonin treatment to lyse the cell wall and plasma membrane (Klein et al., 1983; Lin et al., 1985), might decrease the level of organelles breakage. However, these homogenization protocols are rather long and they require the addition of many chemical reagents (enzymes, EDTA) that could affect the subcellular distribution of metals in algal cells and they are thus inappropriate in the present context.

It might be possible to decrease the damage to organelles by using a shorter sonication than 4 minutes. However, the homogenization efficiency will also tend to decrease as well as the capacity to detect metals in subcellular fractions, especially when working with nonradioactive metals. Increasing cell density of homogenate to increase the sensitivity to detect metal may well be difficult. Indeed, subcellular fractionation of metal is typically done at quite high cell density such as $100-150 \times 10^6$ cell/ml to easily isolate pelleted fractions since separation by differential centrifugation of the debris or the cytosol fraction to isolate and separate, for example, granular compounds or different types of proteins could lead to a very small pellet difficult to discern from the supernatant if the initial algal cell density is too low.
Thus, further increase of these densities would lead to technical difficulties associated with the manipulation of very concentrated and viscous algal samples.

Our results show that homogenization conditions and the physiological state of algae influence the subcellular separation steps and the integrity of the organelles. Homogenization conditions should be properly assessed and optimized with each new species to be studied before relying on subcellular fractionation protocols. Finally, the influence of the physiological state of algae on mitochondria integrity highlights the importance of using algae in the same growth phase in order to reliably compare metal subcellular distribution results.

Optimization and evaluation of the thiolated peptides quantification method by HPLC – <u>Extraction optimization</u>. To optimize the extraction of peptides, we measured GSH concentrations from both species after different extraction treatments (Fig. 4). Surprisingly, heating or sonicating after the resuspension of algae in HCI/DTPA did not increase significantly the GSH extracted concentration for either species (p>0.05). It thus seems that the increase in membrane permeability due to HCI/DTPA is sufficient to extract GSH from the cells. This absence of improvement by sonication and the high efficiency of HCI/DTPA treatment were not expected, since many studies have used a sonication step to extract thiolated peptides (Morelli and Scarano, 2001; Morelli et al., 2005; Kawakami et al., 2006; Rijstenbil et al., 1994). Reports in the literature have shown that sonication could enhance extraction efficiency of chl a in phytoplankton. Indeed, Simon and Helliwell (1998) found that the efficiency of chl a extraction from the freshwater alga *Selenastrum obliquus* increased after a 2 min sonication (using a sonicator equipped with a 25 mm tipped probe; 19 W/cm²; volume=25 mL) in methanol compared to standing cells in solvent for 24 h at 4 °C.

Furthermore, Wright et al. (1997) recommended the addition of a sonication step to improve chl a extraction in methanol in marine algae.

Effect of cell density on GSH extraction efficiency. Since concentrated algal homogenates are often needed for peptide extraction, to obtain high analytical sensitivity and to detect thiolated peptides in the sub-nM range, the effect of the initial cell density in the homogenate on GSH extraction efficiency was assessed. Algal samples were resuspended in HCI/DTPA and several dilutions of these concentrated samples were made to test different cell densities. Extractions were done using the simplest extraction treatment (Treatment B. Fig. 4) and GSH was quantified by HPLC. A strong linear relationship between extracted <u>GSH per</u> <u>injection</u> and the cell density for *C. reinhardtii* (R^2 =0.99) and *P. subcapitata* (R^2 =0.99) was obtained (Fig. SI2) and the intercept from the linear regression was not significantly different from zero (p>0.05), suggesting that cell density had little effect on the efficiency of GSH extraction. Although linear regressions between normalized <u>extracted GSH per cell</u> as a function of cell density gave slightly negative slopes (Fig. SI3), this decrease was not significant for either species (p>0.05).

To investigate the extraction efficiency more fully, multiple extractions were done on algal samples of both species using treatment B (Fig. 5). Percentages were based on total GSH extracted after three extractions. For both species, GSH concentrations were under the detection limit for the third extraction at 40×10^6 cell/mL. Figure 5 shows that a large proportion of GSH was extracted after only one extraction (\geq 88% for both species). The low concentrations of GSH measured after two or three extractions suggest that the extraction of peptides was very efficient for both species.

In contrast with the previously obtained results the multiple extraction tests demonstrated a significant decrease in GSH extraction efficiency in the first extraction with increasing cell density for both species $(40 \rightarrow 150 \times 10^6 \text{ cell/mL for } C. reinhardtii; 40 \rightarrow 530 \times 10^6 \text{ cell/mL for } P. subcapitata$). The proportion of GSH measured after only one extraction was significantly lower for the more concentrated homogenate than for the less concentrated one, for both species (t=6.58, df=4, p<0.01 for C. reinhardtii; t=4.22, df=4, p<0.05 for P. subcapitata). Moreover, for P. subcapitata, GSH recovered for the second extraction was significantly greater at the higher cell density (t=-4.587, df=4, p=0.01) whereas for C. reinhardtii the increase was not significant (t=-2.45, df=4, p=0.07). This weak decrease in GSH extraction efficiency for C. reinhardtii and P. subcapitata when greater cell densities were used would explain the slight but not significant decrease in GSH concentration per cell with increasing cell density of homogenate (Fig. SI3).

In conclusion, an increase in cell density for both *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* did not influence the GSH extraction efficiency significantly, based on the linear regressions (Fig. SI2, SI3). However, a significant decrease in the GSH extraction efficiency was found with the multiple extraction tests over a 15 to 60 fold increase in cell density (Fig. 5). Thus, although the small decrease in GSH extraction efficiency with increasing cell density was not detected by the linear regression analysis, we nevertheless conclude from the multiple extraction tests that there is a small decrease in extraction efficiency with higher cell densities.

<u>Derivatization efficiency</u>. All peptides used showed derivatization efficiencies lower than for GSH or for a combination of GSH and γ -EC (p<0.05) (Table 2). The derivatization

efficiencies relative to GSH decrease when the peptide chain length increases from PC₂ to PC₄. However, the derivatization efficiency for γ -EC, a smaller peptide than GSH, is also lower than for GSH. In comparison, derivatization efficiencies of PC₂₋₄, purified from *Silene vulgaris* plant roots, also decreased with increasing chain length (Sneller et al., 2000). Using estimated thiol concentrations from GSH calibration curves, and cysteine concentrations as determined by amino acid analysis of their PC_n, Sneller et al. obtained derivatization efficiencies for PC₂ (71 ± 0.5%) or PC₃ (58 ± 1.4%) similar to the Eff_{GSH} calculated in this study for PC₂ (75.6 ± 0.9%) and PC₃ (62.1 ±1.7%). However, they measured a much lower PC₄ derivatization efficiency (27 ± 0.6%) compared to ours (48 ± 2%). Although they also used mBrB as a fluorescent tag, their derivatization protocol was different. For example, the TCEP reducing step was not used, product concentrations added during the derivatization were different and the mBrB reaction was carried out at 45 °C. These differences could explain the divergence in the derivatization efficiencies calculated in the present study and those obtained by Sneller et al. (2000).

Derivatization efficiencies are typically higher for the $Eff_{GSH;\gamma EC}$ than for the Eff_{GSH} simply because γ -EC derivatization efficiency (Eff_{GSH}) was lower than that for GSH (100%). Thus, $Eff_{GSH;\gamma EC}$ are better estimates of the efficiency of mBrB in binding to SH groups and the decrease in derivatization efficiency due to the PC structure is then better expressed.

Since the mBrB fluorescent tag is in excess during the derivatization, we expected that the peptide concentration would not affect the mBrB-SH binding efficiencies. Indeed, dilutions of the peptide standards (10 to 40 times) did not affect the derivatization efficiencies (Eff_{GSH} and $Eff_{GSH;\gamma EC}$) (Fig. SI4) (p>0.05). Sneller et al. (2000) also found that 5 to 10 time

dilutions of PC_{2-4} did not alter their derivatization efficiencies. It is therefore possible to use the different derivatization efficiencies calculated empirically from a GSH calibration curve at different concentrations.

Discussion

In this study we have demonstrated that large differences in disruption efficiency can occur among species when using the same homogenization method. Such differences could severely bias comparisons among different algal species. It is however possible to quantify homogenization efficiency with a particle counter, allowing one to express analytical results on a disrupted cell basis. It is important to know the proportion of broken cells in order to correct and better interpret the result obtained, for example, after metal subcellular fractionation of algal cells. For our experimental conditions, assuming 100% homogenization efficiency after sonication of *P. subcapitata* would lead to a large overestimation of the metal in the debris fraction, given that the nominal "debris" fraction contained about 74% intact cells. It thus becomes important to subtract the metal content of intact cells remaining in the debris fraction.

Relatively harsh homogenization treatment must be used: i) to get an acceptable proportion of broken cells for algae with resistant cellulose-rich cell walls; ii) to increase metal concentrations above detection limits in subcellular fractions; and iii) to obtain pellets that could be easily isolated by differential centrifugation. However, even for easy-to-break algae, organelles are damaged inexorably depending on various factors such as sonication treatment, homogenization buffer and algae physiological state. Thus, the goal of complete cell

disruption in resistant algae may well be unattainable without damaging organelles. It is thus important to keep in mind that these factors influence the integrity of organelles and also their separation efficiency by differential centrifugation before attempting any interpretation of metal subcellular distribution results.

With respect to the thiolated-peptide assay, two important results can lead to new insights in future scientific work. Firstly, since the extraction tests showed that a sonication step did not significantly increase the measured GSH concentration in C. reinhardtii and P. subcapitata, this step could be omitted, at least for the experimental conditions of our study. This finding facilitates the peptides assay and allows an increase in the number of samples that can be analyzed in a regular work day. Secondly, the large difference in derivatization efficiencies calculated for the PC_n and the γ -EC dipeptide in relation to GSH shows the importance of running standards before evaluating and optimizing an HPLC method. Since the derivatization efficiencies of PC_n and γ -EC were below that of GSH, earlier studies that extrapolated these derivatization efficiencies from GSH have presumably underestimated the concentrations of PC_n and γ -EC. Existing data from those studies should be corrected by taking into consideration the derivatization efficiency of each peptide and results should be reinterpreted. Indeed, according to the derivatization efficiencies obtained in our study, a large underestimation of about 37%, 24%, 38% and 52% could be made for y-EC, PC₂, PC₃ and PC₄ respectively when using the derivatization efficiency of GSH.

Based on our assessment of differential centrifugation subcellular partitioning and thiolated peptides quantification protocols, optimization and performance evaluation for individual target organisms should improve interpretation of the results. Our results for *P*.

subcapitata and *C. reinhardtii* have shown the usefulness of such optimization. Such an approach will allow future researchers to apply these methods with more confidence. This work also provides a starting guideline for studies dealing with thiolated peptides synthesis and subcellular fractionation in other phytoplankton species.

Comments and recommendations

The results presented in this paper allowed us to identify several critical aspects of the procedures tested and to suggest some recommendations for the rigorous application of subcellular fractionation protocols and for the quantification of thiolated peptides.

(1) It is important to verify the disruption efficiency for each algal species when homogenizing in a buffer without a denaturating agent since *P. subcapitata* has proved to be difficult to break and homogenization efficiency could vary widely between algal species. If the disruption efficiency is under 100%, the proportion of intact cells in the homogenate should be taken into consideration when interpreting the results of metal subcellular fractionation.

(2) Subcellular separation efficiency and organelles integrity should be evaluated and homogenization conditions, such as buffer composition and sonication time, should be optimized before using subcellular fractionation protocols and interpreting the results. Using algae in different physiological states should be avoided if one wants to compare metal subcellular distribution results.

(3) For our experimental conditions and for both species tested, thiol extraction in a HCl/DTPA (0.1 M/5 mM) matrix followed by a 90 °C heating for 2 min proved to be the simplest and most efficient treatment to extract thiols.

(4) Even though the GSH extraction efficiency was relatively high and the cell density of the extract weakly influenced the GSH extraction efficiency, the proportion of peptide recovered after multiple extractions should be measured at cell densities representative of all the samples analysed and, if necessary, used as a correction factor.

(5) Derivatization efficiencies of PC_n and γ -EC must be used to construct the calibration curve of these peptides from the calibration curve of GSH.

In this study we have reported important results concerning the optimization and evaluation of both protocols tested. However, further verification and testing of the subcellular fractionation protocol could be made with other methods (e.g. scanning electron microscopy, nuclear and chloroplastic DNA measurements, other enzyme assays such as lysosyme and NADP-dependant glyceraldehyde-3P dehydrogenase specific to vacuoles and chloroplasts respectively). These assays could help to further evaluate the separation selectivity and the integrity of organelles in other species. It is important to remember that subcellular fractions isolated by differential centrifugation are operationally defined and thus the results obtained with such protocols should be interpreted with caution (Giguère et al. 2006).

References

Ahner, B. A., S. Kong, and F. M. M. Morel. 1995. Phytochelatin production in marine algae.1. An interspecies comparison. Limnol. Oceanogr. 40:649-657.

Ahner, B. A., and F. M. M. Morel. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. Limnol. Oceanogr. 40:658-665.

Burnison, B. K. 1980. Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37:729-733.

De Duve, C. 1975. Exploring cell with a centrifuge. Science 189:186-194.

Eixler, S., U. Selig, and U. Karsten. 2005. Extraction and detection methods for polyphosphate storage in autotrophic planktonic organisms. Hydrobiologia 533:135-143.

Ettajani, H., B. Berthet, J. C. Amiard, and L. Chevolot. 2001. Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters: contribution to the assessment of trophic transfer. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40:209-221.

Fawley, M. W., K.P. Fawley, and M.A. Buchheim. 2004. Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. Microb. Ecol. 48:489-499.

Fournier, E., C. Adam,, J.-C. Massabuau, and J. Garnier-Laplace. 2006. Selenium bioaccumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and subsequent transfer to *Corbicula fluminea*: Role of selenium speciation and bivalve ventilation. Environ. Toxicol. Chem. 25:2692-2699.

Gekeler, W., E. Grill, E.-L. Winnacker, and M. H. Zenk. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150:197-202.

Giguère, A., P. G. C. Campbell, L. Hare, and P. Couture. 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. Aquat. Toxicol. 77:178-189.

Graham, J., 2001. Biological centrifugation. Bios scientific publishers limited, Oxford, UK.

Hampp, R., M. Goller, and H. Ziegler. 1982. Adenylate levels, energy charge, and phosphorylation potential during dark-light and light-dark transition in chloroplasts, mitochondria, and cytosol of mesophyll protoplasts from *Avena sativa* L. Plant Physiol. 69:448-455.

Hoek, C. V. D., D. G. Mann, and H. M. Jahns. 1995. Algae: an introduction to phycology. University Press. Cambridge.

Hopkins, T. 1991. Purification and analysis of recombinant proteins. See tharam and Sharma editors. New York.

Howell, K. E., E. Devaney, and J. Gruenberg. 1989. Subcellular fractionation of tissue culture cells. Trends Biochem. Sci.14:44-47.

Joux-Arab, L., B. Berthet, and J. M. Robert. 1998. Distribution of copper in the diatom *Haslea* ostrearia Simonsen. Mar. Environ. Res. 46:555-558.

Kawakami, S. K., M. Gledhill, and E. P. Achterberg. 2006. Effects of metal combinations on the production of phytochelatins and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. BioMetals 19:51-60.

Klein, U., C. Chen, M. Gibbs, and K. A. Platt-Aloia. 1983. Cellular fractionation of *Chlamydomonas reinhardtii* with emphasis on the isolation of the chloroplast. Plant Physiol. 72:481-487.

Komarek, J., and A.C. Gonzalez. 1982. Taxonomical definition of the genera and several species of *Ankistrodesmus* and *Selenastrum* (Chlorococcales). Arch. Hydrobiol. Suppl. 63:259-277.

Le Faucheur, S., R. Behra, and L. Sigg. 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. Environ. Toxicol. Chem. 24:1731-1737.

Le Faucheur, S., F. Schildknecht, R. Behra, and L. Sigg. 2006. Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. Aquat. Toxicol. 80:355-361.

Lilley, R. M., M. Stitt, G. Mader, and H. W. Heldt. 1982. Rapid fractionation of wheat leaf protoplasts using membrane filtration. The determination of metabolite levels in the chloroplasts, cytosol, and mitochondria. Plant Physiol. 70: 965-970.

Lin, J.-T., O. M. Griffith, and J. W. Corse. 1985. Subcellular fractionation of wheat leaf protoplasts by centrifugal elutriation. Anal. Biochem. 148:10-14.

Macfie, S.M., Y. Tarmohamed, and P.M. Welbourn. 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. Toxicol. 27:454-458.

Mendoza-Cozatl, D., S. Devars, H. Loza-Tavera, and R. Moreni-Sanchez. 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol. Plant. 115:276-283.

Miao, A. J., W-X Wang, and P. Juneau. 2005. Comparison of Cd, Cu and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. Environ. Toxicol. Chem. 24:2603-2611.

Miao, A.-J., and W.-X. Wang. 2007. Predicting copper toxicity with its intracellular or subcellular concentration and the thiol synthesis in a marine diatom. Environ. Sci. Technol.

41:1777-1782.

Morelli, E., and G. Scarano. 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Mar. Environ. Res. 52:383-395.

Morelli, E., B. H. Cruz, S. Somovigo, and G. Scarano. 2002. Speciation of cadmium-γglutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Sci. 163:807-813.

Morelli, E., M. C. Mascherpa, and G. Scarano. 2005. Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in response to arsenate exposure. BioMetals 18:587-593.

Nagel, K., U. Adelmeier, and J. Voigt. 1996. Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Plant. Physiol. 149:86-90.

Olsen, Y., G. Knutsen, and T. Lien. 1983. Characteristics of phosphorus limitation in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophycea) and its palmelloids. J. Phycol. 19:313-319.

Rauser, W. E. 1990. Phytochelatins. Annu. Rev. Biochem. 59:61-86.

Reinfelder, J. R., and N. S. Fisher. 1994. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. Limnol. Oceanogr. 39:12-20.

Rijstenbil, J. W., J. W. M. Derksen, L. J. A. Gerringa, T. C. W. Poortvliet, A. Sandee, M. van den Berg, J. van Drie, and J. A. Wijnholds. 1994. Oxidative stress induced by copper: defence and damage in the marine planktonic diatom *Dytilum brightwelli*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. Mar. Biol. 119:583-590.

Sartory, D. P., and J. U. Grobbelaar. 1984. Extraction of chlorophyll a from freshwater

phytoplankton for spectrophotometric analysis. Hydrobiologia 114:177-184.

Simon, D., and S. Helliwell. 1998. Extraction and quantification of chlorophyll α from freshwater green algae. Water Res. 32:2220-2223.

Simon, O., V. Camilleri, G. Grasset, and J. Garnier-Laplace. 2005. Subcellular fraction associated to radionuclide analysis in various tissues: Validation of the technique by using light and electron observations applied on bivalves and uranium. Radioprotection Suppl. 40:S199-S204.

Sneller, F. E. C., L. M. V. Heerwaarden, P. L. M. Koevoets, R. Vooijs, H. Schat, and J. A. C.
Verkleij. 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris* induced upon to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's Reagent and Monobromobimane.
J. Agric. Food Chem. 48:4014-4019.

Sofyan, A., J. R. Shaw, and W. J. Birge. 2006. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. Environ. Toxicol. Chem. 25:1034-1041.

Sofyan, A., G. Rosita, D. J. Price, and W. J. Birge. 2007. Cadmium uptake by *Ceriodaphnia dubia* from different exposures: relevance to body burden and toxicity. Environ. Toxicol. Chem. 26:470-477.

Sorokin, Y. I. 1999. Aquatic microbial ecology. Backhuys Publishers. Leiden.

Srere, P. A. 1969. Citrate synthase. Method. Enzymol. 13:3-11.

Steffens, J. C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. Annu. Rev. Plant Phys. 41:553-575.

Storrie, B., and E. A. Madden. 1990. Cytochrome c oxidase. Method. Enzymol. 182:214-215.

Thompson, P.-A., and P. Couture. 1991. Short- and long-term changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 21:135-144.

Voigt, J. 1988. The lithium-chloride-soluble cell-wall layers of *Chlamydomonas reinhardtii* contain several immunologically related glycoproteins. Planta 173:373-384.

Wallace, W. G., B.-G. Lee, and S. N. Luoma. 2003. Subcellular compartimentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). Mar. Ecol.-Prog. Ser. 249:183-97.

Wang, W. X., and P. S. Rainbow. 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. Environ. Chem. 3:395-99.

Wehr, J. D., and R.G. Shealth. 2003. Freshwater algae of North America: Ecology and classification. Academic Press. California.

Wong, M.-Y., K. R. Sauser, K.-T. Chung, T.-Y. Wong, and J.-K. Liu. 2001. Response of the ascorbate-peroxidase of selenastrum capricornutum to copper and lead in stormwaters. Environ. Monit. Assess. 67:361-378.

Wright, S. W., S. W. Jeffrey, and R. F. C. Mantoura. 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. *In* S. W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, eds. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Unesco. Paris.

Tables

Table 1: Sonication efficiency (as percentage of broken cells) for *P. subcapitata* and *C. reinhardtii* evaluated with a ¹⁴C assimilation method and a particle counter ($n=3 \pm$ standard deviation). Sonication conditions: 4 min, 22 W, pulse frequency=0.2 sec/sec.

a de la companya de l Companya de la companya de la company	Homogenization efficiency		
•	C. reinhardtii	P. subcapitata	
	%	%	
Carbon-14	97.2 ± 0.7	24.8 ± 5.0	
Particle counter	9 8 .0 ± 0.7	27.8 ± 1.8	

Table 2: Derivatization efficiencies of different peptides in relation to GSH (Eff_{GSH}) and to both GSH and γ -EC (Eff_{GSH; γ -EC}) (n=6 in two separate experiments ± standard deviation). Eff_{GSH} are expressed as percentages of the predicted SH fluorescence of GSH (equation 1). Eff_{GSH; γ -EC} are expressed as percentages of the predicted SH fluorescence of GSH and of γ -EC (equation 2).

	Eff _{GSH}	Eff _{GSH γ-EC}	
	%	%	
γ-ΕС	62.8 ± 3.2		
PC ₂	75.6 ± 0.9	92.9 ± 1.7	
PC ₃	62.1 ± 1.7	82.6 ± 1.3	
PC ₄	48.0 ± 2.0	66.5 ± 1.1	

Figures legend

Fig. 1: Differential centrifugation diagram for subcellular fractionation of homogenized algal samples. The procedure leads to three subcellular fractions: the pellet 1 (P1) for cellular debris, granules and nuclei; the second pellet (P2) for organelles and microsomes and the second supernatant (S2) for the cytosol.

Fig. 2: Particle size distributions obtained after cell disruption (white distribution) and of disrupted cells (black distribution) by sonication (time=4 min; power=22 W; pulse frequency=0.2 sec/sec) for *C. reinhardtii* (A) and *P. subcapitata* (B). The white distribution shows algal debris and intact cells. The black distribution shows the fraction of cells disrupted by sonication. Inset refers to panel A with reduced Y scale range.

Fig. 3: Fraction of the cytochrome c oxidase (CCO) (A) or of the citrate synthase (CS) (B) total enzymatic activity in three subcellular fractions of *C. reinhardtii*. The total enzyme activity is the sum of the activity in each fraction $(n=3 \pm \text{standard deviation})$. The assays were done after different sonication times (4 or 6 min) in two different homogenization matrices (MHSM-1 growth medium or sucrose buffer) using algae in end-exponential (3 days) and in stationary growth phase (5 days). CCO and CS are located in the inner membrane and matrix of mitochondria respectively. Ideally, all the CCO and CS enzyme activity should be found in the "organelles" fraction.

Fig. 4: Concentration of extracted GSH after different treatments for *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* (cell density= $(40 \pm 5) \times 10^6$ cell/mL; n=3 ± standard deviation). GSH was

extracted in HCl 0.1 M/DTPA 5 mM for 1 hour (A) combined with a 2 min heating at 90 °C (B). A sonication (power=22 W; pulse frequency=0.2 sec/sec) time of 15 sec (C), 30 sec (D), 45 sec (E), 90 sec (F) 360 sec (G) was added to heating and acidification.

Fig. 5: GSH extraction percentages in *C. reinhardtii* (A) or in *P. subcapitata* (B) after a simple, a double or a triple extraction at high and low cell densities ($n=3 \pm$ standard deviation). The percentages are based on total GSH extracted after three extractions.

Figures



Fig. 1







Fig. 3









SUPPORTING INFORMATION FOR

Subcellular metal fractionation and quantification of thiolated peptides in phytoplankton

M. Lavoie, J. Bernier, C. Fortin and P.G.C. Campbell

Two supplementary tables and four figures

Chemical composition of culture media

Table SI1: Total molar concentrations of constituents of culture medium (MHSM-1) and rinse solution (MHSM-R) derived from the HSM medium of Macfie et al. (1994). The carbonate concentration is fixed by equilibrium with the atmosphere. pH is maintained at 7.0 with HEPES (3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] propanesulfonic acid) and the free metal concentrations are buffered with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Targeted metal concentrations (Mn, Zn, Fe, Co) in MHSM-1 culture medium (calculated from the trace metal AAP stock solution) were measured by ICP-MS or ICP-AES, and the results indicated that impurities from salts did not contribute significantly to these four metal concentrations in the MHSM-1 culture medium. The Cu concentration in MHSM-1 medium was below the ICP-MS detection limit (1.04×10^{-9} M), but was greater or equal to 2.52×10^{-10} M (concentration calculated from the measured concentration in the AAP trace metal stock solution before dilution). Equilibrium speciation calculations showed that this uncertainty with respect to the Cu concentration did not appreciably affect the free Cd²⁺ concentrations.

Compounds*	HSM	MHSM-1	MHSM-R
NH4 ⁺	9.35 x 10 ⁻³	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴
Cl	9.49 x 10 ⁻³	5.98 x 10 ⁻⁶	<u> </u>
K ⁺	2.20 x 10 ⁻²	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³
PO ₄ ³⁻	1.37 x 10 ⁻²	1.37 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴
CO3 ²⁻	Atm	atm	Atm
NO ₃ -	· _	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³
SO4 ²⁻	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Mg ²⁺	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Ca ²⁺	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵
Na^+	1.02 x 10 ⁻⁴	1.02 x 10 ⁻⁴	1.02 x 10 ⁻⁴
BO ₃ ³⁻	3.01 x 10 ⁻⁶	3.01 x 10 ⁻⁶	
Mn ²⁺	2.10 x 10 ⁻⁶	2.10 x 10 ⁻⁶	
EDTA	8.06 x 10 ⁻⁷	8.06 x 10 ⁻⁷	
Fe ³⁺	5.92 x 10 ⁻⁷	5.92 x10 ⁻⁷	
MoO ₄ ²⁻	3.00 x 10 ⁻⁸	3.00 x 10 ⁻⁸	
Zn^{2+}	2.43 x 10 ⁻⁸	2.33 x 10 ⁻⁷	
Co ²⁺	1.09 x 10 ⁻⁸	1.09 x 10 ⁻⁸	
Cu ²⁺	7.04 x 10 ⁻¹¹	$>2.52 \times 10^{-10}$	
Cu ²⁺		<1.04 x 10 ⁻⁹	
HEPES		10 x 10 ⁻³	

Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green algae <u>*Chlamydomonas reinhardtii*</u>: The influences of the cell wall and pH. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 454-458

*Ionic charges indicate the redox state of the compounds

¹⁴C uptake and assessment of cell homogenization in *P. subcapitata*

Sonication disruption efficiency for *P. subcapitata* calculated with the ¹⁴C uptake or the particle counter method was not significantly different for all the ¹⁴C exposure times tested (Table 1) (p>0.05). The exposure time could have affected the disruption efficiency evaluation by the ¹⁴C technique due to the incorporation of ¹⁴C into membranes and cell walls debris (>2 μ m) retained on filters after homogenization which would contribute to the ¹⁴C intact cells signal. If this were the case, for shorter exposures the proportion of ¹⁴C incorporated into the fraction retained by the filters should decrease and the disruption efficiency should artificially increase. Given that we did not observe this, the *P. subcapitata* algae cells remaining after sonication thus seem to be intact.

Table SI2: Two different methods to estimate cell homogenization efficiency by sonication as percentages of broken cells (sonication conditions: 4 min, 22 W, pulse frequency=0.2 sec/sec) for *P. subcapitata* after different ¹⁴C exposure time (n=3 ± standard deviation).

	¹⁴ C	Particle counter
Exposure time	Homogenization efficiency	
Min		%
7	32.6 ± 6.8	19.2 ± 3.1
25	18.6 ± 11	20.1 ± 4.5
49	25.5 ± 4.3	22.3 ± 6.3
. 68	33.5 ± 13.3	22.3 ± 3.4

Microscopic examination



Fig. SI1: Microscopic picture (40X magnification) of *C. reinhardtii* (A) and *P. subcapitata* (B) culture samples after four minutes of sonication (sonication parameters: 22 W, pulse frequency=0.2 sec/sec).

GSH extraction efficiency



Fig. SI2: Linear regressions of GSH concentration (pmol/injection) as a function of cell density of the homogenate (10^6 cell/mL) for *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* (n=3 ± standard deviation).

Although linear regressions of extracted GSH per cell as a function of cell density (Fig. SI2) show slightly negative slopes, this decrease in the extracted GSH was not significant for *C*. *reinhardtii* (a=-0.3 \pm 0.4; p=0.5) or *P. subcapitata* (a=-0.1 \pm 0.06; p=0.1).



Fig. SI3: Linear regressions of extracted GSH concentration (amol/cell) as a function of cell density of homogenate (10^6 cell/mL) for *C. reinhardtii* and *P. subcapitata*. Errors bars in X and Y are standard deviation of three replicate cultures.

Derivatization efficiencies of thiolated peptides

Derivatization efficiency (Eff_{GSH}: Fig. A and Eff_{GSH; γ EC}: Fig. B) did not change significantly after dilutions of 10 to 40 times (p>0.05).



Fig. SI4: Derivatization efficiency (Eff_{GSH}) (A) or (Eff_{GSH; γ EC}) (B) obtained for γ -EC and PC₂. ₄ at different concentrations. Errors bars are the standard deviation of three replicates.

6. ARTICLE 2

Title: Metal detoxification strategies in two phytoplanktonic species: thiolated peptides synthesis and Cd sequestration in granules

Authors: Michel Lavoie, Séverine Le Faucheur, Claude Fortin and Peter G.C. Campbell

Address: Institut national de la recherche scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), 490 de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Canada.

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

Corresponding author: fortincl@ete.inrs.ca

Keywords: cadmium, algae, subcellular fractionation, thiolated-peptides, phytochelatin, detoxification, granules

Word count: 11529

To be submitted to Aquatic Toxicology

Abstract

The aim of this study was to evaluate whether intracellular detoxification mechanisms could explain, at least partially, the different sensitivity to Cd of two freshwater green algae, Chlamydomonas reinhardtii and Pseudokirchneriella subcapitata. Subcellular Cd distribution as well as metal-binding thiolated peptide synthesis were thus examined in both algae exposed to a range of free Cd²⁺ concentrations from 0.7 to 253 nM. Cadmium partitioning among five subcellular fractions (cellular debris, granules, organelles, heat-denaturable proteins – HDP and heat-stable proteins - HSP) was determined after differential centrifugation of algal homogenates. Thiolated-peptides, phytochelatins (PC_n) and precursors, were analyzed by HPLC with pre-column monobromobimane derivatization. Cadmium uptake per cell was greater for C. reinhardtii than for P. subcapitata by about two to four times, yet C. reinhardtii was more resistant to Cd with an EC₅₀ of 273 nM Cd²⁺ [244 – 333 nM Cd²⁺ CI_{95%}]) for <u>C</u>. reinhardtii compared to 127 nM Cd²⁺ [111 – 143 nM Cd²⁺ Cl_{95%}] for P. subcapitata. Although Cd burdens increased in the HDP and the organelles fractions when free Cd²⁺ concentration increased in the experimental media, their relative contribution to the total Cd burden remained constant or decreased, suggesting that partial protection of some metal sensitive sites was achieved by the initiation of cellular detoxification mechanisms. An increase in the proportion of Cd in the granules fraction was observed for C. reinhardtii between 6 and 43 nM Cd²⁺. Our results suggest the involvement of granules in protecting against the occurence of toxic effects in <u>C. reinhardtii</u>. Both species produced also high levels of PC_n, but with longer oligomers for <u>C. reinhardtii</u>. Unknown thiolated compounds (X_n), which were not canonical or hydroxymethyl PC_n, were also found in both algae but in much higher quantity for <u>C</u>. reinhardtii than P. subcapitata. This difference in thiol synthesis could also be involved in the
higher Cd resistance of <u>C. reinhardtii</u> with respect to <u>P. subcapitata</u>. This study demonstrates the importance of metal detoxification strategies in explaining the metal sensitivity of different algal species.

Résumé

Cette etude visait à évaluer si les mécanismes de détoxication intracellulaires pouvaient expliquer, au moins partiellement, les différences de sensibilité au Cd chez deux espèces d'algues vertes d'eau douce, Chlamydomonas reinhardtii et Pseudokirchneriella subcapitata. La distribution subcellulaire du Cd ainsi que la synthèse de peptides thiolés complexant les métaux furent étudiées chez ces deux espèces exposées à différentes concentrations de Cd²⁺ atteignant 253 nM. La distribution du Cd parmi les cinq fractions subcellulaires (débris cellulaires, granules, organelles, protéines thermosensibles – HDP et protéines thermostables – HSP) fut évaluée après centrifugation différentielle d'un homogénat d'algues. Les peptides thiolés dont les phytochélatines (PCn) et leur précurseur (GSH, γ -EC) furent analysés par HPLC avec dérivatisation pré-colonne au monobromobimane. Les quotas cellulaires de Cd étaient environ de 2 à 4 fois plus élevés chez C. reinhardtii que P. subcapitata. C. reinhardtii était plus résistante au Cd avec une IC₅₀ de 273 nM Cd²⁺ [IC_{95%} = 244 - 333 nM Cd²⁺] comparativement à 127 nM Cd^{2+} [IC_{95%} = 111 – 143 nM Cd^{2+}] chez *P. subcapitata*. Bien que la concentration de Cd augmente dans les fractions HDP et organelles lorsque les concentrations de Cd²⁺ augmentaient dans les milieux expérimentaux, leur contribution relative au Cd intracellulaire demeurait constante ou diminuait, suggérant qu'une protection partielle de certains sites sensibles au Cd était réalisée par la mise en branle de mécanismes de détoxication. Une augmentation significative de la proportion de Cd dans les granules fut observée chez *C. reinhardtii* exposé à des concentrations variant entre 6 et 43 nM Cd²⁺. Nos résultats suggèrent une implication des granules dans la protection contre les effets toxiques du Cd chez *C. reinhardtii*. Les deux espèces produisaient aussi de fortes concentrations de PCn, mais celles-ci étaient plus polymérisées chez *C. reinhardtii*. Des composés non identifiés (X_n) , n'étant pas des PCn canoniques ou des hydroxyméthyl-PCn, furent aussi notés chez les deux espèces d'algues, mais en beaucoup plus forte quantités chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata*. Ces différences dans la synthèse de thiols pourraient aussi contribuer à la plus forte résistance au Cd chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata*. Cette étude démontre l'importance des stratégies de détoxication aux métaux pour expliquer les sensibilités relatives aux métaux chez différentes espèces phytoplanctoniques.

1. Introduction

Phytoplankton organisms are exposed to many metals present in their environment. Through evolution, cells have developed ways to regulate the uptake of essential metals while minimizing the internalisation of non-essential ones that could interfere with cell metabolism (Perales-Vela et al., 2006). Algae also developed specific cellular responses to the potentially dangerous disturbance of metal homeostasis in order to maximize their survival (Mason and Jenkins, 1995). The protection against high levels of metals inside the cells can occur for example with the binding and precipitation of metals inside the cytoplasm and/or vacuoles with polyphosphate bodies (Nishikawa et al., 2003) and by the binding with polypeptides, mainly canonical phytochelatins (Gekeler et al., 1988).

Canonical phytochelatins (PC_n), characterized by the amino acid structure (γ -Glu-Cys)_nGly, where n ranges from 2 to 7, are synthesized enzymatically by phytochelatin

synthase (PCS) using glutathione as a substrate in the presence of many metals and metalloids (Rauser, 1995). They are believed to play an important role in metal detoxification and tolerance, especially for Cd which is the most efficient inducer of phytochelatin synthesis (Rauser, 1995). Other thiolated-compounds similar to fungal metallothioneins, presenting structures different from those of phytochelatins, can also be found in eukaryotic macroalgae as well as in cyanobacteria (Perales-Vela et al., 2006).

The relative importance of detoxification mechanisms has been observed to vary among species. Studies of metal subcellular distribution in <u>Tetraselmis suecica</u> (marine prasinophyceae) and <u>Skeletonema costatum</u> (marine diatomeae) showed that a high proportion of internal Cu (> 90 %) was incorporated in the insoluble subcellular fractions (organelles, membranes, cell walls, nuclei) and only a low proportion of metals was found associated with the cytosolic proteins (Perrein-Ettajani et al., 1999; Amiard-Triquet et al., 2006). In contrast, <u>Haslea ostrearia</u>, a marine diatom, accumulated a greater proportion of Cu in soluble form (> 75 %) than in the insoluble fraction (Amiard-Triquet et al., 2006). This inter-specific difference was also observed in phytochelatin production. Two marine algae, <u>Thalassiosira</u> <u>weissflogii</u> (coastal diatom) and <u>Heterocapsa pygmaea</u> (dinoflagellate), synthesized 6100 and 46 amol SH/cell of PC₂₋₄ respectively when exposed to 1 nM Cd²⁺ even though they accumulated 51 and 500 amol Cd/cell respectively (Ahner et al., 1995).

<u>Chlamydomonas reinhardtii</u> and <u>Pseudokirchneriella subcapitata</u> are two freshwater algae extensively used in ecotoxicological research. Intracellular detoxification mechanisms could play an important role in explaining their different metal resistance since <u>C. reinhardtii</u>, the more tolerant species to aqueous Cd exposure, also appears to be more tolerant to intracellular Cd and, thus, a better accumulator of aqueous Cd. However, the relative importance of different intracellular detoxification strategies in algal cells exposed to different free Cd^{2+} ion concentration is currently unknown. Only a few recent studies have tried to link subcellular metal distribution as well as metal-binding thiolated peptides synthesis to toxicity in marine phytoplankton (Ettajani et al., 2001; Miao and Wang, 2007).

To increase our understanding of different metal detoxification strategies in two algal species of contrasting Cd sensitivity, we followed the subcellular distribution of Cd in cellular pools potentially associated with toxicity (heat denatured proteins, organelles) or with detoxification (granules, heat stable proteins) in both <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u>. The synthesis of phytochelatins, their precursors and other possible thiolated compounds was also quantified. Based on the higher Cd resistance of <u>C. reinhardtii</u>, its relatively low ability to synthesize phytochelatins (Gekeler et al., 1988) and the documented presence of metal-binding polyphosphate granules in this species (Ruiz et al., 2001; Nishikawa et al., 2003; 2006), we expected an involvement of metal sequestration in granular compounds in this species. Moreover, given the known capacity of Cd to induce canonical phytochelatins, their ubiquity in phytoplankton and their importance in the total intracellular thiol pool, we hypothesized that these detoxifying peptides would be the major thiolated compounds synthesized.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Radio-labelled Cd (109 CdCl₂; 0.3 mCi/mL or 0.03 µCi/µmol) from Amersham (Oakville, ON, Canada) or an ICP-MS standard of CdNO₃ from SCP Science (Baie d'Urfé, QC, Canada) (1 mg/mL) were used to spike experimental media. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) (> 99 %), 3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]

propanesulfonic acid (HEPPS) (> 99 %), tris [2-carboxyethyl]-phosphine (TCEP) (> 98 %), sodium hydroxide (NaOH), methanesulfonic acid (MSA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) (> 99 %), acetonitrile (HPLC reagent grade), nitric acid (HNO₃) and hydrochloric acid (HCl) were obtained from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Monobromobimane (mBrB) (\geq 97 %) was purchased from Sigma Scientific (Oakville, ON, Canada) and trifluoroacetic acid (TFA) (99.7 %) from Supelco Scientific (Oakville, ON, Canada). Reduced glutathione (GSH) (99.5 %) and γ -glutamylcysteine (γ -EC) (88.0 %) were acquired from Fisher Scientific and Sigma Scientific, respectively. Phytochelatin standards that is, PC₂ (92.7 %), PC₃ (96.4 %) and PC₄ (93.1 %) were obtained from Anaspec Inc (San Jose, CA, USA). All solutions were prepared with ultrapure water (18 M Ω cm Q-H₂O, grade Nanopure). All flasks were washed with 15 % nitric acid, deionized water, and ultrapure water before use.

2.2 Test organisms and culture condition

The two unicellular green algal species, <u>Pseudokirchneriella subcapitata</u> (formerly known as <u>Selenastrum capricornutum</u>) (UTCC 37) and <u>Chlamydomonas reinhardtii</u> (UTCC 11, walled wild type), were obtained from the University of Toronto Culture Collection (UTCC, ON, Canada). Culture conditions were previously described elsewhere (Lavoie et al., submitted). Briefly, both species were grown separately in MHSM-1 culture media (Modified High Salt Medium; composition described in Table SI1) and kept in an incubation chamber (Conviron, CMP3023) at 20°C under a continuous light regime (100 μ mol/m²/s) with constant rotary agitation at 50 rpm. For exposure experiments, exponentially growing cells were collected by centrifugation and rinsed four times with MHSM-R (culture medium without added trace metals solution; Table SI1) prior to inoculation into experimental media at an initial cell density of 40 000 cells/mL. The rinsing step allowed us to remove any algal

exudates present in the original algae culture. Cellular densities were determined with an electronic particle counter (MultisizerTM 3 Coulter Counter[®], with a 70 μ m aperture; Beckman, Miami, Florida, USA) after appropriate dilution in Isoton III electrolyte.

2.3 Preparation of experimental media

Algae were exposed to various free cadmium ion concentrations from 0.7 to 221 nM (total Cd concentrations: 5.1 nM to 830 nM) for the study of the subcellular cadmium distribution and from 0.9 pM (background free Cd²⁺ concentration in control culture media) to 253 nM (total Cd concentrations: 0.07 to 878 nM) for the thiolated peptides assay. The concentration of the free metal ions in the medium was computed with the chemical speciation program MINEOL⁺ (Schecher and McAvov, 1992) with corrected equilibrium constants (NIST, 2004). Cadmium was added to the culture media by direct spiking of either a ¹⁰⁹Cd radio-isotope solution for the metal subcellular distribution or a CdNO₃ solution for the thiolated peptides assay. The experimental media contained the same major nutrients and essential metals as the culture media, with a pH buffered at 7.0 with NaOH 1 M. Total concentrations of EDTA were adjusted when target free Cd^{2+} concentrations were in the range of 0.7 to 43 nM in the experimental media in order to keep free essential metal concentrations $(Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Mn^{2+})$ constant. Indeed, in the presence of EDTA, the addition of Cd will inexorably lead to dissociation of other metal-EDTA complexes. We thus designed our experiments to keep the free EDTA⁴⁻ concentration constant. However, for Cd²⁺ concentrations higher than 43 nM, the total EDTA concentration was kept constant at 1.3 µM to minimize the uncertainty of the Cd speciation calculation. In effect, the free Cd²⁺ concentration was very sensitive to changes in the total Cd concentration (i.e. pipetting variability) when the total EDTA concentration was higher than 1.3 µM. With respect to the control, calculated free ion concentrations of essential metals did not increased by more than one order of magnitude at 253 nM Cd²⁺. Finally, the experimental media were left to equilibrate for 24 h before inoculation of the test algae. All experiments were performed in triplicate in polycarbonate ware (250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of growth medium) to minimize adsorptive losses to the container walls over the incubation period.

Total metal concentrations in experimental media were measured by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry, Thermo instrument model X7) before experiments. The detection limit for Cd was 0.3 pM.

2.4 <u>Relative yield</u>

After 3 days of Cd exposure for <u>C. reinhardtii</u> and 4 days for <u>P. subcapitata</u>, corresponding to the end of their exponential growth phase, algal cell densities of exposed cultures were measured in triplicate for each Cd concentration with a particle counter. The culture yield relative to control was calculated by dividing the mean final cell densities of the exposed algae by that of the control algae. Cd uptake, Cd subcellular distribution and thiol content in algae were then measured.

2.5 Cd uptake and its subcellular fractionation

A 200-mL portion of the algal cultures was harvested by centrifugation (15,000 g, 15 min, 4 °C) and resuspended in 10 mL EDTA (10^{-4} M) for 10 minutes to remove metals adsorbed to the surface of the algal cells. The algal suspensions were then centrifuged four times (15,000 g, 5 min, 4 °C) and resuspended each time in 10 mL MHSM-R except for the last centrifugation where the algae were resuspended in 2.5 mL MHSM-R. This procedure was designed to remove the excess of EDTA that could strongly affect metal speciation in the

subsequent manipulations. The final cell densities were about 10^8 cell/mL for <u>C. reinhardtii</u> and 2 x 10^8 cell/mL for <u>P. subcapitata</u> and were precisely determined with a particle counter. Two milliliters of the concentrated algal samples were transferred into a glass scintillation vial and analyzed with a gamma spectrometer (Wallac 1480) to assay the total intracellular Cd content. The term "metal uptake" used later in the text refers to the intracellular Cd content, and does not include metal adsorbed to the surface of the cells.

The 2-mL algal samples previously counted by gamma spectrometry were transferred into 7-ml polypropylene tubes and were homogenized on ice by sonication for 4 min (power = 22 W; pulse = 0.2 sec/sec) using a Branson 250 sonicator equipped with a micro-tip probe. The homogenates were then put in 3-mL ultracentrifugation tubes. A differential centrifugation procedure adapted from that of Giguère et al. (2006) and previously optimized for algal homogenates (Lavoie et al., submitted) (Fig. 1) was used to separate five sub-cellular compartments: (1) a debris fraction comprising nuclei, cell membranes, cell walls and, for <u>P</u>. <u>subcapitata</u>, intact cells, (2) a NaOH resistant or granule-like fraction, (3) a fraction combining organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum Golgi apparatus) (4) heat-stable proteins (HSP), including notably phytochelatins and GSH, and (6) heat-denaturable proteins (HDP) or enzymes.

The separation of the granule fraction from the pellet (P1, Fig. 1) was performed by resuspending the pellet P1 in 1 mL ultra-pure water and heating at 100 °C for 2 min, followed by the addition of 1 mL NaOH (1 N) and heating again at 70 °C for an hour. The solution was finally centrifuged at 10,000 g for 10 min at 20 °C to yield a resistant fraction in the final pellet (P2, Fig. 1). The separation of the heat-denaturable and heat-stable proteins was performed by heating the supernatant S4 (Fig. 1) at 80 °C for 10 min and cooling on ice for an hour, followed by centrifugation at 50,000 g for 10 min at 4 °C to separate the HSP fraction in

the final supernatant S5 and the HDP fraction in the pellet P5 (cf. Fig. 1). Total Cd content in each subcellular fraction was determined by gamma spectrometry using the specific activity (¹⁰⁹Cd/Cd total) calculated for each experiment and validated by ICP-MS measurements. Cd in subcellular fraction was expressed as a quantity of Cd (amol) per cell. The proportions of Cd in each fraction were obtained by dividing the Cd subcellular quota per cell with respect to total intracellular Cd.

The sonication treatment disrupted more than 98% of the <u>C. reinhardtii</u> cells whereas a large proportion of cells (about 74%) remained intact for <u>P. subcapitata</u> (Lavoie et al., submitted). The Cd signal from intact <u>P. subcapitata</u> cells pelleted in the debris/granules fraction (P1) was thus subtracted from the total pellet radioactivity in order to correct for the low homogenization efficiency obtained with this species. The Cd quotas within each of the fractions of <u>P. subcapitata</u> were then normalized with respect to the quantity of broken cells, taking into account error propagation. Cadmium burdens for the debris/granules fraction (data not shown) of *P. subcapitata* were not significantly different of 0, due to the relatively large error associated with the homogenization efficiency and the small amount of Cd likely to be found in this fraction. Subsequently, for this species, the total Cd burden used to calculate the proportion of Cd in the "organelles", the "HDP" and the "HSP" fractions did not include the Cd burden in the debris/granules.

Previous experiments (Lavoie *et al.*, submitted) also showed that 90% of the mitochondria in <u>C. reinhardtii</u> remained intact during the homogenization and ultracentrifugation steps. A high selectivity in the mitochondria separation was obtained with the differential centrifugations with > 90% of the mitochondria reporting to the organelles fraction (Lavoie et al., submitted). However, other large organelles like chloroplasts and

133

vacuoles are likely subject to considerable breakage during homogenization (Nagel et al., 1996).

Figure 1 near here

2.6 Thiol analysis

Thiol extraction and analysis methods have been previously described in detail elsewhere (Lavoie et al., submitted). Briefly, about 200 to 300 mL of algal culture were centrifuged and resuspended in 500 µL HCl/DTPA (0.1 M/ 5 mM) on ice to reach a concentration of 1.5 to 4.0 x 10⁸ cells/mL and heated at 90 °C for 2 min. This treatment extracted about 95% (C. reinhardtii) and 90% (P. subcapitata) of cellular thiols. Thiol and blank samples were derivatized with monobromobimane (mBrB) as a fluorescent tag prior to liquid chromatography analysis on a reversed-phase C-18 column. Retention times of the five thiols were verified with purified standards (Fig. SI1). Retention times of PC5 and PC6 were calculated from the linear relationship between the retention time of the standard peptides and log n, where n is the number of γ -Glu-Cys dipeptide pairs. A calibration curve of GSH peak area versus concentration was prepared for GSH quantification and calibration curves for the four other peptides were also constructed, taking into account their derivatization efficiencies. The derivatization efficiencies of PC_5 (36%) and PC_6 (28%) were estimated by using an exponential regression ($r^2 = 0.99$) between the derivatization efficiency and the number of thiol groups in PC_{2 to 4}. PC_n concentrations were expressed as a function of the number of thiol groups per molecule rather than the simple concentration of the molecule. Concentrations of unidentified thiolated peptides (Xn) were estimated using the GSH calibration curve without any adjustment for the derivatization efficiency, which were unknown for these compounds.

2.7 Statistics

Significant differences among the data were identified using one or two-way analyses of variance (ANOVA) followed by a Tukey pairwise comparison test. The Excel macro REGTOX (<u>http://eric.vindimian.9online.fr/</u>) was used to calculate EC_xs with the Hill approach. The 95% confidence intervals about the means were estimated by a bootstrap non parametric simulation. Preliminary conditions for these parametric statistical tests were always verified using raw and, if needed, transformed data using Taylor's transformation. Statistical analyses were performed using Systat software (Version 10.0) except for the linear regressions, which were plotted and tested statistically with Sigma-Plot software (Version 10.0). Results were considered to be significant if p < 0.05. Unless otherwise indicated, errors are given as \pm one standard deviation.

3. Results

3.1 Cd induced toxicity

<u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u> were exposed to a range of free Cd^{2+} concentrations (0.7 to 253 nM Cd^{2+}) and examined for their relative yield (Fig. 2). No effect on <u>C. reinhardtii</u> relative yield was observed up to 43 nM Cd^{2+} , whereas further increases in the Cd^{2+} concentration inhibited the relative yield (45% inhibition at 253 nM). The relative yield of <u>P. subcapitata</u> remained constant up to 6 nM Cd^{2+} and then decreased at higher Cd^{2+} concentrations (75% inhibition at 253 nM). Cadmium EC_xs were significantly different between the two species. Indeed, EC_{20} and EC_{50} values, were 2-3 times lower in <u>P. subcapitata</u> ($EC_{20} = 50$ nM Cd^{2+} [36 – 65 nM Cd^{2+} $Cl_{95\%}$]; $EC_{50} = 127$ nM Cd^{2+} [111 – 143 nM Cd^{2+}

CI_{95%}]) than in <u>C. reinhardtii</u> (EC₂₀ = 156 nM Cd²⁺ [128 – 176 nM Cd²⁺ CI_{95%}]; EC₅₀ = 273 nM Cd²⁺ [244 – 333 nM Cd²⁺ CI_{95%}]).

Figure 2 near here

3.2 Cd uptake and its subcellular distribution

Cadmium uptake per cell was significantly higher in <u>C. reinhardtii</u> than in <u>P.</u> <u>subcapitata</u> for all tested Cd²⁺ concentrations (p < 0.001) even though the total exposure time was 24 h shorter for <u>C. reinhardtii</u>. At 0.7 nM Cd²⁺, the intracellular Cd content was 1.3 ± 0.1 amol/cell in <u>C. reinhardtii</u> and 0.32 ± 0.01 amol/cell for <u>P. subcapitata</u>; cell quotas increased to 599 ± 55 amol/cell and 313 ± 32 amol/cell at 100 nM Cd²⁺ for <u>C. reinhardtii</u> and <u>P.</u> <u>subcapitata</u>, respectively. Cadmium uptake expressed per average cell surface was still significantly higher for <u>C. reinhardtii</u> (p = 0.01) which has a higher surface area per cell (Fig. S12). Intracellular cadmium normalized per surface area was 1.3 to 2.5 times greater for <u>C.</u> <u>reinhardtii</u> than for <u>P. subcapitata</u>.

Figure 3 near here

Cadmium quotas in each subcellular fraction and its relative distribution (in % of total intracellular Cd content) were determined in both algae at each studied Cd^{2+} concentrations (Fig. 4). Cd content in the debris and the granules fractions in <u>C. reinhardtii</u> increased up to 43 nM Cd²⁺. At higher concentrations, no further significant increase was observed. This pattern could also be observed with the relative Cd distribution (Fig. 4 C). Indeed, an increase of the

Cd proportion in the debris/granules fraction was noted for intermediate Cd^{2+} concentrations (6, 15 and 43 nM Cd^{2+}).

Cadmium concentrations in the organelles fractions increased linearly with Cd^{2+} concentrations in the experimental media for <u>C. reinhardtii</u> whereas a plateau was observed between 149 and 221 nM for <u>P. subcapitata</u>. With respect to the total Cd burden, Cd decreased from 44 ± 2% to 6 ± 1% and from 35 ± 3% to 5.3 ± 0.2% in <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u> respectively, between 0.7 and 221 nM Cd²⁺.

In the other studied subcellular fractions (HDP and HSP), Cd concentrations were significantly related to Cd^{2+} concentrations for <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u>. On one hand, the Cd proportion in the HDP fraction was around 5-10% for both species and did not change with varying Cd^{2+} concentrations in the experimental media. On the other hand, the contribution of the HSP fraction to the total Cd burden increased from $36 \pm 1\%$ to $67 \pm 1\%$ and from $50 \pm 4\%$ to $87 \pm 1\%$ for <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u> respectively as Cd^{2+} concentrations increased from 0.7 to 221 nM (Fig. 4 C, D). Most of the intracellular Cd (> 50%) was thus found in the HSP fraction when $[Cd^{2+}]$ reached toxic levels for each species.

Figure 4 near here

3.3 Thiolated peptides synthesis

Cadmium induced the synthesis of various thiolated compounds such as canonical phytochelatins, one of their precursors (γ -EC), as well as other non-identified thiolated peptides (X_n) in both algal species (Fig. 5). In control algae of both species, GSH, γ -EC, PC₂ and PC₃ along with some unknown thiols (X₁ for <u>C. reinhardtii</u>, and X₄ for both algae) were detected and quantified.

Figure 5 near here

3.3.1 Precursors

Cellular GSH and γ -EC content did not respond similarly to cadmium (Fig. 5 A, B). The increase in Cd²⁺ concentrations in the exposure media did not significantly affect the GSH concentration for both species, but significantly more GSH per cell was observed in <u>C</u>. reinhardtii (651 ± 54 amol/cell) than in <u>P. subcapitata</u> (384 ± 89 amol/cell) (p < 0.001). The synthesis of γ -EC was not significantly different between species and was stimulated from 1.8 ± 0.4 to 28 ± 7 amol/cell in <u>C. reinhardtii</u> and from 1.1 ± 0.2 to 25 ± 5 amol/cell in <u>P. subcapitata</u> when the Cd²⁺ concentration in the exposure media was increased from 3 x 10⁻⁴ to 75 nM Cd²⁺ and then slightly decreased at higher concentrations.

3.3.2 Phytochelatins

Basal levels of total phytochelatins per cell (PC₂ and PC₃) were about three times greater in <u>C. reinhardtii</u> (21 ± 3 amol SH/cell) than in <u>P. subcapitata</u> (6.7 ± 1.9 amol SH/cell) due largely to the significantly higher PC₂ concentration in the former (20 ± 2 amol SH/cell) than in the latter (4.8 ± 0.6 amol SH/cell) (p < 0.001) (Fig. 5 A, B). However, this difference disappeared when phytochelatin concentrations were expressed in terms of biovolume. The sum of the phytochelatins in control cultures was then 487 ± 80 and 758 ± 220 μ M SH/L biovolume for <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u> respectively, these values not being significantly different (Fig. SI3).

Cadmium exposure affected the distribution among oligomers in each species (Fig. 5 A, B). Firstly, for <u>C. reinhardtii</u>, PC_2 was the most important phytochelatin up to a Cd

concentration close to the EC₂₀, i.e. 149 nM Cd²⁺, with a concentration of 117 \pm 14 amol SH/cell. At 187 nM Cd²⁺, PC₄ (189 \pm 40 amol SH/cell) reached a concentration similar to that of PC₂ (119 \pm 27 amol SH/cell). Then, at 221 and 253 nM Cd²⁺, i.e., near the EC₅₀, PC₄ and PC₅ became the predominant oligomers with similar concentrations of 286 \pm 89 and 307 \pm 83 amol SH/cell, respectively. Secondly, for <u>P. subcapitata</u>, PC₂ was also the dominant oligomer for Cd²⁺ exposures up to 98 nM (86 \pm 10 amol SH/cell). At 149 nM Cd²⁺, a concentration close to the EC₅₀, equivalent PC₂, PC₃ and PC₄ contents were found, e.g. 135 \pm 36, 106 \pm 25, 87 \pm 32 amol SH/cell, respectively. Then, at 187 and 221 nM Cd²⁺, PC₃ became the most abundant PC reaching 186 \pm 10 and 296 \pm 12 amol SH/cell, respectively. Finally, at 253 nM Cd²⁺, PC₂₋₅ concentrations were not significantly different.

For Cd-exposed cells, the PC content was similar between species (Fig. 5 A, B). Indeed, the PC₂ concentration per cell was not significantly different between species for any of the Cd²⁺ exposure experiments. <u>P. subcapitata</u> synthesized more PC₃ per cell than <u>C.</u> <u>reinhardtii</u> for all Cd²⁺ exposure experiments (p < 0.001) except for the 0.7, 6 and 43 nM Cd²⁺ exposure where the concentration per cell of this oligomer was similar for both species. PC₄ concentrations were higher in <u>C. reinhardtii</u> exposed to 0.7 and 221 nM Cd²⁺ (p < 0.001), but they were no significant differences between species for all other Cd²⁺ concentrations. PC₅ concentrations were always higher in <u>C. reinhardtii</u> cells (p < 0.01). There was no significant difference in the PC₆ induction between species except for the 221 and 253 nM Cd²⁺ exposure where the induction was higher in <u>C. reinhardtii</u>.

Total PC contents (in amol SH/cell) were well correlated with Cd^{2+} concentrations in exposure media for <u>C. reinhardtii</u> ($r^2 = 0.85$) and <u>P. subcapitata</u> ($r^2 = 0.91$) (Fig. 6) and the slopes were not significantly different between species (Fig. 6). However, PC contents normalized to the mean cellular biovolume showed a greater phytochelatin synthesis per cell

biovolume in <u>P. subcapitata</u> (a = 0.18 ± S.E. 0.01 mmol SH/L biovolume/nM Cd²⁺) than in <u>C.</u> <u>reinhardtii</u> (a = 0.06 ± S.E. 0.01 mmol SH/L biovolume/nM Cd²⁺) (p < 0.001) (Fig. SI3). The strong induction of phytochelatins by Cd led to a three-fold increase in the total intracellular thiols compared to the control at the highest Cd exposure concentrations (221-253 nM Cd²⁺) in both species and the sum of PC₂₋₆ even exceeded GSH contents.

Figure 6 near here

3.3.3 Unidentified peptides synthesis

Unidentified peptides X_n accounted for a large part of the intracellular thiols in <u>C</u>. reinhardtii exposed to varying Cd²⁺ concentration, reaching levels similar to the phytochelatin oligomers (from 20 to 50 % of the total SH concentration and from 30 to 70 % of the PC_n concentration) (Fig. 5 C, D). X₄ and X₅ reached the highest estimated concentrations of these unknown thiols with 236 ± 40 and 110 ± 22 amol SH/cell, respectively in <u>C. reinhardtii</u> cells exposed to 221 nM Cd²⁺. However, in <u>P. subcapitata</u>, X_n peptides were only weakly induced upon exposure to Cd since the highest concentrations of these thiols measured for the 253 nM Cd²⁺ exposure were 9.8 ± 3.1 and 9.4 ± 2.2 amol SH/cell, for the X₃ and X₄ peptide, respectively (Fig. 5 C, D).

Six unknown thiols were measured in <u>C. reinhardtii</u> (X₁ to X₆) whereas only three of them (X₂, X₃ and X₄) were quantifiable in <u>P. subcapitata</u> with concentrations about 25 times lower (Fig. 5 C, D). Indeed, the slope of the regression of the total X_n concentrations per cell versus Cd²⁺ concentrations was $1.8 \pm$ S.E. 0.2 amol SH/cell/nM Cd²⁺ in <u>C. reinhardtii</u> and 0.06 \pm S.E. 0.02 amol SH/cell/nM Cd²⁺ in <u>P. subcapitata</u> (p < 0.001) (Fig. 6). Finally, the sum of these X_n peptides was well correlated with Cd^{2+} concentrations in the exposure media for <u>C</u>. reinhardtii ($r^2 = 0.95$) (Fig. 6).

3.4 Ratios of thiols to intracellular cadmium or to cadmium in the HSP fraction

The ratios of thiolated peptides to intracellular Cd content decreased with increasing Cd^{2+} exposure concentrations in both species (Fig. 7 A, B). The PC_n:Cd_{intr} or PC_n+X_n:Cd_{intr} ratios were generally higher in <u>P. subcapitata</u> than in <u>C. reinhardtii</u> for $[Cd^{2+}] < 221$ nM. These ratios obtained in both species exposed to the highest Cd^{2+} concentration tend toward ~ 2. Indeed, the PC_n:Cd_{intr} ratios at 221 nM Cd²⁺ were 1.6 ± 0.1 and 2.0 ± 0.2 amol SH/amol Cd and the PC_n+X_n:Cd_{intr} ratios were 2.4 ± 0.4 and 2.0 ± 0.2 amol SH/amol Cd for <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u>, respectively.

A similar trend was found for the ratio of thiols to Cd measured in the HSP fraction as a function of the increasing Cd²⁺ exposure concentration (Fig. 7 C, D). The PC_n:Cd_{HSP} ratios were also higher in <u>P. subcapitata</u> than <u>C. reinhardtii</u> for $[Cd^{2+}] < 221$ nM (Fig. 7 C), but the difference decreased when X_n peptides were included due to the much stronger presence of these peptides in <u>C. reinhardtii</u> (Fig. 7 D). The PC_n+X_n:Cd_{HSP} ratios tend to ~ 4 in both species exposed to high Cd²⁺ concentrations; at 221 nM Cd²⁺, the ratio was 3.7 ± 0.6 for <u>C. reinhardtii</u> and 3.7 ± 0.5 for P. subcapitata (Fig. 7 D).

Figure 7 near here

4. Discussion

4.1 Cadmium uptake and toxicity

The relationship between metal uptake and free Cd^{2+} concentrations in both species deviated slightly from linearity over the entire Cd^{2+} range used in this study (Fig. 3). For low metal concentrations, i.e. well below the threshold for saturation of the membrane bound metal transporter, linear relationships would be expected from the free ion activity model (FIAM) or its derivative the biotic ligand model (BLM) (Campbell et al., 2002). Production of metalbinding exudates over the long-term exposures to Cd, as well as the high sensitivity of $[Cd^{2+}]$ the EDTA concentration, could explain the deviation from linearity. Cadmium to complexation by exudates would be more important at low Cd concentrations (where the exudate:Cd ratio is high) than at high concentrations. In addition, algae may produce fewer exudates at high Cd²⁺ concentrations due to growth inhibition. Both phenomena would result in more important decreases in $[Cd^{2+}]$ at low total Cd concentrations than for high total Cd. Such a non-linear shift in true $[Cd^{2+}]$ would result in an upward curvature in observed Cd uptake (as seen in Fig. 3) since $[Cd^{2+}]$ are calculated without considering the possible presence of Cd-binding exudates. Also, EDTA concentrations were not measured and any volumetric errors would result in greater relative changes in Cd speciation as the total Cd concentrations decrease.

<u>Chlamydomonas reinhardtii</u> accumulated more Cd than <u>P. subcapitata</u> both on a per cell basis and when uptake is normalized per cell surface area. Taking into account the different exposure times when expressing Cd bioaccumulation would not have changed this trend. Indeed, an increase of the exposure time from 72 to 96 h for <u>C. reinhardtii</u> would have led to either a greater Cd uptake if steady state was not achieved after 72 h, or to an unchanged metal uptake if steady state had been achieved. The differences in Cd accumulation between the two species could be due to higher Cd uptake rates in <u>C. reinhardtii</u> (that might be mediated by different metabolic requirements for essential metals transport by the same

membrane transporter than Cd) or more efficient elimination of Cd from the cells of \underline{P} . subcapitata.

The species more tolerant to aqueous Cd exposure (i.e. <u>C. reinhardtii</u>) was also the more tolerant to intracellular Cd burdens. This result suggests that differences in intracellular detoxification are likely to be more important than exclusion or excretion mechanisms in determining the relative sensitivities of these two freshwater phytoplankton species to Cd stress. Studies with different marine phytoplanktonic species support this observation as a significant positive correlation between EC_{50} ([Cd²⁺] resulting in 50% growth inhibition) and QCd₅₀ (intracellular Cd quotas resulting in 50% growth inhibition) were obtained using many algae species belonging to the <u>Thalassiosira</u> genus (Tortell and Price, 1996) as well as to several other taxa (Payne and Price, 1999).

4.2 Differential centrifugation - limitations

Various potential artefacts can complicate the interpretation of centrifugal fractionation results, such as the breakage or clumping of particles, the aggregation of organelles, the leakage of soluble constituents from organelles and the overlap among centrifugation fractions (De Duve, 1975; Giguère et al., 2006; Graham, 2001; Wallace et al., 2003). Subcellular fractionation protocols involving differential centrifugation have been widely used in ecotoxicology studies dealing with animal cells (Wallace et al., 2003), but only few recent studies have attempted to use this approach for unicellular algae (Perrein-Ettajani et al., 1999; Miao and Wang, 2007). Phytoplankton cells, unlike of animal cells, may contain relatively large vacuoles and chloroplasts that could potentially be disrupted during forceful homogenization. The metal content of these organelles is thus difficult to quantify and leakage could contribute to increase Cd burdens in the HDP and HSP fractions. Given the observed

green color of the organelles fraction, a large amount of chlorophyll <u>a</u> presumably pelleted with the organelles, but some contamination of the debris fraction was also observed. The Cd burden in the organelles fraction could thus be underestimated and must be interpreted with caution.

Another possible mis-interpretation could come from the debris fraction composed presumably by dense algal material such as nuclei, membranes and cell walls. Since Cd is known to accumulate in the nuclei of macroalgae (McLean and Williamson, 1977; Lignell et al., 1982), the interpretation of the debris fraction must also be done with caution since Cd could be bound to different metal-sensitive sites in the same fraction.

4.3 Intracellular cadmium partitioning: link between subcellular Cd distribution and toxicity

Once the metal crosses the cell wall and the plasma membrane and reaches the cytosol, it will partition among the various cytosolic ligands, with potentially deleterious effects. Cadmium-induced toxicity could thus be linked to the increase of Cd in structures with essential metabolic roles like mitochondria (organelles fraction), nuclei (debris fraction) and enzymes (HDP fraction). Among the organelles, mitochondria are important targets of the cadmium-associated cytotoxicity in freshwater green algae (~ $30 - 90 \mu$ M Cd total, speciation undefined) (Silverberg, 1976). There are many electron microscopy studies showing rapid deterioration of mitochondria in algae after Cd exposure (~ $10 - 90 \mu$ M Cd total, speciation undefined) (Soyer and Prevot, 1981; Wong et al., 1994). In the HDP fraction, Cd can compete effectively with Zn and displace this essential cellular metal from sulfhydryl groups of enzymes, altering their functions and inducing toxic effects (Deckert, 2005). In our study, the Cd burden increased in the organelles and HDP fractions of <u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u> as Cd²⁺ concentrations increased in the exposure medium (Fig. 4 A, B). However their relative

contribution to the total Cd burden remained constant or decreased (Fig. 4 C, D), suggesting that a partial protection of some metal-sensitive sites was achieved by the initiation of cellular detoxification mechanisms.

One Cd detoxification strategy could be linked to the granular fraction (insoluble compounds resistant to NaOH), which was especially noticeable for C. reinhardtii. Indeed, a significant increase in the proportion of Cd in the granules fraction of C. reinhardtii was observed between 6 and 43 nM Cd²⁺ (subtoxic levels), whereas at higher Cd²⁺ concentrations, this proportion decreased sharply. The decrease did not seem to be due to a simple transport and storage of Cd-granule complexes in some organelles, as we measured very low amounts of Cd bound to NaOH-resistant compounds (< 1%) in the organelles fraction of C. reinhardtii cells exposed to 149 and 221 nM Cd²⁺(data not shown). This decrease could thus be simply linked to the large increase in the proportion of Cd in the HSP fraction in algae exposed at 149-221 nM Cd²⁺; the absolute Cd concentrations increased in both fractions but more considerably in the HSP fraction along Cd^{2+} gradient. Transport of Cd-granule complexes into some organelles such as vacuoles followed by the extrusion out of the cells could also occur to some extent, even though the absolute Cd concentration in the granules fraction increased with Cd²⁺ concentrations. However, further studies are needed to test this latter hypothesis. Numerous studies have reported the existence of dense bodies or granules composed of linear chains of polyphosphates (poly-P) in the cytoplasm and in vacuoles of many algae species (Visviki and Rachlin, 1992, 1994 and the references cited therein; Nishikawa et al., 2006) which could participate in metal detoxification due to the high affinity of phosphate to hard cations and the low solubility of metal-phosphate complexes. However, even though Cd was detected in these poly-P granules in many algal species, the stability of these complexes is not well known. This soft metal has a low affinity for phosphates and may be bound to other ligands.

Another well-recognized detoxification mechanism involves the induction of thiolated peptides (phytochelatins) synthesis. The effectiveness of heat-stable proteins and peptides in binding intracellular Cd could be measured by following Cd burden in the HSP fraction. Cadmium in the HSP fraction increased with Cd^{2+} concentrations, reaching high proportions of intracellular Cd (approximately 70-80%) when both species were exposed to high Cd²⁺ concentration (149 or 221 nM Cd²⁺) (Fig. 4 C, D). This result indicates that metal-binding heat-stable peptides such as phytochelatins clearly can play an important role in metal detoxification in both species. Our results are in agreement with the study of Howe and Merchant (1992) who reported sequestration of up to 70% of cytosolic Cd by phytochelatins in C. reinhardtii (wild-type strain) exposed to a non-lethal total Cd concentration of 120 µM for 18 h (unknown metal speciation). Recent studies of subcellular distribution of Cd in wild animals using differential centrifugation have also reported a partial detoxification, involving the induction of metallothionein-like peptides and an increase in the Cd-HSP fraction. Reports on fishes (Giguère et al., 2006) and bivalves collected along a Cd concentration gradient (Bonneris et al., 2005) have shown a decrease in the proportion of Cd in the HDP fraction, concomitant with an increase in the HSP fraction as total tissue Cd concentrations increased.

4.4 Synthesis of phytochelatin precursors

Despite the synthesis of phytochelatins and its precursor γ -EC, GSH concentrations were constant over the studied Cd range (Fig. 5 A, B). In earlier studies, glutathione concentrations proved to be tightly regulated by marine algae (Rijstenbil and Wijnholds, 1996; Ahner et al., 2002) and freshwater algae (Le Faucheur et al., 2005) that were exposed to Cd. Cytosolic GSH concentrations in <u>C. reinhardtii</u> (14 mM) and <u>P. subcapitata</u> (40 mM) were higher than in other phytoplankton species investigated in the literature. For example, GSH concentrations in four marine algae species varied from 0.1 to 3.3 mM (Rijstenbil and Wijnholds, 1996) and were around 1 mM in <u>Scenedesmus vacuolatus</u> (Le Faucheur et al., 2005). In contrast to GSH, γ -EC was slightly induced by Cd up to 187 nM Cd²⁺ concentration and then its concentration decreased. A similar pattern was previously observed in <u>Scenedesmus vacuolatus</u> (Le Faucheur et al. 2005) and some marine algae (Ahner et al., 2002) exposed to Cd, but in these studies γ -EC concentrations levelled off (instead of decreasing) at high Cd concentrations. The increase in γ -EC concentration at intermediate Cd²⁺ concentrations is consistent with other published data in which transcription of the γ glutamylcysteine synthetase gene was stimulated by Cd²⁺ in <u>Arabidopsis</u>. This enzyme catalyzes γ -EC formation from glutamic acid and cysteine (Xiang and Olivier, 1998).

4.5 Oligomers of phytochelatins

The relative importance of the different PC_n oligomers was highly dependant of Cd^{2+} exposure and generally differed between species (Fig. 5 A, B). As Cd was added to experimental media, both species produced increased quantities of larger phytochelatins to detoxify Cd. In fact, for concentrations close to the EC_{50} (221 and 253 nM Cd²⁺), PC₄ and PC₅ were the predominant oligomers in <u>C. reinhardtii</u> whereas near the EC_{50} (149 nM Cd²⁺) for <u>P.</u> subcapitata, PC₃ was the most important. Thus, <u>C. reinhardtii</u> synthesized longer phytochelatin oligomers than <u>P. subcapitata</u> at a similar growth inhibition level. Moreover, at a high exposure concentration (221 nM Cd²⁺), PC₄ and PC₅ were the most important oligomers in <u>C. reinhardtii</u>, but in <u>P. subcapitata</u> detoxification with peptides occurred mostly with PC₃. Since stability of Cd-phytochelatin complexes increases when increasing phytochelatin chain lengths

(Kneer and Zenk, 1997) and since peptide length could play an important role in metal tolerance (Torres et al., 1997; Pérez-Rama et al., 2001), more polymerized oligomers in <u>C</u>. <u>reinhardtii</u> could explain, at least partially, the higher Cd resistance of this species.

4.6 Unidentified thiolated peptides

Both species synthesized many unidentified thiolated compounds (X_n) (Fig. 5 C, D). These thiolated compounds did not correspond to hydroxymethyl-PCn (Hm-PCn or [(Glu-Cys)_n-Ser]), as retention times of Hm-PC₂₋₃ by HPLC did not fit with the ones of unidentified peptide peaks, which are synthesized by several species of the Poacea family (Klapheck et al., 1992). Much evidence indicates that phytochelatin synthesis can proceed by a dipeptidyl transfer, i.e. transfer of γ -Glu-Cys units to polymerize phytochelatins, generating only an amino acid (Gly) as by-product. However, another model has also been proposed, by which synthesis of phytochelatins proceeds by a tripeptidyl transpeptidation, i.e. transfer of γ -Glu-Cys-Gly units to generate PC_{n+1} and produced des(Gly)PCs or $[(\gamma-Glu-Cys)_n]$ as a by-product (Rea et al., 2004). Thus, it is possible that some of the X_n peptides could be simply des(Gly)PCs. In addition to canonical PCs and hydroxymethyl-PCs, homo-PCs [iso(PC)(β -Ala)] and iso-PCs [iso-PC(Glu)] have also been discovered in plants (Rea et al., 2004). We cannot exclude the possibility that some of the X_n peptides could belong to one of these two classes. In fact, in vitro experiments using a phytochelatin synthase (PCS) isolated from <u>Arabidopsis</u> (AtPCS1) has shown that the PCS could be poorly specific with respect to its substrates and its activators (Oven et al., 2002). This low specificity of the PCS could facilitate the synthesis of many phytochelatin classes, provided that different substrates are available in the cell. Regardless of the structure of these peptides, the strong synthesis of peptides X_n in <u>C</u>. <u>reinhardtii</u> exposed to Cd could be linked to its higher resistance to this metal, given that <u>P</u>. <u>subcapitata</u> synthesized only relatively little of these peptides.

4.7 Thiolated-peptides induction and Cd binding stoichiometry to thiol groups

The significant correlations between total synthesized phytochelatins and the Cd²⁺ concentration in culture media support the idea that phytochelatins are important polypeptides in metal detoxification (Fig. 6). Cadmium has been shown to be the most effective inducer of phytochelatin synthesis in numerous phytoplanktonic species and this correlation between Cd and phytochelatins have already been observed (Gekeler et al., 1988; Ahner and Morel, 1995; Morelli and Scarano, 2001). However the amount of phytochelatins synthesized after a Cd exposure varies widely among species and cannot be explained only by the Cd uptake (Ahner et al., 1995). Our results also suggest different phytochelatin induction by Cd among species as <u>P. subcapitata</u> synthesized more PC_{2-6} per intracellular Cd or per Cd_{HSP} than did <u>C</u>. reinhardtii for all Cd²⁺ concentrations, except for the 221 nM Cd²⁺ concentration, even though the basal phytochelatin level in C. reinhardtii was three times higher than in P. subcapitata (Fig. 7 A, C). Ratios of total thiolated peptides (phytochelatins and unknown peptides) to intracellular Cd or Cd_{HSP} were also higher in P. subcapitata for the 6, 43 and 149 nM Cd²⁺ exposures than in C. reinhardtii (Fig. 7 B, D). The ratio at 0.7 nM Cd²⁺ exposure could have been affected by the higher thiolated peptides basal level in C. reinhardtii than in P. subcapitata. It is thus likely that the ratio of induced thiolated peptides to internal Cd would have been higher in <u>P. subcapitata</u> than in <u>C. reinhardtii</u> at this low concentration. Gekeler et al. (1988) also found that C. reinhardtii was a relatively low phytochelatin producer species when exposed to Cd.

The higher sensitivity of <u>P. subcapitata</u> to Cd combined with its greater ability to synthesize phytochelatins, especially at lower Cd concentrations, seems paradoxical at first glance. However, higher phytochelatin induction and higher PC-SH:Cd ratios are not necessarily linked to higher metal resistance in algae, since phytochelatins can form high molecular weight (HMW) complexes, i.e.. PC-Cd complexes with incorporated sulphide, typically characterized by a lower SH to Cd ratio (Kneer and Zenk, 1997; Hu et al., 2001). These HMW complexes could be formed from LMW complexes (PC-Cd without sulphide) and could be used to store final forms of Cd for detoxification. Phytochelatins that were no longer necessary to bind Cd could then be recycled or degraded in the cells. Formation of these HMW complexes could in fact play a role in metal resistance among species and the occurrence of these HMW complexes in algae could be more important than the simple ability to synthesize phytochelatins (Hu et al., 2001).

The significantly higher concentrations of thiolated compounds per internal Cd (at 6 and 43 nM Cd²⁺) and per HSP-bound Cd (at 6, 43 and 149 nM Cd²⁺) in <u>P. subcapitata</u> than in <u>C. reinhardtii</u> agrees well with the higher intracellular Cd proportion found in the HSP fraction of <u>P. subcapitata</u> for $[Cd^{2+}]$ (Fig. 7). This greater phytochelatin induction in <u>P. subcapitata</u> could be driven by the elevated substrate concentration (higher GSH concentration per algal volume in <u>P. subcapitata</u>). On the other hand, the lower induction of thiolated peptides in <u>C. reinhardtii</u> exposed to $[Cd^{2+}] \leq 43$ nM could be related, at least partially, to the increase in the proportion of intracellular Cd present in the granules fraction at these concentrations. However, it is also possible that the Cd found in the HSP fractions, and thus the PC to Cd_{HSP} ratios were underestimated for <u>C. reinhardtii</u> due to a possible greater transport of Cd-phytochelatin complex in organelles. Thus, the comparison of Cd proportions in the HSP fraction between species must be done cautiously.

Even though both species responded differently to Cd, they appeared to regulate phytochelatin or total thiolated peptide production to internal Cd and HSP-bound Cd at fixed stoichiometric ratios of 2:1 and 4:1 respectively at high Cd concentrations. Similarly, ratios of PC to internal Cd tend toward a constant value of 2:1 in many marine algae exposed to increasing Cd concentrations (Ahner et al., 1995). The 4:1 ratio obtained at high Cd concentrations could be an estimate of the Cd binding stoichiometry to thiol groups since Cd is expected to be predominantly bound to phytochelatins or other induced thiolated peptides. Complexation of micronutrients (Cu, Zn, Co) by SH groups can be neglected as Cd is present in excess in the cells. Moreover, phytochelatins and maybe the other thiolated peptides produced mainly by C. reinhardtii have a far greater affinity to bind Cd than do smaller peptides such as GSH. However, the transport of thiolated peptides in some organelles could have affected the metal binding stoichiometry to thiol groups obtained in this study. In fact, total intracellular thiolated peptides measured by HPLC and used to calculate these ratios could be present not only in the HSP fraction but also in some intact organelles. Indeed, some studies have shown phytochelatin transport into the chloroplast (Nagel et al., 1996; Mendoza-Cozatl et al., 2002) and maybe into granular dense bodies rich in sulphur and cadmium and observed in vacuoles as well as in the cytosol (Nassiri et al., 1997). Thus the peptide concentration inferred to be exclusive to the HSP fraction would be overestimated (depending on the level of organelle damage for each species). This result remains an estimate and must be interpreted with caution.

It is thus possible that the Cd binding stoichiometry to thiol groups approaches a tetrahedral coordination (4 SH : 1 Cd) but further studies would be needed to confirm this result. Nevertheless, a study of Cd-phytochelatin complexes <u>in vitro</u> by EXAFS (extended X-ray absorption fine structure) proposed a model in which four SH groups bind one Cd atom in

151

a phytochelatin molecule (Strasdeit et al., 1991). However, PC-SH to Cd ratios measured in Cd-phytochelatins complexes isolated from plant cell culture of <u>Rauvolfia serpentina</u> are smaller than four. In fact, they varied from 3:1 to 1.9:1 for the LMW and the HMW complexes respectively (Kneer and Zenk, 1997).

5. Conclusion

<u>C. reinhardtii</u> and <u>P. subcapitata</u> respond to Cd stress with different detoxification strategies. Metal sequestration into granular compounds and the synthesis of thiolated-peptides could explain, at least partially, the difference in Cd tolerance between these species. Both strategies were not used to the same extent by both algae. <u>C. reinhardtii</u> mainly detoxified nontoxic levels of Cd by binding it into granule-like compounds, whereas at higher Cd concentrations, when growth was inhibited, Cd was predominantly found in the HSP fractions which contain phytochelatins and some unknown thiolated compounds (X_n). In contrast, <u>P.</u> <u>subcapitata</u> used the HSP fractions along the Cd gradient, with the synthesis of smalleroligomer phytochelatins and lower unknown thiol polymers than C. reinhardtii.

This study brings further knowledge on the relationship between metal sensitivity and detoxification strategies in algae. We have demonstrated that metal detoxification mechanisms can vary appreciably between species. These strategies are important to study since they help explain interspecific differences in metal sensitivity.

152

Acknowledgements

We acknowledge the technical assistance provided by L. Rancourt, S. Duval, M. Bordeleau and R. Rodrigue as well as J. Bernier for ICP-MS measurements and the optimisation of the subcellular fractionation protocol. This work was supported by the Metals in the Human Environment (MITHE) Strategic Network and by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Grant programme. ML and SLF held scholarships from the Fonds Québecois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and from the Swiss National Fund respectively. PGCC is supported by the Canada Research Chair programme.

References

- Ahner, B.A., Kong, S., Morel, F.M.M., 1995. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. Limnol. Oceanogr. 40, 649-657.
- Ahner, B.A., Morel, F.M.M., 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. Limnol. Oceanogr. 40, 658-665.
- Ahner, B.A., Wei, L.P., Oleson, J.R., Ogura, N., 2002. Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. Mar. Ecol. Prog. Ser. 232, 93-103.
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Joux, L., Perrein-Ettajani, H., 2006. Significance of physicochemical forms of storage in microalgae in predicting copper transfer to filterfeeding oysters (<u>Crassostrea gigas</u>). Environ. Toxicol. 21, 1-7.
- Bonneris, E., Perceval, O., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. Environ. Pollut. 135, 195-208.
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton – applicability of the biotic ligand model. Comp. Biochem. Phys. C 133, 189-206.
- Deckert, 2005. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? BioMetals 18, 475-481.

De Duve, C., 1975. Exploring cells with a centrifuge. Science 189, 186-194.

- Ettajani, H., Berthet, B., Amiard, J.C., Chevolot, L., 2001. Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters: contribution to the assessment of trophic transfer. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 209-221.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150, 197-202.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (<u>Perca flavescens</u>) sampled along a polymetallic gradient. Aquat. Toxicol. 77, 178-189.

Graham, J., 2001. Biological centrifugation. Bios scientific publishers limited, Oxford, UK

- Howe, G., Merchant, S., 1992. Heavy metal-activated synthesis of peptides in <u>Chlamydomonas reinhardtii</u>. Plant. Physiol. 98, 127-136.
- Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J. and Zimmermann, H., 1992. Gammaglutamylcysteinylserine-a new homolog of glutathione in plants of the family <u>Poacea</u>. Bot. Acta 105, 174-179.
- Kneer, R. and Zenk, M.H., 1997. The formation of Cd-Phytochelatin complexes in plant cell cultures. Phytochem. 44, 69-74.
- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., Campbell, P.G.C. Subcellular metal fractionation and quantification of thiolated peptides in phytoplankton. Submitted to Limnol. Oceanogr. Methods on 5 Oct. 2007.
- Le Faucheur, S., Behra, R., Sigg, L., 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation and algal sensitivity to free cadmium ion in <u>Scenedesmus vacuolatus</u>. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1731-1737.
- Lignell, A., Roomans, G.M., Pedersen, M., 1982. Localization of cadmium in <u>Fucus</u> vesiculosus by X-ray microanalysis. Z Pflanzenphysiol. Bd 105, 103-109.

- Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. In: Metal speciation and bioavailability in aquatic systems; Tessier, A., Turner, D.R. (Eds), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 479-608.
- McLean, M.W., Williamson, F.B., 1977. Cadmium accumulation by the marine red alga <u>Porphyra umbilicalis</u>. Physiol. Plant. 41, 268-272.
- Mendoza-Cozatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., Moreno-Sanchez, R., 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of Euglena gracilis. Physiol. Plant. 115, 276-283.
- 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, 1777-1782.
- Morelli, E., Scarano, G., 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom <u>Phaeodactylum tricornutum</u>. Mar. Environ. Res. 52, 383-395.
- Nagel, K., Adelmeier, U., Voigt, J., 1996. Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. J. Plant. Physiol. 149, 86-90.
- Nassiri, Y., Mansot, J.L., Wery, J., Ginsburger-Vogel, T., Amiard, J.C., 1997. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom <u>Skeletonema costatum</u>. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 147-155.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in <u>Chlamydomonas acidophila</u> (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. FEMS Microb. Ecol. 44, 253-259.
- Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M., Tominaga, N.
 2006. Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga <u>Chlamydomonas acidophila</u> KT1 (Chlorophyta) under phosphate stress. Plant Sci. 170, 307-313.

- NIST, 2004. NIST Critical stability constants of metal complexes database. In: Martell, A.E., Smith, R.M. and Motekaitis, R. J. (Eds). National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Database 46, Gaithersburg, MD.
- Oven, M., Page, J.E., Zenk, M.H., Kutchan, T.M., 2002. Molecular Characterization of the Homo-phytochelatin Synthase of Soybean <u>Glycine max</u>. J. Biol. Chem. 277, 4747-4754.
- Payne, C.D., Price, N.M., 1999. Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. J. Phycol. 35, 293-302.
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O., 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 64, 1-10.
- Pérez-Rama, M., López, C.H., Alonso, J. A., Vaamonde, E.T., 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga <u>Tetraselmis</u> <u>suecica (Kylin)</u> Butch. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2061-2066.
- Perrein-Ettajani, H., Amiard, J.C., Haure, J., Renaud, C., 1999. Effets des métaux (Ag, Cd, Cu) sur la composition biochimique et compartimentation de ces métaux chez deux microalgues <u>Skeletonema costatum</u> et <u>Tetraselmis suecica</u>. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 1757-1765.
- Rauser WE. 1995. Phytochelatins and related peptides Structure, biosynthesis, and function. Plant Physiol. 109, 1141-1149.
- Rea, P. A., Vatamaniuk, O. K., Rigden, D. J., 2004. Update on phytochelatin synthase. Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. Plant. Physiol. 136, 2463-2474.
- Rijstenbil, J.W., Wijnholds, J.A., 1996. HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms: Pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. Mar. Biol. 127, 45-54.

- Ruiz, F.A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govingjee, Docampo, R., 2001. The polyphosphate bodies of <u>Chlamydomonas reinhardtii</u> possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. J. Biol. Chem. 276, 46196-46203.
- Schecher, W.D., McAvoy, D.C., 1992. MINEQL⁺: a software environment for chemical equilibrium modeling. Comput. Environ. Urban Systems 16, 65-76.
- Silverberg, B.A., 1976. Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. Phycologia 15, 155-159.
- Soyer, M.-O., Prevot, P., 1981. Ultrastructural damage by cadmium in a marine dinoflagellate, <u>Prorocentrum micans</u>. J. Protozool. 28, 308-313.
- Strasdeit, H., Duhme, A.-K., Kneer, R., Zenk, M.H., Hermes, C., Nolting, H.-F., 1991. Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 16, 1129-1130.
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1997. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom <u>Phaeodactylum tricornutum</u> Bohlin. Aquat. Toxicol. 39, 231-246.
- Tortell, P.D., Price, N.M., 1996. Cadmium toxicity and zinc limitation in centric diatoms of the genus <u>Thalassiosira</u>. Mar. Ecol. Prog. Ser. 138, 245-254.
- Visviki, I., Rachlin, J.W., 1992. Ultrastructural changes in <u>Dunaliella minuta</u> following acute and chronic exposure to copper and cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 23, 420-425.
- Visviki, I., Rachlin, J.W., 1994. Acute and chronic exposure of <u>Dunaliella salina</u> and <u>Chlamydomonas bullosa</u> to copper and cadmium: effects on growth. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 149-153.

- Wallace, W.G., Lee, B.-G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biological detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser. 249, 183-197.
- Wong, S.L., Nakamoto, L., Wainwright, J.F., 1994. Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. J. Appl. Phycol. 6, 405-414.
- Xiang, C., Olivier, D.J., 1998. Glutathione metabolic genes in <u>Arabidopsis</u>. Plant Cell 10, 1539-1550.

Figure captions

Fig. 1: Differential centrifugation method used to separate various subcellular fractions. P: Pellet; S: Supernatant; Cell debris: membranes, cell walls, nuclei; Granules: minerals, NaOHresistant materials; Organelles: mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum; HDP: enzymes; HSP: GSH, phytochelatins and other unidentified peptides (X_n) .

Fig. 2: Relative yield (ρ/ρ_0) obtained after 72 h (<u>C. reinhardtii</u>) or 96 h (<u>P. subcapitata</u>) exposure to various free Cd²⁺ concentrations. Errors bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.

Fig. 3: Intracellular cadmium content (amol Cd/cell) after 72 h (<u>C. reinhardtii</u>) or 96 h exposure (<u>P. subcapitata</u>) to various free Cd²⁺ concentrations (nM) in culture media. Inset shows the three first points on a smaller scale. Error bars are the standard deviations of three replicates algal cultures. Inset shows detail for Cd²⁺ \leq 50 nM.

Fig. 4: Intracellular cadmium distribution in amol Cd/cell (A, B) or % (C, D) after 72 h (\underline{C} . reinhardtii; panels A and C) or 96 h exposure (<u>P. subcapitata</u>; panels B and D) to various Cd²⁺ concentrations (nM) in culture media. Cd burdens for the debris/granules fraction (data not shown) of *P. subcapitata* were not significantly different from zero due to the large error associated with the subtraction of Cd associated with the intact cells that pellet in this fraction. Consequently, for this species, the total Cd burden used to calculate the proportion of Cd in the "organelles", the "HDP" and the "HSP" fractions did not include the Cd burden in the debris/granules. Error bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.
Fig. 5: Thiolated peptides synthesized after 72 h (<u>C. reinhardtii</u>; A and C) and 96 h exposure (<u>P. subcapitata</u>; B and D) to various Cd^{2+} concentrations. Panels A and B show phytochelatins (PC_n), glutathione (GSH), γ -glutamylcysteine (γ -EC) in amol SH/cell. Panels C and D show unidentified (X_n) in amol SH/cell. Error bars are the standard deviation of three replicate algal cultures.

Fig. 6: Sum of all thiols (SH_{tot} = GSH+ γ -EC+PC_n+X_n), sum of all phytochelatins (PC_n = PC_{2 to} 6) and sum of unidentified peptides (X_n = X_{1 to 6}) synthesized after 72 h (<u>C. reinhardtii</u>; A) or 96 h exposure (<u>P. subcapitata</u>; B) at varying Cd²⁺ concentration (nM) in culture media. X_n concentrations are not corrected for derivatization efficiency. Lines represent linear regressions. Values of thiol concentrations are in amol SH/cell. Error bars are the standard deviation of three replicate algal cultures.

Fig. 8: Ratio between the sum of phytochelatin concentrations (PC_n in amol SH/cell) or the sum of the phytochelatins and the unknown peptides (PC_n+X_n in amol SH/cell) as a function of intracellular Cd (Cd_{intr} in amol Cd/cell) (panels A and B) or of the Cd concentration in the HSP fraction (Cd_{HSP} in amol Cd/cell) (panels C and D) for five Cd²⁺ concentrations (nM) in culture media for <u>C. reinhardtii</u> (black circles) and <u>P. subcapitata</u> (white circles). Dotted bars represent a 4:1 theoretical ratio for tetrahedral coordination between thiol groups and Cd. Error bars are the standard deviation of three replicate algal cultures.

Figures



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4





Fig. 5





Fig. 6



Fig. 7





SUPPORTING INFORMATION FOR

Metal detoxification strategies, thiolated peptides synthesis and Cd sequestration in granules, in two phytoplanktonic species

Michel Lavoie, Séverine Le Faucheur, Claude Fortin and Peter G.C. Campbell

One supplementary table and three figures

Chemical composition of culture media

Table SI1: Total molar concentrations of constituents of culture medium (MHSM-1) and rinse solution (MHSM-R) derived from the HSM medium of Macfie et al. (1994). The carbonate concentration is adjusted by equilibrium with the atmosphere. The pH is maintained at 7.0 with HEPES (3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] propanesulfonic acid) and the free metal concentrations are buffered with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Targeted metal concentrations (Mn, Zn, Fe, Co) in MHSM-1 culture medium (calculated from the trace metal AAP stock solution) were measured by ICP-MS or ICP-AES, and the results indicated that impurities from salts did not contribute to these four metal concentrations in the MHSM-1 culture medium. The Cu concentration in MHSM-1 medium was below the ICP-MS detection limit (1.04×10^{-9} M), but was greater or equal to 2.52×10^{-10} M (concentration calculated from the measured Cu content in the AAP trace metal stock solution before dilution). Equilibrium speciation calculations showed that this uncertainty with respect to the Cu concentration did not appreciably affect the free Cd²⁺ concentrations.

Compounds**	HSM	MHSM-1	MHSM-R
NH4 ⁺	9.35 x 10 ⁻³	9.37 x 10 ⁻⁴	$9.37 \text{ x} 10^{-4}$
Cl	9.49 x 10 ⁻³	5.98 x 10 ⁻⁶	<u> </u>
K^+	2.20 x 10 ⁻²	4.22×10^{-3}	4.22 x 10 ⁻³
PO ₄ ³⁻	1.37 x 10 ⁻²	1.37 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴
CO ₃ ²⁻	Atm	atm	Atm
NO ₃ -	_	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³
SO4 ²⁻	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Mg ²⁺	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Ca ²⁺	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵
Na ⁺	1.02 x 10 ⁻⁴	$1.02 \ge 10^{-4}$	1.02 x 10 ⁻⁴
BO ₃ ³⁻	3.01 x 10 ⁻⁶	3.01 x 10 ⁻⁶	
Mn ²⁺	2.10 x 10 ⁻⁶	2.10 x 10 ⁻⁶	
EDTA	8.06 x 10 ⁻⁷	8.06 x 10 ⁻⁷	
Fe ³⁺	5.92 x 10 ⁻⁷	5.92 x10 ⁻⁷	
MoO ₄ ²⁻	3.00 x 10 ⁻⁸	3.00 x 10 ⁻⁸	
Zn^{2+}	2.43 x 10 ⁻⁸	2.33 x 10 ⁻⁷	
Co ²⁺	1.09 x 10 ⁻⁸	1.09 x 10 ⁻⁸	
Cu ²⁺	7.04 x 10 ⁻¹¹	$>2.52 \times 10^{-10}$	
Cu ²⁺		<1.04 x 10 ⁻⁹	
HEPES		10 x 10 ⁻³	· .

Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green algae <u>Chlamydomonas reinhardtii</u>: The influences of the cell wall and pH. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 454-458.

*Ionic charges indicate the redox state of the compounds



Fig. SI1: Chromatograms of cell extracts of <u>C. reinhardtii</u> cultured in control medium (0.3 pM Cd^{2+}) (lower chromatogram) and in 149 nM Cd^{2+} (upper chromatogram). 1. Glutathione (GSH: 32.0 min); 2. γ -glutamylcysteine (γ -EC; 34.0 min); 3. X₁ (36.4 min); 4. PC₂ (55.6 min); 5. X₂ (57.8 min); 6. X₃ (58.7 min); 7 PC₃ (64.7 min); 8 X₄ (66.6 min); 9 X₅ (68.3 min); 10 PC₄ (70.3 min); 11 X₆ (71.9 min); 12 PC₅ (74.5 min); 13 PC₆ (78.1 min). PC_n = phytochelatins.

Regression between the intracellular Cd per average cell surface and the Cd²⁺ concentration in culture media



Fig. SI2 : Intracellular cadmium content per average cell surface area (amol Cd/ μ m²) after 72 h (*C. reinhardtii*) or 96 h exposure (*P. subcapitata*) to various free Cd²⁺ concentrations (nM) in culture media. Errors bars are the standard deviations of three replicates algal cultures.

Regression between the sum of thiol (amol SH/L biovolume) and the Cd²⁺ concentration

in culture media



Fig. SI3: Sum of all thiols (black circle) (GSH, γ -EC, PC_n and X_n), sum of all phytochelatins (open circle) (PC_{2 to 6}) and sum of unknown peptides (black triangle) (X_{1 to 6}) synthesized after 72 h (*C. reinhardtii*; panel A) or 96 h exposure (*P. subcapitata*; panel B) at varying Cd²⁺ concentration (nM) in culture media. X_n concentrations are not corrected for derivatization efficiency. Lines represent linear regressions. Values of thiol concentrations are in mmol SH / L biovolume. Errors bars are the standard deviations of three replicates algal cultures.

7. ANNEXE

7.1 : Méthode utilisée pour le calcul de la proportion des cellules brisées à l'aide du logiciel *Multisizer III* du compteur de particules

1) Cliquer sur les onglets File / Open

2) Ouvrir le fichier correspondant à la distribution de taille de l'échantillon non homogénéisé

3) Cliquer sur les onglets *Analyse / Statistics* et noter le nombre différentiel moyen (*Differential number*) des particules avant homogénéisation

4) Cliquer sur les onglets *Analyse / Load Backgroud Run* et sélectionner le fichier correspondant à la distribution de taille des particules obtenue après homogénéisation

L'étape 4 permet de soustraire la distribution de taille obtenue après homogénéisation (composée de cellules intactes et de cellules brisées) de celle obtenue avant homogénéisation

5) Cliquer sur les onglets *Analyse / Statistics* et noter le nombre différentiel moyen (*Differential number*) de particules étant une estimation du nombre de cellules brisées.

6) Calculer la proportion de cellules brisées à l'aide de la formule suivante :

 $\frac{\text{Nombre différentiel de cellules brisées}}{\text{Nombre différentiel de cellules avant homogénéisation}} \times 100 = \% \text{ de cellules détruites}$

7.2 : Test d'homogénéisation des cellules de *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella pyrenoidosa et Chlamydomonas reinhardtii* par sonification

7.2.1 Objectif:

Évaluer et optimiser l'efficacité d'homogénéisation par sonification chez différentes espèces phytoplanctoniques (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii*).

7.2.2 Utilisation du sonificateur « Branson 250 »

Une sonde de type « *micro-tip* » de 4,8 mm de diamètre fut insérée directement sur la sonde standard de 2,5 cm de diamètre. Cette microsonde est recommandée pour homogénéiser des cellules résistantes telles celles composant des tissus musculaires ou certains champignons. La puissance en Watts (W) des ultrasons délivrés par cette sonde était calculée à partir de la table de conversion à la page 4.3 du manuel d'instruction du sonificateur (Branson Ultrasonics Corporation, 2005). Cette table permet de déduire la puissance en W sachant les valeurs de deux paramètres, soit la valeur du « *loading*» et du « *output* ». La valeur de « *loading* » était lue directement sur un cadran nommée « *loading meter* » placé sur le sonificateur lors des sonifications. La valeur de « *Output* » était quant à elle déterminée par l'utilisateur à l'aide de la roulette « *Output control* » et pouvait varier entre 1 et 10. Cependant, il n'était pas recommandé de dépasser 7 puisque la microsonde risquait de s'endommager. La fréquence pouvait aussi varier entre des pulsations de 0,1 à 0,9 sec/sec. La sonification pouvait aussi être continue. Des tests préliminaires ont permis de déterminer la puissance des ultrasons délivrés pour des « *Output* » variant entre 1 et 7 et pour 5 ml de milieu de culture (MHSM) dans des tubes de 7 ml en PP (tableau 7.1).

Tableau 7.1: Puissance en Watts (W) des ultrasons délivrés par la sonde du sonificateur pour différentes valeurs de « Output ». 5 mL de milieu de culture MHSM-1 fut utilisé comme matrice.

Output	Puissance
	W
1	10
2	22
3	36
4	51
5	65
6	79
7	92

7.2.3 Manipulations

Des milieux de culture de 100 mL dans des erlenmeyers de 250 mL furent inoculés à 40 000 cell./mL pour chacune des espèces étudiées. Les cellules algales des trois espèces furent récoltées par filtration à la fin de la phase exponentielle (après 72 heures de croissance pour P. subcapitata et C. pyrenoidosa, après 48 heures de croissance pour C. reinhardtii). Les cellules récoltées sur les filtres en polycarbonate de diamètre 47 mm et de porosité 2,0 µm furent resuspendues dans du milieu de culture MHSM-1 afin d'obtenir une solution de 1 million de cell./mL. Un volume de 5 mL de cette solution fut placé dans un tube en PP de 7 mL. Les tubes de C. pyrenoidosa et de C. reinhardtii furent placés dans la glace avant la sonification afin que la solution soit à une température initiale de 4 °C. Les tubes de P. subcapitata ne furent pas placés dans la glace préalablement à la sonification et la température initiale était de 21 °C. Les tubes furent sonifiés selon différents paramètres à l'intérieur d'un bol rempli de glace. Les distributions de taille furent enregistrées avant et après sonification avec un intervalle de taille de 2 à 10 µm pour P. subcapitata et de 2,5 à 10 µm pour les deux autres espèces. La proportion de cellules brisée fut estimée par la soustraction du spectre de taille après sonification de celui avant sonification à l'aide du logiciel Multisizer III du Coulter Counter (voir annexe section 7.1). La température de la solution fut mesurée après la sonification à l'aide d'un thermomètre.

7.2.4 Résultats et discussion

Tableau 7.2: Efficacité à briser les cellules de C. pyrenoidosa selon différents paramètres desonification ainsi que la température atteinte après sonification (N = 1).

		% de cellules
Paramètres de sonification	T° final (°C)	détruites
Puissance=10 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 10 minutes	19	19,0
Puissance=22 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 10 minutes	25	28,3
Puissance=51 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 2 minutes	21	22,1
Puissance=51 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 4 minutes	27	23,5

Tableau 7.3 : Efficacité à briser les cellules de C. reinhardtii selon différents paramètres desonification ainsi que la température atteinte après sonification (N = 1).

		% de cellules	
Paramètres de sonification	T° final (°C)	détruites	
Puissance=10 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 3 minutes	14	43,2	
Puissance=10 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 6 minutes	16	78,2	
Puissance=10 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 1 minute	-	42,3	
Puissance=10 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 3 minutes	· - ,	89,8	
Puissance=10 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 4 minutes	· _	95,4	
Puissance=10 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 5 minutes	-	97,8	
Puissance=22 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 3 minutes	16	82,9	
Puissance=22 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 5 minutes	20	95,1	
Puissance=22 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 6 minutes	22	97,4	
Puissance=22 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 1 minute	20	72,1	
Puissance=22 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 2 minutes	25	93,5	
Puissance=22 watts; pulsations=0,4 sec/sec; 3 minutes	27	98,5	
Puissance=22 watts; pulsations=0,5 sec/sec; 3 minutes	37	98,8	
Puissance=36 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 10 minutes	26,5	96,6	

Tableau 7.4 : Efficacité à briser les cellules de P. subcapitata selon différents paramètres de
sonification (N = 1).

	T° final	% de cellules
Paramètres de sonification	(°C)	détruites
Puissance=10 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 5 minutes	· -	23,4
Puissance=10 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 10 minutes	-	27,5
Puissance=10 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 15 minutes	-	32,1
Puissance=22 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 5 minutes	-	26,8
Puissance=22 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 10 minutes	-	32,6
Puissance=51 watts; pulsations=0,2 sec/sec; 30 secondes	-	20,8

L'efficacité à briser les membranes et / ou les parois semblent varier en fonction des espèces phytoplanctoniques. L'efficacité à briser les cellules est grandement supérieure chez *C. reinhardtii* que chez les deux autres espèces. Il est possible de briser par sonification en peu de temps, et sans une augmentation de la température, plus de 95 % des algues d'une suspension de *C. reinhardtii* (5 mL à 10⁶ cell./mL). Après 3 minutes de sonification à une puissance de 22 W (pulsations de 0,4 sec/sec), 98,5 % des cellules sont brisées (T_{final} = 27 °C). Si on baisse les pulsations à 0,2 sec/sec, il suffit de 6 minutes de sonification pour briser 97,4 % des cellules à la même puissance (22 W) (Tableau 7.3). L'augmentation de température est un peu moins grande dans ce dernier cas (T_{final} = 22 °C). À une puissance de 22 W et avec des pulsations de 0,2 sec/sec, seulement 28,3 % et 32,6 % des cellules de *C. pyrenoidosa* (tableau 7.2) et de *P. subcapitata* (tableau 7.4) se brisent après 10 minutes de sonification. Cependant, la plus grande efficacité à briser les cellules de *P. subcapitata* a peut-être été influencée par la température initiale avant sonification de 21 °C au lieu de 4°C pour l'autre espèce.

Les pourcentages d'efficacité obtenus après sonification de *P. subcapitata* sont quand même supérieurs à ceux mesurés par Deault (2005). En effet, dans le cadre d'une étude sur l'homogénéisation des cellules de *P. subcapitata*, Deault (2005) sonifia des échantillons d'algues de 5 mL (densité = 500 000 cell/mL) dans des tubes de centrifugation de 15 ml placés dans la glace. Elle ne pu que briser 8,7 % des cellules de *P. subcapitata* après 5 minutes de sonification à 25 W (pulsations = 5 sec, intervalles = 1 sec). De plus, après sonification à puissance 250 W pendant 5 minutes (pulsations = 5 sec, intervalles = 2 sec), seulement 15,3 %

des cellules furent brisées. Elle souligne aussi que les suspensions d'algues ont le temps de devenir tiède durant les sonifications, ce qui a pu surestimer les pourcentages d'efficacité des sonifications dans le cas où la température aurait un effet positif sur l'homogénéisation cellulaire. Nos tests de sonification avec un sonificateur Branson 250 pourvu d'un embout conçu pour briser les cellules résistantes ont montré qu'il était possible de briser une proportion de cellules plus grandes, mais encore relativement faible, que celle estimée par Deault (2005) sans dépasser une température d'environ 25 °C.

Cependant, ce pourcentage d'efficacité d'homogénéisation est conservateur et ne représente pas une surestimation des cellules brisées. Il représenterait peut-être une sous-estimation, car le pic d'algues brisées chevauche le pic d'algues intactes avant sonification et il pourrait y avoir des cellules brisées de diamètre correspondant à des petites algues. De plus, il est possible que les algues soient perforées, mais que leur paroi rigide demeure intacte après homogénéisation. Nous avons donc vérifié le nombre de cellules intactes ou brisées après sonification avec des techniques de coloration au bleu de méthylène ou d'assimilation au carbone 14.

7.3 : Effet de la congélation dans l'azote liquide sur l'homogénéisation des cellules de *Pseudokirchneriella subcapitata*

7.3.1 Objectif

Vérifier l'effet d'une congélation dans l'azote liquide couplée ou non à une sonification sur l'homogénéisation des cellules de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

7.3.2 Manipulation

Des cellules de *P. subcapitata* ont été récoltées par filtration à la fin de la phase exponentielle (après 72 heures de croissance). Un volume de 5 mL de culture à 10^6 cell./mL fut placé dans des tubes de 7 mL en PP et les distributions de tailles initiales furent mesurées au compteur de particules. Trois tubes furent sonifiés pendant 10 minutes (*Output* = 2, pulsations = 0,2 sec/sec) à l'intérieur d'un bol de glace. Trois autres tubes furent immergés dans l'azote liquide pendant quelques minutes. Après 4-5 heures de décongélation, les distributions de taille des cellules dans les tubes furent mesurées au compteur de particules afin de voir si la congélation / décongélation pouvait briser les cellules. Ensuite, ces trois tubes ayant été congelés et décongelés furent sonifiés et les distributions de taille furent aussi mesurées afin de déterminer l'efficacité d'homogénéisation de la sonification (voir section 7.1) avec ou sans congélation / décongélation préalable.

7.3.3 Résultats et discussion

À la figure 7.1, on peut observer qu'il ne semble pas y avoir d'effet de la congélation dans l'azote liquide et de la décongélation lente sur glace sur l'efficacité à homogénéiser les cellules de *P. subcapitata* puisque les distributions de taille avant et après congélation ne changent pas de façon notable. De plus, des débris cellulaires ne semblent pas avoir été créés.



Figure 7.1 : Distributions de taille avant (rouge) et après (vert) congélation dans l'azote liquide et décongélation dans la glace de 5 ml de suspension d'algues dans des tubes de 7 ml en PP (polypropylène).



Figure 7.2 : Distribution de taille des cellules algales avant sonification et avant congélation dans l'azote liquide (témoin ; rouge). Distribution de taille des cellules algales intactes et brisées après sonification (*Output = 2*, pulsations = 0,2 sec/sec, 10 minutes) (vert). Distribution de taille des cellules algales intactes et brisées après congélation dans l'azote liquide, décongélation et sonification (*Output = 2*, pulsations = 0,2 sec/sec, 10 minutes) (vert). Distribution de taille des cellules algales intactes et brisées après congélation dans l'azote liquide, décongélation et sonification (*Output = 2*, pulsations = 0,2 sec/sec, 10 minutes) (bleu).

	Sans congélation	Avec congélation	
	Efficacité de sonification		
	%		
Réplicat 1	33,7	33,6	
Réplicat 2	29,7	29,1	
Réplicat 3	29,6	29,2	

 Tableau 7.5 : Efficacité à briser les cellules par sonification après congélation à l'azote liquide ou sans congélation.

L'efficacité à briser les cellules par sonification n'est pas augmentée par une congélation préalable de l'échantillon dans l'azote liquide et une décongélation lente sur glace (tableau 7.5, figure 7.2). Les cellules de plusieurs espèces phytoplanctoniques seraient plus friables après avoir été congelées (J.-C. Auclair et S. Le Faucheur ; communication personnelle). De plus, selon Day et Brand (2005), la formation de glace intracellulaire lors de la congélation rapide d'un échantillon de micro-algues entraînerait des dommages ultrastructuraux aux organelles et <u>aux membranes</u>. Cela pourrait expliquer le fait que les cellules algales sont d'habitude plus friables après congélation. On aurait donc dû noter une augmentation de l'efficacité à briser les cellules après congélation / décongélation, ce qui n'a pas été le cas. *P. subcapitata* semble donc encore une fois très résistante à la l'homogénéisation cellulaire.

7.4 : Séparation de cellules de *Pseudokirchneriella subcapitata* selon leur diamètre par centrifugation

7.4.1 Objectif

Vérifier la possibilité de séparer les cellules intactes (diamètre entre 2 et 10 μ m) des débris cellulaires (diamètre entre 1,4 et 2 μ m) par centrifugation afin de pouvoir compter les cellules intactes et aussi de pouvoir doser des métaux dans les différentes fractions.

7.4.2 Manipulation

Une culture d'algues relativement âgée de *P. subcapitata* (environ 27×10^6 cell./mL après 6 jours de croissance) fut utilisée lors de cette expérience puisqu'elle contenait une grande quantité de débris cellulaires de diamètre entre 1,4 et 2 µm (voir distributions de taille en rouge aux figures 7.4 et 7.5). Une dilution fut réalisée dans du milieu de culture MHSM-1 afin d'obtenir 10 mL de suspension d'algues à environ $5,2 \times 10^6$ cell./mL. La densité algale de cette solution (particules entre 2 et 10 µm) fut mesurée au compteur de particules en triplicata et les distributions de taille de 1,4 à 10 µm de diamètre furent enregistrées afin de voir les débris cellulaires entre 1,4 et 2 µm. Un volume de 0,5 mL de cette solution fut placé dans des eppendorfs de 1,5 mL. Les eppendorfs furent centrifugés à différentes vitesses, pendant différents temps et à l'aide de différents rotors. La densité algale du surnageant à l'intérieur des eppendorfs fut mesurée en triplicata au compteur de particules et les distributions de taille furent enregistrées afin de voir la proportion de débris et les distributions de taille furent enregistrées afin de voir la proportion de débris et de cellules restantes dans le surnageant après centrifugation.

7.4.3 Résultats et discussion

Lorsque les eppendorfs sont centrifugés à 1500 g pendant 10 minutes avec le rotor SS-34, on retrouve la moins grande proportion de cellules dans le surnageant (5,9 %) (figure 7.3 et tableau 7.6). Cependant, on note aussi à la figure 7.4 qu'on retrouve aussi la moins grande proportion de débris cellulaires dans le surnageant. Donc, la séparation des débris et des cellules ne serait ici pas possible, car presque tous les débris et les cellules se retrouveront dans le culot et on ne retrouvera que peu de particules dans le surnageant.



Figure 7.3: Concentration d'algues restantes (M cell./mL) dans le surnageant après centrifugation à différentes vitesses (500 g ou 1500 g), pendant 5 ou 10 minutes et avec deux types de rotor différents (HB-6, SS-34). La densité d'algues avant centrifugation est aussi représentée (avant centri).

Tableau 7.6: Pourcentage de cellules algales restante dans le surnageant des eppendorfs après différentes centrifugations (N = 3).

	500 g 5 min	500 g 5 min	500 g 10 min	1500 g 10 min
	(HB-6)	(SS-34)	(SS-34)	(SS-34)
Proportion de cellules dans le surnageant (%)	30,8 ± 3,6	13,7 ± 0,9	9,7 ± 8,1	5,9 ± 2,7





On retrouve plus de cellules intactes dans le surnageant des eppendorfs centrifugés avec le rotor SS-34 à 500 g pendant 5 minutes que ceux centrifugés à la même vitesse, mais pendant 10 minutes (voir tableau 7.6 et figure 7.3; 7.4). Les cellules ont, en effet, plus le temps de sédimenter après 10 minutes qu'après 5 minutes. Après ces centrifugations, il y a environ 13,7

% (500 g, 5 min., SS-34) ou 9,7 % (500 g, 10 min., SS-34) de cellules intactes restantes dans le surnageant et, donc, environ 90 % de cellules intactes dans le culot. Cependant, les proportions de débris entre 1,4 et 2 μ m dans le surnageant semblent faibles d'après la figure 2 (moins de la moitié des débris dans le surnageant). Il y a donc une bonne séparation des cellules entre le culot et le surnageant, mais les débris entre 1,4 et 2 μ m de diamètre précipitent trop facilement avec les cellules, sûrement à cause de leur taille proche de celle des cellules. On ne pouvait que quantifier les débris de diamètre entre 1,4 et 2 μ m et non ceux de diamètre plus faible que 1,4 μ m étant donné l'électrode du compteur de particules utilisée. On ne sait donc pas si les débris de diamètre plus faible que 1,4 μ m sont bien séparés après les centrifugations.



Figure 7.5 : Nombre de particules dans le surnageant des eppendorfs après différentes centrifugations en fonction du diamètre des particules comparativement au nombre de particules présentes dans la solution d'algues initiale avant centrifugation. La distribution de taille en rouge représente les particules dans la suspension d'algues avant centrifugation (témoin). La distribution de taille en rose indique le nombre de particules présentes dans le surnageant des eppendorfs après une centrifugation à 500 g pendant 5 minutes avec le rotor HB-6. Les autres distributions de tailles apparaissant tous en vert sur cette figure ont été obtenues après les centrifugations décrites à la figure 7.4.

Après centrifugation à 500 g pendant 5 minutes avec le rotor HB-6 (swinging bucket), on retrouve la plus grande proportion de débris cellulaires entre 1,4 et 2 μ m (voir distribution de taille rose à la figure 7.5) dans le surnageant. Cependant, la quantité de débris dans le surnageant est d'environ 50 % (par approximation sur la figure 7.5) et donc la proportion de débris dans le culot demeure encore importante et n'est pas négligeable. Il y a donc un mélange de cellules intactes et de débris dans le culot. Il semble donc être très difficile d'écarter les débris cellulaires par centrifugation, car, même après une centrifugation douce à 500 g pendant 5 minutes avec le rotor HB-6 où l'on retrouve 30,8 % des cellules intactes encore dans le surnageant, on ne peut conserver dans le surnageant qu'environ 50 % des débris cellulaires entre 1,4 et 2 μ m. Donc, s'il y avait eu des débris de diamètre entre 2 et 4 μ m, il aurait aussi été difficile de les conserver dans le surnageant après centrifugations puisque ces débris devraient être, intuitivement, plus enclin à précipiter que les débris étudiés dans cette étude entre 1,4 et 2 μ m.

La centrifugation à 500 g pendant 5 minutes effectuée avec le rotor HB-6 (*swinging bucket*) permettait la formation d'un beau culot circulaire au centre et au fond des eppendorfs. En effet, ce rotor permet aux eppendorfs de se placer à l'horizontal lors de la centrifugation et, grâce à la force centrifuge, permet de former un culot plus circulaire et plus au centre du fond de l'eppendorf que lors de l'utilisation d'un rotor conventionnel tel le SS-34 où les eppendorfs sont légèrement inclinés. Cependant, le culot formé comportera une moins grande quantité de cellules avec le HB-6 qu'avec le SS-34 (voir figure 7.3 où il y a plus de cellules dans le surnageant avec le HB-6 qu'avec le SS-34 à 500 g pendant 5 minutes). Avec le SS-34, les eppendorfs restent inclinés lors de la centrifugation et le culot a tendance à se former sur le côté du fond de l'eppendorf. La forme du culot sera donc moins bien définie et ressemblera à une sorte d'ovale allongé. Il est donc possible que les algues ne sédimentent pas de la même façon dans les trois réplicats puisque le culot est peut-être plus fragile sur le côté de l'eppendorf, la surface de contact entre le culot et le surnageant étant plus grande. Cela pourrait expliquer, du moins partiellement, le grand écart-type obtenu lors de la centrifugation à 500 g pendant 10 minutes avec le SS-34 (voir figure 7.3):

Il vaudrait donc mieux essayer d'écarter les débris cellulaires de diamètre plus faible que 2 μ m par filtration à l'aide de tubes à centrifugation ou de seringues pourvus de filtres de porosité 2 μ m si l'on veut par la suite doser les métaux dans cette fraction. De plus, si l'on veut compter le nombre de cellules intactes après homogénéisation en enlevant l'interférence des débris cellulaires de même diamètre, le logiciel du compteur de particules, l'assimilation de carbone 14, la fluorescence *in vivo* ou la cytométrie en flux pourrait permettre de discerner les cellules vivantes ou intactes des cellules mortes ou brisées.

7.5 : Protocole pour la détermination de la prise en charge du NaH¹⁴CO₃ par des cellules sonifiées ou non de *P. subcapitata*

- Trois cultures de *P. subcapitata* furent réalisées pendant 4 jours (densité initiale = 40 000 cell./mL).
- Après les 4 jours de croissance, 100 μL de la source radioactive de NaH¹⁴CO₃ (10 μCi / 1 mL/ 100 μg de NaH¹⁴CO₃) fut directement introduit dans les trois milieux de cultures afin d'atteindre une activité de 10 nCi / mL de milieu de culture.

* La concentration de $NaH^{14}CO_3$ ajoutée est 50 fois plus faible que la concentration de carbonate totale pouvant être atteinte dans le milieu de culture (calculée à l'équilibre avec le logiciel MINEQL). Un dégazage des carbonates en solution était donc peu probable, du moins à court terme d'autant plus que la cinétique des échanges gazeux est plutôt lente.

- 3) Exposition pendant 7 minutes au carbone radioactif.
- 4) Filtration de 1,5 mL de milieu de culture en triplicat avec blanc de filtration pour déterminer la bioaccumulation du carbone 14 avant sonification à chaque pas de temps et rinçage cinq fois avec 10 mL de NaHCO₃ froid pour chaque réplicat. Le blanc de filtration est constitué d'un deuxième filtre placé sous le filtre recueillant les algues.
- Mesurer la prise en charge du carbone 14 au compteur β des algues avant sonification et aussi des blancs de filtration (mettre filtre dans 8 mL d'Ecolume).
- 6) Filtration à nouveau de 1,5 ou 2 mL de milieu de culture en triplicat à chaque pas de temps et resuspension dans 5 ml de milieu MHSM-R.
- 7) Conserver les solutions algales resuspendues au froid pour les sonifier par la suite.
- 8) Répéter les étapes 4, 5, 6 et 7 après 25, 49 et 68 minutes d'exposition.
- 9) Sonifier les quatre séries d'échantillon pendant 4 minutes (*Output* = 2, pulsations = 0,2 sec / sec)
- 10) Filtration des homogénats sur deux filtres et rinçage cinq fois avec 10 mL de NaHCO₃ non radioactif
- 11) Analyser au compteur β le carbone pris en charge par les algues restantes après sonification et aussi les blancs de filtration (filtre dans 8 ml d'Ecolume). L'activité des blancs de filtration (quantité de carbone 14 adsorbée par le filtre) était soustraite de celle des filtres avec algues et/ou débris cellulaires

Problème de mesure de l'activité de la source radioactive avec le liquide à scintillation.

Nous voulions minimiser les risques que les bicarbonates en solution se volatilisent au contact du liquide à scintillation (pH de l'Ecolume = 6,5). Nous avons donc ajouté une certaine quantité de NaOH au liquide à scintillation. Le NaOH (à une certaine concentration) n'était pas soluble avec ce liquide à scintillation. En effet, une concentration d'environ 0,13 M de NaOH dans l'Ecolume avait pour effet d'empêcher le mélange des phases aqueuses et organiques et le NaOH restait en surface du liquide à scintillation. Ce phénomène était normal, car le manufacturier du liquide à scintillation recommande une concentration finale de NaOH inférieure à 0,1 M afin d'obtenir une solution claire. Par conséquent, une plus faible concentration de NaOH fut ajoutée à l'Ecolume (environ 6 mM NaOH). L'activité des blancs (Ecolume et NaOH 6 mM) étaient très élevées (environ 3800 CPM) lorsqu'ils étaient analysés le jour même au compteur β. Il fallait laisser les échantillons une journée dans le noir avant de les analyser afin de diminuer les processus de chémioluminescence. L'activité des blancs devenait d'environ 60 CPM et, donc, le bruit de fond était normal. Cependant, la variabilité était parfois assez grande entre les réplicats des blancs et de l'activité de la source (environ 20 %). Il fallait faire plusieurs réplicats afin d'écarter la ou les valeurs extrêmes. On dirait que le liquide à scintillation utilisé ne fonctionnait pas toujours bien pour doser des solutions basiques contenant du carbone radioactif. Il serait donc préférable d'utiliser un liquide à scintillation spécialement conçu pour la mesure de solutions radioactives alcalines. De toute façon, dans notre cas, nous voulions seulement avoir une mesure relative de la quantité de carbone bioaccumulée par les algues avant et après sonification afin de déterminer la diminution de la proportion de carbone 14 lors de l'homogénéisation cellulaire. La variabilité entre les échantillons composés de filtres d'algues était faible et l'activité demeurait la même après 24 heures d'attente dans le noir, suggérant peu ou pas de processus de chimioluminescence lors du dosage de carbone stocké dans les algues.

7.6: Coloration au bleu de méthylène pour évaluer l'efficacité d'homogénéisation de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Pseudokirchneriella subcapitata*

7.6.1 Objectif

Évaluer le potentiel d'homogénéisation cellulaire après resuspension de *C. reinhardtii* ou de *P. subcapitata* dans une matrice HCl/DTPA (0,1 M / 5 mM).

7.6.2 Matériel

Solution de bleu de méthylène 0,05 ou 0,1 % dans « Ringer solution » (7 g/L NaCl, 0,075 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl₂ et 0,2 g/L NaHCO₃) (Markelova et al., 2000).

7.6.3 Protocole

Selon Markelova et al., 2000 :

- 1) 1 mL de colorant est mélangé à 1 mL de suspension d'algues
- 2) Attendre 15-20 minutes
- Regarder environ 1000 cellules au microscope ou utiliser une chambre de comptage et compter le nombre de cellules mortes (bleu) ou vivantes (non colorées)

7.6.4 Résultats et discussion

Selon certains chercheurs, le bleu de méthylène serait un indicateur de la perméabilité membranaire et serait tout simplement exclu des cellules vivantes tandis que les membranes des cellules mortes seraient perméables au colorant (Pimenova *et al.*, 1965 ; Markelova *et al.*, 2000). Cependant, Painting et Kirshop (1990) affirme plutôt que le bleu de méthylène pénètre dans les cellules vivantes ou mortes, mais est seulement réduit par les cellules vivantes à l'aide d'une enzyme décolorant le bleu de méthylène. Les cellules mortes ont donc une apparence
bleue n'étant pas capable de réduire le colorant à l'intérieur des cellules. Puisque les cellules intactes de *C. reinhardtii* et de *P. subcapitata* incorporaient une certaine quantité de colorant dans notre cas afin de former des petits points bleus dans les cellules (figures 7.6 et 7.7), il semble donc que l'explication de Painting et Kirshop (1990) soit plus appropriée en ce qui concerne l'interaction entre le bleu de méthylène et les cellules. De plus, ces points bleus intracellulaires pourraient bien être des granules de polyphosphate. Le bleu de méthylène est en effet utilisé pour visualiser par microscopie photonique les granules de polyphosphate à l'intérieur des cellules phytoplanctoniques (Eixler *et al.*, 2005).



Figure 7.6 : Cellules intactes de *C. reinhardtii* colorées au bleu de méthylène (1000 X) avec le protocole de Markelova *et al.* (2000).



Figure 7.7 : Cellules intactes de *P. subcapitata* colorées au bleu de méthylène (1000 X) avec le protocole de Markelova *et al.* (2000).

En général, le test de viabilité cellulaire avec le bleu de méthylène fonctionnerait très bien avec des champignons et des bactéries, mais, chez les algues, il serait difficile de distinguer les cellules bleues (colorées) des vertes (non colorées) (communication personnelle John G. Day, Institut de l'écologie des eaux douces, Royaume-Uni). Markelova *et al.* (2000) soulignent aussi qu'il n'est pas possible de distinguer les cellules mortes des vivantes après la coloration au bleu de méthylène de différentes espèces de cyanobactéries quoique la technique fonctionne pour déterminer la viabilité des autres espèces. Une technique de coloration à la fluorescine diacétate (FDA) serait plutôt recommandée pour tester la viabilité cellulaire de microalgues puisqu'une fluorescence jaune intense permettrait de distinguer plus facilement les cellules vivantes (colorées) des cellules mortes (non colorées) (Markelova *et al.*, 2000 ; John G, Day communication personnelle, Institut de l'écologie des eaux douces, Royaume-Uni). Cependant, cette technique ne serait pas appropriée pour tester la viabilité de certaines souches de microalgues sans paroi cellulaire (protoplastes) telles *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 ou *Dunaliella salina* puisque seulement une certaine proportion des cellules vivantes deviendrait fluorescentes (Markelova *et al.*, 2000).



Figure 7.8 : Cellules de P. subcapitata colorées au bleu de méthylène avec le protocole de Markelova et al. (2000) après une simple (A) et triple (B) extraction (chauffage à 90 °C pendant 2 minutes dans une solution HCl 0,1 M / DTPA 5 mM) (1000 X).



Figure 7.9 : Cellules de C. reinhardtii resuspendues dans une matrice HCl 0,1 M / DTPA 5 mM et colorées au bleu de méthylène avec le protocole de Markelova et al. (2000) (1000 X).



Figure 7.10 : Cellules de C. reinhardtii colorées au bleu de méthylène avec le protocole de Markelova et al. (2000) après un chauffage à 90 °C pendant 2 minutes dans HCl 0,1 M/DTPA 5 mM (1000 X).



Figure 7.11 : Cellules de C. reinhardtii après une extraction (chauffage à 90 °C 2 min dans HCl 0,1 M / DTPA 5 mM et sonification de 4 minutes à 22 W, pulse = 0,2 sec/sec) (40 X).

Les tests de coloration effectués sur des cellules traitées à l'acide et chauffées à 90 °C pendant 2 minutes avec ou sans sonification (figures 7.8 à 7.11) montrent en effet souvent une faible coloration des cellules de *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* présumément mortes. Chez *P. subcapitata* (figure 7.8), la coloration bleutée du colorant à l'intérieur des cellules était très difficile à voir et il était donc difficile d'affirmer que les cellules traitées une ou même trois fois avec un chauffage dans l'acide couplé à une sonification étaient bel et bien mortes. Néanmoins, la coloration bleue des cellules présumément mortes de *C. reinhardtii* était plus facile à distinguer. En effet, la quasi-totalité des cellules chez cette espèce resuspendues dans la matrice HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM) (figure 7.9) montrait une coloration bleue (surtout au

niveau de la vacuole contractile). De plus, les cellules de *C. reinhardtii* chauffées et acidifiées (figure 7.10) ou chauffées, acidifiées et sonifiées (figure 7.11) devenaient aussi d'une couleur bleue, quoique dans une moindre mesure que pour les cellules seulement resuspendues dans la matrice acide. Cela concorde bien avec les tests d'extraction du GSH réalisés chez *C. reinhardtii* montrant que l'efficacité d'extraction du GSH n'est pas augmentée par l'ajout d'un chauffage à 90 °C et/ou d'une sonification à la simple resuspension dans l'acide (voir article 1 de ce mémoire).

Des tests de coloration au bleu de méthylène ont aussi été réalisés chez des cellules de *C. reinhardtii* et de *P. subcapitata* ayant été seulement sonifiées pendant 4 minutes (22 W, fréquence : 0,2 sec/sec) à l'intérieur du milieu de culture MHSM-1 (données non présentées). Après ce traitement de sonification, la quasi-totalité des cellules était détruite chez *C. reinhardtii* et il était donc difficile de visualiser des cellules ayant conservées leur forme et ayant incorporées le colorant. Pour ce qui est de *P. subcapitata*, les cellules restantes après sonification incorporaient très peu les deux colorants à la manière des cellules non sonifiées suggérant que les cellules sonifiées sont intactes. Cependant, la faible coloration bleue des cellules de *P. subcapitata* ayant subi une simple ou triple extraction dans une matrice HCl 0,1 M / DTPA 5 mM chauffée pendant 2 minutes à 90 °C (figures 3a et b) suggère plutôt que la coloration au bleu de méthylène ne permet pas de bien distinguer les cellules mortes des vivantes chez cette espèce et qu'il serait difficile de conclure que les cellules restantes après sonification dans le milieu MHSM-1 sont intactes à partir de ce test de coloration.

7.7: Impact de différents traitements (chauffage et acidification) sur l'efficacité de la sonification chez *Chlamydomonas reinhardtii*

7.7.1 Objectif

Déterminer l'impact de différents traitements tels un chauffage de 2 minutes à 90 °C ou une resuspension dans une matrice de HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM) des algues *Chlamydomonas reinhardtii* sur l'efficacité de la sonification à générer des fragments cellulaires de plus faibles diamètres que 2 μ m.

7.7.2 Manipulations

Un total de 15 cultures de 100 mL de *C. reinhardtii* cultivées pendant 3 jours furent centrifugées et resuspendues séparément dans 3 mL de milieu MHSM-R ou de HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM) afin d'obtenir 15 solutions de densité algale d'environ 20-30 millions de cell/mL (six solutions dans le MHSM-R et neuf autres dans le HCl / DTPA). Ces 15 solutions furent transférées dans des tubes en PP de 7 mL. Trois des 6 tubes contenant les algues resuspendues dans le milieu MHSM-R furent chauffés à 90 °C pendant 2 minutes tandis que les trois autres n'ont subit aucun traitement d'extraction. Pour ce qui des neuf tubes d'algues resuspendues dans l'HCl / DTPA, trois premiers tubes ne subirent aucun autre traitement, trois autres tubes furent aussi chauffés à 90 °C pendant 2 minutes et les trois derniers furent soumis à deux reprises au traitement de chauffage. Par la suite, la distribution de taille de chacune des solutions fut déterminée avec le compteur de particules avant et après une sonification de 4 minutes (22 W, fréquence = 0,2 sec/sec) et le pourcentage d'efficacité de l'homogénéisation fut déterminé avec la procédure expliquée à l'annexe 7.1.

7.7.3 Résultats et discussion



Figure 7.12 : Efficacité de l'homogénéisation par sonification de C. reinhardtii après différents traitements d'extraction (A : MHSM-R; B : 2 minutes à 90 °C dans milieu MHSM-R; C : HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM); D : 2 minutes à 90 °C dans HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM); E : deux fois le traitement D. L'efficacité de l'homogénéisation fut calculée à l'aide du compteur de particules.

La resuspension des cellules de *C. reinhardtii* dans la matrice HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM) diminue paradoxalement l'efficacité de la sonification, mesurée avec le compteur de particules, des cellules de *C. reinhardtii* resuspendues dans la matrice HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM) est paradoxalement plus faible que lors d'une simple resuspension dans le milieu MHSM-R couplé ou non à un chauffage (Figure 7.12.; comparer les traitements A et B avec les traitements $C \rightarrow E$). Le potentiel de désintégration des cellules en fragments de diamètre inférieur à environ 2 µm diminuait lors de l'usage de la matrice HCl / DTPA. Intuitivement, on aurait pu penser qu'un traitement à l'acide des cellules algales aurait fragilisé ces cellules ou les aurait affaiblies en quelques sortes permettant d'augmenter l'efficacité d'une éventuelle sonification. De plus, des tests d'extraction de GSH (voir article 1 du mémoire) ainsi que de coloration au bleu de méthylène (voir annexe 7.6) chez *C. reinhardtii* ont montré que l'efficacité d'extraction était la même qu'on ajoute ou non un chauffage et / ou une sonification à l'acidification des cellules dans la matrice HCl / DTPA. L'ensemble des résultats de cette expérience et aussi de ceux obtenus après les tests d'extraction du GSH et de colorations au bleu de méthylène montrent que la resuspension des cellules de *C. reinhardtii* dans cette matrice acide perméabilise les cellules tout en diminuant leur potentiel de désintégration en petits fragments (< 2 μ m) après sonification, ce qui biaise grandement l'estimation de l'efficacité de l'homogénéisation au compteur de particules. Au lieu d'obtenir une efficacité d'homogénéisation de près de 100 % si l'on se fie aux tests d'extraction de GSH ou encore aux colorations au bleu de méthylène, l'estimation « virtuelle » au compteur de particules donne plutôt une efficacité d'homogénéisation d'environ 70-75 % (figure 7.12).

Les résultats obtenus dans cette expérience (figure 7.12) suggèrent que la matrice acide induisait un changement dans les propriétés structurales membranaires et / ou des parois cellulaires afin que ces structures soient plus difficilement désintégrables par sonification. Il y a donc plusieurs cellules qui ne sont pas détruites alors que seulement les cellules de plus grand diamètre sont détruites (distributions de taille des cellules non présentées). Ce phénomène ressemble étrangement et de façon intéressante à celui rencontré lors de sonifications. dans des milieux non acides, d'autres espèces d'algues comme Pseudokirchneriella subcapitata ou Chlorella pyrenoidosa possédant des parois cellulaires riches en cellulose au lieu d'être fait de glycoprotéines (voir annexe 7.2 et article 1). Dans le premier article nous avons supposé que les cellules de P. subcapitata et de C. pyrenoidosa sont difficiles à briser par sonification à cause de la constitution de leur membrane et / ou paroi cellulaire rendant plus difficile la désintégration en petits fragments des cellules et que seulement les plus grandes cellules peuvent être détruites par les ultrasons. Ces grandes cellules peuvent cependant être davantage brisées simplement à cause de leur taille ou encore à cause d'une hétérogénéité dans la composition de paroi cellulaire de ces deux espèces rendant plus rigide les cellules de plus petits diamètres.

L'efficacité de l'homogénéisation des cellules de *C. reinhardtii* par sonification pourrait être davantage influencée par la taille des cellules que par une hétérogénéité dans la composition de la paroi cellulaire de la population algale. En effet, les cellules resuspendues dans le milieu MHSM-R (traitement A) sont presque toutes brisées indépendemment de la taille (figure 7.12). De plus, lors de sonifications moins intenses ne brisant pas la totalité des cellules de *C*.

reinhardtii, les distributions de tailles des cellules restantes ne semblaient pas démontrées une plus grande efficacité à briser les cellules plus grandes (observation faite au laboratoire et données non disponibles). L'utilisation d'un vortex agitateur à micro-billes (disruptor genie) par Lavoie (2004) pour briser les cellules de C. reinhardtii permettait aussi de briser les cellules avec une efficacité de plus en plus grande lors d'une augmentation du temps d'agitation indépendemment de la taille des cellules (e.g. les petites cellules sont aussi faciles à briser que les grandes cellules) (voir figure 5 dans Lavoie, 2004). Donc, la présence d'hétérogénéité dans la composition de la paroi cellulaire chez les cellules de C. reinhardtii de différentes tailles ne semble pas influencée l'efficacité à rompre les parois cellulaires lors de l'homogénéisation. Cependant, lorsque les cellules de C. reinhardtii sont resuspendues dans une matrice acide, l'efficacité à briser les cellules chutent (figure 7.12), mais les cellules de plus grands diamètres sont cette fois plus faciles à briser que les plus petites (données non montrées). Cela suggère que les cellules acidifiés de plus grand diamètre sont davantages friables simplement à cause de leur plus grande taille au lieu de leur paroi cellulaire pouvant être d'une composition différente et aussi plus âgés que celles des plus petites cellules si l'on suppose que l'acidification influe sur l'ensemble des cellules de la population algale et non pas chez seulement une fraction des cellules de la population.

7.8 : Préparation des solutions étalons

Des solutions étalons de γ -EC, GSH, PC₂, PC₃ et PC₄ ont été réalisées à partir des peptides sous forme de poudre. Environ 1 mg de peptides fut pesé à l'aide d'une microbalance précise au microgramme. Les peptides étaient pesés dans des bateaux de pesé. Par la suite, les peptides étaient dissous dans une matrice de HCl 0,1 M / DTPA 5 mM en mettant directement le bateau de pesé dans environ 5 mL de cette matrice. La solution était bien agitée afin de bien dissoudre l'ensemble des peptides. La solution était par la suite versée dans un autre tube de 50 mL sans transvider le bateau de pesée. Une très faible proportion, soit 2-3 gouttes, de la solution demeuraient dans le tube contenant le bateau de pesée. Ce tube fut quand même rincé deux fois avec 1 mL de matrice HCI/DTPA afin de minimiser les pertes de peptides lors du transfert de la solution. Le volume était par la suite ajusté afin d'atteindre une concentration d'environ 100 µM pour chacun des étalons. La concentration des cinq étalons fut corrigée en fonction de leur pureté (γ-EC : 88 %; GSH : 100 %; PC₂ : 92,7 % : PC₃ : 96,4 %; PC₄ : 93,1 %). Les solutions étalons créées furent ensuite pesées à l'aide d'une balance précise au centième de milligramme. En sachant le poids du tube avant l'introduction de la solution, on pouvait déduire le poids de la solution. Avec la densité de la matrice déterminée expérimentalement (1,005 g/ml), le volume de la solution a pu être déterminé.

Une solution contenant les cinq thiols à des concentrations de 10 μ M fut ensuite produite. Les différents volumes à pipeter dans le même tube furent transformés en masse à peser à l'aide de la densité de la solution puis le volume fut complété pour atteindre une concentration de 10 μ M. Cette solution fut ensuite dérivatisée et analysée en triplicat à l'HPLC pour déterminer l'efficacité de la dérivatisation au monobromobimane.



Figure 7.13 : Chromatogramme des cinq solutions étalons de thiols à des concentrations de 10 μ M. Le glutathion (GSH) éluait à 34,5 min. (pic 6), le γ -glutamylcystéinr (γ -EC) à 36,2 min. (pic 7), phytochélatines (PC₂, PC₃ et PC₄ à, respectivement, 56,9 min. (pic 10), 65,9 min. (pic 12) et 71,3 min. (pic 13). Les autres pics (1, 2, 4, 8, 9, 11, 14) provenaient des réactifs.

7.9 :Protocole de dosage de la cytochrome c oxydase (CCO) (EC4.1.3.7)

7.9.1 Préparation des solutions

1) Tampon phosphate 0,1 M; pH 7; 1 L

- KH₂PO₄ 1 M : Dissoudre 6,8045 g de KH₂PO₄ (136,1 g/mol) dans 50 mL d'eau milli-Q dans un bain à ultrasons.
- K₂HPO₄ 1 M : Dissoudre 17,418 g de K₂HPO₄ (174,2 g/mol) dans 100 mL d'eau milli-Q.
- Prélever 38,5 mL de KH_2PO_4 1 M et ajouter 61,5 mL de K_2HPO_4 1 M
- Compléter à 1 L avec de l'eau milli-Q.

2) Solution de cytochrome c (substrat de l'enzyme ; poids moléculaire = 12327 g/mol)
0,07 mM

- Dissoudre 0,0346 g dans 40 mL de tampon phosphate et conserver 10 mL pour les cuvettes de référence pour faire 30 échantillons.
- Ajouter un grain de NaHSO₃ (sensible à l'humidité) au 30 mL de tampon phosphate pour réduire la cytochrome c. Ajouter une très faible quantité de bisulfite de sodium quitte à en rajouter par la suite.
- Faire buller de l'air doucement pendant 5 minutes afin d'oxyder l'excès de NaHSO₃.
 Le NaHSO₃ sous sa forme réduite pourrait réduire la cytochrome c qui est oxydé par l'enzyme cytochrome c oxydase lors de la réaction enzymatique et pourrait ainsi empêcher le déroulement de la réaction enzymatique.

207

3) Solution stock de K₃Fe(CN)₆ 33%; poids moléculaire = 329,26 g/mol)

Le $K_3Fe(CN)_6$ est un accepteur d'électron qui doit être placé seulement dans les cuvettes de références afin d'oxyder la cytochrome c.

- Dissoudre 0,165 g dans 500 μ L de tampon phosphate.

4) Solution CCO avec K₃Fe(CN)₆ 0,33 % pour les cuvettes de références

- Ajouter 101 μ L de K₃Fe(CN)₆ 33 % à 10 mL de cytochrome c 0,07 mM.

7.9.2 Mesure de l'activité enzymatique au spectrophotomètre

- Ouvrir le spectrophotomètre et le laisser réchauffer 10 minutes.
- Mesurer l'absorbance d'une solution CCO sans K₃Fe(CN)₆ à des longueurs d'onde de 550 et de 565 nm.

Le rapport de l'absorbance à 550 nm (pic d'absorbance de la ferrocytochrome c ou cytochrome c réduite) sur celle à 565 nm (ferricytochrome c ou cytochrome c oxydé) doit être plus grand que 9. Sinon, il faut rajouter du NaHSO₃. Si le ratio est plus petit que 9, remettre un grain de NaHSO₃ (très peu) dans la solution de cytochrome c et refaire buller 5 minutes. Cependant, s'il y a trop de NaHSO₃, la pente de la réaction risque d'être très faible ou encore positive au lieu de négative indiquant une réduction de la cytochrome c par le NaHSO₃ au lieu d'une oxydation de la cytochrome c par la CCO.

- Ouvrir le programme KINETICS.
- Remplir six cuvettes de référence (numéro 7 à 12) avec 1 mL de solution CCO + K₃Fe(CN)₆

- Mettre 900 μL de solution CCO sans K₃Fe(CN)₆ et 100 μL d'homogénat d'algue ou de fraction subcellulaire dans les cuvettes de 1 ml pour échantillons (dilution 1 : 10 si trop dilué faire dilution 1 : 5).
- Mesurer la diminution de l'absorbance (disparition de la ferrocytochrome c) à 550 nm (coefficient d'extinction = 19,1 mmol⁻¹ cm⁻¹) sur une période de 5 minutes à température ambiante.

La CCO oxyde la ferrocytochrome c en ferricytochrome c. On suit la disparition dans le temps de la ferrocytochrome c (forme réduite de la cytochrome c). La pente de la réaction devra donc être négative.

7.10 : Protocole de dosage de la citrate synthase (CS) (EC 4.1.3.7)

7.10.1 Préparation des solutions

A1) Tampon Tris-HCl (100 mM) : 12,114 g de Tris base pour 1 L d'eau milli-Q (121,14 g mol⁻¹).

* se conserve à 4 °C pendant un mois

A2) Tampon Tris-HCl ajusté : 250 mL de tampon Tris-HCl pour lequel on ajuste le pH à 8,0 avec de l'acide.

* se conserve à température ambiante pendant 1 mois

B) Acétyl-CoA 4 mM : 0,0032 g d'acétyl-CoA (809,6 g mol⁻¹) pour 1 mL de Tris-HCl ajusté.

* se conserve 2 jours

C) Oxaloacétate 6 mM : 0,008 g d'oxaloacétate (132,1 g mol⁻¹) pour 1 mL de Tris-HCl ajusté.
* se conserve 2 jours

D) DTNB 10 mM : 0,004 g de DTNB (396,36 g mol⁻¹) pour 1 mL de Tris-HCl ajusté.
* se conserve 2 jours

7.10.2 Procédure

Conditions : 690 µL Tris-HCl ajusté 50 µL Acetyl-CoA 10 µL DTNB 200 µL d'homogénat Laisser stabiliser le témoin 2 minutes et mesurer ensuite l'absorbance à 412 nm pendant 5 minutes (témoin).

Activité : ajout de 50 μ L d'oxaloacétate

L'activité de la CS est suivie à 412 nm afin de détecter le transfert de groupements thiols du CoASH au DTNB (coefficient d'extinction = 13,6 mmol⁻¹ cm⁻¹) pendant 5 minutes à température ambiante. La pente de la réaction sera donc positive puisque l'on mesure l'apparition du DTNB-SH dans le temps.

7.10.3 Principe du dosage enzymatique

L'enzyme citrate synthase réagit avec l'acétyl-CoA qui perd notamment un groupement thiol. Cette réaction permet la réaction de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate (substrat de la réaction) pour former le citrate (produit de la réaction). Le groupement thiol perdu par l'acétyl-CoA se lie au DTNB et on évalue l'activité enzymatique en dosant l'augmentation de la formation du DTNB-SH en fonction du temps.

7.11 : Protocole d'exposition au Cd et mesure des peptides thiolés ainsi que de la distribution intracellulaire du Cd chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*

7.11.1 Préparation des milieux d'exposition

- Faire 1 L de milieu de culture MHSM-1 (composition décrite dans les articles 1 et 2 de ce mémoire).
- Ajouter 1 mL de solution AAP ainsi que l'EDTA 10⁻³ ou 10⁻⁴ M (dilué dans MHSM-R de composition décrite dans les articles 1 et 2), le Cd chaud et/ou froid.
- Attendre 24 heures et ajuster le pH à 7,0.
- Prélèvement de 1 mL du milieu pour dosage au compteur gamma et / ou à l'ICP pour valider la concentration de Cd visée dans les milieux d'exposition.

7.11.2 Exposition au cadmium

- Préparer environ 800 mL de culture de *C. reinhardtii* (deux cultures de 400 mL inoculées à environ 40 000 cell./mL) et 200 mL de culture de *P. subcapitata* (une culture de 200 mL inoculé à environ 40 000 cell./mL) pour pouvoir inoculer, respectivement, environ 25 et 80 erlenmeyers de 100 mL.
- Récolter les cellules vers la fin de la phase exponentielle de croissance (2 jours pour C. reinhardtii et 3 jours pour P. subcapitata) par centrifugation (20 000 g, 19-21 °C, 10 minutes).
- Rinçage avec environ 10 mL de milieu de culture sans AAP (MHSM-R).
- Répéter cinq fois le cycle de centrifugation et de rinçage (1 centrifugation de 10 min. et quatre autres de 5 min.).

L'étape de rinçage sert à enlever les différents ligands présents dans le milieu de culture (EDTA, exsudats d'algue) pouvant influencer la spéciation du cadmium en solution dans nos milieux d'exposition (Boily, 2004).

- Resuspension dans 5 à 10 mL MHSM-R.

- Inoculation de cellules dans quatre milieux (deux pour les thiols et deux pour la distribution intracellulaire pour *C. reinhardtii*) ou trois (deux pour les thiols et un pour la distribution intracellulaire pour *P. subcapitata*) de 100 mL par réplicat pour atteindre une densité initiale de 40 000 cell/mL.
- Exposition pendant 3 jours (72 heures) pour *C. reinhardtii* et 4 jours (96 heures)
 pour *P. subcapitata* afin d'avoir une bonne densité d'algues à la fin et d'atteindre le début de la phase stationnaire.

7.11.3 Calculs de radioactivité

L'activité du cadmium radioactif était mesurée avec un compteur gamma (Wallac 1480 WizardTM 3"). L'efficacité de comptage du ¹⁰⁹Cd pour les différents vials utilisés fut premièrement déterminée en triplicat à partir d'une dilution de la source radioactive originale. Pour ce faire, 2 mL fut placé dans les flacons à scintillation de 5 mL (Opticlear, borosilicate, 5 mL) et les tubes à ultracentrifugation de 2,5 mL. L'efficacité du compteur était de 49,1 \pm 0,6 % pour les flacons à scintillation et de 80,9 \pm 0,3 % pour les tubes à ultracentrifugation. Le temps de comptage était ajusté afin d'obtenir une erreur sur l'activité relativement faible (\leq 5 %). La fenêtre pour mesurer les désintégrations du Cd était restreinte entre 16 et 36 keV (pic principal à 22 keV).

Le signal gamma obtenu avec le compteur était converti afin de déterminer la concentration totale de Cd dans les échantillons. En premier lieu, les comptes par minute (CPM) étaient transformés en désintégrations par minut (DPM) en divisant les CPM par l'efficacité du compteur (%). Les DPM étaient ensuite converties en nCi en les divisant par 2220 (2220 DPM / nCi) puis transformées en concentration totale de l'élément (nmol) en utilisant l'activité spécifique du cadmium (Amersham ; 0,03 μ Ci / μ mol). L'activité spécifique corrigée du cadmium est déterminée, dans un premier temps, à partir de l'activité spécifique initiale fournie par Amersham en corrigeant pour la décroissance radioactive selon l'équation 2.1 :

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

où N est l'activité à un temps t, N_o est l'activité initiale et $t_{1/2}$ est la demi-vie du radioisotope (¹⁰⁹Cd = 462,3 jours). La quantité totale de cadmium (nmol) était obtenue à partir de l'activité mesurée en utilisant l'activité spécifique corrigée. Cette dernière devait tenir compte de toute dilution isotopique. Ce rapport isotopique correspond au taux de dilution du cadmium chaud (¹⁰⁹Cd) avec du cadmium froid (¹¹²Cd).

7.11.4 Récolte des algues et mesure de la répartition subcellulaire du Cd

7.11.4.1 Mesure de la densité cellulaire en fonction du diamètre et du diamètre moyen

- Centrifuger 200 ou 100 mL de culture par réplicat (20 000 g, 19-21 °C, 10 minutes) dans des tubes à centrifugation de 500 mL.
- Décanter jusqu'à ce qu'il reste environ 25-30 mL de milieu (jusqu'à ce que le surnageant touche au culot et que l'on voit un peu d'algues être resuspendues afin de pas perdre trop d'algues).
- Transvider dans des tubes à centrifugation de 35 mL et centrifuger une deuxième fois (20 000 g, 19-21 °C, 5 minutes).
- Décanter le surnageant et resuspendre le culot dans 10 mL EDTA 10⁻⁴ M et attendre 10 minutes afin d'enlever les métaux adsorbés sur les cellules.
- Centrifuger pendant 5 minutes (20 000 g, 19-21 °C).
- Effectuer deux autres centrifugations en resuspendant dans environ 10 mL de milieu MHSM-R après avoir enlevé le surnageant soigneusement avec une pipette afin de bien rincer les algues.
- Resuspendre le culot final dans 2,5 mL de MHSM-R.
- Mesurer la densité cellulaire après une dilution dans l'Isoton d'un facteur d'environ 1/1000 pour C. reinhardtii et 1/4000 pour P. subcapitata.

7.11.4.2 Mesure de la répartition subcellulaire du Cd

- La densité cellulaire sera d'environ 50×10^6 cell/mL pour *C. reinhardtii* et d'environ 200×10^6 cell/mL pour *P. subcapitata*.
- Transférer 2 mL dans un flacon pour compteur gamma et déterminer la quantité de Cd intracellulaire à partir de l'activité de ¹⁰⁹Cd.
- Transférer environ 2,4 mL de solution dans un flacon de polypropylène (PP) de 7
 mL et sonifier 4 minutes (22 W, fréquence = 0,2 sec/sec).
- Conserver l'homogénat pour les centrifugations différentielles (voir schéma article
 2 où 800 g = 5000 RPM; 10 000 g = 14 000 RPM; 100 000 g = 43 000 RPM;
 50 000 g = 30 000 RPM).
- Effectuer les différentes centrifugations dans des tubes pour ultracentrifugation de 3 mL.
- Mettre les culots directement dans le compteur gamma afin de mesurer le ¹⁰⁹Cd.
- Pipeter le surnageant en touchant le moins possible au culot (appuyer la pointe de l'embout de pipette du côté opposé au culot) et transférer dans un autre tube à centrifugation pour continuer les centrifugations ou encore dans un flacon pour compteur gamma pour le dosage du ¹⁰⁹Cd dans les fractions.

7.11.5 Mesure des peptides thiolés

7.11.5.1 Récolte des cellules et extraction des thiols

- Récolte des cellules (200 mL de culture par réplicat).
- Première centrifugation avec des tubes de 500 mL (20 000 g, 19-21 °C, 10 minutes).
- Décanter jusqu'à ce qu'il reste environ 25-30 mL de milieu.
- Deuxième centrifugation (10 000 g, 19-21 °C, 5 minutes) dans des tubes de 35 mL.
 La deuxième centrifugation doit être moins rapide et moins longue que la première afin de pouvoir resuspendre sans trop de difficulté le culot d'algues dans 500 μL
 HCl / DTPA. Si la centrifugation est trop intense, les algues, en particulier *P*.

subcapitata adhérant davantage aux tubes que *C. reinhardtii*, seront difficiles à resuspendre et devront être vortexées longtemps ce qui pourrait risquer de faire éclater une partie des cellules.

Resuspension dans 500 μ L HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM) et conserver à 4 °C.

L'acide empêche l'oxydation des groupements thiols (par protonation des groupements thiols) et enlève les métaux liés aux phytochélatines (Ahner, 2005 comm. pers.). De plus, l'acide peut entrer dans les cellules et altérer la structure tridimensionnelle des protéines et des enzymes telles les protéases pouvant altérer la structure des phytochélatines *in vitro* lors de l'homogénéisation (Le Faucheur, 2003 non publié).

Prélever 100 μ L et mesurer la densité cellulaire au compteur de particules en fonction du diamètre ainsi que le diamètre moyen pour calculer l'aire et le volume moyen.

Extraction (chauffage 2 min. à 90 °C).

Le chauffage des cellules sert à compléter la dénaturation des protéases (Ahner *et al*, 1995). Les phytochélatines sont stables jusqu'à 95 °C dans l'acide (Le Faucheur, 2003 non publié). Le chauffage et la resuspension dans l'acide briserait la presque totalité des cellules (% de récupération du GSH < 10 % environ lors de la deuxième extraction ; voir article 1).

 Centrifugation (20 000 g, 10 minutes, 4 °C) dans des flacons Spin-X ou eppendorfs et récolte du surnageant.

7.11.5.2 Dérivatisation au mBrB

7.11.5.2.1 Préparation des solutions

Les solutions étaient préparées 2 à 3 jours avant chaque dérivatisation.

➤ HCl / DTPA (0,1 M / 5 mM):

- Mettre 0,985 g de DTPA dans un ballon de 500 mL avec de l'eau milli-Q.
- Dissoudre dans un bain sonificateur ou sur une plaque chauffante pour accélérer la dissolution.

- Ajouter 4,11 mL de HCl concentré.
- Compléter à 500 mL avec de l'eau milli-Q.

> NaOH 10 M :

- Dissoudre 4 g de NaOH dans 10 mL d'eau milli-Q.

Tampon HEPPS / DTPA (200 mM / 5 mM ; pH = 8,2) :

- Mettre 49,169 mg de DTPA dans un ballon de 25 mL avec un peu d'eau milli-Q.
- Dissoudre dans bain sonificateur ou sur une plaque chauffante.
- Ajouter 1,2615 g de HEPPS.
- Ajouter 319 μ L de NaOH 10 M.
- Compléter à 25 mL et ajuster le pH avec NaOH 10 M.

TCEP 0,7 mM :

Dissoudre 6-12 mg de TCEP (286,65 g/mol) dans 5 ml de tampon HEPPS /
 DTPA et faire une deuxième dilution avec ce même tampon pour atteindre un volume final de 5 mL.

▶ mBrB 10 mM :

Dissoudre 2,71 mg de mBrB dans 1 mL d'ACN 100 %.
 Couvrir la solution de papier d'aluminium, car le mBrB est sensible à la lumière et conserver dans une bouteille de verre.

> MSA 1 M :

- Ajouter 283 µl de MSA concentré à 4 mL d'eau milli-Q.

> Cystéine 100 mM :

Dissoudre 121,152 mg de cystéine à 10 mL de HCl / DTPA.
 Conserver cette solution recouverte de papier d'aluminium.

7.11.5.2.2 Protocole de dérivatisation (optimisé par Le Faucheur, 2003 non publié)

Ajouter 140 μL de TCEP 0,7 mM dilué dans du tampon HEPPS / DTPA, pH
8,2, à 50 μL de surnageant ou de solution étalon.

Le DTT est remplacé par le TCEP, car le pic du DTT gène la quantification du pic de phytochélatine n = 3 (Sneller *et al.*, 2000).

L'addition du tampon (pH = 8,2) permet à la solution de conserver un pH basique optimal pour la réaction subséquente avec le mBrB (Le Faucheur, 2005 non publié).

Le tampon HEPPS / DTPA contient un excès d'un fort agent chélateur (DTPA) permettant aux métaux de ne pas se lier à nouveau aux phytochélatines à un pH élevé (Ahner, 2005 comm. personnelle).

 Vortexer et laisser reposer 20 minutes pour réduire la cystéine et les ponts disulfures du glutathion oxydé (GSSG) formés lors de la préparation de l'homogénat.

Le glutathion comme la plupart des peptides contenant de la cystéine se trouve sous deux formes en équilibre : forme réduite GSH et forme oxydée GS-SG (la forme réduite étant généralement largement majoritaire chez des cellules non contaminées). Lorsqu'on ajoute un agent réducteur comme le TCEP ou le DTT, celui-ci réduit tous les ponts disulfures et les groupements thiols oxydés et on peut donc doser tous les groupements thiols des cystéines présentes et non pas seulement les groupements présents à l'état réduit.

 - 20 μL de mBrB 10 mM dissous dans l'acétonitrile est ajouté au mélange en absence de lumière lorsque possible.

Le mBrB est la sonde fluorescente se liant aux groupements thiols réduits. Il permet la détection ultérieure des molécules par fluorimétrie.

- Vortexer et laisser reposer 10 minutes.
- Ajouter 20 μL de cystéine 100 mM.
- Vortexer et attendre encore 10 minutes.

L'ajout de cystéine permet de lier le mBrB en excès et de diminuer les pics interférents du mBrB sur le chromatogramme.

 Ajout de 20 µL de MSA 1 M pour stopper la réaction entre le réactif mBBr et l'échantillon.

L'échantillon peut être conservé à 4 °C pendant 4 semaines jusqu'aux analyses à l'HPLC (décrites dans l'article 2) (Morelli et Scarano, 2001).

7.12: Reproductibilité dans le temps de la prise en charge et de la répartition intracellulaire du Cd chez *Pseudokirchneriella subcapitata*

Les mesures de distribution intracellulaire du Cd pour différentes concentrations d'exposition au Cd ont dû être réalisées lors de multiples expériences espacées à un intervalle d'une ou deux semaines. En effet, il n'était pas possible de faire en une seule journée de travail l'ensemble des manipulations nécessaires pour déterminer la répartition du Cd dans les 4 ou 5 fractions subcellulaires isolées par centrifugation différentielle pour plus de deux concentrations d'exposition de Cd. De plus, les échantillons ne pouvaient pas être congelés pour analyses ultérieures puisque nous pensions qu'il était fort probable que ce traitement affecterait l'intégrité des organites. Par exemple, des mitochondries isolés à partir de tissus de poissons congelés seraient considérablement brisées (<30% de mitochondries intacts) sur la base de tests enzymatiques tels la citrate synthase (Dominique Lapointe, comm. pers.). La reproductibilité dans le temps des mesures de distribution intracellulaire et aussi de prise en charge se devait donc d'être testée afin de voir si les résultats obtenus pouvaient être bien comparés.

Tableau 7.7 : Quotas intracellulaires de Cd (amol Cd/cell) mesurés chez P. subcapitata exposé à 43 nM Cd²⁺ pendant 96 heures pour trois expériences réalisées séparément à une ou deux semaines d'intervalles. L'erreur pour chaque expérience représente l'écart-type calculé à partir de trois expositions réalisées avec des cultures d'algues indépendantes.

Quotas intracellulaires
amol Cd/cell
10,4 ± 1,4
20,5 ± 2,9
19,3 ± 3,1

La variation inter-expériences de la prise en charge du Cd fut relativement importante chez *P*. *subcapitata* (Tableau 7.7). En effet, les quotas intracellulaires pouvaient varier de presque un facteur 2. Cependant, la distribution relative du Cd intracellulaire s'est révélée (étonnamment) reproductible pour les trois expériences réalisées (figure 7.14). Il n'y avait pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les différentes expériences (p>0,05; ANOVA). Même si la proportion de Cd dans la fraction HSP pour l'expérience 3 semblait être inférieure à celles obtenues pour les deux autres expériences, la différence n'était pas significative étant donné le grand écart-type obtenu pour cette proportion de Cd intracellulaire.



Fractions subcentulaires

Figure 7.14 : Distribution relative du Cd intracellulaire (%) chez P. subcapitata exposé à 43 nM Cd²⁺ pendant 96 heures pour trois expériences réalisées séparément à une ou deux semaines d'intervalles. Les barres d'erreur sur le graphique représentent l'écart-type calculé à partir de trois expositions réalisées avec des cultures d'algues indépendantes pour chaque expérience.

7.13 : Rapports entre les concentrations de thiols induits et le Cd intracellulaire ou associé à la fraction HSP chez Chlamydomonas reinhardtii et Pseudokirchneriella subcapitata

À l'intérieur de l'article 2 de ce mémoire, des ratios entre les concentrations de phytochélatines totales avec ou sans les peptides X_n et le Cd intracellulaire ou associé à la fraction HSP ont été effectués. Cependant, étant donné qu'une certaine quantité de phytochélatines et de peptides Xn fut mesurée chez les cultures témoins, le potentiel du Cd à induire la synthèse de ces peptides ne pouvait être établi quantitativement. Les niveaux de base de peptides thiolés ont donc été soustraits des concentrations de peptides mesurées chez les deux espèces et des ratios entre la somme de ces peptides induits et le Cd intracellulaire ou associé à la fraction HSP furent calculés. L'écart-type associé à ces ratios est devenu cependant très élevé dû à la propagation d'erreurs (Tableaux 7.8 et 7.9). Malgré cette grande incertitude, les ratios « SH(PCn)total : HSP Cd » ou « SH(PCn)total : Cdintr » chez P. subcapitata suggèrent quand même une synthèse de phytochélatines en excès par rapport à la concentration nécessaire pour séquestrer le Cd puisque, pour les expositions à des concentrations de Cd^{2+} < 149 nM, ces ratios (Tableau 7.9) montrent des concentrations de phytochélatines produites largement supérieures à ce qu'il serait nécessaire pour séquestrer le Cd.. En effet, une stochiométrie de liaison entre les groupements thiols des phytochélatines et le Cd in vitro serait de 4 : 1 pour une coordination tétrahédrique selon l'étude de Strasdeit et al. (1991) ayant utilisé une technique d'EXAFS (extended X-ray absorption fine structure). Kneer et Zenk (1997) font quant à eux état d'un rapport SH : Cd variant entre 3 : 1 et 1,9 : 1 pour des complexes Cd-phytochélatines isolés de cultures cellulaires de la plante, Rauvolfia serpentina. Cependant, Ahner et al. (2002) ont mesuré des ratios SH : Cd de 30 à 80 fois supérieurs à la concentration nécessaire pour une complexation directe des ions Cd chez une diatomée marine, Thalassiosira pseudonana. Cette synthèse excédentaire de phytochélatines en réponse au Cd pourrait être expliquée par le fait que le Cd, chez quelques espèces phytoplanctoniques comme P. subcapitata, ne doit pas nécessairement faire partie des substrats et des produits de la réaction de la phytochélatine synthase (PCS) et que les molécules de phytochélatines produites peuvent permettre la synthèse d'autres molécules de

phytochélatines (Oven *et al.*, 2002). Ainsi, la réaction ne peut être rétro-inhibée par une séquestration du Cd dans les produits de la réaction.

Les ratios entre la somme des phytochélatines et des peptides X_n et le Cd associé à la fraction HSP chez les deux espèces exposées à la plus forte concentration de cadmium (221 nM Cd²⁺) se rapprochent cependant de 4 : 1 tel qu'observé par Strasdeit *et al.* (1991) suggérant que la synthèse excédentaire de peptides thiolés aurait lieu seulement à des concentrations relativement faible de Cd (43 nM et moins). Cette synthèse de phytochélatines plus grandes que ce qu'il en faut à des concentrations représentatives du milieu naturel pourrait représenter un mécanisme adaptatif de détoxication afin de permettre à la cellule de séquestrer d'éventuels ions Cd plus efficacement lors d'une augmentations toxiques et, du même coup, rarement rencontré en nature, la cellule pourrait avoir de la difficulté à séquestrer directement le Cd par les phytochélatines peut-être à cause d'une inhibition de leur synthèse ou encore de leur « excès » moins important et d'un débordement de leur capacité détoxifiante. Cette dernière interprétation demeure cependant appuyée par des résultats malheureusement très variables. Des études complémentaires devraient donc être réalisées pour la valider ou non.

pendant 72 heures. [SH(PCn)total] : [PC1-6]; [SH(PCn)total+Xn]= [PC1-6]+[X1-6]; Cdint = Cadmium intracellulaire; HSP Cd **Tableau 7.8**: Ratios thiols induits : Cd (amol SH/amol Cd) chez *C. reinhardtii* exposé à différentes concentrations de Cd²⁺ libre

1211		
•	ction	
ę	6.1 C	
1		
	2 9 2	2
	0006	
ł	2	

X _n]:[HSP Cd]	Écart-type	14,1	0 '0	2,1	0,4	1,0
[SH(PC _n) _{total} +	Moyenne	2,3	11,4	4,1	2,5	3,6
a]:[HSP Cd]	Écart-type	11,9	7,6	1,6	0,2	0,7
[SH(PC _n) _{tot}	Moyenne	1,8	11,1	3,4	1,5	2,5
I+Xn]:[Cdintr]	Écart-type	4,0	2,0	0,5	0,2	0,6
[SH(PC _n)tota	Moyenne	0,7	2,3	1,1	1,5	2,3
total]:[Cdintr]	Écart-type	3,4	1,5	0,4	0,1	0,4
[SH(PC _n)	Moyenne	0,5	2,2	0,9	6'0	1,6
[Cd ²⁺]	Mu	0,7	6,0	43,0	149,0	221,0

pendant 96 heures. [SH(PCn)total] : [PC1-6]; [SH(PCn)total+Xn]= [PC1-6]+[X1-6]; Cdintr = Cadmium intracellulaire ; HSP Cd Tableau 7.9 : Ratios thiols induits : Cd (amol SH/amol Cd) chez P. subcapitata exposé à différentes concentrations de Cd libre

=Cd associé à la fraction HSP.

+Xn]:[HSP Cd]	Écart-type	42,9	17,5	2,0	1,7	0,5
[SH(PC _n) _{total} ⁴	Moyenne	42,0	50,5	15,5	5,6	3,5
a]:[HSP Cd]	Écart-type	40,0	17,2	2,0	1,7	0,5
[SH(PC _n) _{tot}	Moyenne	44,0	50,3	15,5	5,6	3,5
¹ ,+Xn]:[Cdintr]	Écart-type	15,9	4,8	0,3	1,2	0,2
[SH(PC _n)tota	Moyenne	15,6	16,5	5,5	2,9	2,0
otal]:[Cdintr]	Écart-type	14,9	4,7	0,3	1,2	0,2
[SH(PC _n)	Moyenne	16,3	16,5	5,5	2,8	2,0
[Cd ²⁺]	Nn	0,7	6,0	43,0	149,0	221,0

224

7.14 : Aire et biovolume moyen calculé à l'aide d'un microscope et d'un compteur de particules

<u>7.14.1 Objectif</u>

Vérifier si l'aire et le volume algal moyen sont similaires lorsque calculés avec deux techniques différentes, soit le compteur de particules ou le microscope.

7.14.2 Manipulations

Des gouttes d'une culture de *C. reinhardtii* et de *P. subcapitata* âgées de 3 et 4 jours respectivement furent montées sur lame et observées à l'aide d'un microscope relié à un ordinateur. Dix cellules de chaque espèce furent mesurées à l'aide du logiciel d'acquisition d'images. Contrairement à Hillebrand *et al.* (1999), *C. reinhardtii* n'avait pas une forme sphérique. Les cellules étaient plutôt ovale (prolate sphéroïde) présentant un ratio longueur / largeur d'environ 1,5. La longueur et la largeur furent notées et l'aire et le volume furent calculés à l'aide des formules décrites par Hillebrand *et al.* (1999) pour un prolate sphéroïde. *P. subcapitata* avait une forme de cylindre courbée avec laquelle on pouvait former un demicercle si l'on reliait les deux extrémités du cylindre. On pouvait ensuite former un cercle à l'aide de deux de ces demi-cercle Les mesures de diamètre et de rayon du cercle ont été utilisées afin de déterminer la longueur du cylindre fut aussi mesuré. L'aire et le volume de dix cellules cylindriques furent ensuite déterminés à l'aide de la longueur du cylindre et du diamètre de la section à l'aide de formules pour une forme cylindrique décrite dans Hillebrand *et al.* (1999).

Parallèlement à ces mesures microscopiques, chacune des cultures d'algues utilisées pour chaque espèce fut analysée au compteur de particules afin de déterminer l'aire et le volume moyen des cellules.

7.14.3 Résultats et discussion

Tableau 7.10 : Aire et volume moyen de cultures d'algues témoins de *C. reinhardtii* et de *P. subcapitata* calculés à l'aide de deux techniques, soit le compteur de particules et le microscope. L'erreur représente l'écart-type sur dix et trois mesures pour, respectivement, le microscope et le compteur de particules.

	C. rein	hardtii	P. subc	capitata
	Aire	Volume	Aire	Volume
	μm²	μm³	Mm ²	μm³
Compteur de particules	74,2 ± 5,0	60,1 ± 6,1	41,4 ± 1,5	25,2 ± 1,6
Microscope	71,3 ± 12,7	41,1 ± 9,2	38,7 ± 9,3	8,8 ± 3,3

Les mesures d'aire moyenne calculées à l'aide du microscope ou du compteur de particules n'étaient pas significativement différentes (p > 0,05) pour les deux espèces quoiqu'elles semblaient un peu plus faibles en moyenne (sans tenir compte des écarts-types) avec le microscope (Tableau 7.10). Cependant, le compteur de particules surestimait significativement d'environ 32 (p = 0,04) et 65 % (p < 0,01) le volume moyen cellulaire de *C. reinhardtii* et de *P. subcapitata* respectivement par rapport à la mesure de volume au microscope.

Le compteur de particules calcule l'aire et le volume à l'aide du diamètre moyen des particules qu'ils présument sphériques. La similitude des mesures d'aire moyenne pourrait donc s'expliquer par le fait que l'aire d'une sphère amènerait une relativement bonne approximation de l'aire d'un prolate sphéroïde ou d'un cylindre et que les grandes erreurs associées aux mesures microscopiques ne permettent de déclarer une quelconque surestimation de l'aire par le compteur de particules. Pour ce qui est des mesures de volumes cellulaires, il se peut que les formules utilisées pour calculer le volume d'une sphère approximent moins bien le volume d'un prolate sphéroïde ou d'un cylindre permettant de faire ressortir la surestimation du volume moyen calculé avec le compteur de particules.

Il est aussi possible que les 10 réplicats réalisés avec le microscope ne couvrent pas bien toute la gamme de dimension des cellules comparativement au 10^6 réplicats en trois occasions du compteur de particules. Les écarts-types obtenus avec les mesures microscopiques sont en effet plus élevés que ceux associés aux mesures prises avec le compteur de particules. Les cellules de très grandes ou petites tailles ont pu influencer davantage l'écart-type sur 10 mesures que sur plus de 10^6 mesures. Il est donc possible que le compteur de particules surestime aussi l'aire des cellules dans un moindre étendu que le volume des cellules, mais que le trop faible nombre de mesure au microscope empêche de déclarer un effet significatif entre les deux techniques de mesure.

Théoriquement, l'aire et le volume d'un prolate sphéroïde ou d'un cylindre courbé en forme de demi-cercle doivent être plus faibles que ceux d'une sphère. Nous aurions donc dû mesurer une surestimation des mesures faites avec le compteur de particules comparativement à celles réalisées avec le microscope. Même si l'expérience réalisée n'a pu que démontrer que le volume moyen cellulaire est surestimé avec le compteur de particules, probablement à cause du faible nombre de réplicats pour les observations microscopiques, une étape de plus a été franchie afin d'obtenir des mesures d'aires et de volumes cellulaires plus précises. Il serait donc important de corriger au moins les mesures de volume moyen réalisées au compteur de particules. Cette correction pourra cependant grandement affecter les résultats tels des concentrations de peptides exprimés en fonction du volume cellulaire, et ce, surtout chez P. subcapitata.

D'autres études seraient nécessaires afin de confirmer la surestimation des mesures d'aires moyennes avec le compteur de particules. Il serait intéressant de réaliser la comparaison entre les deux techniques de mesure chez plusieurs espèces phytoplanctoniques si possible, mais en utilisant cette fois un plus grand nombre de réplicats pour les observations microscopiques.

7.15 Références

- Ahner, B.A., Kong, S., Morel, F.M.M. 1995. Phytochelatin production in marine algae.
 An interspecies comparison. Limnol Oceanogr 40, 649-657
- Ahner, B.A., Wei, L.P., Oleson, J.R., Ogura, N. 2002. Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. Mar Ecol Prog Se. 232, 93-103
- Boily, F. 2004. Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise, INRS-ÉTÉ. Québec, Qc. Canada
- 4. Branson Ultrasonics Corporation, 2005. Instruction manual of the sonifier (Model 250/450). 100-413-016 Danburry, CT, USA, p.4-3
- Day, J.G., Brand, J.J. 2005. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. Dans: Anderson, R.A. (ed). Algal culturing techniques. Chapitre 12, 165-187, Academic Press, Elsevier, ME, USA
- Deault, J. 2005. Résumé des travaux de laboratoire et des travaux connexes réalisés au cours de la maîtrise de recherche. Rapport pour les cours EAU 302 et EAU 303. INRS-ETE, Québec, Qc, Canada
- Eixler, S., Selig, U. et Karsten, U. 2005. Extraction and detection methods for polyphosphate storage in autotrophic planktonic organisms. Hydrobiologia. 533, 135-143
- Hillebrand, H., Duerselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollingher, U., Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J Phycol 35, 403-424
- 9. Kneer, R., Zenk, M.H. 1997. The formation of Cd-Phytochelatin complexes in plant cell cultures. Phytochem 44, 69-74

- Lavoie, M. 2004. Évaluation de l'efficacité d'un agitateur-vortex à micro-billes visant à homogénéiser les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Pseudokirchneriella subcapitata*. Rapport de stage. INRS-ÉTÉ. Québec, Qc. Canada
- 11. Le Faucheur, S. 2003. Non publié. Analysis of phytochelatins by RP-HPLC. Informal document. EAWAG. Dübendorf, Suisse, 9 p.
- Markelova, A.G., Vladimirova, M.G., Kuptsuva, E.S. 2000. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. Russ J Plant Physl+ 47, 815-819
- 13. Morelli, E., Scarano, G. 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaedactylum tricornutum*. Mar Environ Res 52, 383-395
- Oven, M., Page, J.E., Zenk, M.H., Kutchan, T.M. 2002. Molecular Characterization of the Homo-phytochelatin Synthase of Soybean <u>Glycine max</u>. J Biol Chem 277, 4747-4754
- Painting, K., Kirshop, B. 1990. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. World J Microb Biot 6, 346-347
- 16. Pimenova, M.N., Zhdannikova, E.N., Maksimova, I.V. 1965. Identification of living and dead cells in cultures of protococcal algae. Microbiologica 34, 1080-1085
- 17. Sneller, F.E.C., Heerwaarden, L.M. van, Koevoets, P.L.M., Vooijs, R., Schat, H., Verkleij, J.A.C. 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. J. Agric. Food Chem. 48, 4014-4019
- Strasdeit, H., Duhme, A.-K., Kneer, R., Zenk, M.H., Hermes, C., Nolting, H.-F. 1991.
 Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 16, 1129-1130