



Université de Montréal

**Effet du calcium, plomb et cuivre sur la bioaccumulation du  
cadmium et la production des phytochélatines par  
*Chlamydomonas reinhardtii***

par

Pauline Abboud

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

en Chimie

Mai, 2012

© Pauline Abboud, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Effet du calcium, plomb et cuivre sur la bioaccumulation du  
cadmium et la production des phytochélatines chez les  
*Chlamydomonas reinhardtii***

Présenté par :

Pauline Abboud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Chaurand, président-rapporteur

Kevin J Wilkinson, directeur de recherche

Sébastien Sauvé, membre du jury

## Résumé

Dans les milieux contaminés par les métaux, les organismes vivants sont exposés à plusieurs d'entre eux en même temps. Les modèles courants de prédiction des effets biologiques des métaux sur les organismes (p. ex., modèle du ligand biotique, BLM ; modèle de l'ion libre, FIAM), sont des modèles d'équilibre chimique qui prévoient, en présence d'un deuxième métal, une diminution de la bioaccumulation du métal d'intérêt et par la suite une atténuation de ses effets. Les biomarqueurs de toxicité, tels que les phytochélatines (PCs), ont été utilisés comme étant un moyen alternatif pour l'évaluation des effets biologiques. Les phytochélatines sont des polypeptides riches en cystéine dont la structure générale est  $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-Gly}$  où  $n$  varie de 2 à 11. Leur synthèse semble dépendante de la concentration des ions métalliques ainsi que de la durée de l'exposition de l'organisme, aux métaux. L'objectif de cette étude était donc de déterminer, dans les mélanges binaires de métaux, la possibilité de prédiction de la synthèse des phytochélatines par les modèles d'équilibres chimiques, tel que le BLM. Pour cela, la quantité de phytochélatines produites en réponse d'une exposition aux mélanges binaires : Cd-Ca, Cd-Cu et Cd-Pb a été mesurée tout en surveillant l'effet direct de la compétition par le biais des concentrations de métaux internalisés. En effet, après six heures d'exposition, la bioaccumulation de Cd diminue en présence du Ca et de très fortes concentrations de Pb et de Cu (de l'ordre de  $5 \times 10^{-6}$  M). Par contre, avec des concentrations modérées de ces deux métaux, le Cd augmente en présence de Cu et ne semble pas affecté par la présence de Pb. Dans le cas de la compétition Cd-Cu, une bonne corrélation a été observée entre la production de PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub> et la quantité des métaux bioaccumulés. Pour la synthèse des phytochélatines et la bioaccumulation, les effets étaient considérés comme synergiques. Dans le cas du Cd-Ca, les quantités de PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub> ont diminué avec le métal internalisé (effet antagoniste), mais ce qui était remarquable était la grande quantité de cystéine (GSH) et PC<sub>2</sub> qui ont été produites à de fortes concentrations du Ca. Le Pb seul n'a pas induit les PCs. Par conséquent, il n'y avait pas de variation de la quantité de PCs avec la concentration de Pb à laquelle les algues ont été exposées. La détection et la quantification des PCs ont été faites par chromatographie à haute performance couplée d'un détecteur de fluorescence (HPLC-FL). Tandis que les concentrations métalliques intracellulaires ont été analysées par spectroscopie

d'absorption atomique (AAS) ou par spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS).

**Mots-clés** : phytochélatines, bioaccumulation, *C. reinhardtii*, cadmium, HPLC-FL, AAS et ICP-MS.

## Abstract

In contaminated environments, organisms are often exposed to multiple contaminants at the same time. Based upon the current models for predicting metal effects on organisms (e.g., Biotic Ligand Model, BLM, the free ion model, FIAM), the presence of a second metal is predicted to decrease the bioaccumulation and biological effects of the first. In contrast to this prediction, antagonistic, synergistic and additive effects have been well documented in the literature. Phytochelatins (PCs) are a family of thiol-rich peptides with a general structure  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  with  $n=2-11$ . PCs are involved in both metal homeostasis and the protection of plants from metal toxicity, through their role as metal chelators. Their synthesis depends upon the metal exposure, the duration of exposure and the biological species involved. Therefore, the objective of this study was to determine, in binary mixtures of metals, if the synthesis of phytochelatins could be predicted using equilibrium models, such as the BLM. The study initially examined binary mixtures: Cd-Ca, Cd-Pb and Cd-Cu by comparing the quantity of internalized metal to the amount of phytochelatins produced by *Chlamydomonas reinhardtii* in response to a metal stress. The bioaccumulation results, after six hours of exposure, showed that Cd decreased in the presence of Ca and very high concentrations of Pb and Cu. In contrast, it increased in the presence of Cu and remained unchanged in the presence of moderate concentrations of Pb. For mixtures of Cu and Cd, a good correlation was observed between the production of PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> and the quantity of internalized metals. Both bioaccumulation and phytochelatin synthesis were considered to be synergistic. For mixtures of Cd and Ca, the amount of PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> produced decreased with the internalized metal (antagonistic effect); however, in the presence of added Ca, GSH and PC<sub>2</sub> production was much higher than predicted. The detection and quantification of the PCs were performed using an optimized protocol for high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FL); metal uptake was determined using atomic absorption spectrometry (AAS) or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

**Keywords** : phytochelatins, bioaccumulation, *C. reinhardtii*, cadmium, HPLC-FL, AAS et ICP-MS

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abbreviations.....	x
Remerciements.....	xii
Introduction.....	13
1. CONTEXTE DE LA RECHERCHE.....	13
1.1 Rôles et concentrations des métaux dans l'environnement.....	13
1.2. Spéciation et interaction des métaux avec les organismes vivants.....	15
1.3. Effets des métaux – biomarqueurs de toxicité.....	20
1.4. Objectifs de l'étude.....	28
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	29
2.1. Choix de l'organisme : <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	29
2.2. Milieu de culture des algues.....	30
2.3. Milieu d'expérience.....	31
2.4. Détermination de la bioaccumulation.....	32
2.5. Dosage des phytochélatines par HPLC.....	35
2.6. Viabilité cellulaire.....	38
3. OPTIMISATION.....	39
3.1. Optimisation du dosage des phytochélatines.....	39
3.1.1. Stabilité des phytochélatines.....	39
3.1.2. Choix de la phase mobile.....	40
3.1.3 Choix de la méthode de dérivation.....	45
3.1.4. Effet de la matrice sur le signal fluorescent des étalons des PCs.....	46

3.1.5. Domaine de linéarité du dosage.....	47
3.2. Optimisation de l'exposition des algues aux métaux.....	48
3.2.1. Temps d'exposition du métal.....	49
3.2.2. Isolation des algues par centrifugation ou filtration.....	50
3.2.3. Densité algale (volume d'exposition).....	51
3.2.4. Concentration du métal d'intérêt.....	52
3.2.5. Extraction des Phytochélatines.....	53
3.3. Conclusion.....	54
4. ARTICLE.....	55
Présentation de l'article.....	55
Abstract.....	57
Keywords.....	57
Brief.....	57
4.1 Introduction.....	58
4.2 Materials and Methods.....	59
4.2.1 Culture condition.....	60
4.2.2 Metal exposures.....	60
4.2.3 Bioaccumulation analysis.....	61
4.2.4 Phytochelatin analysis.....	61
4.2.5 HPLC analysis.....	62
4.2.6 Cellular viability.....	62
4.3 Results.....	62
4.3.1 Single metals.....	62
4.3.2 Binary mixtures of metals.....	63
4.4 Discussion.....	68
4.5 Environmental implications.....	73
4.6 Acknowledgments.....	73
4.7 Supporting information.....	74



Conclusion ..... 76  
Bibliographie..... xiii

## Liste des tableaux

Tableau I.1. Classification de quelques métaux et métalloïdes selon leurs réactivités envers le soufre, l'oxygène et l'azote [9].	15
Tableau I.2. Classification des peptides du type <i>PCs-like</i> produites chez différents organismes [40, 69].	24
Tableau I.3. Résumé des techniques analytiques pour la détermination des PCs.	26
Tableau II.1. Composition du milieu de croissance TAP+MT	30
Tableau II.2. Paramètres du spectromètre d'absorption atomique à four graphite.	33
Tableau II.3. Paramètres d'analyse du ICP-MS.	34
Tableau II.4. Profil de gradient de concentration des phases.	38
Tableau III.1. Proportion des phytochélatines restantes à des différentes températures.	40
Tableau III.2. Résultats de l'optimisation partielle de la phase mobile (MeOH et eau) permettant la séparation des phytochélatines par HPLC à phase inversée.	43
Tableau III.3. Comparaison des produits nécessaires pour la dérivatisation des PCs selon les deux principales méthodologies [66, 96].	45
Tableau III.4. Domaine de linéarité de PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> et PC <sub>4</sub> .	48

## Liste des figures

Figure 1.1. Répartition des métaux selon leur abondance biogéochimique dans l'environnement [6].	14
Figure 1.3 : Concept général du FIAM ( <i>free ion activity model</i> ) et du BLM ( <i>biotic ligand model</i> ). Modifié de [7, 24].	17
Figure 1.4 : Structure du glutathion [50].	20
Figure 1.5 : Schéma représentant la synthèse et le cycle redox du glutathion [54].	21
Figure 1.6 : Schéma représentant la bioaccumulation et la séquestration du cadmium par les PCs dans une cellule végétale [62].	23
Figure 1.7 : Schéma représentant la séquestration du cadmium par les groupements sulfures présents dans les cystéines d'une phytochélatine.	24
Figure 2.1. Observation microscopique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [93].	29
Figure 2.2. Inoculation d'une culture de <i>C. reinhardtii</i> .	31
Figure 2.3. Étapes requises pour l'analyse des métaux dissous et bioaccumulés.	33
Figure 2.4. Isolation d'algues à la suite d'une exposition aux métaux.	35
Figure 2.5. Étapes requises pour l'extraction des thiols.	36
Figure 2.6. Étapes requises pour la dérivation des thiols.	37
Figure 3.1. Stabilité de PC <sub>3</sub> en fonction de la condition d'entreposage.	40
Figure 3.2. Profile de séparation et de détection des phytochélatines en utilisant deux solvants organiques différents (a) l'ACN et (b) le Me-OH. Le débit était de 1mL/min. (i) représente le pic de la cystéine et (ii) est un dérivé du mBrB.	41
Figure 3.3. Profile de séparation et de détection des phytochélatines en utilisant le MeOH comme phase mobile pour un débit de 0.5mL/min.	42
Figure 3.4. Chromatogramme de la séparation et de détection des phytochélatines en utilisant les conditions du gradient « optimisées » de Me-OH/eau (Tableau 3.1). Les analyses ont été faites à deux concentrations différentes de PCs : (a) 100 µg/mL; (b) 1 mg/mL. Le débit de la phase mobile était de 1 mL/min.	44

Figure 3.5. Comparaison des signaux fluorescents pour des solutions identiques de PCs, obtenus selon les deux principales méthodes de dérivatisation.....	46
Figure 3.6. Effet de la matrice (algale) sur des étalons des PCs.....	47
Figure 3.7. Courbe de calibration de PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> et PC <sub>4</sub> .....	48
Figure 3.8. Variation de la concentration du Cd dissous en fonction du temps.....	49
Figure 3.9. Synthèse de PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> et PC <sub>4</sub> en fonction du temps en réponse à une exposition à 10 <sup>-6</sup> M du Cd <sup>2+</sup> .....	50
Figure 3.10. Effet de la densité cellulaire sur (a) la concentration du Cd dissous et (b) la concentration du Cd internalisé.....	51
Figure 3.11. Induction des PCs à la suite des expositions à différentes concentrations de Cd <sup>2+</sup> .....	52
Figure 3.12. Trois modes d'extraction des PCs des algues.....	53
Figure 4.1. Phytochélatins produced by <i>C. reinhardtii</i> after a 6 hours of exposure to various concentrations of (a) Cd <sup>2+</sup> , (b) Cu <sup>2+</sup> and (c) Pb <sup>2+</sup> .....	63
Figure 4.2. (a) Intracellular Cd concentrations (mol/cm <sup>2</sup> ) and (b) PC concentrations (PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> and PC <sub>4</sub> ) produced in the presence of 5x10 <sup>-7</sup> M Cd <sup>2+</sup> and a range of Ca <sup>2+</sup> concentrations.....	65
Figure 4.3. (a) Intracellular Cd concentrations (mol/cm <sup>2</sup> ) and (b) PC concentrations (PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> and PC <sub>4</sub> ) observed in the presence of 5x10 <sup>-7</sup> M Cd <sup>2+</sup> over a wide range of Pb <sup>2+</sup> concentrations.....	66
Figure 4.4. (a) Intracellular Cd (mol/cm <sup>2</sup> ) and (b) PC concentrations (PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> and PC <sub>4</sub> ) observed in the presence of 5x10 <sup>-7</sup> M Cd <sup>2+</sup> and a range of Cu <sup>2+</sup> concentrations.....	67
Figure 4.5. Observed phytochelatin concentrations in the Cu-Cd (black circles) and Pb-Cd (red triangles) mixtures as a function of predicted values.....	70
Figure 4.6. Observed phytochelatin concentrations observed after an exposure to 5x10 <sup>-7</sup> M Cd <sup>2+</sup> .....	72
Figure 4.7. Viability of the cells as given by the formazan production of the viable cells in the presence of 5x10 <sup>-7</sup> M Cd <sup>2+</sup> and a range of (a) Pb <sup>2+</sup> (b) Cu <sup>2+</sup> .....	74
Figure 4.8. Intracellular metal concentrations for (a) Pb and (b) Cu as a function of the free ion concentrations in the bulk solution at a fixed Cd <sup>2+</sup> concentration of 5x10 <sup>-7</sup> M.....	75

## Liste des abréviations

AAS	Spectroscopie d'absorption atomique
ACN	Acétonitrile
ANOVA	analyse de variance
BLM	Modèle des ligands biotiques
C <sup>z+</sup>	Métal compétiteur
Cys	Cystéine
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
FIAM	Modèle de l'ion libre
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GSH	Glutathion
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC-FL	Chromatographie à haute performance couplée d'un détecteur de fluorescence
ICP-MS	Spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif
Mz+	Métal d'intérêt
mBrB	monobromobimane
MeOH	Méthanol
MSA	acide métasulfonique
PCn	Phytochélatine avec n = 2, 3, 4...
PCs	Phytochélatines
PCS	Phytochélatine synthétase
R <sup>2</sup>	Coefficient de corrélation
TAP+MT	<i>Tris</i> (acétate-phosphate) avec métaux trace
TAP-MT	<i>Tris</i> (acétate-phosphate) sans métaux trace
TCEP	<i>Tris</i> (2-carboxyethyl) phosphine

*Connaître son ignorance est la meilleure part de la  
connaissance - **Proverbe chinois***

## Remerciements

Je tiens à remercier profondément mon directeur de recherche, Kevin J. Wilkinson, pour sa confiance et son encadrement exceptionnel durant la réalisation de ce long projet. Tes conseils judicieux, ta patience et ton encouragement m'ont grandement servi à accomplir cette recherche avec succès. J'aimerais également te dire à quel point je suis reconnaissante de ta grande disponibilité durant mes années d'études et surtout pour la relecture des documents que je t'ai adressés. Merci infiniment !

Je remercie également les personnes et les stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer durant mes études. Merci pour les filles : Dana, Roxane, Elena, Zohree, Rute, Feng, Maya, Léo, Aude et les Caroline Hoang et Peyrot. Merci aussi pour les gars, pour toute votre sympathie et votre bonne humeur que vous avez entretenues dans le lab : Madjid, Faraz, Simon, Vlad, Philippe, Chen, Thomas, Sixian, Mohammed et Francis.

Je tiens aussi à remercier mes parents et mes beaux parents qui habitent dans l'autre bout du monde. Merci pour votre appui et votre encouragement même s'ils étaient à distance. Je remercie surtout ceux qui habitent au Canada : Rannia, Pascal, Mona, Stephanie et Sarah-Jane. Je vous aime beaucoup !

En terminant, un merci exceptionnel à mon mari Ziad et mes rayons du soleil Marilynne et Maroun. Sans vous, je ne serais pas qui je suis. Ziad, tu sais à quel point je t'aime et je tiens à toi. Merci pour ton écoute, ta générosité et ton soutien constant. Merci pour tout.

# Introduction

Les activités anthropiques peuvent déposer et mobiliser les métaux dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, ce qui augmente leur concentration au-delà des niveaux naturellement observés. L'exposition des organismes vivants à de telles concentrations peut générer, chez eux, une certaine toxicité. Dans la majorité des études [1, 2], les formes ioniques d'un métal sont considérées comme étant les formes les plus biodisponibles pour les organismes et par la suite ils sont fortement corrélés aux effets biologiques dus aux métaux. Dans ce contexte, plusieurs modèles ont été formulés tels que celui de l'ion libre (FIAM) et celui des ligands biotiques (BLM). Ces modèles relient la biodisponibilité et la bioaccumulation (internalisation) des métaux aux observations d'effets toxiques. Pour évaluer la toxicité, plusieurs biomarqueurs sous-létaux sont mis en œuvre; y compris la quantification des phytochélatines. Les phytochélatines sont des polypeptides synthétisés pour complexer les métaux indésirables et réguler leurs concentrations dans l'organisme. Dans cette étude, la bioaccumulation des métaux est reliée à la synthèse des phytochélatines afin de mieux prédire la toxicité des mélanges de métaux.

## 1. CONTEXTE DE LA RECHERCHE

### 1.1 Rôles et concentrations des métaux dans l'environnement

Les métaux sont naturellement répartis dans l'environnement. Leurs propriétés physiques telles que le lustre, la malléabilité, la ductilité et la conductivité thermique et électrique les caractérisent et les distinguent des autres éléments chimiques [3]. Les métaux traces, comme leur nom l'indique, se trouvent en faible abondance dans l'environnement (Figure 1.1). Leurs concentrations ne dépassent pas 1 mg/L ou 1 ppm [4]. Néanmoins, l'activité industrielle qui connaît un grand essor depuis le XIXe siècle a provoqué une concentration locale de ces métaux, ce qui a augmenté leur potentiel toxique quant aux organismes vivants [5]. Dans la littérature, différentes classifications existent afin de quantifier les effets biologiques des métaux. Ces classifications dépendent de certains critères tels que le caractère nutritionnel, la réactivité et l'abondance.



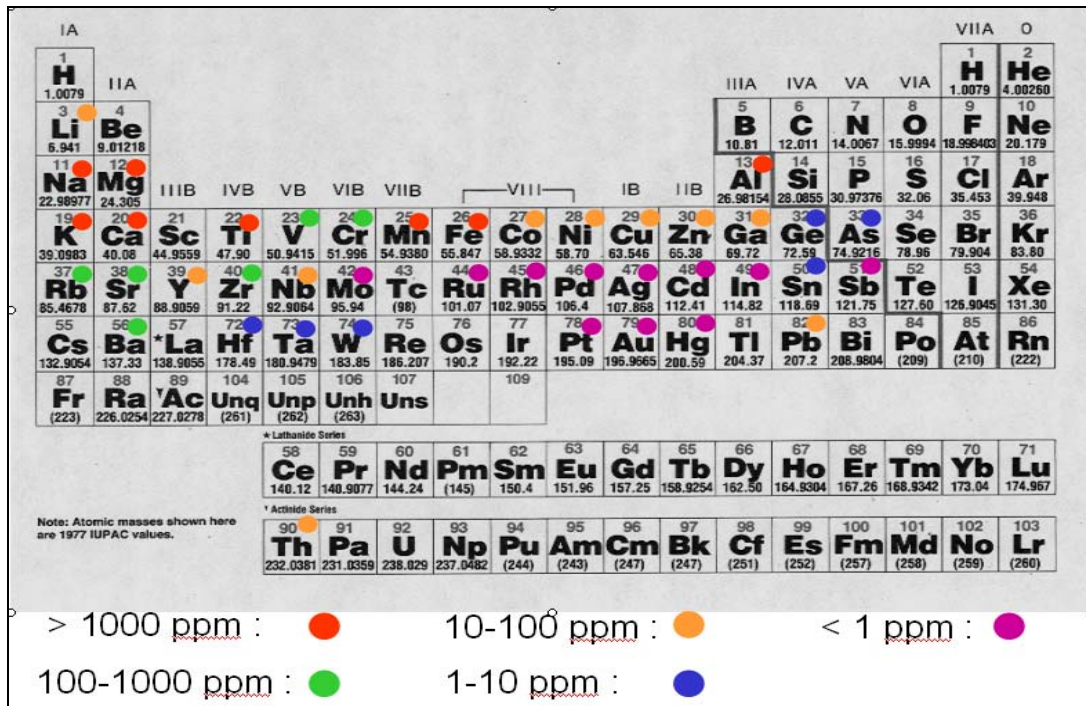


Figure 1.1. Répartition des métaux selon leur abondance biogéochimique dans l'environnement [6].

Certains métaux sont des micronutriments et d'autres n'ont aucun rôle essentiel. Les micronutriments (p. ex. Fe, Ni, Cu, Zn...) sont nécessaires à maintenir le métabolisme cellulaire, mais à de fortes concentrations, ils peuvent devenir toxiques. Les métaux non essentiels (p. ex. Cd, Hg, Pb...) ne semblent avoir, même à l'état de trace, un rôle biologique bénéfique. Plusieurs métaux ont tendance à former des complexes avec les ligands contenant le soufre, l'oxygène et l'azote dans des molécules tels que les acides aminés [7] entraînant, par la suite, une perturbation du fonctionnement cellulaire [8]. Ils sont souvent classés en trois groupes différents : les métaux en classe A qui sont les plus réactifs avec l'oxygène; les métaux en classe B qui préfèrent le soufre et l'azote et les métaux en classe C qui ont une affinité intermédiaire (Tableau I.1).

Tableau I.1. Classification de quelques métaux et métalloïdes selon leurs réactivités envers le soufre, l'oxygène et l'azote [9].

Classe A	Classe B	Classe C
Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cs <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Ga <sup>3+</sup> , Sc <sup>3+</sup> , Y <sup>3+</sup>	Tl <sup>+</sup> , Tl <sup>3+</sup> , Pb <sup>4+</sup> , Bi <sup>3+</sup> , Pd <sup>2+</sup> , Pt <sup>2+</sup> , Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Au <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Ga <sup>3+</sup> , In <sup>3+</sup> , Sn <sup>4+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , As <sup>3+</sup> , Sb <sup>3+</sup> , Ti <sup>2+</sup> , V <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>

Le cadmium est un métal trace, non essentiel. Sa source naturelle est volcanique. L'intérêt de ce métal réside surtout de son utilisation dans des domaines tels que la métallurgie (plaquage électrochimique), la fabrication des piles rechargeables, des pigments et des stabilisants pour les plastiques. Ces activités industrielles ont augmenté considérablement ses émissions dans l'environnement [5].

La toxicité du cadmium résulte de son affinité avec les ligands contenant le soufre, l'azote et l'oxygène. En effet, il interagit avec le métabolisme de trois métaux essentiels : le zinc, le calcium et le fer. Chez les plantes, une contamination en cadmium cause des dégâts au niveau de l'appareil photosynthétique, et par la suite, ralentit la croissance des plantes [10]. Chez l'être humain, la bioaccumulation du cadmium entraîne un mauvais fonctionnement des reins et favorise l'ostéoporose. Le plus inquiétant de ce polluant est sa durée de résidence dans le corps humain qui peut atteindre les 60 ans [11].

## 1.2. Spéciation et interaction des métaux avec les organismes vivants

En milieu aquatique, un métal peut exister sous différentes formes physiques (dissoutes, particulaires et colloïdales) et chimiques (ioniques complexées ou organiques). La spéciation d'un métal est définie comme étant la distribution quantitative des différentes formes chimiques et physiques

d'un métal. La spéciation est fonction de plusieurs variables physicochimiques telles que la température, la salinité, le pH, le potentiel redox, la concentration et la nature des ligands [12, 13]. Il est nécessaire de tenir compte de la spéciation chimique d'un métal afin d'évaluer sa biodisponibilité, sa bioaccumulation ainsi que sa toxicité envers les organismes vivants (Figure 1.2) [14, 15].

La membrane plasmique constitue l'interface entre l'environnement et l'organisme. En général, les effets toxiques ont lieu lorsqu'un métal est disponible pour un récepteur biologique à une dose appropriée et sous formes chimiques appropriées. Selon la littérature, la forme ionique est la forme la plus biodisponible d'un métal [2]. La somme de l'internalisation des métaux par les différentes voies de transport représente la bioaccumulation [16].

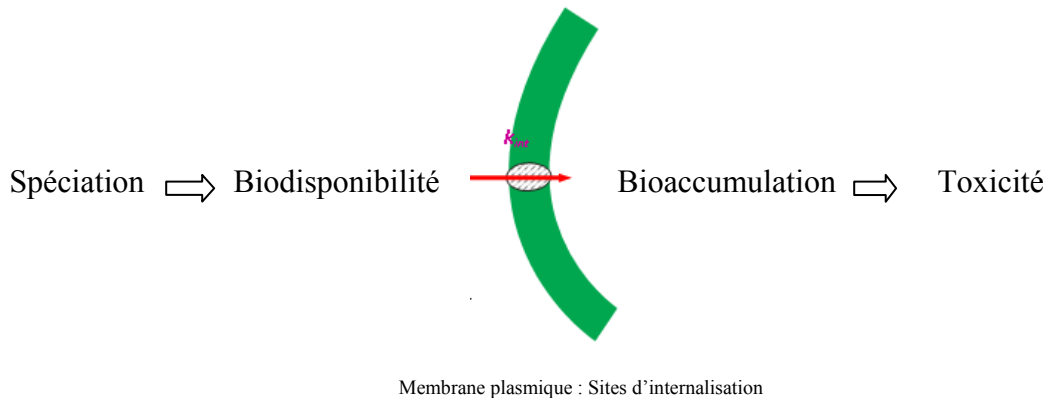


Figure 1.2 : Schématisation de l'interaction d'un métal avec l'organisme, menant à une toxicité.

La présence d'une forte corrélation entre la concentration de l'ion libre d'un métal et les effets biologiques observés a incité la formulation de divers modèles de prédiction de la biodisponibilité / toxicité. Parmi les modèles les plus étudiés, il y a le *Free Ion Activity Model* (FIAM) et le *Biotic Ligand Model* (BLM). Le FIAM a été interprété par Sunda [17], Payle [18], Campbell [19] puis Parker et Pedler [20] et réévalué par Brown et Markich [21]. Ce modèle est basé sur l'activité de l'ion libre en solution. Il traduit l'interaction du métal libre ( $M^{z+}$ ) chez un organisme en quatre étapes clés (Figure 1.3) : (1) transport de masse de l'ion métallique ( $M^{z+}$ ) et ses complexes hydrophiles (ML) en solution; (2) dissociation/formation des complexes métalliques en solution; (3) adsorption du métal sur la surface de l'organisme ( $M-R_{cell}$ ); (4) internalisation lente (limitante) du métal. En plus des étapes citées ci-

dessus, le BLM tient compte d'une manière explicite, de l'effet de compétition des ions avec les « ligands biotiques ». Les ligands biotiques peuvent être des sites de transport, des sites actifs sur des enzymes ou simplement des sites arbitraires. Comme c'est un modèle d'équilibres chimiques, plus la concentration de l'ion compétiteur est grande, moins il y a d'interactions des ions métalliques d'intérêt avec les sites sensibles [22, 23].

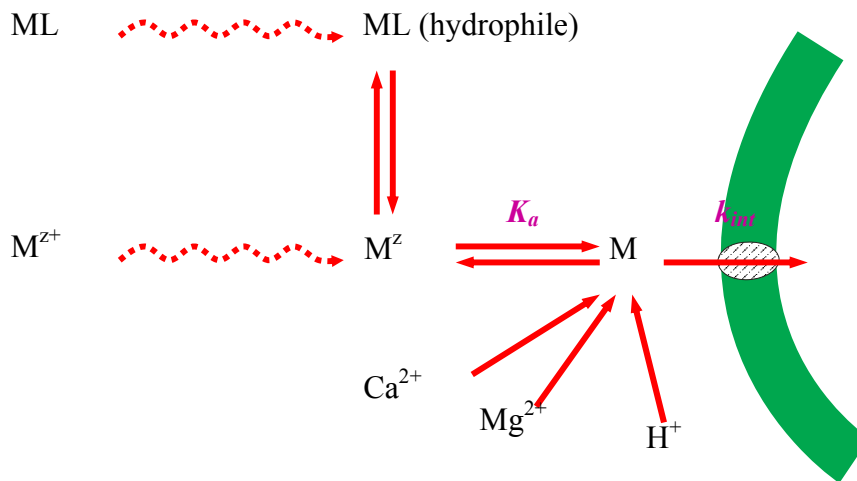


Figure 1.3 : Concept général du FIAM et du BLM. Modifié de [7, 24].

Pour les deux modèles, les fortes concentrations des métaux causent une saturation des sites de transport ou de bioaccumulation du métal. On peut tenir compte de la saturation des sites en appliquant une équation du type « Michaelis – Menten »:

$$J_{int} = \frac{J_{max} [M^{z+}]}{[M^{z+}] K_{M-Rs}}$$

Où  $J_{max}$  est le flux maximal d'internalisation qui a lieu lorsque les transporteurs sont saturés;  $K_{M-Rs}$  est la constante de Michaelis –Menten ou aussi la constante de demi-saturation qui correspond à la saturation de la moitié des transporteurs;  $[M^{z+}]$  est la concentration du cation libre en solution. Dans ce

cas, le paramètre limitant l'internalisation est le transport du métal à travers la membrane biologique. Si les concentrations de métaux sont inférieures à  $1/K_{M-Rs}$ , le flux d'internalisation  $J_{int}$  devrait être directement proportionnel à la concentration du métal libre en solution (correspondant à une cinétique de transfert du premier ordre).

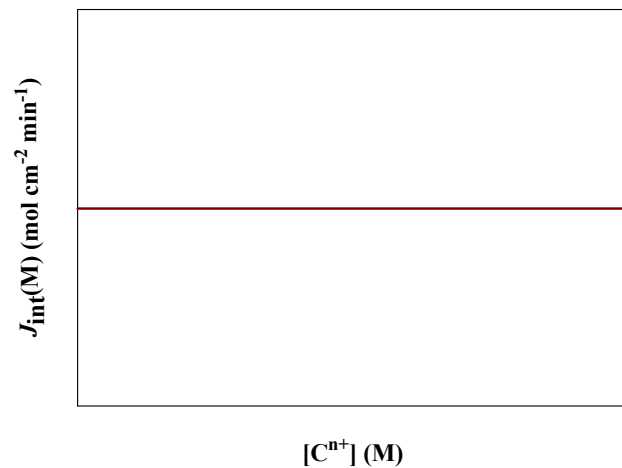
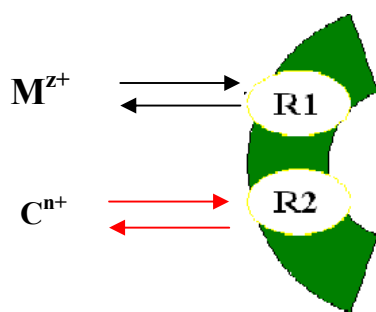
En présence d'autres métaux, il est possible de modifier l'équation de Michaelis-Menten afin de tenir compte d'une compétition au même site d'internalisation :

$$J_{int} = \frac{J_{max} [M^{z+}] K_{M-Rs}}{[M^{z+}] K_{M-Rs} + [C^{n+}] K_{C-Rs} + 1}$$

Où  $K_{C-Rs}$  est la constante de Michaelis –Menten de l'ion compétiteur;  $[C^{n+}]$  est la concentration de l'ion compétiteur libre en solution. Cette dernière équation nous amène à proposer trois hypothèses de recherche pour l'effet des métaux compétiteurs:

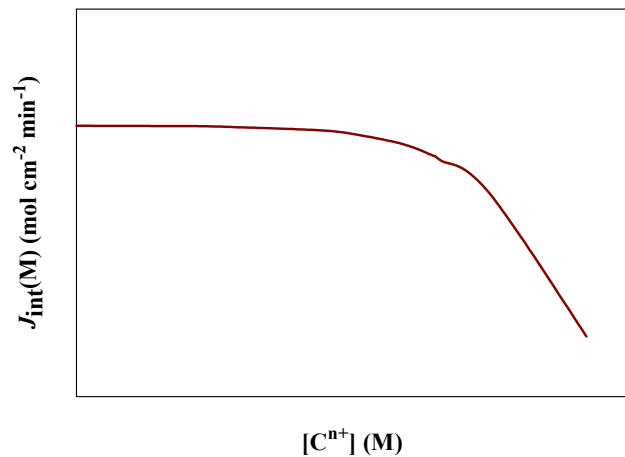
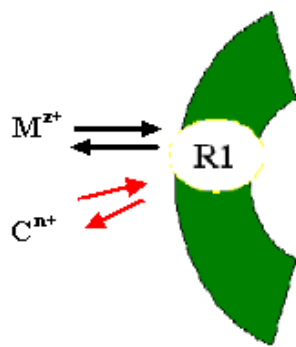
#### 1- Cas des cations indépendants :

Si l'internalisation du métal d'intérêt et celle du compétiteur se font par deux sites indépendants, le métal compétiteur n'a aucun effet sur le flux d'internalisation celui d'intérêt. Par conséquent, on prédit qu'aucun effet ne sera observé sur la bioaccumulation du métal d'intérêt et que les effets biologiques observés sont additifs.



## 2- Cas des cations en compétition :

Si l'internalisation du métal d'intérêt et celle du compétiteur se font par l'intermédiaire du même site de transport, la bioaccumulation du premier métal pourrait être affectée par la présence du compétiteur (bioaccumulation compétitive). Dans ce cas, on s'attendrait à des effets biologiques qui soient antagoniques (réduction quantitative de la toxicité) ou moins qu'additifs.



Néanmoins, ces modèles demeurent un sujet de débat, particulièrement pour leur application aux mélanges des métaux [25-32]. Une étude faite par Norwood et coll. [23] sur des résultats publiés concernant les mélanges des métaux montre que 43.5 % des cas présentent des effets antagonistes ou moins additifs, 27.2 % sont additifs et 29.3 % ont un effet plus qu'additif ou synergique. Dans la littérature, il n'y a aucun moyen précis pour l'interprétation de ces résultats, car le processus de bioaccumulation ou de toxicité est très complexe. Les métaux d'intérêts peuvent interagir avec les constituants du milieu d'exposition, les processus physiologiques et le (s) site (s) de toxicité. De même, il n'est toujours pas compréhensible de relier les effets biologiques à la bioaccumulation du métal.

### 1.3. Effets des métaux – biomarqueurs de toxicité.

Afin de se protéger des métaux toxiques et de maintenir une concentration optimale de micronutriments à l'intérieur de la cellule, les algues et les plantes ont développé diverses stratégies. Une de ses stratégies est la synthèse des biomolécules contenant des groupements fonctionnels à haute affinité tels que les groupes amines, les carboxyles et les thiols [33-38]. La haute affinité du groupement sulfureux aux Cd, Cu, Ag, Pb, *etc.* classe les métallothionéines, le glutathion (GSH) et les phytochélatines (PCs) parmi les chélateurs les plus efficaces des ions métalliques [39]. Ainsi, l'électronégativité de ce groupement (thiol) et la présence d'une multitude de méthodes de détection le classifient parmi les biomarqueurs de toxicité les plus étudiés [40-45].

**Les métallothionéines.** Les métallothionéines sont des protéines, riches en cystéines, de faible masse molaire (5 à 10 kDa). Elles sont présentes dans toute la chaîne alimentaire allant des bactéries jusqu'à l'être humain [46]. Elles ont été isolées pour la première fois chez les mammifères par Margoshes et Vallée en 1957 [47]. Les métallothionéines ont été classées en trois classes différentes où les phytochélatines font partie de la troisième classe [48]. Elles jouent un rôle important dans le contrôle homéostatique, le métabolisme et la détoxification d'un certain nombre de métaux tant essentiels (Cu, Zn) que toxiques (Cd, Hg) [49].

**Le glutathion.** Le glutathion (GSH) est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine :  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine (Figure 1.4)

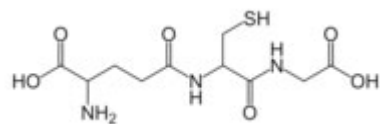


Figure 1.4 : Structure du glutathion [50].

Le glutathion est typiquement présent dans les cellules eucaryotes. Il forme des réservoirs importants de sulfures non protéiniques chez les animaux, plantes, algues et bactéries [51]. Dans

certaines tissus, sa concentration peut atteindre  $10^{-3}$  M [52]. La synthèse du glutathion a lieu dans les chloroplastes et le cytosol [53]. Elle nécessite la présence de deux enzymes : la  $\gamma$ -glutamyl-Cystéin-Synthétase ( $\gamma$ -ECS) et le Glutathion-Synthétase (GS). La première catalyse la formation de  $\gamma$ -glutamylcystéine ( $\gamma$ -EC), à partir de la cystéine et de l'acide glutamique et la deuxième active la formation du glutathion en additionnant la glycine au C terminal de  $\gamma$ -EC (étape 3 de la figure 1. 5).

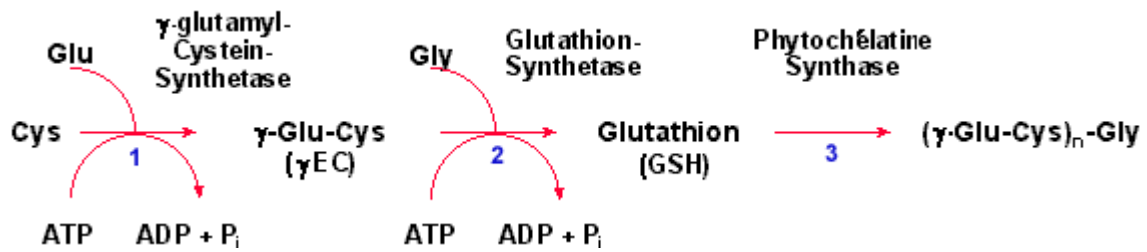
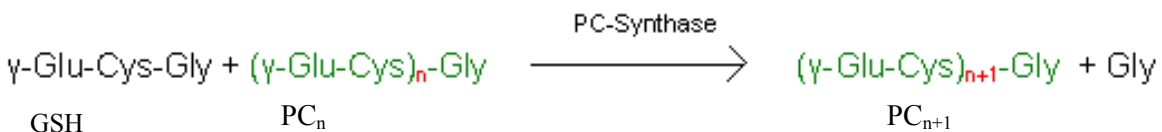


Figure 1.5 : Schéma représentant la synthèse et le cycle redox du glutathion [54].

L'échange entre les deux formes du glutathion (forme réduite : GSH et forme oxydée : GSSG) maintient l'équilibre redox à l'intérieur des compartiments cellulaires [55] et confère ainsi au glutathion le pouvoir d'être un antioxydant très puissant. Par conséquent, il défend l'organisme contre les radicaux libres et les dérivés oxygénés tel que le peroxyde d'hydrogène. De plus, le GSH constitue le substrat de la biosynthèse des phytochélatines (étape 3 de la figure 1.4).

**Les phytochélatines.** Les phytochélatines (PCs) sont des polypeptides intracellulaires non ribosomales, de faibles masses moléculaires (2 à 10 kDa). Elles étaient découvertes pour la première fois dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* [56-58] puis dans les plantes supérieures [59] et les algues [60, 61].

La structure générale des PCs est ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>Gly où n varie entre 2 et 11. Sa réaction de biosynthèse à partir du glutathion est représentée ci-dessous :





La détoxification et l'homéostasie des métaux par les PCs passent par plusieurs étapes (Figure 1.6). Une fois que les métaux sont bioaccumulés, ils peuvent activer la phytochélatine synthétase (PCS), l'enzyme responsable de la synthèse des PCs. Les PCs synthétisées séquestrent les ions métalliques en formant des complexes de faible poids moléculaire (*Low molecular weight Cd,S-complex* (LMW)) et les transportent activement vers la vacuole où ils se stabilisent, par l'addition des sulfures, en complexes de poids moléculaire plus important (*high molecular weight Cd,S-complex* (HMW)). L'acidité de la vacuole peut contribuer à la dégradation de ces complexes en acides aminés qui, à leur tour, migrent vers le cytoplasme. Les ions métalliques, quant à eux, peuvent être complexés de nouveau par les phytates et les acides polycarboxyliques présents dans la vacuole ou aussi migrer vers le cytoplasme.

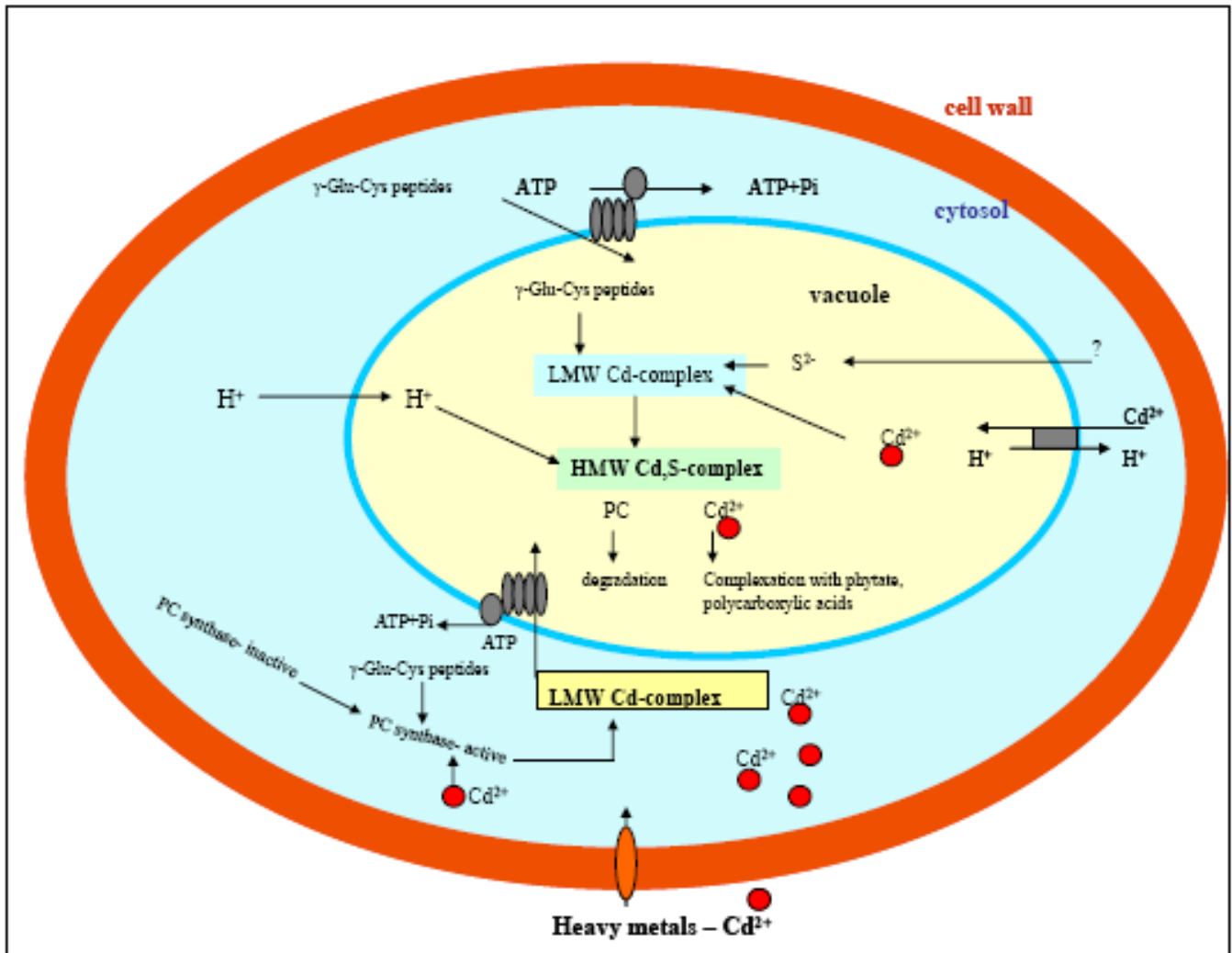


Figure 1.6 : Schéma représentant la bioaccumulation et la séquestration du cadmium par les PCs dans une cellule végétale [62].

La synthèse et le degré de polymérisation des PCs dépendent de quatre facteurs : la nature du métal, la concentration de sa forme ionique, l'espèce étudiée et le temps d'exposition. Dans des conditions contrôlées aux laboratoires sur les phytoplanctons, le Cd est considéré comme l'activateur principal des PCs, suivi de Cu, Zn, As, Hg, Cr, Co, Ag, Ni et Pb [35, 36, 63-66]. Pour un métal donné, plus le temps d'exposition est long ou la concentration est élevée, plus les PCs sont induites et leur

degré de polymérisation devient de plus en plus important, et cela, pour complexer le plus possible les métaux indésirables et former, par la suite, des complexes PC-métaux assez stables (Figure 1.7) [67, 68].

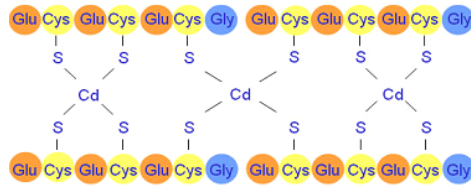


Figure 1.7 : Schéma représentant la séquestration du cadmium par les groupements sulfures présents dans les cystéines d'une phytochélatine.

En plus de la production des PCs, d'autres peptides analogues aux PCs (*PCs-like*) ont été identifiés (Tableau I.2). Structuralement, ces peptides ont le même motif de répétitions  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$  que celle des PCs avec une substitution de l'acide aminé terminal (Tableau I.2).

Tableau I.2. Classification des peptides analogues aux PCs (*PCs-like*) produites chez différents organismes [40, 69].

Type	Structure	Organisme	Précurseur
Homophytochélatine	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Ala}$	Légumes	Homoglutathione
Phytochélatine Déglyciné	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n$	Maïs, levures	
Hydroxyméthyl- phytochélatine	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Ser}$	Graminées	Hydroxymethylglutathione
iso-Phytochélatine (Glu)	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Glu}$	Maïs	Glutamylcysteinylglutamate
iso-Phytochélatine (Gln)	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gln}$	Raifort	

***Identification et détection des phytochélatines.*** Plusieurs méthodes sont utilisées pour la caractérisation des PCs seules ou des complexes métal-PC dans des différentes matrices (Tableau I. 3). Par exemple, pour quantifier le complexe PC – métal, des techniques telle que la spectroscopie d'ionisation par électro nébulisation couplée à la spectrométrie de masse (ESI-MS) ou à la spectrométrie de masse en tandem (ESI – MS / MS) ont été utilisées. La spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) et celle en tandem nécessitent une étape préliminaire de purification et d'isolation des PCs. Cette étape peut être effectuée soit par l'électrophorèse capillaire à zone (CZE), soit par chromatographie liquide (HPLC) à phase inversée ou par chromatographie par exclusion de taille (SEC). Ce genre de couplage offre une bonne sensibilité et des bons renseignements sur la structure des PCs, mais ils sont dispendieux.

Due à l'électronégativité du groupement thiol, il est possible d'avoir recours aux méthodes électrochimiques qui analyse directement les PCs sans effectuer l'étape de dérivatisation (Section 2.5). Parmi ces méthodes, il y a la voltampérométrie à redissolution cathodique (CSV) [70], la chronopotentiométrie par redissolution (SCP) ou la voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV).

Récemment, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été couplée à une électrode modifiée avec des nanotubes de carbone (HPLC-ED). Cette méthode offre une très bonne limite de détection de l'ordre de fmol avec un temps d'analyse relativement court. En 2010, la chromatographie liquide à ultra pression couplée à une spectrométrie de masse en tandem (UPLC – MS / MS) a été utilisée. Sa limite de détection est légèrement plus basse que celle de l'HPLC-ED. Elle peut être une très bonne technique de détection pour les PCs.

Tableau I.3. Résumé des techniques analytiques pour la détermination des PCs.

Technique utilisée	Matrice	Analyte	LOD <sup>(a)</sup> (nM)	Référence
Polarographie	<i>P. tricornutum</i> et <i>Agrostis capillaris</i>	PCs	–	[71]
CSV	Solutions standards	GSH, PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub>	–	[72]
SEC-ICP-MS	Plantes	PCs	10 000	[73]
HPLC-ICP-MS	Plantes	PCs	–	[74, 75]
HPLC-FL	Phytoplanctons	GSH, PC <sub>2</sub>	41.4, 37.3 <sup>(b)</sup>	[44]
HPLC-(UV-Vis)	Plantes	PCs	–	[76]
CE – (UV-Vis)	Échantillons biologiques	GSH, PCs	2500, --	[77]
SCP	<i>Nicotiana tabacum</i>	GSH, PC <sub>3</sub>	–	[78]
DPV	Solutions standards	PC <sub>2</sub>	–	[79]
ESI-MS	Solutions standards	PC <sub>4</sub>	–	[80, 81]
HPLC-ESI-MS/MS	<i>Datura innoxia</i> et <i>Vicia faba</i> et <i>Chlorella vulgaris</i>	GSH, PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub>	81, 440, 120	[82-84]
CZE-ICP-MS/MS	Riz ( <i>Oriza sativa</i> )	PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> , PC <sub>4</sub>	55.4, 142, 717	[85]
HPLC-ED	Maïs ( <i>Zea mays</i> L.)	GSH, PC <sub>2</sub> , PC <sub>5</sub>	1, 7, 519	[86, 87]
UPLC-MS-MS	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	GSH, PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub>	5.8, 5.1, 16.8	[88]

Glossaire : LOD : limite de détection ; CSV : voltampérométrie à redissolution cathodique ; SEC : chromatographie par exclusion de taille ; CE : l'électrophorèse capillaire ; ICP-MS : spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif ; MS-MS : spectrométrie de masse en tandem ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; FL : fluorescence ; CZE : électrophorèse capillaire de zone ; SCP : chronopotentiométrie par redissolution ; DPV : voltamétrie impulsionnelle différentielle ; ESI-MS : spectrométrie de masse d'ionisation électrospray ; ED : Détection électrochimique ; UPLC : Chromatographie liquide ultra performance

(a) valeurs tirées de la référence la plus récente. (b) Calculée.

Parmi les premières techniques qui étaient et sont encore très populaires est la HPLC à phase inversée couplée soit à un détecteur d'UV-VIS soit à un détecteur de fluorescence. Ces méthodes sont caractérisées par leur faible coût d'instrumentation, la facilité de manipulation et la possibilité d'automatisation par l'intermédiaire d'un échantillonneur automatisé. Souvent, la HPLC exige une étape supplémentaire qui est la dérivation des PCs. Selon le type de détecteur, la dérivation peut avoir lieu à différents moments. Avec le détecteur de spectrométrie UV-VIS, la dérivation se fait après la séparation des polypeptides (dérivation post-colonne). Le réactif utilisé, pour ce type de dérivation, est le 2,4-dinitrothiocyanatebenzène (DTNB). Le DTNB réagit avec le groupement sulfureux pour produire le 2-nitro-5-thiobenzoate dont son absorption maximale est à 410 nm [89]. Par contre, ce dérivé n'est pas suffisamment sensible pour la détection des PCs dans les phytoplanctons, mais il peut l'être dans le cas des plantes supérieures [66]. Avec le détecteur de fluorescence, une dérivation pré-colonne est nécessaire [66, 90]. Le fluorophore le plus communément utilisé est le monobromobimane (mBrB). Son dérivé absorbe à 380 nm et fluoresce à 470 nm. Une comparaison a montré que le mBrB est plus sensible que celui de DTNB. Aussi, le détecteur de fluorescence montre une meilleure sensibilité par rapport aux techniques basées sur l'UV-VIS. À tenir compte que ces deux agents ne sont pas spécifiques juste pour les PCs, mais pour n'importe quel composé contenant un groupement sulfureux.

Dans le cas de la fluorescence, d'autres fluorophores sont aussi utilisés tel que le 7-fluorobenzotriazole-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate d'ammonium (SBD-F) et le O-phthaldialdéhyde (OPA). L'utilisation de ces deux fluorophores est cependant limitée. L'OPA n'est stable que pour de courtes périodes de temps, inférieures à 3 heures [91]. De plus, des réactions secondaires peuvent avoir lieu avec les groupements aminés des peptides ce qui limite les analyses. Quant au SBD-F, il nécessite un détecteur de fluorescence très sensible avec des filtres optiques spécifiques. De même, son dérivé n'est stable que pour des durées limitées. Dans les conditions optimales d'entreposage, à 4 °C et à l'abri de la lumière, le dérivé de SBD-F reste stable pendant 10 jours. Tandis que celui du mBrB reste stable pendant six semaines [44].

Les PCs sont très sensibles à la température, à la lumière et à la présence des métaux en solution. En effet, la température facilite la dégradation de ces polypeptides grâce aux enzymes présents dans la matrice algale ; la lumière et les métaux favorisent l'oxydation des thiols réduits. D'où la nécessité de les manipuler à 4 °C, à l'abri de la lumière et d'ajouter des agents complexants des métaux tels que le DTPA et des agents de réduction (réduction des thiols oxydés) tels que le *dithiothreitol* (DDT) ou le *tris 2-carboxyethyl phosphine* (TCEP).

#### **1.4. Objectifs de l'étude**

L'objectif de cette étude est de vérifier la possibilité de prédiction de la synthèse des phytochélatines par le modèle des ligands biotiques (BLM), ou plutôt le modifier pour mieux prévoir les effets des mélanges de métaux. L'étude examinera la réponse d'une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, suite à une exposition au cadmium seul puis aux mélanges binaires des métaux : Cd – Ca, Cd - Cu et Cd - Pb. La bioaccumulation ainsi que la synthèse des phytochélatines ont été vérifiées afin de mieux comprendre le rôle de l'interaction des métaux sur leurs effets biologiques.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, seulement les détails expérimentaux qui n'ont pas été suffisamment approfondis dans l'article sont présentés.

### 2.1. Choix de l'organisme : *Chlamydomonas reinhardtii*

Greek : *chlamys*, cape ou couverture ; *monas* : unique, terme utilisé pour les organismes unicellulaires flagellés [92].



Figure 2.1. Observation microscopique de *Chlamydomonas reinhardtii* [93]. Échelle de 1  $\mu\text{m}$ .

*Chlamydomonas reinhardtii* est une algue unicellulaire. Son diamètre varie entre 1 et 10  $\mu\text{m}$ . Comme tout les autres organismes unicellulaires, elles ont une bonne capacité d'accumulation des métaux. Échelle correspond; leurs paramètres de croissance (taille, phase de croissance, surface et densité cellulaire) sont facilement contrôlables et mesurables en laboratoire; leur mise en culture est simple et rapide. Il y a plusieurs avantages d'avoir recours au *C. reinhardtii* pour les études environnementales : (i) elles sont à la base de la chaîne alimentaire; (ii) elles sont sensibles à de faibles concentrations de métaux; (iii) elles n'ont besoin que des éléments inorganiques et du gaz carbonique pour maintenir l'ensemble de leurs fonctionnements vitaux et surtout (iv) le génome de *C. reinhardtii* est totalement séquencé [94].



## 2.2. Milieu de culture des algues

La souche de *C. reinhardtii* utilisée pour cette étude a été obtenue du Centre de Chlamydomonas à *Duke University* (type sauvage WT-2137). L'algue a été cultivée sur une plaque 1.5 % d'agar afin de maintenir la viabilité des cellules. Pour rester le plus près possible des conditions environnementales, la plaque a été conservée pour un maximum d'un mois dans un incubateur à 20 °C, sous un cycle de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Un grain d'algues a été prélevé de la plaque d'agar par l'intermédiaire d'un fil de platine stérilisé à la flamme, puis transféré dans 100 mL d'un milieu de croissance TAP (Tris-Acétate-Phosphate) contenant des métaux traces (MT) (Tableau II.1). Cette culture liquide est appelée "Diaz 0".

Tableau II.1. Composition du milieu de croissance TAP+MT

Macronutriments (M)		Micronutriments (M)	
NH <sub>4</sub> Cl	1,75×10 <sup>-3</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,61×10 <sup>-5</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8,50×10 <sup>-5</sup>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,91×10 <sup>-5</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,01×10 <sup>-4</sup>	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6,40×10 <sup>-6</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,88×10 <sup>-4</sup>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,49×10 <sup>-6</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00×10 <sup>-4</sup>	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,70×10 <sup>-6</sup>
Tris	4,99×10 <sup>-3</sup>	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,58×10 <sup>-6</sup>
CH <sub>3</sub> COOH	4,85×10 <sup>-3</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,24×10 <sup>-6</sup>
		Na <sub>2</sub> ·EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,36×10 <sup>-5</sup>

Après 4 jours d'incubation, la Diaz 0 devrait atteindre la phase mi-exponentielle avec une densité cellulaire entre 1,5 et 3,0 millions de cellules par mL. Cette densité cellulaire a été mesurée par un compteur de particules (Multisizer III, Beckman Coulter). La culture a été diluée à 100 000 cellules par mL<sup>-1</sup> (volume total de 1 L) qui, à son tour, devraient atteindre la phase mi-exponentielle après 3 jours (Figure 2.2). Cette culture est appelée « Culture 1 ». Les deux cultures (Diaz 0 et Culture 1) ont

été incubées sous les mêmes conditions : une température de 20 °C, une agitation circulaire de 100 rpm et un cycle de 12 h lumière et 12 h obscurité (Infors HT, Multitron).

Afin d'éviter toute contamination, toute la verrerie a été préalablement trempée dans l'acide (0.1 % HNO<sub>3</sub>) durant 24 à 48 h puis rincée 6 fois avec de l'eau ultra pure (MilliQ). Les fioles, contenant le milieu de culture, sont ensuite stérilisées par autoclavage.

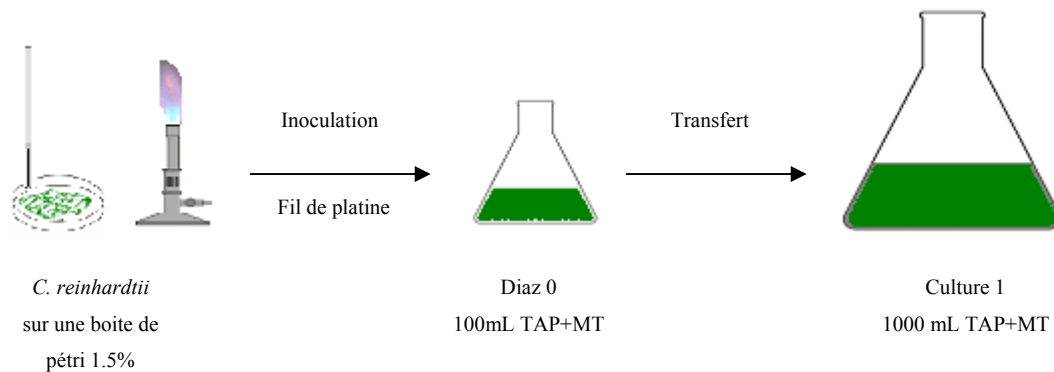


Figure 2.2. Inoculation d'une culture de *C. reinhardtii*.

### 2.3. Milieu d'expérience

Les algues de la culture 1 atteignant la phase exponentielle ont été centrifugées à 2150×g (4000 rpm, Multifuge 1SR, Heraeus) pendant 4 minutes. Le culot d'algues a été rincé deux fois avec une solution du milieu d'expérience (milieu TAP sans les métaux traces; TAP-MT) préalablement autoclavée et ajustée à un pH de 7. Finalement, le nombre de cellules de la solution concentrée et leurs volumes désirés ont été mesurés par un compteur de particules (Multisizer III, Beckman coulter).

Afin de prévoir les concentrations totales du métal à ajouter dans les différents milieux d'expérience, la spéciation chimique des métaux dans ces milieux a été calculée par le logiciel Visual MINTEQ 3.0 en tenant compte de tous les composants du milieu et des paramètres physico-chimiques

clés (pH = 7, température = 25 °C et force ionique =  $10^{-2}$  M). En utilisant ce logiciel, il est possible d'estimer la concentration du métal libre.

## 2.4. Détermination de la bioaccumulation

Les expériences de bioaccumulation ont été préalablement optimisées dans le groupe pour des expositions de courte durée (<1 h). Le besoin des expositions à plus long terme (6 h) exige des optimisations supplémentaires en ce qui concerne la densité cellulaire (voir chapitre optimisation - densité algal), et cela, afin d'assurer qu'aucune perte de métal ou modification de sa spéciation chimique n'ait lieu. Tous les milieux expérimentaux ont été équilibrés pendant 24 h avant l'exposition. À la suite de la mesure de la surface cellulaire des algues, un volume de la solution concentrée d'algues a été transféré vers le milieu d'exposition afin d'atteindre une faible densité cellulaire de  $0.15 \text{ cm}^2/\text{mL}$ . Après 6 h d'exposition aux métaux, la bioaccumulation a été arrêtée par l'ajout d'une solution d'EDTA (concentration finale =  $10^{-3}$  M). Ce traitement assure que tout le métal non internalisé par les algues (c'est à dire adsorbé sur les parois cellulaires des algues ou en solution) est complexé. La solution a ensuite été filtrée, par l'intermédiaire d'une unité de filtration, sur une membrane de nitrocellulose ( $3.0 \text{ }\mu\text{m}$ , Millipore) puis les bords de l'unité de filtration ont été rincés avec une solution de TAP-MT. Le filtre a été digéré avec de l'acide nitrique ultra pur 65 % à une température de 80 °C (four VWR, model 1324). Suite à la digestion, la solution a été diluée pour obtenir 1.95 % (v/v) d'acide nitrique. En ce qui concerne la détermination du métal dissous, la filtration d'un faible volume (p. ex. 10 mL) du milieu d'expérience s'est fait par l'intermédiaire d'une seringue et un petit porte - filtre (taille de membrane est de  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ ) (Figure 2.3).

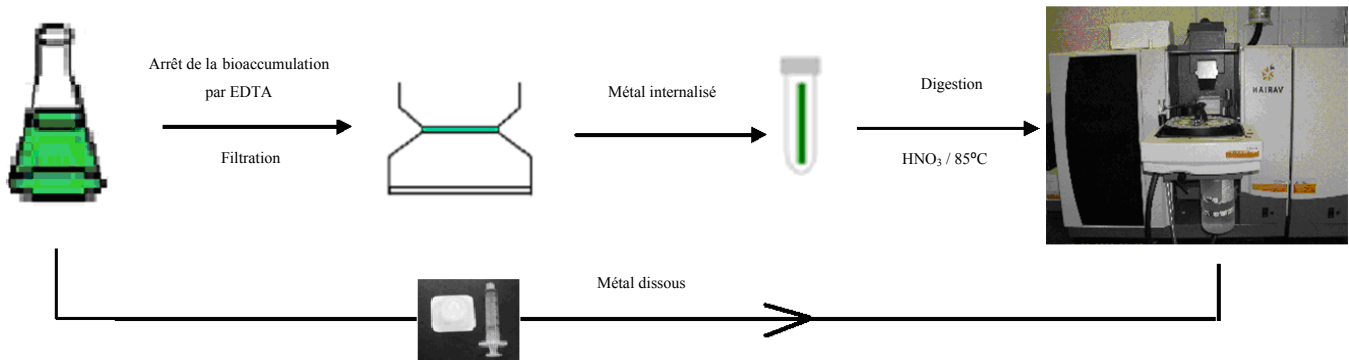


Figure 2.3. Étapes requises pour l'analyse des métaux dissous et bioaccumulés.

Les concentrations de métaux ont été mesurées par la spectroscopie d'absorption atomique au four de graphite (GFAAS) ou par spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) dont les paramètres d'analyse sont définis dans les tableaux II.2 et II.3. respectivement.

Tableau II.2. Paramètres du spectromètre d'absorption atomique à four graphite.

Élément :		Cd		
Matrice :		1,95% v/v acide nitrique ultrapure 65% (Sigma-Aldrich)		
Courant de la lampe :		4 mA		
Longueur d'onde :		228,8 nm		
Largueur de la bande spectrale :		0,5 nm		
Gaz :		Argon		
Conditions d'opération du four				
No. Étape	Température (°C)	Temps (sec.)	Débit du gaz (L/min.)	Lecture
1	85	5	3,0	Non
2	95	40	3,0	Non

3	120	10	3,0	Non
4	250	5	3,0	Non
5	250	1	3,0	Non
6	250	2	0	Non
7	1800	0,8	0	Oui
8	1800	2	0	Oui
9	1800	2	3,0	Non

Tableau II.3. Paramètres d'analyse du ICP-MS.

Eléments	Cd: 111 Cu: 63 Pb: 208
Débit du Nébuliseur	0,97 L/min
Débit du gaz du plasma	18 L/min
Débit du gaz auxiliaire	1,2 L/min
Temps d'arrêt	50 ms /UMA
Balayages	20
Répliques	3
Temps d'intégration	1000 ms
Étalon interne pour les interférences de la matrice	Indium 50 ppb

## 2.5. Dosage des phytochélatines par HPLC

Les phytochélatines (thiols) induites à la suite des expositions aux métaux ont été extraites puis dérivatisées afin de les analyser par HPLC couplée d'un détecteur de fluorescence.

**Isolation des algues.** Suivant l'exposition des algues aux solutions expérimentales, la collecte des algues peut se faire de deux manières différentes soit par filtration soit par centrifugation (Figure 2.3). Dans le cas d'une collecte par filtration, la même procédure expérimentale que celui de la bioaccumulation a été utilisée, sauf qu'à la fin, le tube contenant le papier-filtre a été congelé à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction des phytochélatines. La collecte par centrifugation consistait à centrifuger la solution contenant les algues pendant 4 min à  $2150\text{ x g}$  ( $4000\text{ rpm}$ , Multifuge 1SR, Heraeus). Par la suite, le culot a été lavé par la solution d'exposition (TAP-MT) puis recentrifugé 4 minutes à la même vitesse. Le culot rincé est de nouveau combiné à une solution de rinçage puis transféré à un microtube ( $1,5\text{ mL}$ , Eppendorf). Le volume du microtube a été ajusté par ajout du TAP-MT à  $1.5\text{ mL}$  puis de nouveau centrifugé à haute vitesse ( $13000\text{ x g}$ ) pendant 5 minutes. Finalement, le surnageant a été retiré du microtube et ce dernier avec le culot ont été conservés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction des phytochélatines. Un schéma des deux modes d'isolation d'algues a été détaillé dans la Figure 2.4.

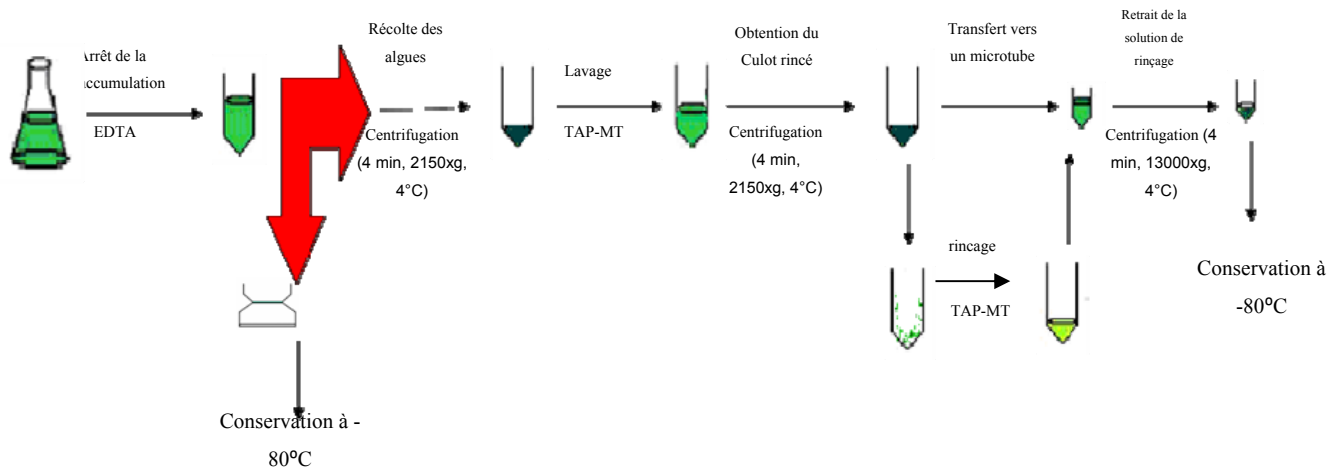


Figure 2.4. Isolation d'algues à la suite d'une exposition aux métaux.

**Extraction des thiols.** Pour éviter toute dénaturation possible des polypeptides par les enzymes, l'extraction des thiols a été faite à 4 °C (Figure 2.5). Les microtubes contenant les algues seules (cas de centrifugation) ou les algues avec papier filtre (cas de filtration) ont été décongelés en les remuant entre les doigts. Ensuite, 1 mL de 0.12 M d'HCl/5 mM de DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique) a été ajouté au microtube pour minimiser l'oxydation des thiols [14]. Afin de réaliser un meilleur bris cellulaire, on a ajouté des billes de verre puis tourbillonné le mélange par l'intermédiaire d'un vortex (Digital vortex mixer, 3000 rpm, Fisher Scientific) pendant 2 minutes, effectué une ultrasonication (Branson 5510) des cellules (4 °C, 5 min), puis centrifugé le tout (13000 x g, 20 min, 4 °C) afin d'éliminer les débris cellulaires.

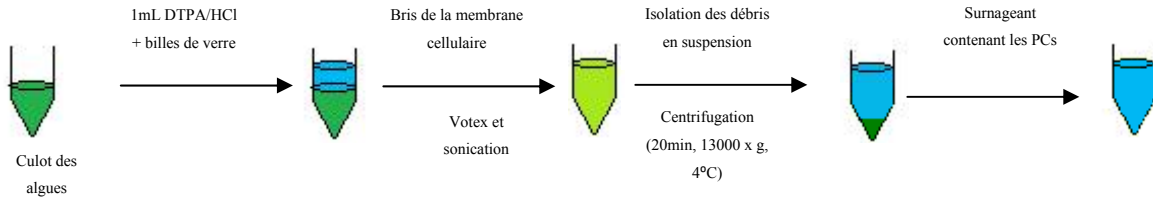
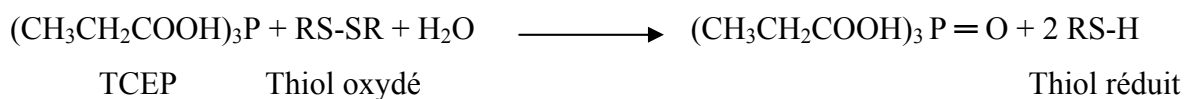
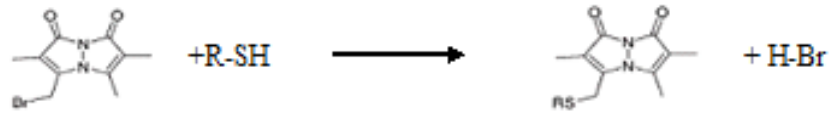


Figure 2.5. Étapes requises pour l'extraction des thiols.

**Dérivatisation des thiols.** Une aliquote de 250 µL du surnageant a été prélevée et tamponnée à un pH entre 8 et 9 en ajoutant 615 µL de 200 mM HEPES/5mM DTPA (Figure 2.6). À ce pH, les groupements thiols sont déprotonnés. Comme le S<sup>-</sup> est un bon nucléophile, il favorise ainsi la réaction de dérivatisation [19]. Ensuite 25 µL de TCEP (*tris (2-carboxyethyl) phosphine*) ont été ajoutés pour maintenir le soufre à l'état réduit avant la dérivatisation par mBrB (*monobromobimane*).



Après 15 min dans l'obscurité, 10 µL de 100 mM mBrB ont été ajoutés et le mélange est laissé un 15 min supplémentaire dans l'obscurité.



Les réactions ont été stabilisées par l'addition de 100  $\mu\text{L}$  de 1 M MSA (acide métrasulfonique). Les échantillons ont été filtrés à travers des filtres en nylon avec une porosité de 0,2  $\mu\text{M}$ , puis conservés à 4 °C jusqu'à l'analyse par HPLC. Le blanc et la courbe standard sont obtenus en utilisant 250  $\mu\text{L}$  du surnageant d'algues de contrôle (non exposées aux métaux) et différentes concentrations des étalons de PCs (de chez Anaspec) 1, 5, 10, 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

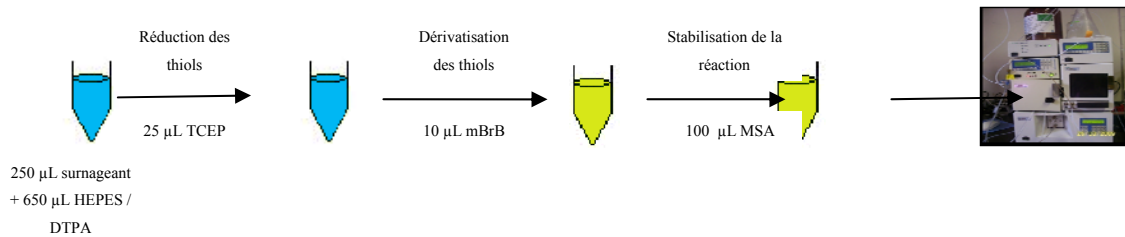


Figure 2.6. Étapes requises pour la dérivation des thiols.

**Analyse sur HPLC.** Les échantillons dérivés (thiols fluorescents) sont placés dans des flacons pour les injecter automatiquement (Jasco *Intelligent Autosampler* AS-2055). L'analyse en chromatographie liquide est en phase inversée avec une colonne C18 (*Atlantis 3  $\mu\text{m}$  reverse phase 4.6 mm 75 mm*). Le système est un Jasco LC-NetII/ADC couplé à un détecteur en fluorescence (Jasco FL-2020 Plus). Pour le dosage, un volume de 100  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon est injecté dans le système HPLC, préalablement réglé et équilibré (Température de la colonne = 40 °C, débit de la phase mobile = 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 470 \text{ nm}$ ) et un gradient de concentration des phases bien défini (Tableau II.4).



Tableau II.4. Profil de gradient de concentration des phases.

Temps de pompage (min)	Gradient de concentration	
	ACN	TFA/Eau (1 :1000, v/v)
0 à 20	10 → 25 %	90 → 75 %
20 à 30	25 → 100 %	75 → 0 %
30 à 35	100 → 10 %	0 → 90 %
35 à 45	10 %	90 %

## 2.6. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée par un test colorimétrique basé sur l'activité de la déshydrogénase afin d'assigner le nombre des cellules vivantes lors des expositions à fortes concentrations en métaux. En effet, en présence du PMS (phenazine metosulfate), le MTS ([3 - (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfophényl)-2H-tétrazolium], sel interne, Promega) est réduit par les cellules en formazan de couleur brunâtre. Le formazan dans la solution absorbe fortement à 490 nm et la quantité produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans la solution. Après mélange des réactifs et des cellules, l'échantillon est incubé pendant 30 min à 37 °C. Le témoin est préparé à partir d'un simple mélange MTS/PMS dans le TAP-MT.

## 3. OPTIMISATION

Dans ce chapitre, le dosage des phytochélatines standards ainsi que la méthode d'exposition d'algues aux métaux ont été optimisés.

### 3.1. Optimisation du dosage des phytochélatines

#### 3.1.1. Stabilité des phytochélatines

Pour mesurer la stabilité des PCs, quatre concentrations filles de 100 µg/mL PCs ont été préparées, dans l'eau distillée, à partir d'une concentration mère de 1 mg/mL. Les solutions filles ont été conservées, pendant 24 h, à différentes températures (-80 °C, -20 °C, 4 °C et à la température ambiante) puis elles ont été dérivatisées puis analysées sur HPLC (Tableau III.1). Une autre solution a d'abord été dérivatisée puis congelée à -20 °C pendant 24 h. Les résultats obtenus ont été comparés à une solution fraîchement préparée puis dérivatisée. En supposant que la solution fraîchement préparée correspond à 100 % du signal, celle qui a d'abord été dérivatisée puis congelée a donné un signal de 99.7 % tandis que le signal correspondant à l'échantillon congelé à -20 °C était 92.6 % et celui de -80 °C était de 81 % (Tableau III.1). Les résultats indiquaient que l'utilisation de la solution fraîche était optimale, cependant, l'erreur analytique associée avec le pesage de très faibles quantités (inférieure à 1 mg) pour chaque analyse faisait que cette solution n'était pas réalisable dans nos laboratoires. Comme deuxième choix, l'utilisation d'un dérivé congelé, mais on avait peu de confiance qu'une courbe standard effectuée à partir d'une dérivatisation antérieure (l'erreur de dérivatisation peut parfois dépasser les 20 %). La conservation a donc été effectuée par une simple congélation à -20 °C. Dans ce cas environ 1 mg de chaque standard : PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub> ont été dissous dans 1 mL d'eau Milli-Q (le même microtube). À la suite de leur dilution, des aliquotes de 50 µL des PCs ont été distribués dans des microtubes de 200 µL puis congelés à -20 °C.

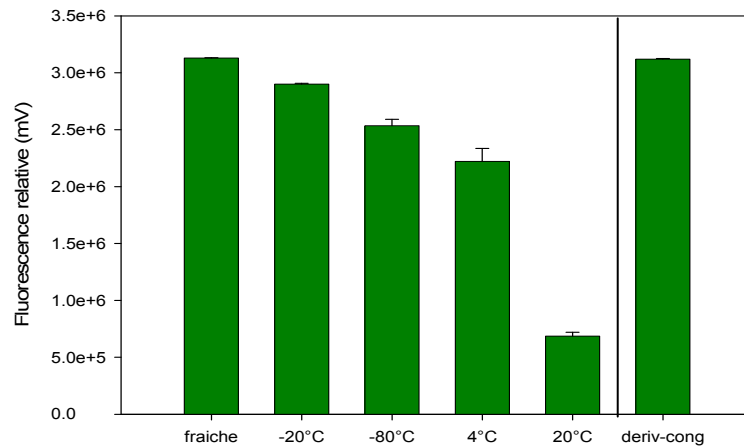


Figure 3.1. Stabilité de PC<sub>3</sub> en fonction de la condition d'entreposage.

Tableau III.1. Proportion des phytochélates restantes à des différentes températures.

PC <sub>3</sub>	fraîche	-20 °C	-80 °C	4 °C	20 °C	Dérivatisé congelé
<b>Pourcentage</b>	100 %	92.6 %	81.0 %	71.0 %	21.9 %	99.7 %

### 3.1.2. Choix de la phase mobile

La performance de la technique HPLC dépend évidemment du choix de la phase mobile. Le solvant le plus utilisé pour la séparation et quantification des phytochélates en chromatographie en phase inverse est l'acétonitrile (ACN). Cependant, au début de la maîtrise, il y avait une rupture de stock internationale de l'acétonitrile et de ce fait, son coût a énormément augmenté (un bidon de 4 L d'acétonitrile coûtait 400 \$). Encore, dans la littérature scientifique, la séparation et la quantification des PCs en utilisant le mélange ACN/eau était bien documenté [44, 95] par contre il n'y avait pas des études montrant la possibilité de leurs quantifications par le Me-OH/eau. Ceci nous a incités d'essayer de séparer les PCs par le méthanol et de comparer les résultats obtenus avec celles de l'ACN. Effectivement, l'analyse sur HPLC montre clairement la bonne séparation des pics de PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub> (Figure 3.2.a) alors qu'il y avait un chevauchement de pics pour la séparation en Me-OH/eau (Figure 3.2.b)

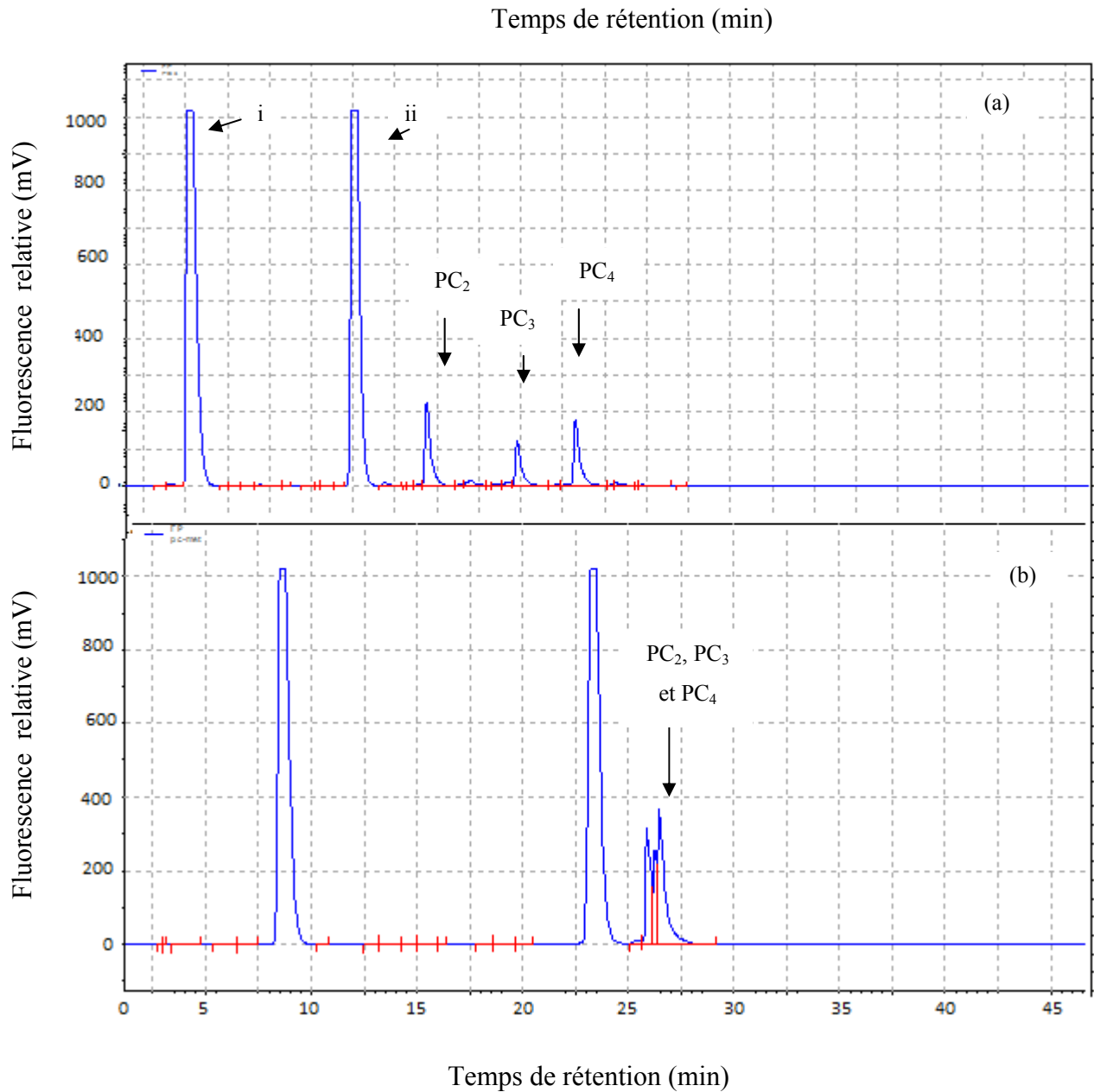


Figure 3.2. Profil de séparation et de détection des phytochélatines en utilisant deux solvants organiques différents (a) l'ACN et (b) le Me-OH. Le débit était de 1mL/min. (i) représente le pic de la cystéine et (ii) est un dérivé du mBrB.

En modifiant le débit de la phase mobile de 1 mL/min à 0,5 mL/min, tous les produits et les sous-produits fluorescents, excepté, la cystéine avait le même temps de rétention (Figure 3.3).

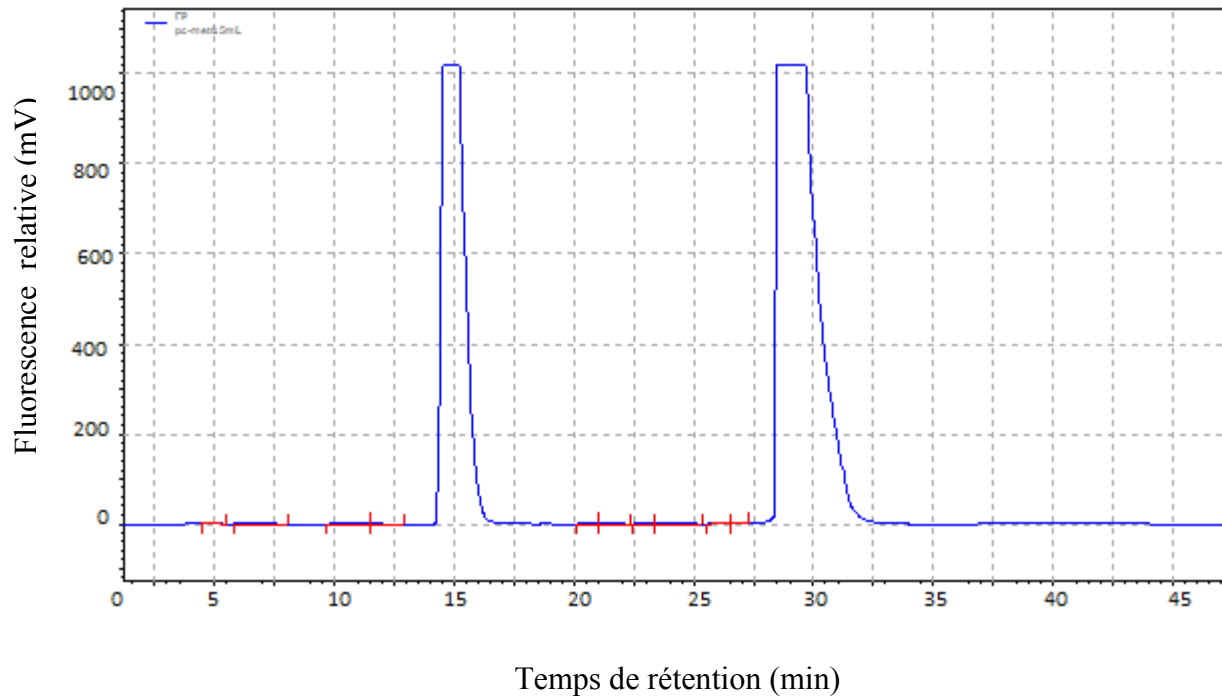


Figure 3.3. Profil de séparation et de détection des phytochelatines en utilisant le MeOH comme phase mobile pour un débit de 0.5mL/min.

Le gradient d'élution a été testé dans le but d'améliorer la résolution des pics de phytochelatines. En variant le gradient de concentration, on fait varier le pouvoir d'élution et en d'autres termes, le coefficient de distribution  $K$  du soluté dans la phase stationnaire par rapport à ce qui est dans la phase mobile. En effet, plusieurs modifications du gradient (12 essais) nous ont amenés à une séparation raisonnable des pics (Tableau III.2; Figure 3.4 a), mais deux problèmes persistaient : la faible efficacité (finesse des pics) et le chevauchement des pics à de fortes concentrations des PCs ( $>400 \mu\text{g/mL}$ ) (Figure 3.4-b). Entretemps, le prix de l'ACN a régressé, d'où le choix de reprendre l'ACN/eau pour le reste des expériences.

Tableau III.2. Résultats de l'optimisation partielle de la phase mobile (MeOH et eau) permettant la séparation des phytochelatines par HPLC à phase inversée.

Temps de pompage (min)	Gradient de concentration <i>initial</i>		Temps de pompage (min)	Gradient de concentration « <i>optimisé</i> »	
	MeOH	Eau		MeOH	Eau
0 à 20	10 → 25 %	90 → 75 %	0 à 20	10 → 25 %	90 → 75 %
20 à 30	25 → 100 %	75 → 0 %	20 à 22	25 → 40 %	75 → 60 %
30 à 35	100 → 10 %	0 → 90 %	22 à 38	40 → 50 %	60 → 50 %
35 à 45	10 %	90 %	38 à 40	50 → 100%	50 → 0%
			40 à 45	100 → 10 %	0 → 90 %
			45 à 55	10 %	90 %

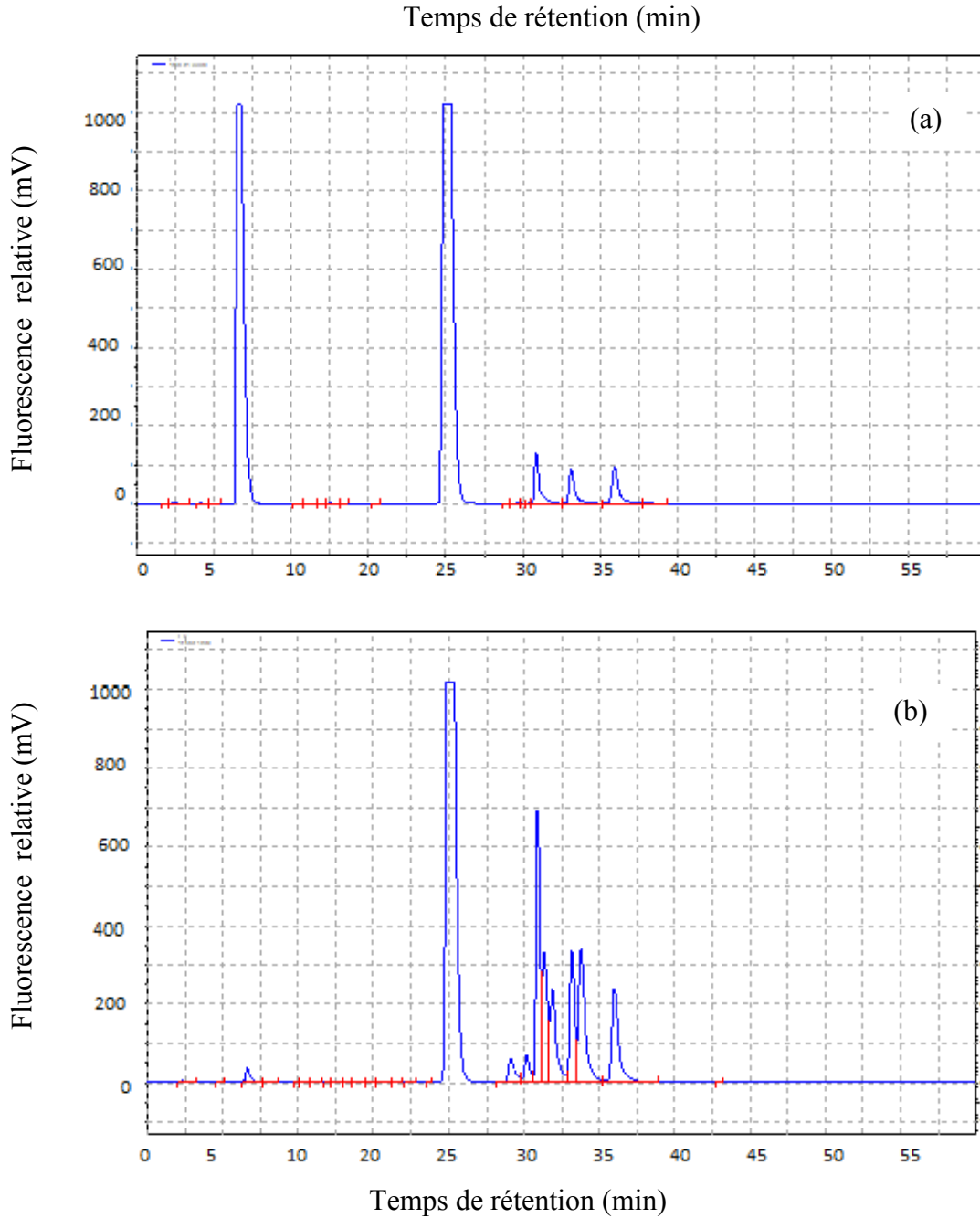


Figure 3.4. Chromatogramme de la séparation et la détection des phytochélatines en utilisant les conditions du gradient « optimisées » de Me-OH/eau (Tableau 3.1). Les analyses ont été faites à deux concentrations différentes de PCs : (a) 100  $\mu\text{g/mL}$ ; (b) 1  $\text{mg/mL}$ . Le débit de la phase mobile était de 1  $\text{mL/min}$ .

### 3.1.3 Choix de la méthode de dérivation.

Les standards, dans toutes les expériences antérieures, ont été dérivatisés selon la méthode de Morelli et coll [96]. Cette méthode diffère légèrement de celle de Rijstenbil et coll [66] (tableau 3.3) qui était bien interprétée par Kawakami et coll en 2006 [44]. Nous avons donc comparé les 2 méthodes, en utilisant les mêmes solutions (50 µg/mL) des étalons de PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub> (Figure 3.5). Le détecteur donnait un meilleur signal en suivant la dérivation de Rijstenbil et coll. ce qui nous a amenés à l'adopter pour la suite des expériences (méthode décrite dans la section 2.5).

Tableau III.3. Comparaison des produits nécessaires pour la dérivation des PCs selon les deux principales méthodologies [66, 96]

	Morelli et coll	Rijstenbil et coll
	Composé V (µL)×C(mM) (C finale mM)	
Tampon	<b>HEPPS</b> 130 × 200 ( <b>104</b> )	<b>HEPES</b> 615 × 200 ( <b>123</b> )
Agent réducteur	<b>TCEP</b> 10 × 10 ( <b>0,40</b> )	<b>TCEP</b> 25 × 20 ( <b>0.50</b> )
Agent fluorescent	<b>mBrB</b> 20 × 10 ( <b>0.80</b> )	<b>mBrB</b> 10 × 100 ( <b>1,00</b> )
Agent acidifiant	<b>MSA</b> 20 × 1000 ( <b>80,0</b> )	<b>MSA</b> 100 × 1000 ( <b>100,0</b> )

**HEPPS** (acide 3-[4-(2-Hydroxyéthyl)-1-piperazine propane sulfonique); **HEPES** (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique); **TCEP** (*tris* (2-carboxyethyl) phosphine); **mBrB** (monobromobimane), **MSA** (acide métrasulfonique).



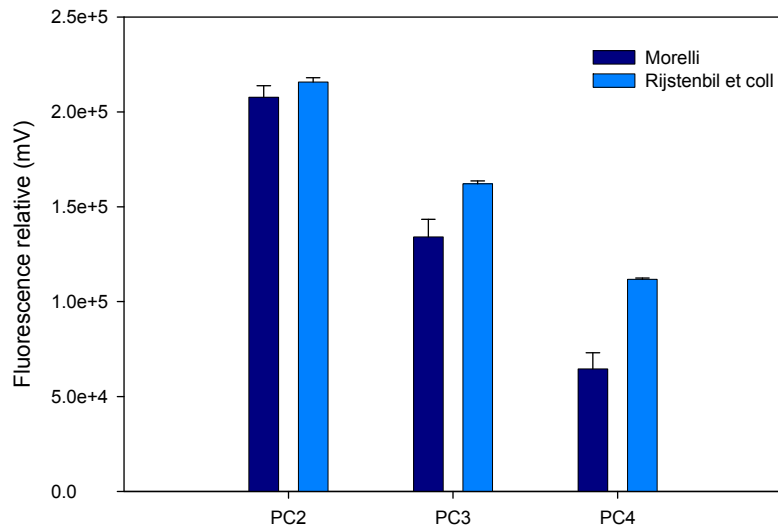


Figure 3.5. Comparaison des signaux fluorescents pour des solutions identiques de PCs, obtenus selon les deux principales méthodes de dérivation.

### 3.1.4. Effet de la matrice sur le signal fluorescent des étalons des PCs.

L'effet de la matrice a été évalué par la méthode d'ajouts dosée où des étalons des phytochélatines ont été ajoutés aux échantillons d'algues non exposées aux métaux. En effet, trois répliques de 200 µg/mL des PCs ont été ajoutées à des aliquotes de 250 µL de surnageant d'algues non exposées aux métaux et préalablement extraites selon la méthodologie de la section 2.5. Les échantillons ont été comparés à trois autres répliques, de la même concentration des PCs, simplement dans le tampon (HEPES, 200 mM, pH 8). Les solutions ont été dérivasées et analysées par HPLC. La comparaison des étalons préparés en HEPES avec ceux préparés dans l'extrait d'algues nous montre que la matrice n'a pas eu d'effet sur les étalons. Néanmoins, à la suite à des observations ultérieures, les algues pouvaient parfois produire des PCs et surtout de PC<sub>2</sub> lorsqu'elles étaient stressées en réponse d'une exposition à de la lumière intense ou parfois de centrifugations répétitives. Pour cela, nous avons décidé de toujours préparer nos étalons dans des solutions de nos algues de contrôle.

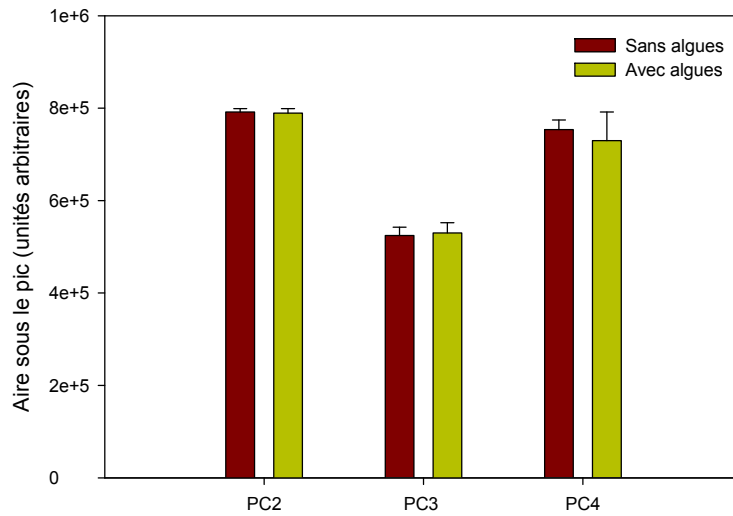


Figure 3.6. Effet de la matrice (algale) sur des étalons des PCs.

### 3.1.5. Domaine de linéarité du dosage.

La courbe d'étalonnage a été établie en utilisant de différentes concentrations filles des PCs (1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  et 200  $\mu\text{g/mL}$ ) qui ont été préparées à partir d'une solution mère de 1  $\text{mg/mL}$ . Les concentrations filles ont été ajoutées à des échantillons de contrôle (matrice algale), puis dérivatisées et analysées sur HPLC. Le dosage était linéaire sur toute la gamme de concentrations évaluées (Figure 3.7).

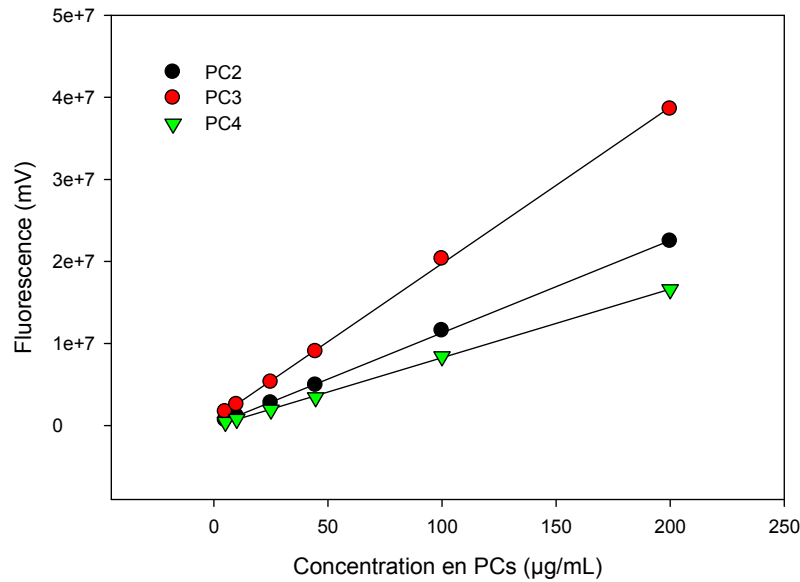


Figure 3.7. Courbe de calibration de PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub>.

Tableau III.4. Domaine de linéarité de PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub>

Composé	Temps de rétention (min)	Zone de linéarité testée (pmol)	R <sup>2</sup>	Pente (×10 <sup>5</sup> mV×mL/ug)
PC <sub>2</sub>	12,6	8,0 – 640	0.999	113
PC <sub>3</sub>	17.0	60,0 - 528	0.999	191
PC <sub>4</sub>	19,9	26,0 – 208	0.999	836

### 3.2. Optimisation de l'exposition des algues aux métaux.

Plusieurs paramètres ont été optimisés en raison de leurs impacts directs sur les résultats. Ces paramètres sont : le temps d'exposition des métaux, la densité d'algues nécessaires pour éviter la déplétion du métal en solution, la concentration du métal d'intérêt dans les milieux d'exposition, la

méthode d'isolation d'algues (centrifugation ou filtration) pour les expériences de bioaccumulation et le mode d'extraction des phytochélatines.

### 3.2.1. Temps d'exposition du métal

Le temps d'exposition optimal est le temps nécessaire pour avoir une réponse optimale en matière de PCs sans avoir modifié la physicochimie des métaux (déplétion des métaux traces dans la solution ; complexation des métaux traces par des exsudats libérés par les algues). Pour déterminer le temps optimal, tous les autres paramètres qui peuvent avoir un impact sur les résultats ont été fixés tels que la concentration ( $10^{-6}$  M) du métal libre (Cd), la densité cellulaire des algues ( $1 \text{ cm}^2/\text{mL}$ ) et ainsi que l'isolation des algues par centrifugation (Section 2.5, isolation des algues). Les mesures de Cd dissous montrent une faible déplétion (2 %) après 6 h d'exposition, mais qui a eu tendance à augmenter avec le temps pour atteindre les 15 % après 24 h d'exposition (Figure 3.8).

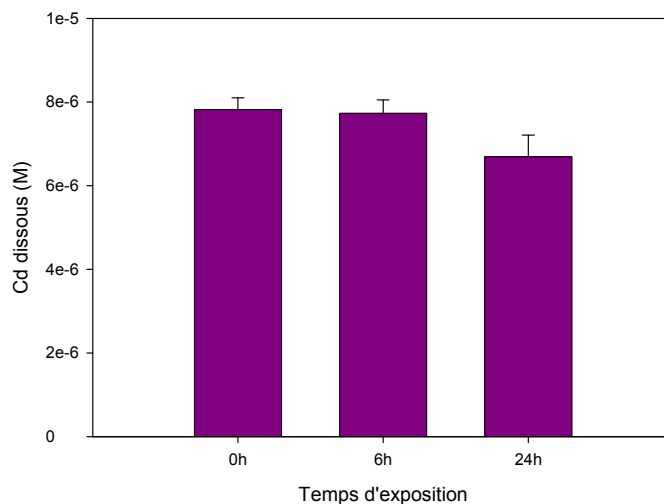


Figure 3.8. Variation de la concentration du Cd dissous en fonction du temps.

En ce qui concerne l'induction des PCs, on voit clairement l'augmentation de la production des PCs avec le temps (Figure 3.9). En effet, la concentration de  $\text{PC}_2$  a augmenté et elle avait atteint son maximum après 9 h d'exposition. Ensuite et à des expositions de plus longues durées, la concentration de  $\text{PC}_2$  détectée était plus faible. Cette diminution était probablement due à l'utilisation du  $\text{PC}_2$  pour

former des polymères d'ordre supérieur (PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub>) qui n'ont pas cessé d'augmenter [97]. Par conséquent, le choix du temps d'exposition 6 h était un compromis permettant d'avoir un bon signal des PCs sans trop de déplétion de Cd dissous (et aussi une facilité relative pour effectuer les expériences dans une journée de travail !). En effet, une exposition de 7, 8 ou même 9 h, aurait impliqué une durée totale de manipulation supérieure ou égale à 12 h (2 h de préparation, 6 h d'exposition, 4 h d'isolation d'algues).

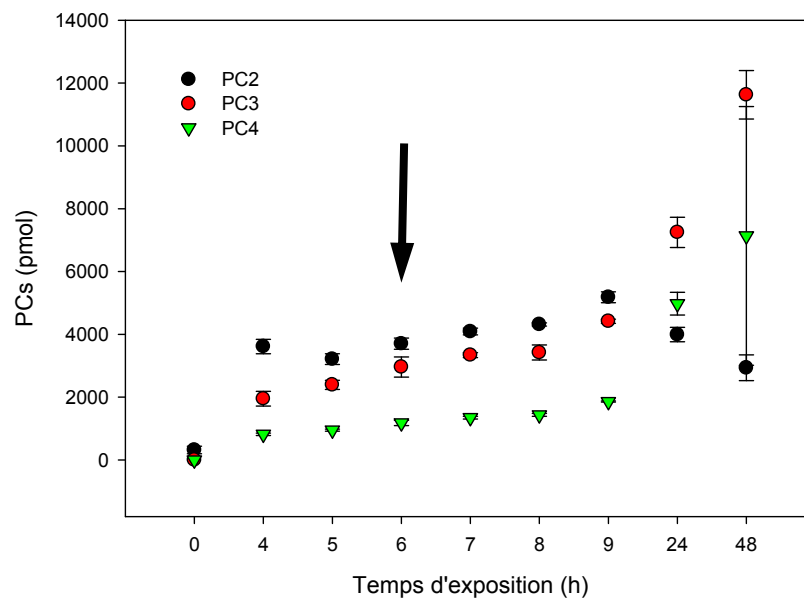


Figure 3.9. Synthèse de PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> et PC<sub>4</sub> en fonction du temps en réponse à une exposition à 10<sup>-6</sup> M du Cd<sup>2+</sup>.

### 3.2.2. Isolation des algues par centrifugation ou filtration

À la suite des expositions aux métaux, les algues doivent être récupérées, soit par centrifugation soit par filtration (Section 2.5, Isolation des algues). Des tests de centrifugation à une vitesse de rotation de 4000 rpm pendant 4 min ont montré qu'à des faibles volumes (30 mL), la quantité d'algues perdues était minimale (3 %). Par contre, les pertes pouvaient atteindre 40 % dans le cas de l'utilisation

de grands volumes (400 mL) à la même vitesse de rotation pendant 8 min. La filtration a donc été préconisée pour la plupart des séparations algales.

### 3.2.3. Densité algale (volume d'exposition)

De longues expositions sont nécessaires pour produire des PCs, mais celles-ci peuvent entraîner une diminution de la concentration de Cd dissous (et bioaccumulé). Ces variations peuvent être dues à l'adsorption du métal sur la paroi cellulaire, la bioaccumulation du métal et la production des exsudats qui peuvent jouer un rôle dans la spéciation du métal dans le milieu d'exposition [98]. Une expérience a donc été faite afin de quantifier la variation du métal biodisponible dans les différentes conditions. Cette expérience a été basée sur la variation de densité d'algues dans le milieu et son impact sur les paramètres en question. En effet, 60 cm<sup>2</sup> d'algues (8×10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>) ont été ajoutés à différents volumes d'exposition (30 mL, 60 mL, 100 mL, 200 mL et 400 mL) contenant 10<sup>-7</sup> M Cd<sup>2+</sup>. Ces concentrations algales correspondent à approximativement 2 cm<sup>2</sup>/mL, 1 cm<sup>2</sup>/mL, 0.33 cm<sup>2</sup>/mL, 0.15 cm<sup>2</sup>/mL ou 0.12 cm<sup>2</sup> cellules par mL. Pour une exposition de 6 h, le Cd dissous a diminué lorsque la densité d'algues a augmenté tandis que le Cd a été moins accumulé par les algues lorsque celles-ci étaient en forte densité dans le milieu.

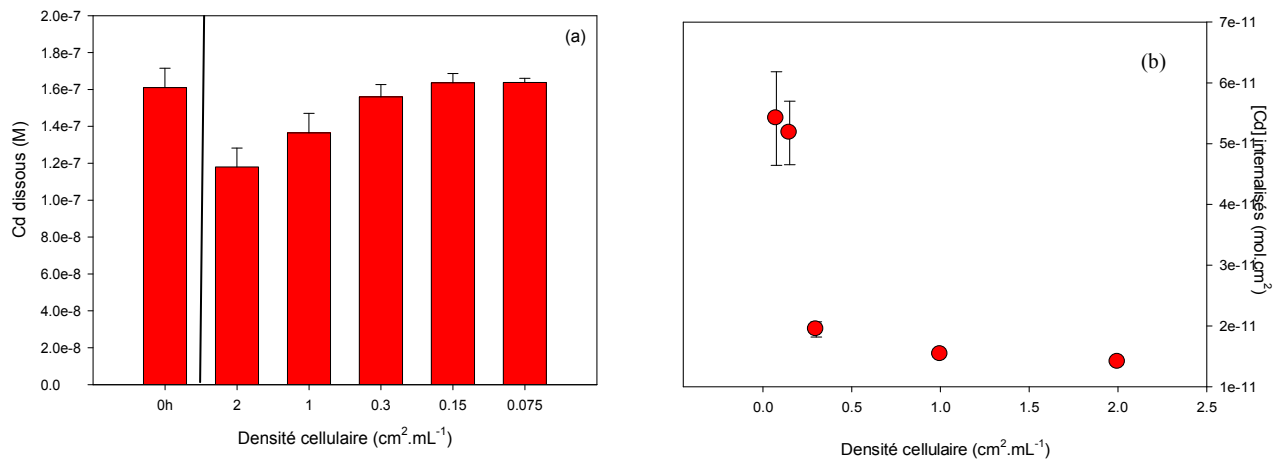


Figure 3.10. Effet de la densité cellulaire sur (a) la concentration du Cd dissous et (b) la concentration du Cd internalisé.

Selon la figure 3.9 a, la déplétion du Cd dissous a eu lieu à partir d'une densité supérieure à 0.3  $\text{cm}^2/\text{mL}$  et celle de la bioaccumulée a plafonné à partir d'une densité de 0.15  $\text{cm}^2/\text{mL}$ . Par conséquent, la densité cellulaire choisie pour le reste des manipulations était 0.15  $\text{cm}^2/\text{mL}$ .

### 3.2.4. Concentration du métal d'intérêt

Afin d'assurer l'observation d'effets significatifs, il était nécessaire de fixer la concentration du métal d'intérêt (le cadmium) de façon à obtenir une production considérable des PCs, tout en restant le plus près possible des conditions environnementales. Les algues ont été exposées à différentes concentrations du Cd entre  $5 \times 10^{-9}$  et  $5 \times 10^{-7}$  M pour un temps d'exposition de 6 h, une densité cellulaire de 0.15  $\text{cm}^2/\text{mL}$  et l'isolation d'algues était réalisée par filtration. Selon les résultats de la figure 3.11 et puisque notre hypothèse était que la présence d'autres métaux pourrait diminuer l'induction des PCs, la concentration choisie était quand même  $5 \times 10^{-7}$  M, la concentration la plus forte que nous avons étudiée.

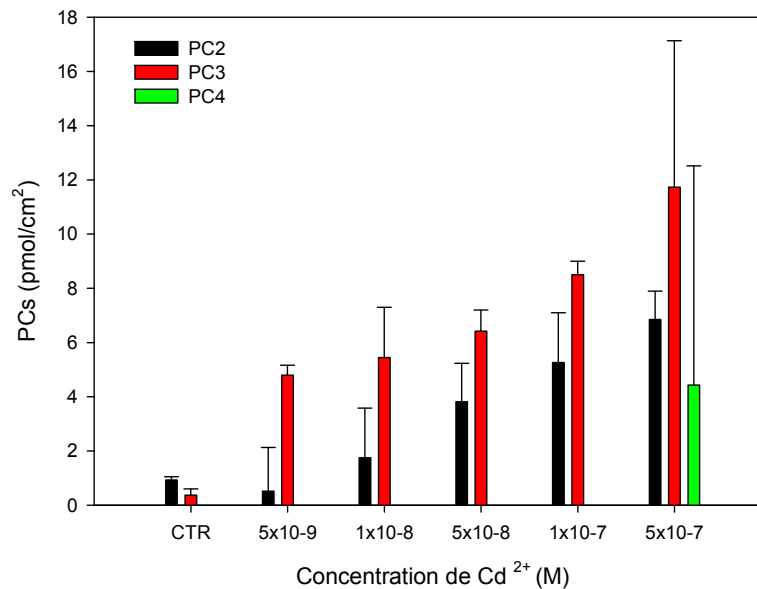


Figure 3.11. Induction des PCs à la suite des expositions à différentes concentrations de  $\text{Cd}^{2+}$ .

### 3.2.5. Extraction des Phytochélatines

La variation énorme du signal des PCs (barres d'erreur) pour une même concentration de métal (Figure 3.11) était un problème persistant malgré toutes les optimisations antérieures. En retournant un peu aux étapes préalables de l'analyse sur HPLC, l'étape qui a attiré le plus d'attention était l'extraction des PCs (Section 2.5, extraction des thiols) et plus précisément l'effet de la congélation qui ont rendu le détachement des algues et par la suite, l'extraction des PCs moins favorables. Trois possibilités étaient examinées : (a) la conservation directe des algues isolées sur un papier-filtre à -80 °C ; (b) la filtration des algues suivie d'un rinçage du papier filtre et des centrifugations répétitives (Section 2.5, Isolation des algues) et (c) l'extraction immédiate des algues suivies par la congélation (Figure 3.12). Le coefficient de variation calculé (écart type/ moyenne) était 10 fois moins dans le cas c en le comparant à ceux de a et b (même ordre de grandeur). Par conséquent, la procédure « c » a été donc adoptée pour la série des expériences.

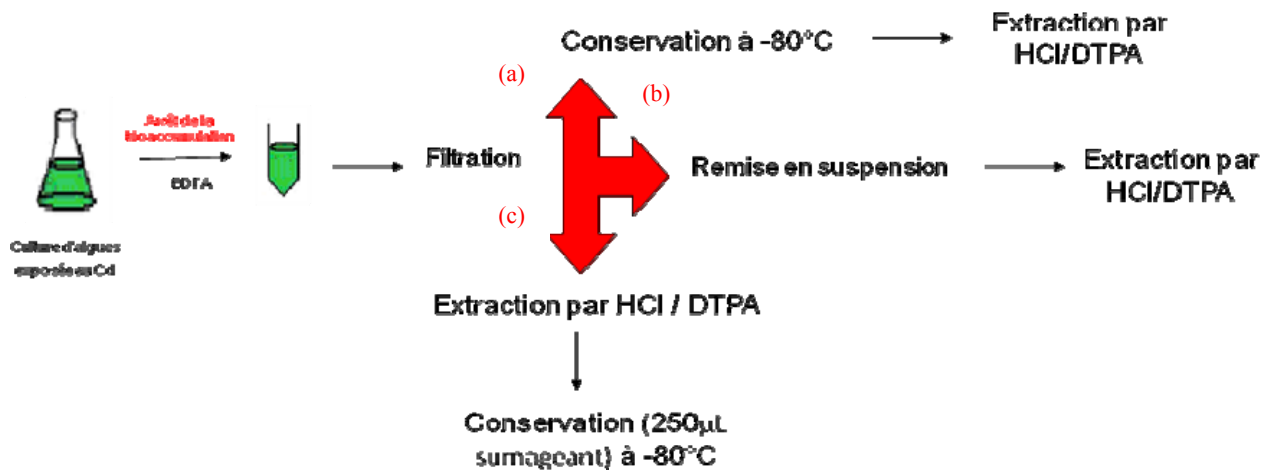


Figure 3.12. Trois modes d'extraction des PCs des algues.



### **3.3. Conclusion**

Plusieurs paramètres ont été optimisés afin d'améliorer la précision et la justesse des résultats. Pour la suite des expériences, nous allons donc employer une phase mobile d'acétonitrile; une conservation des PCs à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; un temps d'exposition aux métaux de 6 h; une isolation des algues par filtration; une densité cellulaire de  $0.15\text{ cm}^2/\text{mL}$  (i.e.  $75\text{ cm}^2$  d'algues dans 500 mL); une concentration du cadmium libre de  $5\times 10^{-7}\text{ M}$  et une extraction des PCs immédiatement après leur filtration.

## 4. ARTICLE

### Présentation de l'article

L'objectif de cet article est de souligner la possibilité de prédiction (cas des mélanges de métaux) de la bioaccumulation des métaux et de leurs effets biologiques sur les algues par le modèle de ligand biotique (BLM). Le Cd a été choisi comme métal d'intérêt tandis que le Ca, le Cu et le Pb étaient des métaux compétiteurs. L'algue, *Chlamydomonas reinhardtii*, a été exposée en premier lieu à un seul métal (Cd, Cu et Pb) puis à des mélanges binaires : Cd-Ca, Cd-Cu et Cd-Pb. Les résultats de la bioaccumulation, après six heures d'exposition, ont montré que le Cd internalisé a diminué en présence des concentrations relativement élevées de Ca, Cu et Pb, cependant et contrairement à nos attentes, il a augmenté en présence de concentrations équimolaires de Cu. En ce qui concerne la production des phytochélatines (PCs), une bonne corrélation a été observée, entre la production de PCs et de la quantité de métaux bioaccumulés pour les mélanges binaires de Cd-Pb et Cd-Cu, mais ce n'est pas le cas du mélange Cd-Ca. Selon les résultats, le métal bioaccumulé était plutôt un meilleur indicateur de l'effet biologique (dans ce cas, la production des PCs) que le métal libre. De plus, les exceptions qui ont été observées montrent la déficience du BLM pour la prédiction des effets biologiques dans le cas des mélanges de métaux.

Cet article a été soumis au journal *Environmental Science & Technology* le mois d'avril 2012. Je suis la seule, avec mon directeur de recherche, à y avoir contribué. Ainsi, j'ai accompli la totalité des expériences présentées dans cet article. L'article a été légèrement modifié pour qu'il soit compatible avec la totalité du mémoire. Une seule liste bibliographique a été complétée à la fin du mémoire.

Role of metal mixtures (Ca, Cu and Pb) on Cd bioaccumulation and phytochelatin production by *Chlamydomonas reinhardtii*

**Pauline Abboud and Kevin J. Wilkinson\*.**

Department of Chemistry, Biophysical Environmental Chemistry group, University of Montreal C.P.  
6128, succursale Centre-ville Montreal, Canada H3C 3J7.

## **Abstract**

The goal of the study was to determine whether metal uptake and biological effects could be predicted by the Biotic Ligand Model (BLM) when organisms were exposed to Cd in the presence of a second metal. Bioaccumulation and algal phytochelatin (PC) concentrations were determined for *Chlamydomonas reinhardtii* following a 6 hour exposure. Algae were either exposed to a single metal (Cd, Cu and Pb) or to a binary metal mixture of Cd and Ca, Cu or Pb as the competitor ions. Bioaccumulation results, after six hours of exposure, showed that Cd uptake decreased in the presence of relatively high concentrations of Ca, Cu and Pb, however, contrary to our expectations, Cd bioaccumulation increased in the presence of ca. equimolar concentrations of Cu. With respect to PC production, a good correlation was observed between the production of PCs and the amount of metals bioaccumulated for the binary mixtures of Cd-Pb and Cd-Cu, but not the Cd-Ca mixture. The results suggest that, in the case of mixtures, bioaccumulated metal rather than free ion concentrations are a better predictor of biological effect (in this case, PC production). Nonetheless, some important exceptions were observed, showing that other factors are also at play and that a BLM type (equilibrium) model may not be sufficient for predicting the biological effects of metal mixtures.

## **Keywords**

bioaccumulation, phytochelatin, competition, metal mixtures, biotic ligand model

## **Brief**

Algae were exposed to binary metal mixtures to determine whether metal uptake and biological effect (phytochelatin synthesis) could be predicted by the biotic ligand model.

## 4.1 Introduction

Metals are naturally present in the environment; however, following anthropogenic inputs or mobilization, they can attain levels that can cause toxicity to biota. The deleterious effects of single metals on organisms have been fairly well documented- indeed, single metal toxicity tests are used to establish most water quality criteria. In contrast, organisms inhabiting metal-contaminated natural waters are almost always exposed to multiple metals. The point has recently been recognized by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) as being a key gap in metal risk assessments [99]. Nonetheless, the interpretation of bioaccumulation or toxicity results from metal mixtures is complex because there are chemical interactions with constituents in the media, interactions with physiological processes and interactions at the site(s) of toxicity. Furthermore, trace metals may enter the organisms via common uptake routes or interact at independent sites. In metal mixtures, bioaccumulation may be both competitive and non-competitive and the presence of additional metal(s) can lead to antagonistic, additive or synergistic toxicological impacts [22, 100, 101]. These interactions vary depending on the metals, their concentrations, the exposure pathway and duration and the species and organs studied.

The Biotic Ligand Model (BLM) has proven to be useful for estimating the acute impacts of single metal exposures (e.g., Cu, Ag, Cd, Zn, Ni) to aquatic biota [15]. It utilizes mechanistic understandings of toxic action and metal uptake in order to establish site-specific predictions of toxicity. The BLM modeling approach lends itself well to the incorporation of additional equilibrium constants as they are determined; however, the approach is dependent on understanding the interactions that influence metal uptake and effects. Although the BLM is fundamentally based upon the equilibrium interaction of trace metals in solution with sensitive biological receptors (e.g. bioaccumulation), it is employed to predict biological effects, often using constants that have been derived from organism level toxicity measurements (e.g. decrease in growth rate, photosynthesis rate, ATP concentration,...). The quantification of biomarkers, such as phytochelatin [102], metallothioneins [103] or transcript expression [104] are an alternative means to assess metal stress. In this paper, our working hypothesis was that the molecular level biomarkers are more likely to better

reflect equilibrium interactions of the metals (i.e. as predicted by BLM modeling) than the higher level toxicity measurements.

Phytochelatin (PC) are involved in metal homeostasis, tolerance and detoxification [105] and are considered to be a good bioindicator of metal stress, especially for Cd [65] and other S binding metals (especially Cu, Zn, Hg, Ag, Ni and Pb). The goal of this study was to verify whether phytochelatin levels are well predicted by metal concentrations in solution (basis of the BLM), when in the presence of (binary) metal mixtures. Competing metals were selected on the basis of their ability to compete with Cd and/or to induce PC synthesis. Both bioaccumulation and biological effects (PC levels) were measured in order to provide insight into the mechanistic underpinnings of the BLM.

## 4.2 Materials and Methods

In order to reduce trace contamination, polymerware was soaked in an acid bath (0.1% HNO<sub>3</sub>) for at least 24 hours and then rinsed six times with de-ionized water (>18 MΩ cm; total organic carbon <2 μg L<sup>-1</sup>; Milli-Q, Millipore). Chemicals used in the analyses were analytical grade or better. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (99%), trifluoroacetic acid (TFA) (≥99%), methanesulfonic acid (MSA) (≥99.5%), diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) (99%), monobromobimane (mBrB) (≥97%), tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) (98%), sodium hydroxyde (NaOH) (98%), calcium nitrate (CaNO<sub>3</sub>) (99%), glutathione (GSH) (>97%), phenazine metosulfate (PMS; P9625) and Dubelco's phosphate buffer (D8662) were obtained from Sigma-Aldrich. HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 99%) was obtained from Fisher Scientific. Analytical standards of cadmium, copper and lead, in addition to nitric acid (HNO<sub>3</sub>), hydrochloric acid (HCl), L-cysteine (>99.5%) and sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>) (99.99%) were purchased from Fluka Analytical. Phytochelatin standards: PC2, PC3 and PC4 (> 95%), were obtained from Anaspec (Fremont,CA,USA) while [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS; PRG1112) was obtained from Promega (WI, USA). Finally, acetonitrile and HPLC grade water were obtained from TekniScience Inc. (QC, CAN).

### 4.2.1 Culture condition

*Chlamydomonas reinhardtii* (wild type CL2010), a unicellular green alga, was used for this study. It is easy to grow and has a fully sequenced genome [94]. Size, growth phase, surface areas and cell densities were monitored during cell growth and experimental exposures using a Coulter Multisizer 3 particle counter (50  $\mu\text{m}$  orifice). *C. reinhardtii* was transferred from a 1.5% agar plate containing tris-acetate-phosphate (TAP) medium [106] into a (4x) diluted liquid TAP ( $I=10^{-2}$  M) [26] at 20°C, under a 12 h: 12 h light: dark cycle of fluorescent lighting (50  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and orbital shaking (100 rpm) (Infors HT, Multitron). At mid-log exponential growth (density:  $2\text{-}3 \times 10^6$  cells. $\text{mL}^{-1}$ ), cells were diluted into fresh media at a concentration of  $10^5$  cells. $\text{mL}^{-1}$  in order to prepare the second subculture that would be used for the bioaccumulation experiments. The second subculture generally reached mid-log growth, after 3 days. Cells were pelleted by centrifugation (3300  $\times g$ , 4 min) then washed twice in a metal-free experimental medium (diluted TAP without trace metals, dTAP-M, pH=7). The cell pellet was resuspended in either 200 mL (bioaccumulation experiments) or 500 mL (phytochelatin experiments) of the dTAP-M experimental medium at a final cell density of  $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$  (ca.  $8 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). All culture and experimental media were autoclaved prior to use; all manipulations of algal cultures were performed under laminar flow (Heraus, Germany) and all bottle borders were flame sterilized prior to transfers.

### 4.2.2 Metal exposures

*C. reinhardtii* were first cultured in a weakly complexing, experimental medium (dTAP-M) containing  $10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  or  $10^{-6}$  M of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$ . In metal mixture experiments, the concentration of free Cd was held constant at  $5 \times 10^{-7}$  M, while the concentration of the second metal was varied. Cu and Pb were added at the same free concentrations as above, while Ca was added at  $4 \times 10^{-4}$ ,  $8.5 \times 10^{-4}$ ,  $1.5 \times 10^{-3}$  and  $3.3 \times 10^{-3}$  M. Note that for Ca, all dTAP-M media initially contained  $8.5 \times 10^{-5}$  M Ca, which was used to ensure the integrity of the algal cell wall. Thermodynamic calculations (MINTEQA2 version 2.5.3) were performed for each condition of added metal. These calculations indicated that free ion concentrations accounted for  $\geq 57$  % of the dissolved Cd,  $\geq 36$ % of the dissolved Cu and  $\geq 36$ % of the dissolved Pb. Six hour exposures and low cell densities ( $0.15$

$\text{cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) were employed in order to allow the organisms sufficient time to produce phytochelatin, without allowing time for significant modifications of the exposure media (production of exudates; depletion of metal concentrations). Bioaccumulation experiments were performed in an identical manner with the same cell density, except that a smaller exposure volume was used. In both cases, exposure to the metals was stopped by adding a small volume of EDTA (final concentration  $10^{-3}$  M), prior to collection of the cells by filtration ( $3.0 \mu\text{m}$  nitrocellulose filters, Millipore). Experiments were performed in triplicate on three separate days (i.e. using replicate cultures).

#### **4.2.3 Bioaccumulation analysis**

Filters and algae were digested by adding  $300 \mu\text{L}$  of ultrapure  $\text{HNO}_3$ , then heating the solutions at  $85^\circ\text{C}$  until they became colorless ( $\approx 24$  h). Cellular metals were quantified by graphite furnace atomic absorption spectrometry (Varian AA240Z) or by inductively coupled plasma mass spectroscopy (Perkin Elmer, NexION 300x).

#### **4.2.4 Phytochelatin analysis**

Phytochelatin (PCs) are metal-binding, thiol rich peptides, enzymatically synthesized by eukaryotes upon exposure to excessive amounts of several metals. Their main structure is  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  where  $n = 2-11$  [59]. Filters and algae were placed in microtubes ( $1.5 \text{ mL}$ , Eppendorf) containing  $1 \text{ mL}$  of  $0.12 \text{ M HCl}$  and  $5 \text{ mM DTPA}$  in order to minimize oxidation of the thiols [36]. Phytochelatin were extracted by ultrasonication of the cells ( $4^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ min}$ ), followed by centrifugation ( $13000 \times g$ ,  $20 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) to remove cell debris. The pH of  $250 \mu\text{L}$  aliquots of the supernatant was adjusted to pH 8-9 in order to deprotonate the thiol groups, thus favoring the derivatization reaction [107]. Samples were buffered by adding  $615 \mu\text{L}$  of  $200 \text{ mM HEPES}/5\text{mM DTPA}$  and  $25 \mu\text{L}$  of TCEP. After  $15 \text{ min}$  in the dark,  $10 \mu\text{L}$  of  $100 \text{ mM mBrB}$  (fluorescent reagent) were added to the mixture and the reactions were stabilized by adding  $100 \mu\text{L}$  of  $1 \text{ M MSA}$ . The derivatized samples were filtered using  $0.2 \mu\text{M}$  nylon syringe filters (Microliter Analytical Supplies, GA, USA) and then stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis by HPLC.



#### 4.2.5 HPLC analysis

PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> (n=2, 3, 4) were quantified using high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection [44]. The HPLC system (Jasco LC-Net II/ADC) consisted of a pump (PU-2089 *plus*), degasser, autosampler (Intelligent Autosampler AS-2055), a 200 µL sample loop and a fluorescence detector (Jasco FL-2020 *plus*) operating with an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 470 nm. A 150 × 4.6 Atlantis C-18 column and a 20 × 4.6 Atlantis C-18 guard column were used to separate the phytochelatins. The column temperature was fixed to 40 °C. Solvent A consisted of diluted TFA (1000x, v/v), solvent B consisted simply of acetonitrile. The gradient profile was 0-20 min, 10-25% B; 20-25 minutes, 25- 100% B; 25 to 30 min, 100% B; 30-35 min, 100-10% B (column cleaning) 35 to 45 minutes, 10% B (re-equilibration). Flow rate was held constant at 1.0 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.2.6 Cellular viability

Viable cells were quantified by a colorimetric method based on dehydrogenase activity. In the presence of an electron coupling reagent (PMS), MTS is bio-reduced by the cells to formazan, which has a strong absorbance at 490 nm. The quantity of formazan produced is directly proportional to the number of living cells in culture [108, 109].

### 4.3 Results

#### 4.3.1 Single metals

The 3 phytochelatins (PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub>) were first quantified in the presence of increasing Cd<sup>2+</sup> (Figure 4.1a), Cu<sup>2+</sup> (Figure 4.1b) and Pb<sup>2+</sup> (Figure 4.1c) concentrations. Cd most strongly induced the synthesis of all three PCs, followed by Cu. For example, for the exposure to 10<sup>-6</sup> M of the metals, Cd-induced 2x more PC<sub>2</sub>, 4x more PC<sub>3</sub> and 12x more PC<sub>4</sub> more than Cu. Pb had no visible effect on PC production with values measured at 10<sup>-6</sup> M not being significantly different from those produced in the control algae (absence of metal).

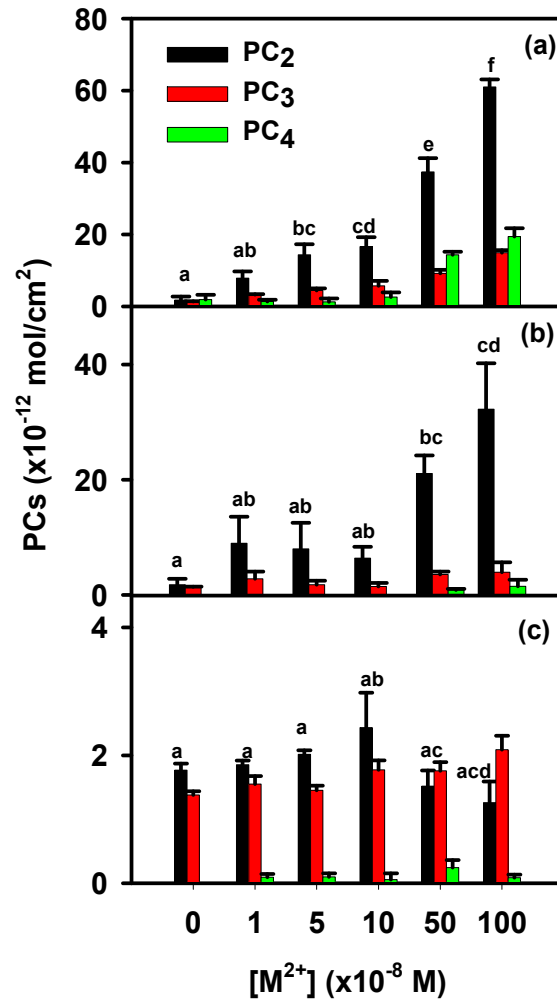


Figure 4.1. Phytochelatins produced by *C. reinhardtii* after 6 hours of exposure to various concentrations of (a) Cd<sup>2+</sup>, (b) Cu<sup>2+</sup> and (c) Pb<sup>2+</sup>. Error bars represent standard deviations obtained from triplicate experiments. For PC<sub>2</sub>, treatments that do not share a common letter are significantly different (one way ANOVA, Tukey test at  $p < 0.05$ ).

#### 4.3.2 Binary mixtures of metals

***Influence of the second metal on Cd bioaccumulation.*** In the presence of a competitor, the BLM can predict either no effect (independent sites) or a decreased (same site) bioaccumulation of the

primary metal [24, 104]. In these experiments, the concentrations of three competitors were varied for a constant exposure concentration of  $\text{Cd}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-7}$  M).

***Influence of Ca on bioaccumulation and phytochelatin production.*** No control exposure was performed in the complete absence of Ca, given that it was always necessary to have at least  $8.5 \times 10^{-5}$  M Ca in order to maintain the cell wall integrity of *C. reinhardtii* [98]. Additional Ca concentrations were selected based upon environmental relevance and previously published internalization constants [26]. As expected, the addition of Ca reduced Cd biouptake by up to 44% (Figure 4.2a). Since Ca is not known to induce phytochelatin synthesis, we hypothesized that its increased concentration would decrease PC production in line with the decreased Cd biouptake. In fact, while the concentration of  $\text{PC}_4$  decreased with increasing Ca (15x less than the control), there was no significant change in  $\text{PC}_3$ . Contrary to our expectations,  $\text{PC}_2$  nearly doubled (Figure 4.2b).

***Influence of Pb on bioaccumulation and phytochelatin production.*** In the case of Pb-Cd interactions, the addition of Pb ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M) had no significant effect on Cd uptake. Similarly, the addition of Pb had no significant effect on PC production – none of the PC demonstrated any significant differences over the wide range of examined competitor concentrations (Figure 4.3b). Based upon the expectation of a significant reduction in Cd bioaccumulation in the presence of Pb (Kola and Wilkinson, 2005), an additional experiment was performed to see if very high concentrations of Pb ( $5 \times 10^{-6}$  M) could reduce Cd biouptake (red point, Figure 4.3a). Indeed, a reduction of 56% in the Cd biouptake flux was observed with respect to the control under these conditions. Nonetheless, at these high Pb concentrations, the viability of the cells decreased by 68% with respect to the control (i.e. reduction in formazan absorbance in the presence of 5  $\mu\text{M}$ , Fig. 4.7), leading us to believe that the reduced biouptake may have been due to high toxicity and cell mortality rather than competitive interactions at the cell surface.

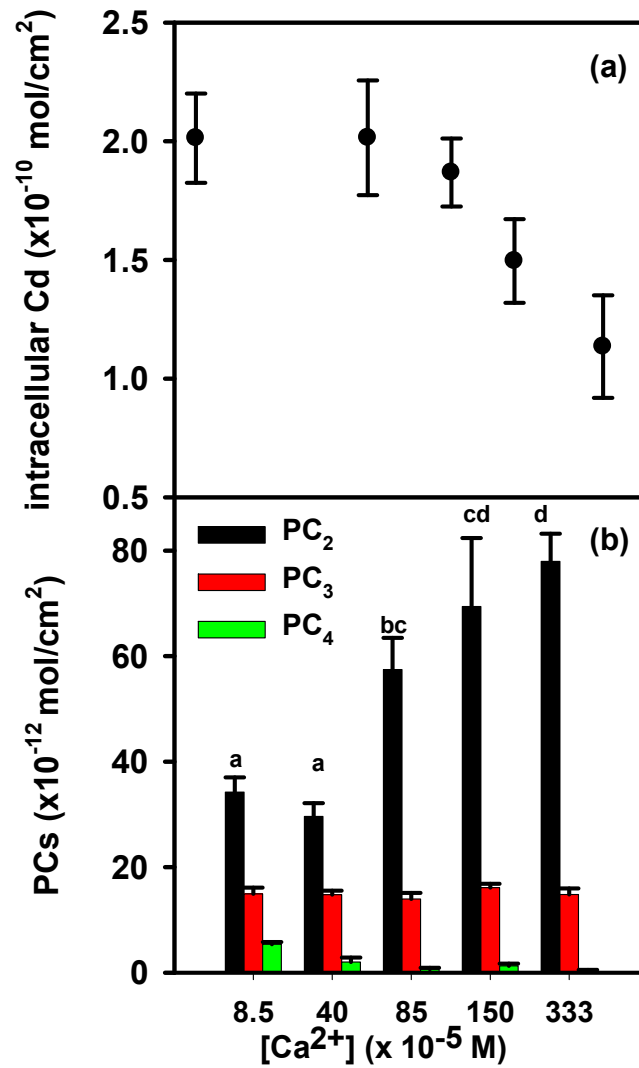


Figure 4.2. (a) Intracellular Cd concentrations ( $\text{mol}/\text{cm}^2$ ) and (b) PC concentrations ( $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  and  $\text{PC}_4$ ) produced in the presence of  $5 \times 10^{-7}$  M  $\text{Cd}^{2+}$  and a range of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Error bars represent standard errors obtained from three biological replicates. For  $\text{PC}_2$ , treatments that do not share a common letter are significantly different (one way ANOVA, Tukey test at  $p < 0.05$ ).

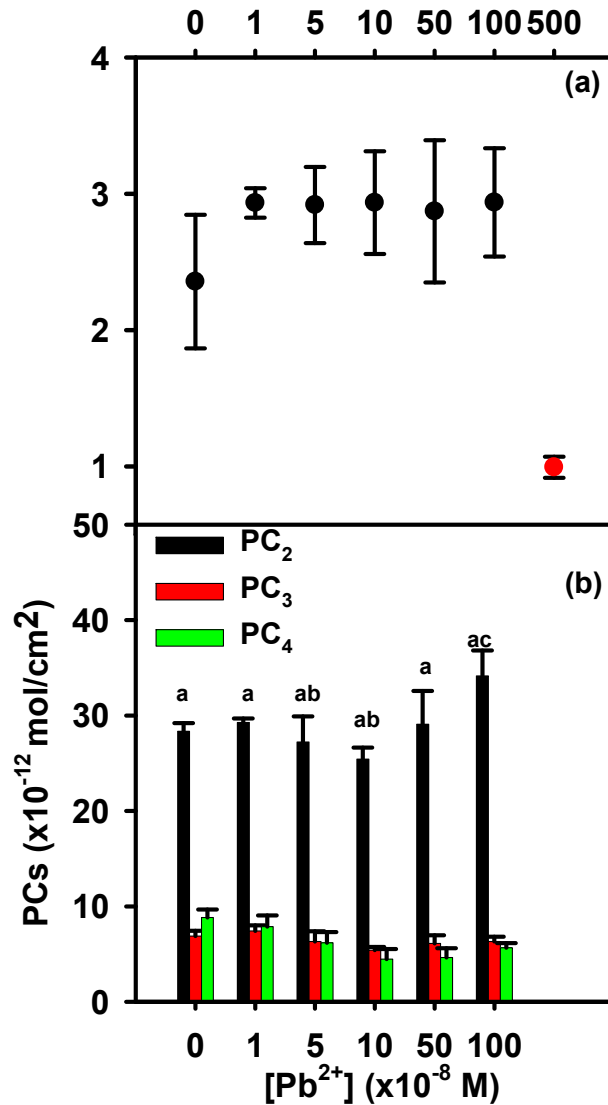


Figure 4.3. (a) Intracellular Cd concentrations (mol/cm<sup>2</sup>) and (b) PC concentrations (PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub>) observed in the presence of 5 × 10<sup>-7</sup> M Cd<sup>2+</sup> over a wide range of Pb<sup>2+</sup> concentrations. Error bars represent the standard errors obtained from three biological replicates. For PC<sub>2</sub>, treatments that do not share a common letter are significantly different (one way ANOVA, Tukey test at p < 0.05). Corresponding intracellular Pb concentrations are provided in Fig. 4.8.

**Influence of Cu on bioaccumulation and phytochelatin production.** Somewhat counter intuitively, the addition of low concentrations of Cu ( $<10^{-6}$  M), resulted in a significant *increase* in Cd biouptake. Only for Cu concentrations  $>10^{-6}$  M, did bioaccumulation decrease to levels that were seen in the absence of Cu (Figure 4.4a). The production of phytochelatins also increased with increasing Cu concentrations (Figure 4.4b). For example, an 8 fold increase in PC<sub>2</sub> and a 3fold increase in PC<sub>3</sub> were observed when an equimolar concentration ( $5 \times 10^{-7}$  M) of Cu was added to the Cd exposure medium. PC<sub>4</sub> increased up to 5x with increasing Cu<sup>2+</sup> but subsequently decreased at the higher Cu<sup>2+</sup> concentrations. At the highest concentration of added Cu ( $10^{-6}$  M), all three phytochelatins decreased, likely due to cell death or additional cell stress (Fig. 4.7) [101].

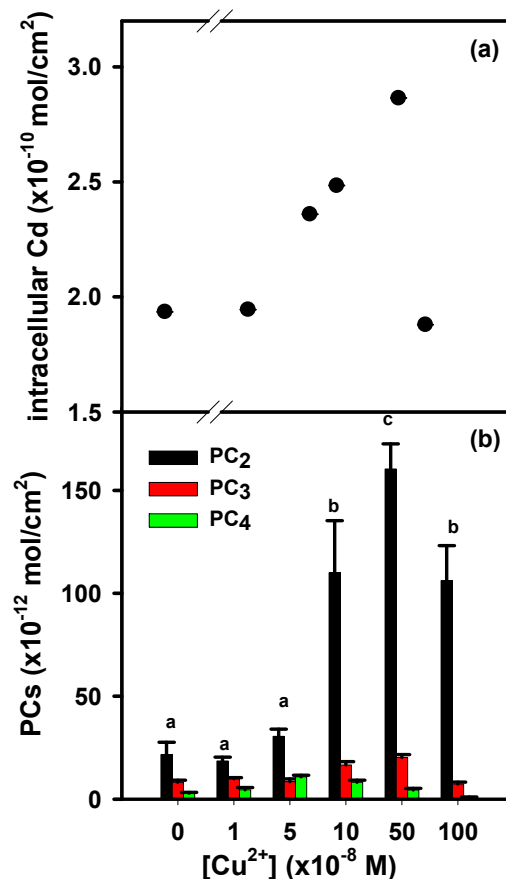


Figure 4.4. (a) Intracellular Cd ( $\text{mol}/\text{cm}^2$ ) and (b) PC concentrations (PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub>) observed in the presence of  $5 \times 10^{-7}$  M Cd<sup>2+</sup> and a range of Cu<sup>2+</sup> concentrations. Error bars represent the standard

errors obtained from three biological replicates. For PC2, treatments that do not share a common letter are significantly different (one way ANOVA, Tukey test at  $p < 0.05$ ). Corresponding intracellular Cu concentrations are provided in Fig. 4.7.

#### 4.4 Discussion

Microorganisms produce PCs in response to metal exposure. The amounts of PCs that are synthesized depend on the algal species, the metal and the exposure concentration [66, 102]. While the interaction of metals are well known to cause additive, synergistic or antagonistic effects on organism health [23], it is less well known how more specific indicators such as PC production [110], transcriptomic responses [104] or oxidative stress [111] react to multiple stressors.

The present study on *C. reinhardtii*, confirms that Cd and Cu are potent inducer of PCs, in agreement with several prior studies [43]. In contrast to the results of Scheidegger et al. [97], significant PC induction was not observed following short term exposures of *C. reinhardtii* to Pb. It is presently unclear why differences between the two studies were observed, however, it may be due to differences in the experimental media, laboratory strains or exposure times.

The study was designed to test a BLM type approach for predictions of the bioavailability of binary metal mixtures. It is currently unclear whether metal mixtures should be modelled using a single or multiple, independent uptake sites [23]. For a single uptake site in the presence of multiple metals, the BLM will always predict competitive interactions leading to **decreased** bioaccumulation and **decreased** toxicological effects (or no change). In contrast, for a model invoking independent uptake sites, the presence of a second metal should result in **no change** to bioaccumulation and either **similar** or **increased** toxicological effects as compared to single metal exposures.

Cd uptake decreased in the presence of Ca, increased in the presence of Cu and was unchanged in the presence of Pb in agreement with a number of previously published results (e.g. decrease of Cd uptake by *Hyalella azteca* in the presence of Ca, [112]; increase of Cd uptake in the presence of Cu [104]; unchanged Cu uptake in the presence of Pb [32]; unchanged Cd uptake in the presence of Pb

[104]). The observation of increased Cd biouptake in the presence of Cu cannot be predicted by an equilibrium model such as the BLM, although the presence of Cu has previously been shown to increase bioaccumulation of a second metal [113]. For example, Chen et al. invoked a feedback mechanism involving multiple transporters to explain their observations of increasing Pb bioaccumulation in the presence of Cu. Komjarova and Blust [100] suggested that a competition between Cu and Pb at the Na and Ca uptake channels may have led to some of the complex patterns that they observed.

Quantities of PCs observed following exposure to the binary mixtures (Cu-Cd and Pb-Cd) *could not be predicted* from simple addition of PC concentrations obtained from the corresponding single metal exposures (Figure 4.5). In the case of independent receptors and additive effects, all of the data points should have fallen on the 1:1 line in Fig. 4.5. In contrast, if a competitive interaction at a single transport site is hypothesized, data points should fall on or below the 1:1 line. Synergistic interactions, not predictable by BLM modeling, are identified by points falling significantly above the line. Indeed, based upon the ionic concentrations of the metals in solution, several of the measured values of PC<sub>2</sub> and PC<sub>3</sub> produced in the *Cd-Cu mixture* were higher than values predicted from the simple additive response of observations obtained for single metals. Calculations based upon the total quantity of polypeptide ( $PC_n = 2PC_2 + 3PC_3 + 4PC_4$ ) also showed a synergistic effect, however, this was largely due to the dominant influence of PC<sub>2</sub> concentrations on the sum. In contrast, observed PC<sub>4</sub> values were consistently lower than predicted values (antagonistic response).

PC quantities measured *following the addition of Pb* were less (3-28%) than quantities predicted from a strictly additive response (Figure 4.5). Such a result is surprising given that no effect on bioaccumulation was observed for Pb. The results for the addition of Ca were also unexpected. Since Ca was not a known inducer of PC, PC levels were not determined for single metal exposures to this metal. Nonetheless, based upon the observed increase in PC<sub>2</sub> and the observed decrease in PC<sub>4</sub> (Fig. 4.2), it is clear that neither the purely additive nor the competitive model would adequately predict effects under these conditions. The results show clearly that PC synthesis for these binary metal



mixtures *cannot be predicted* from single metal exposures using bulk water concentrations of the free metals.

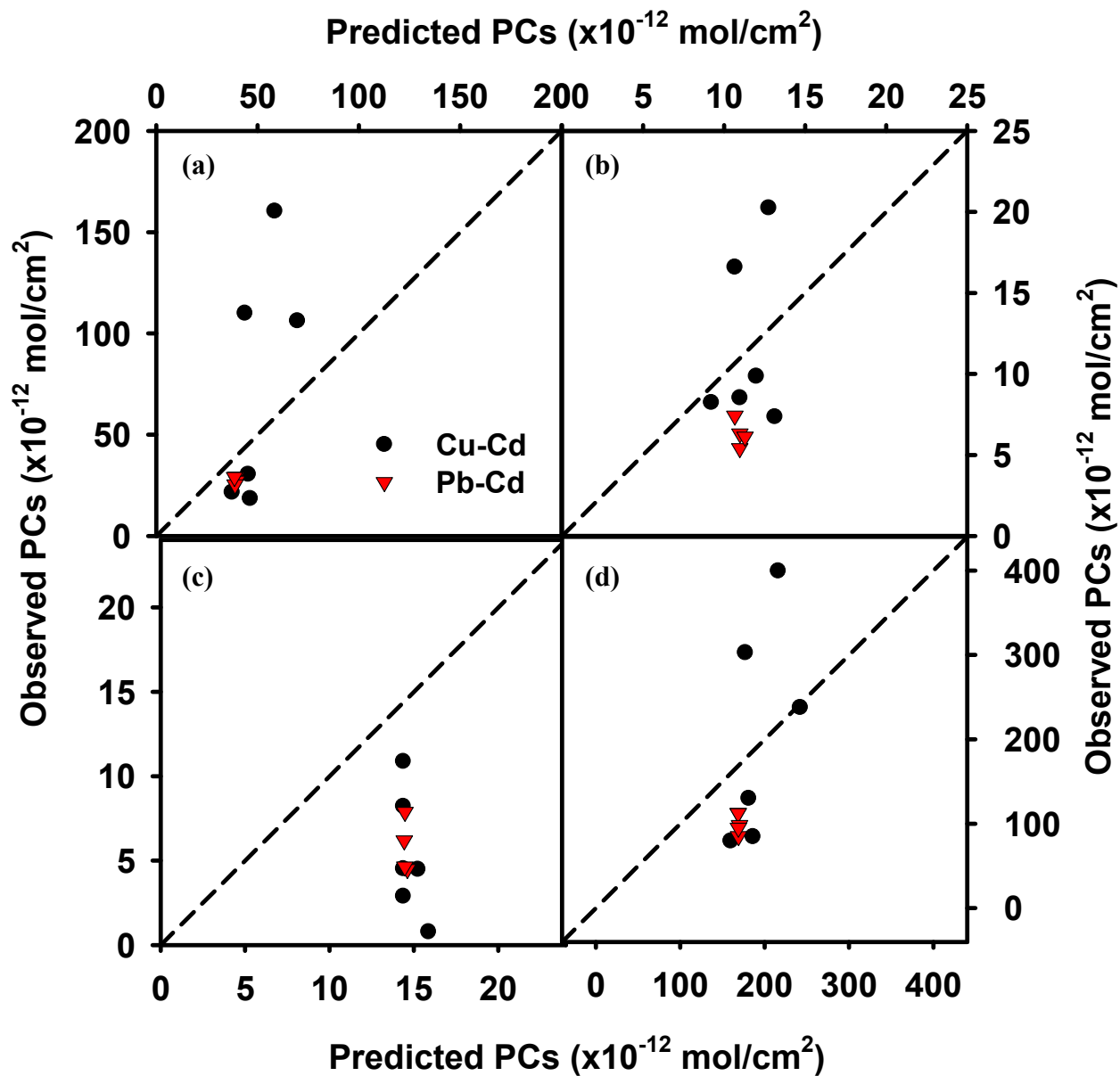


Figure 4.5. Observed phytochelatin concentrations, (a) PC<sub>2</sub>, (b) PC<sub>3</sub>, (c) PC<sub>4</sub> and (d) PC<sub>n</sub>, in the Cu-Cd (black circles) and Pb-Cd (red triangles) mixtures as a function of predicted values obtained by adding PC values from the corresponding individuals metals' exposures (from Fig. 1). Data points falling on

the dashed line represent values that can be predicted from a strictly additive relationship; points below the line represent less than additive effects (antagonistic) while points above the line correspond to greater than additive effects (synergistic effects). PC<sub>n</sub> concentrations are determined as the sum of the thiol concentrations ( $PC_n = 2PC_2 + 3PC_3 + 4PC_4$ ). Fig. 4.5a:  $R_2 = 0.54$ ; Fig. 4.5b:  $R_2 = 0.09$ ; Fig. 4.5c:  $R_2 = 0.37$ ; Fig. 4.5d:  $R_2 = 0.23$

It is also possible to take competition effects into account by determining PC concentrations based upon bioaccumulated metal rather than free metal concentrations in solution (Fig. 4.6). In this case, the role of Ca could also be determined (Fig. 4.6a) by assuming that Ca alone would not induce PC synthesis. Overall, the use of bioaccumulation data as opposed to free metal concentrations in solution generally improved predictions of PC synthesis (c.f. Fig. 4.6b and Fig. 4.5). Indeed, PC concentrations that were predicted on the basis of actual Cd biouptake were well correlated to observed concentrations ( $R^2$  ranging from 0.5 to 0.85). Nonetheless, it is noteworthy that observed PC<sub>2</sub> concentrations were higher than predicted (synergistic effect) in mixtures containing both Ca (Fig. 4.6a) and Cu (Fig. 4.6b). Indeed, in the presence of Ca, the observation of decreased Cd biouptake and increased PC synthesis can, under no conditions, be reconciled by equilibrium modeling (i.e. BLM). Finally, PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> appeared to be better predictors of competitive effects than PC<sub>2</sub>; however, this may have been due to the smaller concentrations (and thus smaller variations) that were measured.

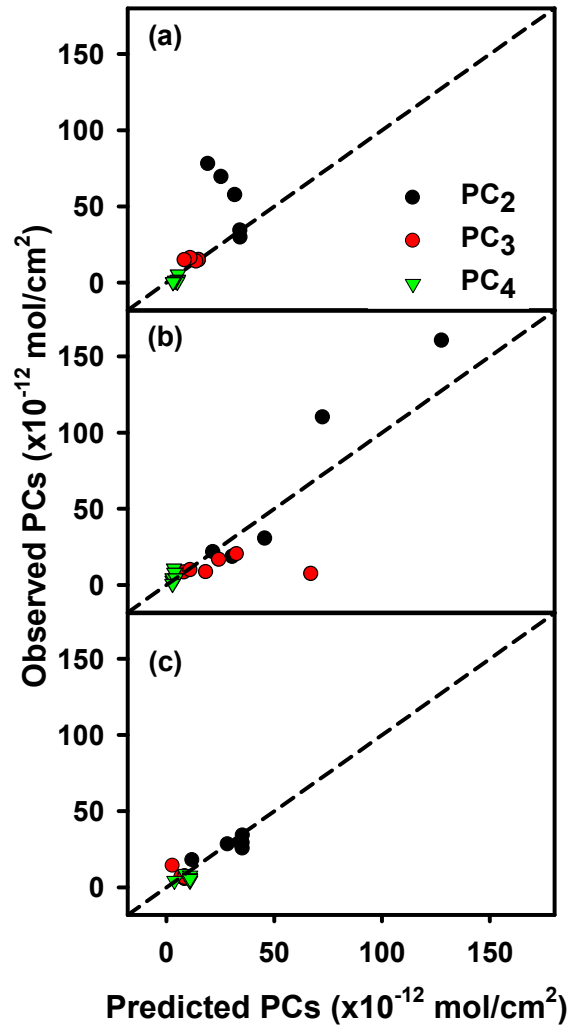


Figure 4.6. Observed phytochelatin concentrations observed after an exposure to  $5 \times 10^{-7}$  M  $\text{Cd}^{2+}$  and variable concentrations of (a) Ca, (b) Cu and (c) Pb. In contrast to Fig. 5, predictions were based upon values obtained from observed Cd bioaccumulation (as opposed to free ion concentrations in solution). Points falling on the dashed line represent values that can be predicted from a strictly additive relationship; data points below the line represent less than additive effects (antagonistic) while points above the line correspond to greater than additive effects (synergism). PC<sub>n</sub> concentrations are determined as the weighted sum of the thiol concentrations ( $\text{PC}_n = 2\text{PC}_2 + 3\text{PC}_3 + 4\text{PC}_4$ ). Fig. 4.6a:  $R_2 = 0.50$ ; Fig. 4.6b:  $R_2 = 0.71$ ; Fig. 4.6c:  $R_2 = 0.85$ .

## 4.5 Environmental implications

Clearly, simple equilibrium modeling was not sufficient for accurately predicting the molecular level effects of these simple metal mixtures. Nonetheless, a factor of 2 agreement with the BLM is generally considered to be acceptable for monitoring purposes. If we remove cases where the response was plus or minus an order of magnitude OR where the observed response was less than that predicted (i.e. model predictions are overprotective), then only a limited number of cases merit added attention. Significant ( $>2x$ ), non-predictable, synergistic responses were observed for the effects of Cd in the presence of both Ca and Cu. The results involving Ca are particularly worrisome given that it is generally accepted that water hardness has a protective effect on metal toxicity. Indeed, Cd bioaccumulation clearly decreased in the presence of Ca (Fig. 4.2a). This result will therefore merit further study. Mixture effects were also difficult to predict when Cu was added to the exposure solutions containing Cd. An increase in Cd bioaccumulation, following the addition of Cu, also cannot be predicted by an equilibrium model. While the BLM can be easily modified to account for an increased effect due to the presence of an additional metal, it cannot (yet) predict synergistic (greater than additive) effects. Metal mixtures causing non predictable, synergistic effects clearly should be one of the priorities of regulatory agencies and at the very least should merit further, in-depth, study.

Finally, while this study focused on a molecular level response to metal mixtures, it must be noted that toxicity is a complex response resulting from numerous molecular level pathways. If impossible to predict the response for a relatively simple pathway such as peptide synthesis or transcriptomic response [104], then it will certainly be necessary to be extremely careful when predicting complex responses at the level of the organism or populations of organisms.

## 4.6 Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support of NSERC and the FQRNT team research grants program. This project was undertaken with the financial support of the Government of Canada through the Department of the Environment.

#### 4.7 Supporting information

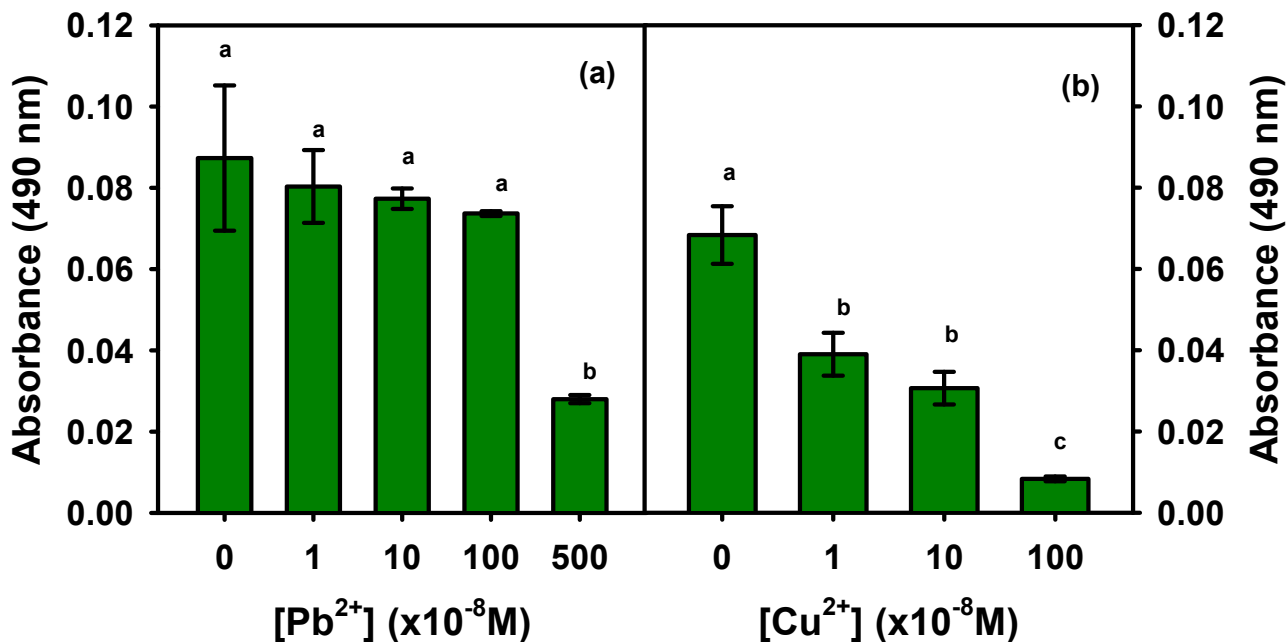


Figure 4.7. Viability of the cells as given by the formazan production of the viable cells in the presence of  $5 \times 10^{-7} M Cd^{2+}$  and a range of (a)  $Pb^{2+}$  (b)  $Cu^{2+}$ .

***Influence of Cd on Cu and Pb uptake.*** For the metal mixture experiments, bioaccumulation was also verified for Cu and Pb in the presence of  $5 \times 10^{-7} M Cd^{2+}$ . As expected, metal biouptake increased as a function concentration of metal in the bulk solution. Previously, Cu and Pb uptake were measured in the presence and the absence of  $Cd^{2+}$  [104]. For the range of concentrations used in this study, no differences were observed between uptake values.

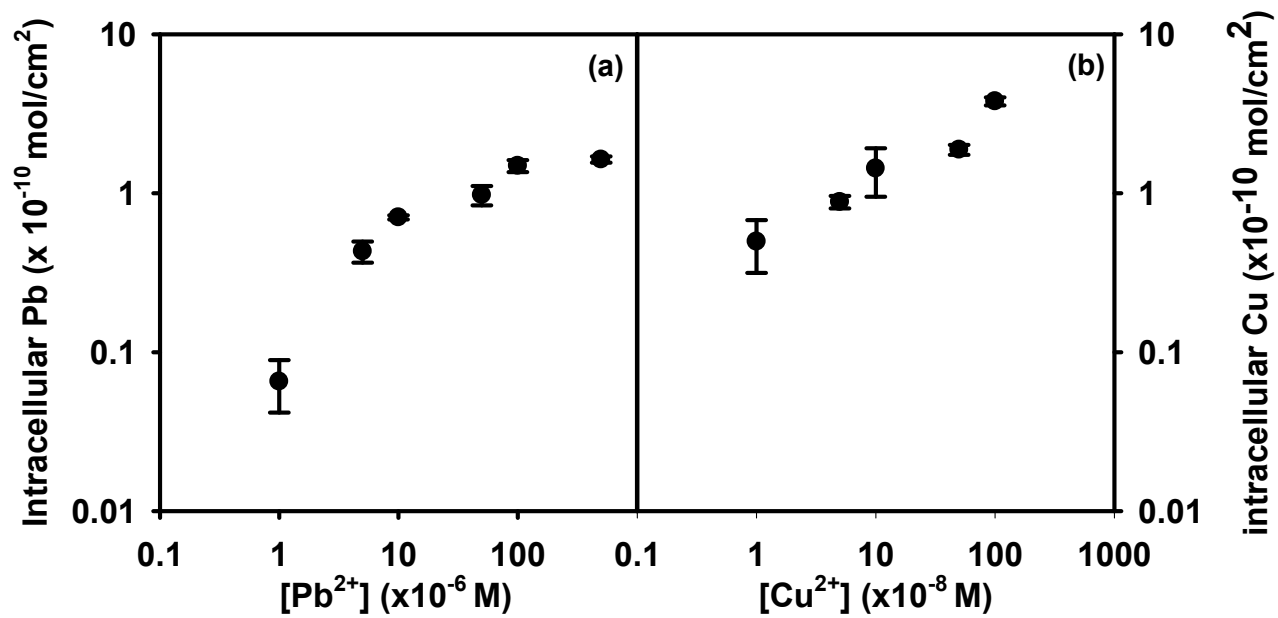


Figure 4.8. Intracellular metal concentrations for (a) Pb and (b) Cu as a function of the free ion concentrations in the bulk solution at a fixed Cd<sup>2+</sup> concentration of 5x10<sup>-7</sup> M.

## Conclusion

Somme toute, cette étude a permis de constater que le métal bioaccumulé est un meilleur prédicteur d'effets biologiques (c.-à-d. production des phytochélatines) chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Par rapport aux modèles utilisés par des instances gouvernementales, le modèle des ligands biotiques était généralement acceptable pour prédire les résultats de mélanges des métaux (à l'exception de Cu-Cd). L'originalité de cette étude réside dans le fait que personne n'avait encore quantifié les phytochélatines après exposition aux mélanges de métaux en surveillant, en même temps, les quantités des métaux bioaccumulés dans les algues. Ainsi, ces résultats contribueront à améliorer la compréhension de la bioaccumulation des mélanges de métaux aussi bien que leurs effets toxiques sur les algues (synergiques, antagonistes ou même sans effets). À ceci, s'ajoutent les optimisations du protocole de bioaccumulation et d'extraction des phytochélatines qui peuvent servir comme base pour des expériences ultérieures. La prochaine étape sera d'évaluer plus profondément l'effet du Ca, étant donné qu'une diminution de la bioaccumulation a été accompagnée d'une production exagérée de la cystéine et du PC<sub>2</sub>. D'autre part, des études d'autres mélanges de métaux seront utiles afin de mieux clarifier les critères clés pour améliorer la prédiction des effets des métaux dans l'environnement.

## Bibliographie

1. Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G. C.; Delos, C. G.; Di Toro, D. M.; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hogstrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. C.; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B., The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 2002, 133, (1-2), 3-35.
2. Kushner, D. J., Effects of speciation of toxic metals on their biological activity. *Water Pollution Research Journal of Canada* 1993, 28, (1), 111-28.
3. Duffus, J. H., "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem* 2002, 74, (5), 793-807.
4. Essington, M. E., Soil and Water Chemistry, *CRC Press*, 2004.
5. Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T. C. S.; Leitao, M. A. S.; Okamoto, O. K.; Morse, D.; Colepicolo, P., Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 2003, 39, (6), 1008-1018.
6. Carignan, R., Cours de toxicologie de l'environnement TXL6014. *Université de Montréal*, 2009.
7. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J.; Hassler, C. S., Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004, 23, (2), 283-291.
8. Bryan, G. W.; Langston, W. J., Bioavailability, accumulations and effect of heavy-metals in sediments with special reference to United-Kingdom estuaries - A review. *Environ. Pollut.* 1992, 76, (2), 89-131.
9. Nieboer, E.; Richardson, D. H. S., The replacement of the non-descript term heavy-metals by a biologically and chemically significant classification of metal-ions. *Environmental Pollution Series B-Chemical and Physical* 1980, 1, (1), 3-26.
10. Tsuji, N.; Hirayanagi, N.; Okada, M.; Miyasaka, H.; Hirata, K.; Zenk, M. H.; Miyamoto, K., Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by zinc-induced phytochelatin synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002, 293, (1), 653-659.
11. Olivier, M. J., *Chimie de l'environnement*. Les productions Jaques Bernier, 5th edition. Quebec, 2007.
12. Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; Van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements.



Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl Chem* 2000, 72, (8), 1453-1470.

13. Luoma, S. N., Bioavailability of trace-metals to aquatic organisms-A Review. *Science of the Total Environment* 1983, 28, (JUN), 1-22.
14. Chapman, P. M., How toxic is toxic? *Mar Pollut Bull* 2001, 42, (12), 1279-1280.
15. Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H. L.; Meyer, J. S.; Paquin, P. R.; Santore, R. C., Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 2001, 20, (10), 2383-2396.
16. Nolan, A. L.; Lombi, E.; McLaughlin, M. J., Metal bioaccumulation and toxicity in soils - Why bother with speciation? *Aust J Chem* 2003, 56, (2-3), 77-91.
17. Sunda, W. G.; Hanson, A. K., Measurement of Free Cupric Ion Concentration in Seawater by a Ligand Competition Technique Involving Copper Sorption onto C-18 Sep-Pak Cartridges. *Limnology and Oceanography* 1987, 32, (3), 537-551.
18. Playle, R. C.; Dixon, D. G.; Burnison, K., Copper and Cadmium-Binding to Fish Gills - Estimates of Metal Gill Stability-Constants and Modeling of Metal Accumulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1993, 50, (12), 2678-2687.
19. Campbell, P. G. C., *Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model*. J. Wiley & Sons, Chichester: UK, 1995.
20. Parker, D. R.; Pedler, J. F., Reevaluating the free-ion activity model of trace metal availability to higher plants. *Plant Soil* 1997, 196, (2), 223-228.
21. Brown, P. L.; Markich, S. J., Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquat Toxicol* 2000, 51, (2), 177-194.
22. Borgmann, U.; Norwood, W. P.; Dixon, D. G., Modelling bioaccumulation and toxicity of metal mixtures. *Hum Ecol Risk Assess* 2008, 14, (2), 266-289.
23. Norwood, W. P.; Borgmann, U.; Dixon, D. G.; Wallace, A., Effects of metal mixtures on aquatic biota: A review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment* 2003, 9, (4), 795-811.
24. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environmental Chemistry* 2005, 2, (1), 9-24.
25. Niyogi, S.; Wood, C. M., Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science & Technology* 2004, 38, (23), 6177-6192.

26. Kola, H.; Wilkinson, K. J., Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environmental Science & Technology* 2005, 39, (9), 3040-3047.
27. Campbell, P. G. C.; Errecalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, W. R.; Vigneault, B., Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 2002, 133, (1-2), 189-206.
28. Arnold, W. R.; Santore, R. C.; Cotsifas, S., Predicting copper toxicity in estuarine and marine waters using the Biotic Ligand Model. *Mar Pollut Bull* 2005, 50, (12), 1634-1640.
29. Fortin, C.; Denison, F. H.; Garnier-Laplace, J., Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Mg^{2+}$ ) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007, 26, (2), 242-248.
30. Lock, K.; De Schamphelaere, K. A. C.; Becaus, S.; Criel, P.; Van Eeckhout, H.; Janssen, C. R., Development and validation of an acute biotic ligand model (BLM) predicting cobalt toxicity in soil to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Soil Biol Biochem* 2006, 38, (7), 1924-1932.
31. Heijerick, D. G.; De Schamphelaere, K. A. C.; Janssen, C. R., Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations (vol 133, pg 207, 2002). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 2003, 135, (4), 485-485.
32. Chen, Z. Z.; Zhu, L.; Wilkinson, K. J., Validation of the Biotic Ligand Model in Metal Mixtures: Bioaccumulation of Lead and Copper. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44, (9), 3580-3586.
33. Cobbett, C. S., A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends in Plant Science* 1999, 4, (9), 335-337.
34. Cobbett, C. S., Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* 2000, 3, (3), 211-216.
35. Cobbett, C.; Goldsbrough, P., Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 2002, 53, 159-182.
36. Kawakami, S. K.; Gledhill, M.; Achterberg, E. P., Effects of metal combinations on the production of phytochelatins and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Biometals* 2006, 19, (1), 51-60.
37. Minocha, R.; Thangavel, P.; Dhankher, O. P.; Long, S., Separation and quantification of monothiols and phytochelatins from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* 2008, 1207, (1-2), 72-83.

38. Feng, Q.; Tai, P.; Fu, S.; Zhang, Y.; Chen, Y., Role of thiol pool in cadmium detoxification in marigold plants. *Huanjing Gongcheng Xuebao* 2010, 4, (1), 214-218.
39. Clemens, S., Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 2006, 88, (11), 1707-1719.
40. Brautigam, A.; Bomke, S.; Pfeifer, T.; Karst, U.; Krauss, G. J.; Wesenberg, D., Quantification of Phytochelatins in *Chlamydomonas reinhardtii* using ferrocene-based derivatization. *Metallomics* 2010, 2, (8), 565-570.
41. Mishra, S.; Tripathi, R. D.; Srivastava, S.; Dwivedi, S.; Trivedi, P. K.; Dhankher, O. P.; Khare, A., Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresource Technology* 2009, 100, (7), 2155-2161.
42. Hori, Y.; Yoshikawa, T.; Tsuji, N.; Bamba, T.; Aso, Y.; Kudou, M.; Uchida, Y.; Takagi, M.; Harada, K.; Hirata, K., Phytochelatins inhibit the metal-induced aggregation of alpha-crystallin. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009, 107, (2), 173-176.
43. Devez, A.; Achterberg, E.; Gledhill, M., *Metallothionein and Related Chelators*. In: *Metal Ions in Life Sciences. Volume 5*  
Royal Society of Chemistry: Cambridge: 2009; Vol. 5.
44. Kawakami, S. K.; Gledhill, M.; Achterberg, E. P., Determination of phytochelatins and glutathione in phytoplankton from natural waters using HPLC with fluorescence detection. *Trac-Trend Anal Chem* 2006, 25, (2), 133-142.
45. Bramanti, E.; Toncelli, D.; Morelli, E.; Lampugnani, L.; Zamboni, R.; Miller, K. E.; Zemetra, J.; D'Ulivo, A., Determination and characterization of phytochelatins by liquid chromatography coupled with on line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2006, 1133, (1-2), 195-203.
46. Nordberg, M.; Nordberg, G. F., *Metallothioneines and related chelators*. RSC publishing: 2009; Vol. 5.
47. Margoshes, M.; Vallee, B. L., A cadmium protein from equine kidney cortex. *American Chemical Society* 1957, 79, 4813-4814.
48. Fowler, B. A.; Hildebrand, C. E.; Kojima, Y.; Webb, M., Nomenclature of metallothionein. *Experientia, Supplementum* 1987, 52, (Metallothionein 2), 19-22.
49. Chassaing, H.; Lobinski, R., Study of the polymorphism of metallothioneins by ion-spray mass spectrometry (in French). *Analisis* 1998, 26, (6), 65-67.
50. Glutathion <http://www.proanox.com/includes/images/glutathione.jpg> (Consulté le 9 Mai 2012).

51. Noctor, G.; Foyer, C. H., Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 1998, *49*, 249-279.
52. Kruusma, J.; Benham, A. M.; Williams, J. A. G.; Katakya, R., An introduction to thiol redox proteins in the endoplasmic reticulum and a review of current electrochemical methods of detection of thiols. *Analyst* 2006, *131*, (4), 459-473.
53. Noctor, G.; Foyer, C. H., Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Anal Biochem* 1998, *264*, (1), 98-110.
54. Harlan, J. M.; Levine, J. D.; Callahan, K. S.; Schwartz, B. R.; Harker, L. A., Glutathione Redox Cycle Protects Cultured Endothelial-Cells against Lysis by Extracellularly Generated Hydrogen-Peroxide. *J Clin Invest* 1984, *73*, (3), 706-713.
55. Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V., Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot-London* 2003, *91*, (2), 179-194.
56. Kondo, N.; Imai, K.; Isobe, M.; Goto, T.; Murasugi, A.; Wadanakagawa, C.; Hayashi, Y., Cadystin-a and Cadystin-B, Major Unit Peptides Comprising Cadmium Binding Peptides Induced in a Fission Yeast ----- Separation, Revision of Structures and Synthesis. *Tetrahedron Lett* 1984, *25*, (35), 3869-3872.
57. Murasugi, A.; Wada, C.; Hayashi, Y., Cadmium-Binding Peptide Induced in Fission Yeast, *Schizosaccharomyces-Pombe*. *J Biochem-Tokyo* 1981, *90*, (5), 1561-1564.
58. Kondo, N.; Isobe, M.; Imai, K.; Goto, T., Synthesis of Metallothionein-Like Peptides Cadystin-a and Cadystin-B Occurring in a Fission Yeast, and Their Isomers. *Agr Biol Chem Tokyo* 1985, *49*, (1), 71-83.
59. Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Phytochelatins - the Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher-Plants. *Science* 1985, *230*, (4726), 674-676.
60. Hanikenne, M., *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol* 2003, *159*, (2), 331-340.
61. Howe, G.; Merchant, S., Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas-Reinhardtii*. *Plant Physiol* 1992, *98*, (1), 127-136.
62. Supalkova, V.; Huska, D.; Diopan, V.; Hanustiak, P.; Zitka, O.; Stejskal, K.; Baloun, J.; Pikula, J.; Havel, L.; Zehnalek, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Beklova, M.; Kizek, R., Electroanalysis of plant thiols. *Sensors-Basel* 2007, *7*, (6), 932-959.

63. Mendoza-Cozatl, D. G.; Rangel-Gonzalez, E.; Moreno-Sanchez, R., Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup> Uptake and Accumulation by Photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2006, *51*, (4), 521-528.
64. Mendoza-Cozatl, D.; Loza-Tavera, H.; Hernandez-Navarro, A.; Moreno-Sanchez, R., Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *Fems Microbiol Rev* 2005, *29*, (4), 653-671.
65. Ahner, B. A.; Kong, S.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnology and Oceanography* 1995, *40*, (4), 649-57.
66. Rijstenbil, J. W.; Wijnholds, J. A., HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms: Pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. *Mar Biol* 1996, *127*, (1), 45-54.
67. Torres, E.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Herrero, C.; Abalde, J., Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquat Toxicol* 1997, *39*, (3-4), 231-246.
68. Torres, E.; Cid, A.; Herrero, C.; Abalde, J., Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technol* 1998, *63*, (3), 213-220.
69. Inouhe, M., Phytochelatin. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005, *17*, (1), 65-78.
70. Nyberg, S.; Zhou, L., Polarography as a tool in peptide and protein analysis: studies on metal-chelating substances induced by cadmium in the algae *Pheodactylum tricornutum* and the gramineae *Agrostis capillaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1995, *32*, (2), 147-53.
71. Rosenfeld, J. M., Derivatization in the current practice of analytical chemistry. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* 2003, *22*, (11), 785-798.
72. Nyberg, S.; Zhou, L. Z., Polarography as a Tool in Peptide and Protein-Analysis - Studies on Metal-Chelating Substances Induced by Cadmium in the Algae *Pheodactylum-Tricornutum* and the Graminae *Agrostis-Capillaris*. *Ecotox Environ Safe* 1995, *32*, (2), 147-153.
73. Vacchina, V.; Chassaigne, H.; Oven, M.; Zenk, M. H.; Lobinski, R., Characterisation and determination of phytochelatin in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry. *Analyst* 1999, *124*, (10), 1425-1430.
74. Loreti, V.; Toncelli, D.; Morelli, E.; Scarano, G.; Bettmer, J., Biosynthesis of Cd-bound phytochelatin by *Phaeodactylum tricornutum* and their speciation by size-exclusion chromatography and ion-pair chromatography coupled to ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2005, *383*, (3), 398-403.

75. Raml, R.; Goessler, W.; Francesconi, K. A., Improved chromatographic separation of thio-arsenic compounds by reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006, *1128*, (1-2), 164-170.
76. Thumann, J.; Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., Reactivation of Metal-Requiring Apoenzymes by Phytochelatin Metal-Complexes. *Febs Lett* 1991, *284*, (1), 66-69.
77. Perez-Rama, M.; Vaamonde, E. T.; Alonso, J. A., Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis* 2005, *26*, (3), 610-620.
78. Fojta, M.; Fojtova, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Dorcak, V.; Sestakova, I., Electrochemical monitoring of phytochelatin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium. *Anal Chim Acta* 2006, *558*, (1-2), 171-178.
79. Cruz, B. H.; Diaz-Cruz, J. M.; Sestakova, I.; Velek, J.; Arino, C.; Esteban, M., Differential pulse voltammetric study of the complexation of Cd(II) by the phytochelatin ( $\gamma$ -Glu-Cys)(2)Gly assisted by multivariate curve resolution. *J Electroanal Chem* 2002, *520*, (1-2), 111-118.
80. Yen, R.; Villa, J.; Louie, S.; DeWitt, J. G., Characterization of the phytochelatin-cadmium complex from a metal tolerant plant cell line by ESI/MS. *Abstr Pap Am Chem S* 1999, *217*, U127-U127.
81. Chekmeneva, E.; Diaz-Cruz, J. M.; Arino, C.; Esteban, M., Binding of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> with the phytochelatin ( $\gamma$ -Glu-Cys)(4)-Gly: a voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and electrospray ionization mass spectrometry. *Electroanal* 2007, *19*, (2-3), 310-317.
82. El-Zohri, M. H. A.; Cabala, R.; Frank, H., Quantification of phytochelatins in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* 2005, *382*, (8), 1871-1876.
83. Yen, T. Y.; Villa, J. A.; DeWitt, J. G., Analysis of phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1999, *34*, (9), 930-941.
84. Simmons, D. B. D.; Hayward, A. R.; Hutchinson, T. C.; Emery, R. J. N., Identification and quantification of glutathione and phytochelatins from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free extraction. *Anal Bioanal Chem* 2009, *395*, (3), 809-817.
85. Mounicou, S.; Vacchina, V.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R., Determination of phytochelatins by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* 2001, *126*, (5), 624-632.

86. Potesil, D.; Petrlova, J.; Adam, V.; Vacek, J.; Klejdus, B.; Zehnalek, J.; Trnkova, L.; Havel, L.; Kizek, R., Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 2005, *1084*, (1-2), 134-144.
87. Petrlova, J.; Mikelova, R.; Stejskal, K.; Kleckerova, A.; Zitka, O.; Petrek, J.; Havel, L.; Zehnalek, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Kizek, R., Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution-liquid chromatography with Coul-Array detection. *J Sep Sci* 2006, *29*, (8), 1166-1173.
88. Brautigam, A.; Wesenberg, D.; Preud'homme, H.; Schaumlöffel, D., Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts. *Anal Bioanal Chem* 2010, *398*, (2), 877-883.
89. Grill, E.; Loeffler, S.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. Purification of gamma -glutamyl cysteine transferase from plant tissue. 89-113850  
352784, 19890727., 1990.
90. Sneller, F. E. C.; van Heerwaarden, L. M.; Koevoets, P. L. M.; Vooijs, R.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C., Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J Agr Food Chem* 2000, *48*, (9), 4014-4019.
91. Mopper, K.; Delmas, D., Trace Determination of Biological Thiols by Liquid-Chromatography and Precolumn Fluorometric Labeling with Ortho-Phthalaldehyde. *Anal Chem* 1984, *56*, (13), 2557-2560.
92. Harris, E., *The Chlamydomonas Sourcebook*. second ed.; Elsevier Inc: Oxford, UK, 2009; Vol. 1, p 444.
93. <http://www.biology-blog.com/images/blogs/10-2007/Chlamydomonas-2941.jpg> (Consulté le 14 Mai 2012).
94. Merchant, S. S.; Prochnik, S. E.; Vallon, O.; Harris, E. H.; Karpowicz, S. J.; Witman, G. B.; Terry, A.; Salamov, A.; Fritz-Laylin, L. K.; Marechal-Drouard, L.; Marshall, W. F.; Qu, L. H.; Nelson, D. R.; Sanderfoot, A. A.; Spalding, M. H.; Kapitonov, V. V.; Ren, Q. H.; Ferris, P.; Lindquist, E.; Shapiro, H.; Lucas, S. M.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Cardol, P.; Cerutti, H.; Chanfreau, G.; Chen, C. L.; Cognat, V.; Croft, M. T.; Dent, R.; Dutcher, S.; Fernandez, E.; Fukuzawa, H.; Gonzalez-Ballester, D.; Gonzalez-Halphen, D.; Hallmann, A.; Hanikenne, M.; Hippler, M.; Inwood, W.; Jabbari, K.; Kalanon, M.; Kuras, R.; Lefebvre, P. A.; Lemaire, S. D.; Lobanov, A. V.; Lohr, M.; Manuell, A.; Meir, I.; Mets, L.; Mittag, M.; Mittelmeier, T.; Moroney, J. V.; Moseley, J.; Napoli, C.; Nedelcu, A. M.; Niyogi, K.; Novoselov, S. V.; Paulsen, I. T.; Pazour, G.; Purton, S.; Ral, J. P.; Riano-Pachon, D. M.; Riekhof, W.; Rymarquis, L.; Schroda, M.; Stern, D.; Umen, J.; Willows, R.; Wilson, N.; Zimmer, S. L.;

- Allmer, J.; Balk, J.; Bisova, K.; Chen, C. J.; Elias, M.; Gendler, K.; Hauser, C.; Lamb, M. R.; Ledford, H.; Long, J. C.; Minagawa, J.; Page, M. D.; Pan, J. M.; Pootakham, W.; Roje, S.; Rose, A.; Stahlberg, E.; Terauchi, A. M.; Yang, P. F.; Ball, S.; Bowler, C.; Dieckmann, C. L.; Gladyshev, V. N.; Green, P.; Jorgensen, R.; Mayfield, S.; Mueller-Roeber, B.; Rajamani, S.; Sayre, R. T.; Brokstein, P.; Dubchak, I.; Goodstein, D.; Hornick, L.; Huang, Y. W.; Jhaveri, J.; Luo, Y. G.; Martinez, D.; Ngau, W. C. A.; Otilar, B.; Poliakov, A.; Porter, A.; Szajkowski, L.; Werner, G.; Zhou, K. M.; Grigoriev, I. V.; Rokhsar, D. S.; Grossman, A. R.; Annotation, C.; Team, J. A., The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 2007, *318*, (5848), 245-251.
95. Sun, Q.; Ye, Z. H.; Wang, X. R.; Wong, M. H., Increase of glutathione in mine population of *Sedum alfredii*: A Zn hyperaccumulator and Pb accumulator. *Phytochemistry* 2005, *66*, (21), 2549-2556.
96. Morelli, E.; Scarano, G., Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environmental Research* 2001, *52*, (4), 383-395.
97. Scheidegger, C.; Behra, R.; Sigg, L., Phytochelatin formation kinetics and toxic effects in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon short- and long-term exposure to lead(II). *Aquat. Toxicol.* 2011, *101*, (2), 423-429.
98. Kola, H.; Laglera, L. M.; Parthasarathy, N.; Wilkinson, K. J., Cadmium Adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its Interaction with the Cell Wall Proteins. *Environmental Chemistry* 2004, *1*, (3), 172-179.
99. Fairbrother, A.; Wenstel, R.; Sappington, K.; Wood, W., Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007, *68*, (2), 145-227.
100. Komjarova, I.; Blust, R., Multimetal Interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn Uptake from Water in the Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* 2009, *43*, (19), 7225-7229.
101. Chen, Z. Z.; Zhu, L.; Wilkinson, K. J., Validation of the Biotic Ligand Model in Metal Mixtures: Bioaccumulation of Lead and Copper. *Environmental Science & Technology* 2010, *44*, (9), 3580-3586.
102. Ahner, B. A.; Morel, F. M. M., Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnology and Oceanography* 1995, *40*, (4), 658-65.
103. Cai, X.-H.; Brown, C.; Adhiya, J.; Traina, S. J.; Sayre, R. T., Growth and heavy metal binding properties of transgenic *Chlamydomonas* expressing a foreign metallothionein gene. *International Journal of Phytoremediation* 1999, *1*, (1), 53-65.



104. Hutchins, C. M.; Simon, D. F.; Zerges, W.; Wilkinson, K. J., Transcriptomic signatures in *Chlamydomonas reinhardtii* as Cd biomarkers in metal mixtures. *Aquat. Toxicol.* 2010, *100*, (1), 120-127.
105. Devez A.; Achterberg E.; Gledhill M., Metallothioneins and related chelators. *Royal society of Chemistry* Cambridge, UK, 2009, ( 5), 441-481.
106. Gorman, D. S.; Levine, R. P., Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1965, *54*, (6), 1665-1669.
107. Nekrassova, O.; Lawrence, N. S.; Compton, R. G., Analytical determination of homocysteine: a review. *Talanta* 2003, *60*, (6), 1085-1095.
108. CellTiter 96 Aqueous Non - Radioactive Cell proliferation Assay, i. f. u. p. G., G5430, G5440, G1111 and G1112, <http://www.promega.com/tbs/TB169/tb169.pdf> (consulté en novembre 2011).
109. Simon, D. F.; Davis, T. A.; Tercier-Waeber, M. L.; England, R.; Wilkinson, K. J., In situ evaluation of cadmium biomarkers in green algae. *Environ. Pollut.* 2011, *159*, (10), 2630-2636.
110. Wei, L.; Donat, J. R.; Fones, G.; Ahner, B. A., Interactions between Cd, Cu, and Zn Influence Particulate Phytochelatin Concentrations in Marine Phytoplankton: Laboratory Results and Preliminary Field Data. *Environmental Science & Technology* 2003, *37*, (16), 3609-3618.
111. Israr, M.; Jewell, A.; Kumar, D.; Sahi, S. V., Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *J Hazard Mater* 2011, *186*, (2-3), 1520-1526.
112. Borgmann, U.; Schroeder, J. E.; Golding, L. A.; Dixon, D. G., Models of Cadmium Accumulation and Toxicity to *Hyalella azteca* during 7-and 28-Day Exposures. *Hum Ecol Risk Assess* 2010, *16*, (3), 560-587.
113. An, Y. J.; Kim, Y. M.; Kwon, T. I.; Jeong, S. W., Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment* 2004, *326*, (1-3), 85-93.

