

# Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications (ED 211)

## THESE

N° \_\_\_\_\_

Présentée par

**Florent PENEN**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour**

Spécialité : **Chimie analytique et environnement**

---

### **Imagerie cellulaire du stress métallique induit par le cadmium chez la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* par techniques synchrotron $\mu$ XRF / XAS et nanoSIMS**

---

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2015

Directeur de thèse : **Dirk SCHAUMLÖFFEL**

Co-directrice de thèse : **Marie-Pierre ISAURE**

#### **Composition du jury**

<b>Arnaud GAUTHIER</b>	Rapporteur	Professeur des universités, Université de Lille 1
<b>Emmanuel DOELSCH</b>	Rapporteur	Directeur de recherche, CIRAD, Aix-en Provence
<b>Philippe Le COUSTUMER</b>	Examineur	Maître de conférences, Université de Bordeaux
<b>Rémy GUYONEAUD</b>	Examineur	Professeur des universités, UPPA, Pau
<b>Dirk SCHAUMLÖFFEL</b>	Directeur de thèse	Directeur de recherche, CNRS, Pau
<b>Marie-Pierre ISAURE</b>	Co-Directrice de thèse	Maître de conférences, UPPA, Pau



# REMERCIEMENTS

Au cours de cette thèse, en raison du caractère pluridisciplinaire de mon travail, j'ai été amené à travailler avec de nombreuses personnes qui m'ont aidé à avancer dans l'étude de ce sujet. Je voudrais remercier ici les différentes équipes qui m'ont accueilli parmi elles et plus particulièrement les personnes qui ont eu la gentillesse de m'accompagner, me former et me soutenir tout au long de ces trois années de recherche.

Premièrement, je souhaite remercier Rémy Guyoneaud d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie également Arnaud Gauthier et Emmanuel Doelsch d'avoir accepté la tâche de rapporteur.

Je remercie tout particulièrement mes encadrants de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces recherches. Merci à mon directeur de thèse Dirk Schaumlöffel et ma co-directrice Marie-Pierre Isaure pour leur confiance, leur compréhension, leur disponibilité et leurs conseils qui m'ont permis de travailler de manière agréable et efficace.

Merci à Dirk Dobritzsch et Ivo Bertalan de m'avoir accueilli chaleureusement au sein des instituts de physiologie végétale et de biologie moléculaire de l'université Wittenberg à Halle en Allemagne, afin d'apprendre toutes les ficelles de la culture de *Chlamydomonas*.

Je remercie Hiram Castillo-Michel et Olivier Proux des lignes de lumière ID21 et FAME de l'ESRF de Grenoble qui m'ont permis de réaliser les mesures par techniques synchrotron dans les meilleures conditions possibles et dans la bonne humeur.

Je remercie également l'équipe du Bordeaux Imaging Center et plus particulièrement Etienne Gontier pour son investissement et son savoir-faire dans la préparation des échantillons en condition cryo ainsi que de m'avoir donné accès à la microscopie électronique.

Merci à Philippe Le Coustumer d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et de m'avoir épaulé durant de nombreuses heures dans le repérage fastidieux des cellules par TEM. Je remercie également Julien Malherbe pour les merveilleuses cartographies nanoSIMS obtenues, notamment celles des cellules repérées par TEM.

Je remercie Stéphanie Huguet pour son aide dans la préparation d'échantillons et dans le traitement de données synchrotron. Merci pour les bons moments passés ensembles durant la première moitié de thèse. Je tiens à dire merci à Joana Cavalhiero pour m'avoir fait partager ses connaissances concernant le traitement statistique des données avec le logiciel R.

Enfin, je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu durant mes études et tout particulièrement ma compagne et ma fille qui m'ont tenu éveillé pendant la rédaction de ce manuscrit.

Merci à tous

## RESUME

La micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est considérée comme un modèle dans l'étude du stress métallique chez les organismes photosynthétiques. Les mécanismes de tolérance au stress induit par le cadmium ne sont pas encore clairement établis. Afin de déterminer ces mécanismes, la localisation subcellulaire et la spéciation chimique *in situ* du cadmium ont été déterminées chez trois souches de *C. reinhardtii* exposées au cadmium en condition mixotrophe (CO<sub>2</sub> + Acétate) : (i) une souche de type sauvage (wt), (ii) la souche cell-wall less (cw15) qui est déficiente en paroi cellulaire, (iii) la souche pcs1 qui surexprime la phytochélatine synthase (PCS), enzyme ordinairement cytosolique, directement dans son chloroplaste. Pour ce faire, la toxicité du cadmium a été déterminée en mesurant la croissance ainsi que la teneur en chlorophylle et en amidon des micro-algues. Puis, la localisation du cadmium au niveau subcellulaire a été réalisée par trois techniques complémentaires (fractionnement subcellulaire,  $\mu$ XRF, TEM/X-EDS). La spéciation chimique *in situ* du cadmium a été effectuée par  $\mu$ XAS et XAS. Enfin, l'imagerie élémentaire et isotopique par nanoSIMS a permis de compléter les distributions élémentaires dans la cellule et de déterminer l'impact du cadmium sur les mécanismes d'assimilation du carbone.

(i) Les résultats de ce travail montrent que la souche wt est la plus sensible au cadmium des trois avec une diminution de la croissance et de la teneur en chlorophylle. Lorsqu'elle ne présente pas ces signes de toxicité, le cadmium est séquestré dans l'ensemble de la cellule par des ligands thiolés et de façon mineure par les granules de polyphosphates. Suite à l'exposition à de fortes concentrations en cadmium, le cadmium intracellulaire est lié majoritairement à des ligands carboxylés probablement induits par le stress oxydatif. De plus, la présence du cadmium dans le pyrénioïde bloque l'assimilation du carbone inorganique (CO<sub>2</sub>), au profit de l'assimilation du carbone organique (acétate), qui est stocké sous forme d'amidon.

(ii) La surexpression de la PCS de la souche pcs1 provoque une production d'amidon importante autour du pyrénioïde et protège la chlorophylle du stress lié au cadmium. Bien que la synthèse de phytochélatines soit potentiellement élevée, la moitié du cadmium intracellulaire est séquestrée par les granules de polyphosphates et l'amidon.

(iii) La souche cw15 est la plus tolérante des trois souches et n'accumule pas la totalité du cadmium disponible, contrairement aux cellules possédant une paroi cellulaire. Similairement au wt, le cadmium intracellulaire est séquestré majoritairement par des ligands thiolés et de façon mineure par les granules de polyphosphates. L'observation de granules de polyphosphates excrétées par les micro-algues permet l'hypothèse de l'excrétion du cadmium vacuolaire induisant un flux constant de cadmium à travers la cellule.

En conclusion, la séquestration du cadmium via des ligands soufre, potentiellement par des polypeptides thiolés, est le mécanisme de tolérance majoritaire mis en place par *C. reinhardtii*. Néanmoins, la séquestration du cadmium par les granules de polyphosphates semble apporter une plus grande tolérance vis-à-vis du stress lié au cadmium.

# SOMMAIRE

<b>Introduction generale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique.....</b>	<b>7</b>
1. PROBLEMATIQUE DU CADMIUM .....	7
2. <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> : UN ORGANISME MODELE.....	8
2.1. Ultrastructure de <i>C. reinhardtii</i> .....	8
2.2. Un organisme modèle multidisciplinaire .....	11
2.2.1. Modèle génétique .....	11
2.2.2. Modèle dans l'étude des photosystèmes .....	12
2.2.3. Modèle dans la mobilité flagellée .....	15
2.2.4. Modèle dans l'étude du rythme circadien.....	16
2.2.5. Modèle dans l'étude de la tolérance vis-à-vis des métaux .....	16
3. INTERACTION DU CADMIUM AVEC <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> .....	18
3.1. Toxicité .....	18
3.1.1. Compétition avec les ions $Ca^{2+}$ .....	18
3.1.2. Augmentation du stress oxydatif .....	21
3.2. Gestion du stress métallique par la micro-algue .....	22
3.2.1. La paroi cellulaire comme première barrière.....	22
3.2.2. Pénétration du cadmium .....	23
3.2.3. Induction de la synthèse de biomolécules .....	23
3.2.4. Séquestration dans les granules.....	26
4. LOCALISATION ET SPECIATION INTRACELLULAIRE DES METAUX .....	28
4.1. Localisation subcellulaire des métaux .....	28
4.1.1. Fractionnement subcellulaire .....	28
4.1.1. Microscopie électronique à transmission couplée à la micro-analyse X.....	31
4.1.2. Imagerie par couplage ablation laser-ICP-MS .....	34
4.1.1. Emission de rayons X induite par des protons, à l'échelle du nanomètre .....	36
4.1.2. Micro fluorescence X.....	37
4.1.3. Spectrométrie de masse à ionisation secondaire, à l'échelle du nanomètre .....	39
4.2. Spéciation des métaux .....	44
4.2.1. Couplage de techniques de séparation avec un spectromètre de masse en tant que détecteur pour la spéciation des métaux.....	44
4.2.2. Spectroscopie d'absorption X .....	46
4.2.3. $\mu$ XRF et $\mu$ XAS en tandem.....	48
5. CONCLUSION .....	49
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes .....</b>	<b>55</b>
1. CULTURE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> .....	55
2. MESURE DE LA TOXICITE.....	57
2.1. Mesure de la croissance.....	57
2.2. Mesure de la production de chlorophylle .....	58
2.3. Mesure de la production d'amidon.....	59
2.4. Détermination de la spéciation du cadmium et des métaux essentiels dans les milieux de culture.....	59
2.5. Tests statistiques .....	60
3. DOSAGE DES METAUX DANS LA BIOMASSE DE <i>C. REINHARDTII</i> .....	60
3.1. Lavage des cellules.....	60
3.2. Dosage des métaux.....	61
4. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE .....	61
5. PURIFICATION DES GRANULES .....	63
6. IMAGERIE PAR TEM ET NANOSIMS .....	64
6.1. Préparations des échantillons .....	64
6.1.1. Cryofixation .....	64

6.1.2. Cryosubstitution.....	65
6.1.3. Ultramicrotomie .....	66
<b>6.2. Analyse TEM/X-EDS .....</b>	<b>67</b>
<b>6.3. Analyse nanoSIMS .....</b>	<b>68</b>
<b>7. TECHNIQUES SUR RAYONNEMENT SYNCHROTRON.....</b>	<b>69</b>
<b>7.1. Préparation des échantillons .....</b>	<b>69</b>
7.1.1. Analyse subcellulaire par $\mu$ XRF et $\mu$ XANES.....	69
7.1.2. Analyse au niveau de la culture .....	69
7.1.3. Synthèse du standard Cd-Phytate .....	70
<b>7.2. Analyse XANES et EXAFS au seuil K du cadmium sur BM30B (ESRF).....</b>	<b>70</b>
7.2.1. Présentation de la ligne de lumière .....	70
7.2.2. Acquisition des données .....	71
7.2.3. Traitement des données.....	71
7.2.4. Exploitation des données .....	72
<b>7.3. Analyse <math>\mu</math>XRF et <math>\mu</math>XANES/XANES au seuil L<sub>III</sub> du cadmium sur ID21 (ESRF) .....</b>	<b>73</b>
7.3.1. Présentation de la ligne de lumière.....	73
7.3.2. Acquisition des données .....	74
7.3.3. Traitement et exploitation des données .....	75

## **Chapitre III : Résultats et discussion.....79**

<b>1. DISPONIBILITE DU CADMIUM ET DES ELEMENTS TRACES DANS LES MILIEUX DE CULTURE .....</b>	<b>79</b>
<b>2. TOXICITE DU CADMIUM .....</b>	<b>81</b>
2.1. Choix des concentrations d'exposition au cadmium.....	81
2.2. Impact du cadmium sur la vitalité de <i>C. reinhardtii</i> .....	82
2.2.1. Croissance et teneur en chlorophylle .....	82
2.2.2. Production d'amidon.....	84
2.3. Accumulation du cadmium .....	85
<b>3. LOCALISATION DU CADMIUM AU NIVEAU SUBCELLULAIRE .....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Localisation du cadmium dans l'ultrastructure cellulaire par TEM/X-EDS .....</b>	<b>91</b>
3.1.1. Souche wt en milieu TAP classique .....	91
3.1.2. Souche pcs1 en milieu TAP classique .....	94
3.1.3. Souche cw15 en milieu TAP classique .....	96
3.1.4. Souche wt en milieu TAP modifié .....	98
<b>3.2. Localisation du cadmium par SR-<math>\mu</math>XRF .....</b>	<b>100</b>
3.2.1. Localisation du cadmium dans la souche wt.....	101
3.2.2. Localisation du cadmium dans les souches mutantes.....	103
<b>3.3. Localisation du cadmium par fractionnement subcellulaire .....</b>	<b>105</b>
<b>4. SPECIATION CHIMIQUE DU CADMIUM IN SITU CHEZ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII PAR SR-XAS .....</b>	<b>111</b>
4.1. Spéciation du Cd à l'échelle subcellulaire par $\mu$ XANES au seuil L <sub>III</sub> du Cd .....	111
4.2. Spéciation globale du cadmium par SR-XAS au seuil L <sub>III</sub> et K du cadmium .....	114
<b>5. IMPACT DU CADMIUM SUR L'ASSIMILATION DU CARBONE PAR IMAGERIE NANOSIMS. 121</b>	<b>121</b>
<b>6. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES METAUX ESSENTIELS.....</b>	<b>131</b>
6.1. Impact du cadmium sur l'assimilation des métaux essentiels.....	131
6.1.1. En milieu TAP classique.....	132
6.1.2. En milieu TAP modifié .....	133
6.2. Localisation subcellulaires des métaux essentiels par imagerie nanoSIMS.....	135

**Conclusion générale.....141**

**Références.....153**

**ANNEXES.....169**

# Liste des figures

## Chapitre I

Figure 1 : Structure cellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	8
Figure 2 : Fonctionnement d'un acidocalcisome.....	10
Figure 3 : La vacuole pulsatile chez <i>C. reinhardtii</i> .....	10
Figure 4 : schéma du cycle de vie de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	11
Figure 5 : Schéma des métabolismes impliqués dans l'assimilation du carbone chez <i>C. reinhardtii</i> .....	13
Figure 6 : Le flagelle de <i>C. reinhardtii</i> .....	15
Figure 7 : inhibition de la photo-activation du photosystème II par le cadmium.....	20
Figure 8 : Réduction des ROS par le glutathion.....	22
Figure 9 : La synthèse des phytochélatines.....	24
Figure 10 : mécanismes régulés à la hausse par le cadmium, impliqués dans l'assimilation du soufre.....	26
Figure 11 : Méthodes de fractionnement subcellulaire chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	30
Figure 12 : La microscopie électronique à transmission.....	31
Figure 13 : Schéma d'un système d'ablation laser couplée à l'ICP-MS.....	35
Figure 14 : Schéma de du phénomène de fluorescence X.....	37
Figure 15 : Schéma du nanoSIMS 50L.....	42
Figure 16 : Couplage de techniques pour la détection et l'identification des composés biologiques liés aux métaux .....	44
Figure 17 : Principe de la spectroscopie d'absorption X.....	46

## Chapitre II

Figure 18 : Culture de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en milieu liquide.....	57
Figure 19 : réactions enzymatiques ayant lieu au cours du dosage de l'amidon par le kit enzymatique HK (Sigma Aldrich).....	59
Figure 20 : organigramme du protocole de lavage de <i>C. reinhardtii</i> .....	61
Figure 21 : protocole de fractionnement subcellulaire de <i>C. reinhardtii</i> .....	63
Figure 22 : protocole de purification des granules de polyphosphate.....	65
Figure 23 : Procédure de découpe du bloc de résine afin d'obtenir des coupes successives utilisées en imagerie corrélative TEM/nanoSIMS.....	67
Figure 24 : Configuration de la ligne de lumière FAME (ESRF).....	70
Figure 25 : Spectre d'absorption du Cd-Phytate avant normalisation.....	71
Figure 26 : Spectre EXAFS correspondant au spectre d'absorption en figure 24 après changement d'abscisse.....	72
Figure 27 : Configuration de la ligne de lumière ID21 (ESRF).....	74

## Chapitre III

Figure 28 : Concentrations en ions libres des éléments trace et du cadmium suivant l'ajout en cadmium total dans les milieux TAP classique et modifié, calculée avec le logiciel Visual Minteq.....	79
Figure 29 : Courbes concentration-réponse calculée en fonction des taux de croissance de la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposées à 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP modifié. ....	81
Figure 30 : Impact du cadmium sur <i>C. reinhardtii</i> . Taux de croissance et teneur en chlorophylle.....	83
Figure 31 : Impact du cadmium sur <i>C. reinhardtii</i> . Teneur en amidon.....	84

Figure 32 : Accumulation du cadmium par les souches wt, pcs1 et cw15 de <i>C. reinhardtii</i> exposées à 10 et 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures dans les milieux TAP classique et modifié.....	86
Figure 33 : Localisation du cadmium chez la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique.....	93
Figure 34 : Localisation du cadmium chez la souche pcs1 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique.....	95
Figure 35 : Localisation du cadmium chez la souche cw15 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique.....	97
Figure 36 : Localisation du cadmium chez la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP modifié.....	99
Figure 37 : Cartographies élémentaires de Cd, P, S et Ca par $\mu\text{XRF}$ chez la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 2 et 48 heures dans le milieu TAP classique et modifié.....	101
Figure 38 : Cartographies élémentaires de Cd, P, S et Ca par $\mu\text{XRF}$ chez les souches pcs1 et cw15 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique.....	103
Figure 39 : Localisation du cadmium par fractionnement subcellulaire.....	106
Figure 40 : Culot de débris cellulaire à gauche. Culot de débris cellulaire mis en présence de lugol à droite.....	108
Figure 41 : Spéciation du cadmium à l'échelle subcellulaire par $\mu\text{XANES}$ au seuil LIII du Cd chez les souches wt et pcs1 exposées à 70 $\mu\text{M}$ de Cd pendant 48 heures....	112
Figure 42 : Spéciation globale du cadmium à l'échelle de la culture par XANES au seuil LIII du Cd, par XANES et EXAFS au seuil K du Cd chez les souches wt, pcs1 et cw15 exposées à 70 $\mu\text{M}$ de Cd pendant 2 et 48 heures en milieu TAP classiques et modifié. .....	116

Figure 43 : Cartographies élémentaires du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et images des électrons secondaires (SE) correspondantes réalisées par nanoSIMS (source Cs+) chez la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée ou non à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP modifié où l'acétate est marqué au $^{13}\text{C}$ .....	122
Figure 44 : Imagerie corrélative par nanoSIMS et TEM/X-EDS de la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP modifié où l'acétate est marqué au $^{13}\text{C}$ .....	124
Figure 45 : Imagerie corrélative par nanoSIMS et TEM/X-EDS de la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP modifié où l'acétate est marqué au $^{13}\text{C}$ .....	125
Figure 46 : Schéma simplifié des voies métaboliques chez <i>C. reinhardtii</i> .....	126
Figure 47 : Modèle hypothétique du mécanisme de concentration du $\text{CO}_2$ chez <i>C. reinhardtii</i> .....	129
Figure 48 : Teneurs en métaux essentiels des souches wt, pcs1 et cw15 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 10 et 70 $\mu\text{M}$ de cadmium pendant 48 heures en milieu TAP classique et modifié.....	134
Figure 49 : Localisation subcellulaire des métaux essentiels par imagerie corrélative TEM / nanoSIMS de la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> cultivée en milieu TAP modifié.....	136
Figure 50 : Localisation subcellulaire des métaux essentiels par imagerie corrélative TEM / nanoSIMS de la souche pcs1 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP classique.....	137
Figure 51 : Stratégie de séquestration du cadmium mise en place par la souche wt de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP classique et modifié.....	144
Figure 52 : Stratégie de séquestration du cadmium mise en place par la souche pcs1 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP classique.....	145
Figure 53 : Stratégie de séquestration du cadmium mise en place par la souche cw15 de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 70 $\mu\text{M}$ de cadmium en milieu TAP classique.....	147

# Liste des tables

## Chapitre I

Table 1 : Liste des enzymes impliquées dans l'assimilation du carbone chez <i>C. reinhardtii</i> .....	13
Table 2 : Liste non exhaustive des études traitant de la toxicité du cadmium chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	18
Table 3 : méthode utilisée pour la fixation chimique de <i>C. reinhardtii</i> .....	32
Table 4 : Efficacité d'ionisation en fonction de la nature de la source d'ions primaires.....	38
Table 5 : Facteurs de sensibilité relative mesurés pour un bombardement d'ions primaires d'oxygène, des ions secondaires positifs et une matrice de silicium .....	38
Table 6 : Facteurs de sensibilité relative mesurés pour un bombardement d'ions primaires de césium, des ions secondaires négatifs et une matrice de silicium.....	39
Table 7 : Complémentarité des techniques à faisceau X ( $\mu$ XRF/XAS), d'ions (nanoSIMS) et d'électrons (TEM/X-EDS) dans l'étude du stress métallique chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	51

## Chapitre II

Table 8 : Composition du milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP).....	55
Table 9 : Composition du milieu Tris-acétate-phosphate modifié.....	56
Table 10 : Etapes d'infiltration des échantillons.....	66

### Chapitre III

Table 11 : Constantes de stabilité des complexes entre les métaux du milieu TAP classique et l'EDTA ainsi qu'entre les métaux du milieu TAP modifié et l'EDDHA (lindsay's database).....80

Table 12 : Taux de croissance et teneur en chlorophylle après 72 heures de culture en milieux TAP classique et modifié des souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii*.....82

Table 13 : Impact de la paroi cellulaire sur l'accumulation du cadmium. Le cadmium cellulaire est considéré comme étant la somme du cadmium intracellulaire et adsorbé à la paroi cellulaire. Les pourcentages du cadmium intracellulaire et adsorbé par rapport au cadmium cellulaire sont donnés entre parenthèses.....87

Table 14 : Concentrations en ions libres des métaux présents dans les milieux TAP classique et modifié contaminés par 10 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium, calculées avec Visual Minteq.....129

# **INTRODUCTION GENERALE**



## **INTRODUCTION GENERALE**

Dans le cadre d'un développement démographique et technologique accru, la société contemporaine prélève 10 % de l'eau douce de surface disponible pour ses activités industrielles, agricoles et domestiques (Jackson et al., 2001). Il en résulte des rejets d'eaux usées chargées en polluants organiques et inorganiques, libérés dans le milieu aquatique. Le déversement industriel des micropolluants métalliques majeurs (As, Pb, Cd, Hg) dépasse largement les quantités émises naturellement et influence leur cycle biogéochimique, entraînant une dégradation de la qualité de l'eau (Nriagu, 1989). Le cadmium est un métal classé comme polluant prioritaire à cause de sa grande accessibilité, de son effet toxique au sein de la chaîne trophique aquatique (Campbell, 2006; Nriagu, 1989). L'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* appartient au premier maillon de cette chaîne trophique aquatique. La rapidité de sa culture et la facilité de manipulation de ses génomes en font un excellent modèle parmi les organismes photosynthétiques dans l'étude de la photosynthèse, de la motilité flagellée et du stress métallique (Dent et al., 2001; Hanikenne, 2003; Merchant et al., 2007). Aussi, nous avons choisi ce modèle d'algue unicellulaire pour déterminer l'impact du métal dans l'écosystème aquatique.

Pour évaluer l'effet toxique du cadmium sur cette algue, plusieurs questions émergent :

- **Sous quelles formes se trouve le métal dans l'algue ?**
- **Dans quels compartiments cellulaires est-il séquestré ?**

En effet, la toxicité d'un métal dépend de la concentration des différentes espèces chimiques du métal (i.e. la spéciation chimique du métal) ainsi que de leur localisation dans l'écosystème et les organismes vivants (Campbell, 1995). Dans le milieu aquatique, la spéciation chimique du métal régit la disponibilité du métal dans le milieu aquatique. Par exemple, les métaux présents sous forme d'ions libres pénètrent plus facilement dans la cellule qu'un métal fortement complexé ou précipité (Paquin et al., 2002). Dans l'organisme, la spéciation chimique intracellulaire gouverne la circulation et la séquestration du métal contaminant. Des mécanismes d'homéostasie sont mis en œuvre afin de maintenir les concentrations adéquates en ions métalliques essentiels (Fe, Cu, Zn, Mn, ...) dans certains compartiments cellulaires. De plus, la

## Introduction générale

cellule met en place des mécanismes de tolérance visant à minimiser les dommages engendrés par la compétition entre ions métalliques essentiels et non-essentiels pour les sites biologiques d'intérêt majeur (Clemens, 2001). Généralement, cela passe par la séquestration du métal contaminant, soit par des biomolécules, soit à l'intérieur d'une organelle précise, soit les deux à la fois (Clemens, 2006a). Cette répartition subcellulaire et cette spéciation auront également des répercussions sur la façon dont sera remobilisé le métal par la suite, durant la vie ou à la mort de l'organisme, dans le système aquatique.

La littérature traitant de l'interaction entre le cadmium et l'algue unicellulaire modèle est déjà bien étoffée mais peu d'études s'attardent sur la localisation subcellulaire du cadmium (Lavoie et al., 2009a; Nagel et al., 1996a; Nishikawa et al., 2006). Le travail présenté dans ce manuscrit vise à caractériser l'impact du cadmium au niveau subcellulaire chez la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, choisie en tant que modèle de cellule végétale phytoplanctonique. Les objectifs de ce travail sont :

- **déterminer l'impact physiologique du cadmium sur la micro-algue**
- **déterminer dans quels compartiments subcellulaires le métal est stocké et sous quelles formes.**
- **déterminer l'impact du cadmium sur l'assimilation du carbone**
- **d'évaluer le rôle de la paroi cellulaire, des granules de polyphosphate et de la surexpression de la phytochélatine synthase dans la séquestration du cadmium via l'utilisation de mutants**

Afin d'atteindre les objectifs de ce travail, plusieurs techniques complémentaires ont été mises en œuvre. L'utilisation de techniques d'imagerie comprenant la microscopie électronique par transmission (TEM), la fluorescence X (XRF) et la nano spectrométrie de masse à ionisation secondaire (nanoSIMS) ont permis la localisation directe du cadmium dans les compartiments cellulaires. En parallèle des techniques d'imagerie, le fractionnement subcellulaire a donné accès à la distribution subcellulaire du cadmium par une approche indirecte. Enfin, la spéciation chimique du cadmium a été déterminée *in situ* par spectroscopie d'absorption X (XAS). A notre connaissance, cette approche n'avait jamais été développée, pour l'étude des mécanismes de tolérance au stress métallique de *C. reinhardtii*.

## Introduction générale

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique visant à présenter la micro-algue modèle *Chlamydomonas reinhardtii* et l'impact du cadmium sur cette dernière. Les méthodes d'étude de la localisation subcellulaire et de la spéciation chimiques des métaux sont détaillées dans la dernière partie de ce chapitre. Le matériel et les méthodes employés pour mener à bien la partie expérimentale de ces travaux sont décrits en chapitre II. Enfin, le troisième chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des résultats. L'impact toxicologique du cadmium sur les souches de *C. reinhardtii* est traité dans un premier temps, suivi par sa localisation et sa spéciation chimique au niveau subcellulaire. L'effet du cadmium sur l'assimilation du carbone et des métaux essentiels est exposé dans un second temps.



# CHAPITRE I :

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. PROBLEMATIQUE DU CADMIUM</b> .....	7
<b>2. CHLAMYDOMONAS REINHARDTII : UN ORGANISME MODELE</b> .....	8
<b>2.1. Ultrastructure de <i>C. reinhardtii</i></b> .....	8
<b>2.2. Un organisme modèle multidisciplinaire</b> .....	11
2.2.1. <i>Modèle génétique</i> .....	11
2.2.2. <i>Modèle dans l'étude des photosystèmes</i> .....	12
2.2.3. <i>Modèle dans la mobilité flagellée</i> .....	15
2.2.4. <i>Modèle dans l'étude du rythme circadien</i> .....	16
2.2.5. <i>Modèle dans l'étude de la tolérance vis-à-vis des métaux</i> .....	16
<b>3. INTERACTION DU CADMIUM AVEC CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</b> .....	18
<b>3.1. Toxicité</b> .....	18
3.1.1. <i>Compétition avec les ions Ca<sup>2+</sup></i> .....	18
3.1.2. <i>Augmentation du stress oxydatif</i> .....	21
<b>3.2. Gestion du stress métallique par la micro-algue</b> .....	22
3.2.1. <i>La paroi cellulaire comme première barrière</i> .....	22
3.2.2. <i>Pénétration du cadmium</i> .....	23
3.2.3. <i>Induction de la synthèse de biomolécules</i> .....	23
3.2.4. <i>Séquestration dans les granules</i> .....	26
<b>4. LOCALISATION ET SPECIATION INTRACELLULAIRE DES METAUX</b> .....	28
<b>4.1. Localisation subcellulaire des métaux</b> .....	28
4.1.1. <i>Fractionnement subcellulaire</i> .....	28
4.1.1. <i>Microscopie électronique à transmission couplée à la micro-analyse X</i> .....	31
4.1.2. <i>Imagerie par couplage ablation laser-ICP-MS</i> .....	34
4.1.1. <i>Emission de rayons X induite par des protons, à l'échelle du nanomètre</i> .....	36
4.1.2. <i>Micro fluorescence X</i> .....	37
4.1.3. <i>Spectrométrie de masse à ionisation secondaire, à l'échelle du nanomètre</i> .....	39
<b>4.2. Spéciation des métaux</b> .....	44
4.2.1. <i>Couplage de techniques de séparation avec un spectromètre de masse en tant que détecteur pour la spéciation des métaux</i> .....	44
4.2.2. <i>Spectroscopie d'absorption X</i> .....	46
4.2.3. <i>μXRF et μXAS en tandem</i> .....	48
<b>5. CONCLUSION</b> .....	49



## **CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1. PROBLEMATIQUE DU CADMIUM**

Naturellement présent dans la croûte terrestre, le cadmium est émis dans l'atmosphère lors d'éruptions volcaniques et de feux de forêt, puis en milieu aquatique lors de l'érosion des sols. Dans un milieu naturel comme les lacs helvètes non contaminés de Greifen, Sempach et Lucerne, la concentration en cadmium dissout varie entre 0,03 et 0,09 nM (Xue and Sigg, 1998). Dans l'environnement, la principale source de cadmium reste néanmoins anthropique. C'est un déchet du raffinage du zinc. Il est utilisé dans la fabrication de batteries au nickel, de pigments (jaune CdS), de revêtements anti-corrosion et présent dans les engrais phosphatés. En milieu contaminé, les concentrations en cadmium peuvent varier. Par exemple, en Suisse, la rivière Glatt polluée par des effluents industriels de station d'épuration voit sa concentration en cadmium dissout augmenter jusqu'à 2 nM (Xue and Sigg, 1998). De même, la concentration en cadmium total dans l'eau de sol prélevée près d'une usine atteint les 70 µM (Lee et al., 2004).

Contrairement aux autres métaux tels que Pb, Cu, Zn, le cadmium possède une faible affinité pour les particules comme les oxyhydroxydes de fer (Tessier et al., 1993), ce qui favoriserait son maintien dans la phase dissoute et augmenterait son temps de résidence dans les environnements aquatiques. Néanmoins, la quantité de ligands biologiques jouerait un rôle important dans la complexation du cadmium. Par exemple, dans le lac Orta en Italie où la présence de ligands biologiques est faible, 80 % du cadmium dissout total est sous forme  $\text{Cd}^{2+}$  libre alors qu'elle ne représente que 1 % dans le lac eutrophe de Greifen (Xue and Sigg, 1998). En supplément de sa capacité à se maintenir dans les écosystèmes aquatiques, des études ont montré une biomagnification du cadmium au sein de la chaîne trophique (Croteau et al., 1998; Seebaugh et al., 2005), faisant de ce dernier un polluant majeur (Campbell, 2006).

Le phytoplancton constitue la base de la chaîne alimentaire et sera le premier impacté par la pollution liée au cadmium. Ce métal est généralement considéré comme non-essentiel pour les micro-algues. Grâce à leur facilité de culture, les micro-algues unicellulaires sont les modèles parfaits pour étudier l'impact et les mécanismes de tolérance vis-à-vis du cadmium chez les organismes aquatiques photosynthétiques.

## 2. *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* : UN ORGANISME MODELE

L'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* occupe une place particulière parmi les micro-algues puisqu'elle fait office d'organisme modèle photosynthétique. Elle partage de nombreuses caractéristiques physiques et physiologiques avec les plantes supérieures par sa photosynthèse chloroplastique (Dent et al., 2001) et les animaux par sa mobilité flagellaire (Merchant et al., 2007) ou la synthèse de sélénoprotéines (Novoselov, 2002). Largement étudiée, sa structure cellulaire a été bien décrite, ce qui facilite l'interprétation des données d'imagerie cellulaire.

### 2.1. Ultrastructure de *C. reinhardtii*

La figure 1 présente les structures intracellulaires de la micro-algue obtenues par TEM. En tant qu'organisme photosynthétique, elle possède un chloroplaste en forme de croissant qui occupe la majorité de la cellule. En son sein, les thylakoïdes abritent les photosystèmes dans leurs membranes. Le pyrénéoïde assure la fixation du CO<sub>2</sub> en accueillant un amalgame de l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RubisCo) ainsi qu'un mécanisme de concentration du CO<sub>2</sub> (carbon-concentrating mechanism (CCM)) (Moroney and Ynalvez, 2007). Généralement, le pyrénéoïde est entouré d'une carapace d'amidon, forme de stockage du carbone, qui est induite par le CCM (Ramazanov et al., 1994).

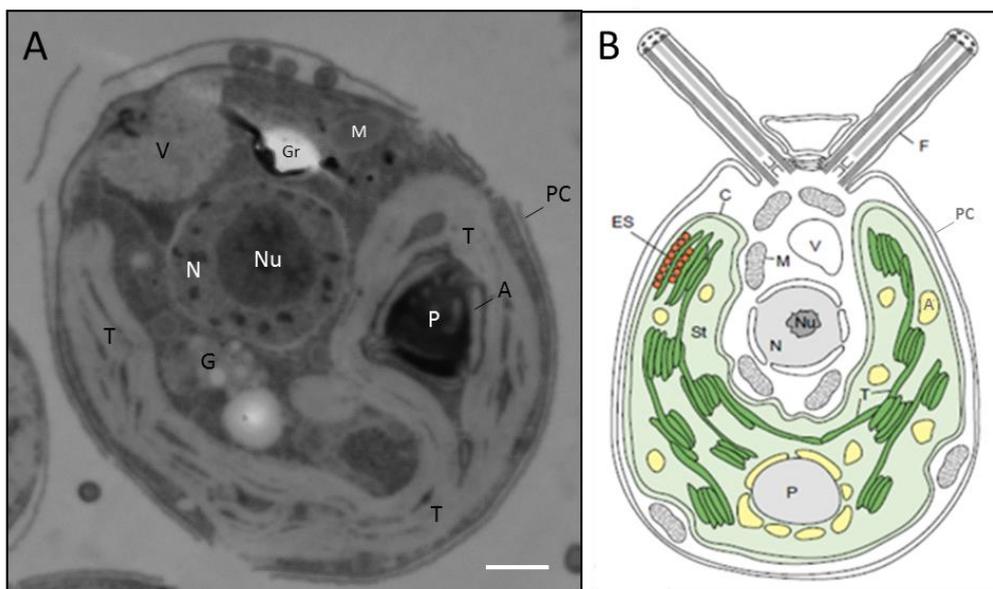


Figure 1 : Structure cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii*. (A) Image de coupe de *C. reinhardtii* obtenue par microscopie électronique à transmission, barre d'échelle = 1 µm. (B) Schéma de la structure cellulaire de *C. reinhardtii* (Dent et al., 2001). Légende : A, amidon ; C, chloroplaste ; ES, eye-spot ; F, flagelle ; G, appareil de Golgi ; Gr, granule ; M, mitochondrie ; N, nucleus ; Nu, nucleolus ; P, pyrénoïde ; PC, paroi cellulaire ; St, stroma ; T, thylakoïde ; V, vacuole pulsatile.

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Afin d'assurer une photosynthèse optimale, *C. reinhardtii* est capable de se déplacer vers les meilleures conditions d'éclairage par phototaxie. Pour se faire, elle utilise le stigma ou « eyespot » afin de détecter les sources lumineuses. Cet organelle contenue dans le chloroplaste est constituée de petites granules recouvertes de pigments de type caroténoïdes. La micro-algue est munie d'une paire de flagelles pour sa mobilité. Ces dernières sont ancrées en tête de cellule au niveau du corps basal.

Dans le cytoplasme, les mitochondries sont le siège de la respiration. Le noyau central est entouré de l'appareil de Golgi, organelles responsables de la maturation et du transfert des protéines et autres biomolécules vers la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules. *C. reinhardtii* possède également deux types particuliers de vacuoles, impliquées dans le transfert et l'osmorégulation cellulaire.

Mises en évidence chez *C. reinhardtii* (Ruiz et al., 2001), les acidocalcisomes furent décrits dans un premier temps chez le parasite *Trypanosoma brucei* (Vercesi et al., 1994), avant d'être identifiées les champignons (Marchesini et al., 2002), chez les bactéries (Seufferheld et al., 2003), chez les plaquettes de l'être humain (Ruiz et al., 2004) et chez les cellules d'œufs de poule (Ramos et al., 2010). Ces organelles sont de petites vacuoles au pH acide remplies par une granule de polyphosphates complexée à des cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ...). Le fonctionnement de l'acidocalcisome est présenté en figure 2. Afin de maintenir le pH acide, l'acidocalcisome est équipé de plusieurs types de pompe à protons ( $\text{H}^+$ -Pyrophosphatase,  $\text{H}^+$ -ATPase ...). A l'intérieur de la vacuole, la polyphosphatase kinase s'emploie à la formation de polyphosphate à partir de phosphate inorganique tandis que l'exopolyphosphatase catalyse la réaction inverse. Grâce à ces enzymes, l'acidocalcisome jouerait un rôle important dans le stockage des phosphates. De plus, les transporteurs de cations présents dans la membrane impliqueraient cet organelle dans l'homéostasie des métaux (Docampo et al., 2010). Ainsi, chez *C. reinhardtii* il a été montré que le cuivre était séquestré dans les acidocalcisomes lorsque l'apport en zinc était limité. Cela éviterait l'utilisation du cuivre en tant que cofacteur par les enzymes nécessitant un cation  $\text{Zn}^{2+}$  pour fonctionner correctement (Hong-Hermesdorf et al., 2014).

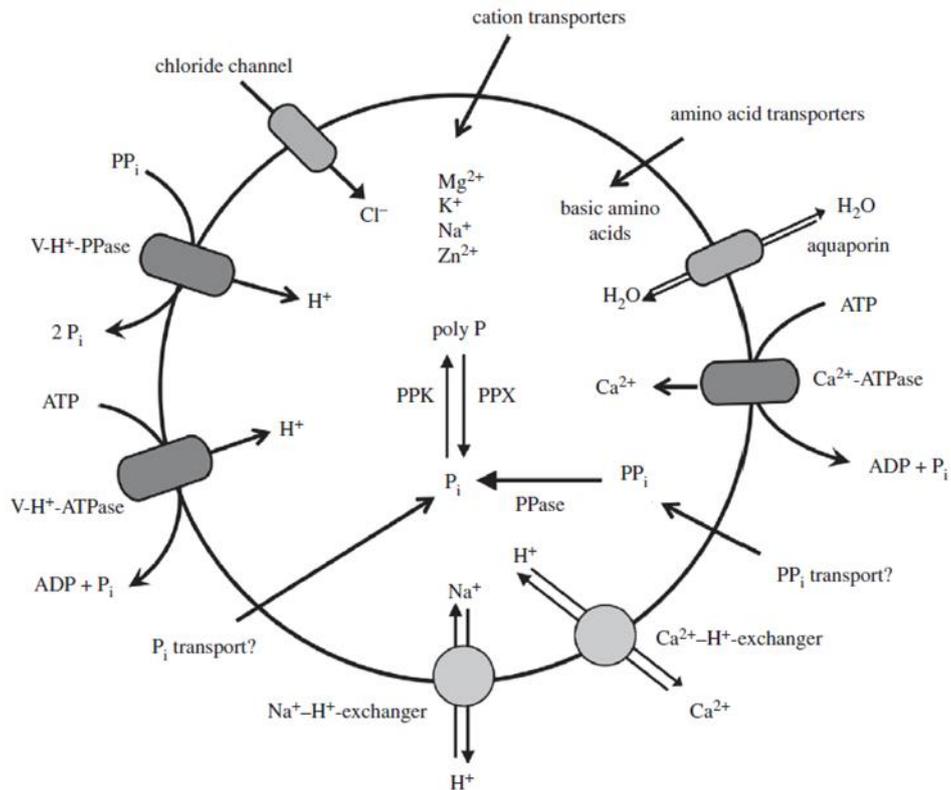


Figure 2 : Fonctionnement d'un acidocalcisome (*Docampo et al., 2010*). Légende : Pi, inorganic phosphate ; PPi, pyrophosphate ; Poly-P, polyphosphate ; PPX, exopolyphosphatase ; PPase, pyrophosphatase ; PPK, polyphosphate kinase.

Les vacuoles pulsatiles, présentées en figure 3, sont les plus grosses vacuoles de *C. reinhardtii*. Situées sous le corps basal, elles sont responsables de l'osmorégulation dans la cellule. En milieu hypotonique, la vacuole se remplit et se gorge de solutés osmotiquement actifs afin d'éviter que la cellule implose. L'état de la vacuole est alors considéré en diastole. Lorsque le milieu devient hypertonique, la vacuole pulsatile se vide et se rétracte pour empêcher l'explosion de la cellule. Dans cet état, appelé systole, elle forme un complexe de minuscules vacuoles (Denning and Fulton, 1989).

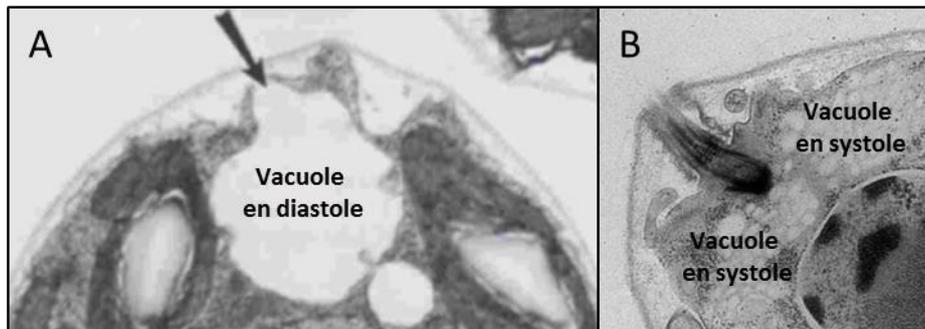


Figure 3 : La vacuole pulsatile chez *C. reinhardtii*. (A) Vacuole pulsatile durant la diastole (*Denning and Fulton, 1989*) ; (B) Vacuole pulsatile durant la systole.

Il semblerait que les acidocalcisomes et les vacuoles pulsatiles soient liés, formant un grand système assurant la gestion de l'osmorégulation (Docampo et al., 2010; Marchesini et al., 2002; Ruiz et al., 2001).

## 2.2. Un organisme modèle multidisciplinaire

### 2.2.1. Modèle génétique

Depuis une quarantaine d'année, la culture de *C. reinhardtii* est parfaitement maîtrisée (Harris, 1989). Son cycle de vie présente la particularité de pouvoir être asexué ou sexué, suivant les conditions de leur environnement (figure 4). Lorsque le milieu de culture fournit les nutriments nécessaires à sa croissance, la micro-algue se reproduit par voie asexuée, aboutissant à la formation de colonies de cellules génétiquement identiques. Quand la source d'azote vient à s'épuiser, une reproduction sexuée a lieu entre les gamètes de souche différente. La possibilité de maîtriser l'alternance des cycles sexués et asexués constitue un précieux avantage lors des études génétiques. D'un côté, le cycle sexué autorise les croisements génétiques et l'étude de la localisation des gènes par l'analyse de tétrades. D'un autre côté, les cellules haploïdes expriment directement les phénotypes dus aux mutations des gènes et les conservent tant que le cycle de reproduction asexué est maintenu.

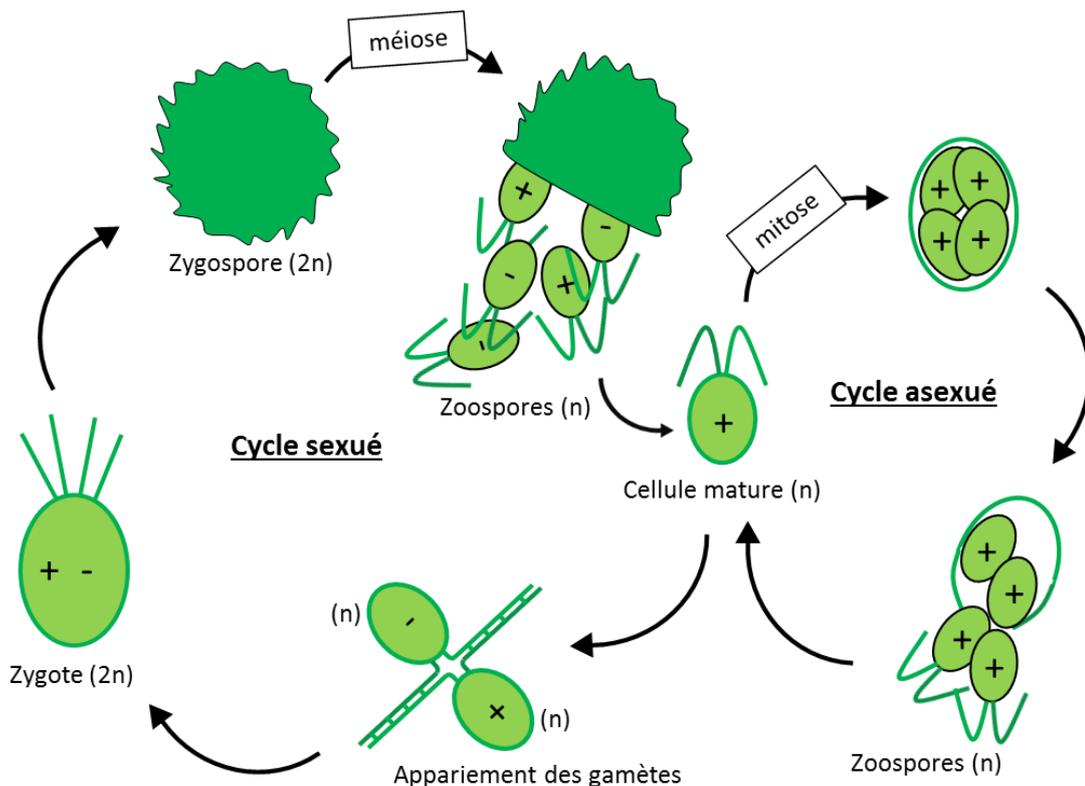


Figure 4 : schéma du cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii* d'après (Harris, 2009).

En tant que modèle génétique, ses génomes nucléaires, mitochondriaux et chloroplastiques ont été entièrement séquencés (Rochaix et al., 1998 ; Maul et al., 2002; Merchant et al., 2007). De plus, il est possible de transformer les trois génomes (Goldschmidt-Clermont, 1998; Kindle, 1998) ce qui laisse une grande souplesse dans l'étude de ses photosystèmes, très proches de celui des plantes supérieures.

### 2.2.2. Modèle dans l'étude des photosystèmes

Contrairement aux plantes supérieures, *C. reinhardtii* ne possède qu'un seul chloroplaste, ce qui facilite son étude. Les protéines constituant les photosystèmes sont codées dans les génomes nucléaires et chloroplastiques. Le fait de pouvoir transformer ces deux génomes séparément ouvre le champs d'exploration de la synthèse et de la structure des complexes photosynthétiques (Dent et al., 2001).

*C. reinhardtii* peut se développer hétérotrophiquement avec l'acétate comme seule source de carbone ce qui lui permet vivre complètement dans l'obscurité. Il est ainsi possible d'isoler des mutants incapables de réaliser la photosynthèse et d'étudier les réactions biochimiques et l'expression de gènes induites ou non par la lumière (Johnson et al., 2011; Semenova et al., 2015).

En conditions photoautotrophes, la photosynthèse assure la production d'ATP et de NADPH. Le triose phosphate (G3P), synthétisé dans le chloroplaste par les enzymes du cycle de Calvin suite à la fixation du CO<sub>2</sub>, est utilisé comme substrat de la néoglucogénèse, aboutissant à la formation d'amidon. En conditions hétérotrophes et à l'obscurité, la concentration en ATP est plus importante dans le cytosol. Le G3P y est synthétisé grâce à l'assimilation de l'acétate lors du cycle du glyoxylate, puis est transféré dans le chloroplaste. Une partie du G3P est transformée en amidon lors de la néoglucogénèse, l'autre partie est utilisée pour la production d'ATP (Johnson and Alric, 2013). L'assimilation de l'acétate est présentée en figure 5 et table 1. *C. reinhardtii* peut être cultivée en milieu mixotrophe, alliant source de carbone organique et inorganique. Cette méthode assure la meilleure production de biomasse (Moon et al., 2013).

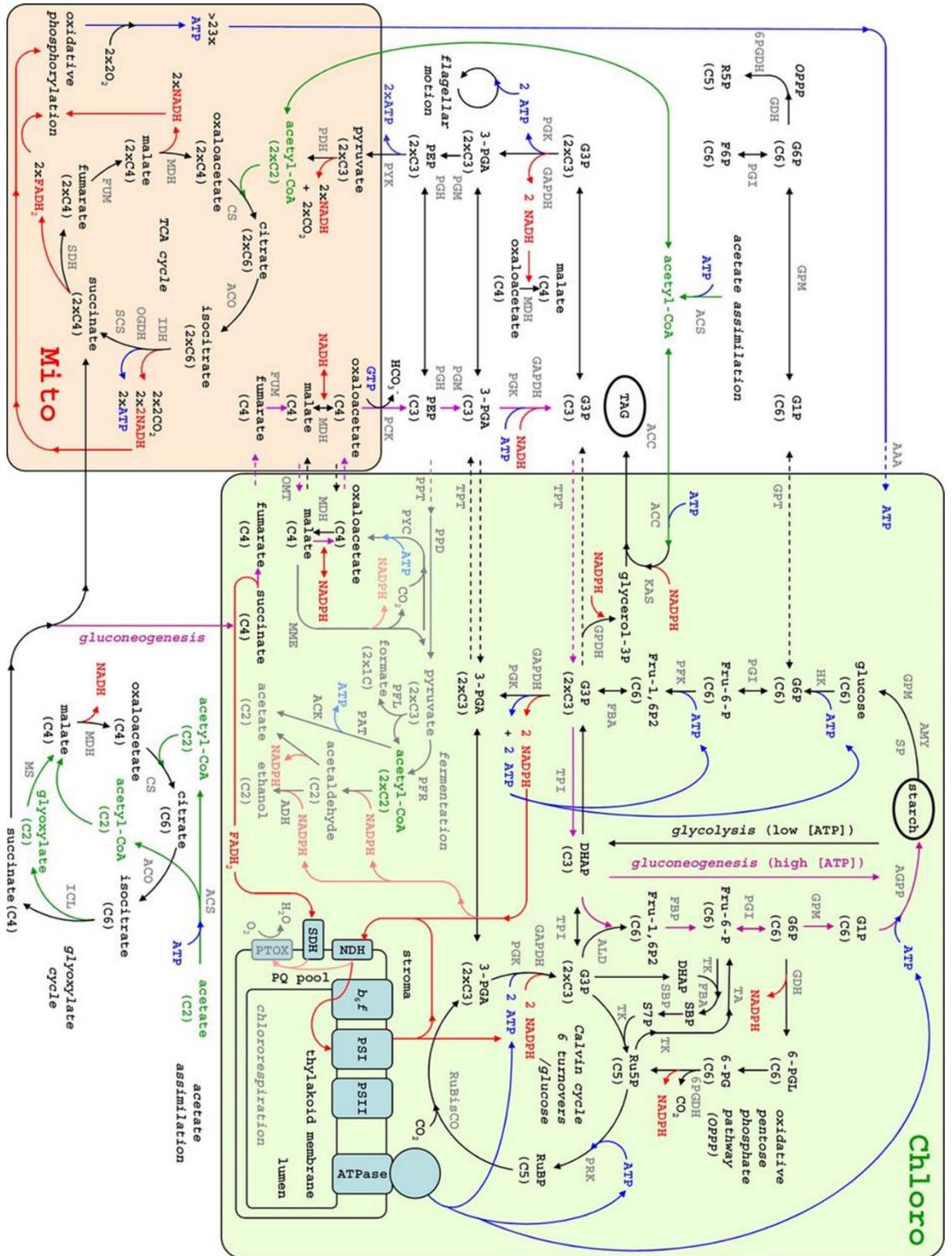


Figure 5 : Schéma des métabolismes impliqués dans l'assimilation du carbone chez *C. reinhardtii*. L'assimilation de l'acétate est colorée en vert, la néoglucogénèse en violet, l'ATP en bleu, le NADPH en rouge (Johnson and Alric, 2013).

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Table 1 : Liste des enzymes impliquées dans l'assimilation du carbone chez *C. reinhardtii* (Johnson and Alric, 2013). En relation avec la figure 5.

Abb.	Enzyme	Reaction
<b>Starch synthesis</b>		
AMY	Amylase	Starch → glucose
SP	Starch phosphorylase	Starch → G1P
GPM	Phosphoglucomutase	G1P ↔ G6P
<b>Glycolysis / gluconeogenesis</b>		
HK	Hexokinase	Glucose + ATP → G6P
AGPP	ADP-glucose pyrophosphorylase	ADP-glucose ← G1P + ATP
PGI	Phosphoglucose isomerase	G6P ↔ Fru-6-P
PFK	Phosphofructokinase	Fru-6-P + ATP → Fru-1,6-P2
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase	Fru-6-P ← Fru-1,6-P2
ALD	Fructose bisphosphate aldolase	Fru-1,6-P2 ↔ G3P
TPI	Triose-phosphate isomerase	G3P ↔ DHAP
GAPDH	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	G3P ↔ 1,3BPG + NAD(P)H
PGK	Phosphoglycerate kinase	1,3BPG ↔ 3-PGA + ATP
PGM	Phosphoglycerate mutase	3-PGA ↔ 2-PGA
PGH	Enolase	2-PGA ↔ PEP
PYK	Pyruvate kinase	PEP → pyruvate + ATP
PCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PEP + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ↔ oxaloacetate + GTP
PEPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase	PEP + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → oxaloacetate
<b>Oxidative pentose-phosphate pathway</b>		
GDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6P → 6-PGL + NADPH
6PGDH	6-phosphogluconate dehydrogenase	6-PG → Ru5P + NADPH + CO <sub>2</sub>
<b>Acetate assimilation</b>		
ACS	Acetyl-CoA synthetase	Acetyl-CoA ← acetate + ATP
PAT*	Phosphate acetyltransferase	Acetyl-CoA ← acetyl-P
ACK*	Acetate kinase	Acetyl-P ← acetate + ATP
<b>Metabolism of acetyl-CoA, pyruvate, phosphoenolpyruvate and C4 compounds</b>		
PDH	Pyruvate dehydrogenase	Pyruvate ↔ acetyl-CoA + NADH + CO <sub>2</sub>
PYC	Pyruvate carboxylase	Oxaloacetate ← pyruvate + ATP + CO <sub>2</sub>
PPD	Pyruvate, phosphate dikinase	Pyruvate + ATP ↔ PEP
MDH	Malate dehydrogenase	Oxaloacetate + NAD(P)H ↔ malate
MME	Malic enzyme	Malate ↔ pyruvate + NAD(P)H + CO <sub>2</sub>
NNT	Transhydrogenase	NADH ↔ NADPH
FUM	Fumarase	Fumarate ↔ malate
<b>Fermentation enzymes</b>		
PDC	Pyruvate dehydrogenase	Pyruvate → acetyl-CoA + CO <sub>2</sub>
PFR	Pyruvate ferredoxin oxidoreductase	Pyruvate → acetyl-CoA + CO <sub>2</sub>
PFL	Pyruvate formate lyase	Pyruvate → formate + acetyl-CoA
PDC	Pyruvate decarboxylase	Pyruvate → acetaldehyde + CO <sub>2</sub>
ADH	Alcohol dehydrogenase	Acetaldehyde + NAD(P)H → ethanol
PAT*	Phosphate acetyltransferase	Acetyl-CoA → acetyl-P
ACK*	Acetate kinase	Acetyl-P → acetate + ATP
<b>Membrane-bound enzymes</b>		
SDH	Succinate dehydrogenase	Succinate + Q → fumarate + QH <sub>2</sub>
NDH	NAD(P)H dehydrogenase	NAD(P)H + Q → NAD(P) <sup>+</sup> + QH <sub>2</sub>
PTOX	Plastid terminal oxidase	QH <sub>2</sub> + ½ O <sub>2</sub> → Q + H <sub>2</sub> O
<b>Lipid synthesis</b>		
ACC	Acetyl-CoA carboxylase	Malonyl-CoA ← acetyl-CoA + ATP + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
KAS	β-ketoacyl synthase, fatty acid synthase	FA + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ← ac-CoA + ma-CoA + NADPH
GPDH	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	Glycerol-3P ← DHAP + NAD(P)H
<b>Metabolite shuttle across organelles</b>		
MEX	Maltose exporter	(Plastid targeted) 1 gene
HXT	Hexose (glucose) transporter	(Plastid targeted) 1 gene
TPT	Triose-P or hexose-P (GPT) translocator	(Plastid targeted) 2 genes
OMT	Oxoglutarate / malate transporter	(Plastid targeted) 2 genes, see also LC120
MITC	Mitochondrial carrier	(Mito targeted) 14 genes
PPT	PEP transporter	(Plastid targeted) 1 gene
AAA	ATP / ADP transporter (NTT homolog)	(Plastid targeted) 3 genes
ANT	ATP / ADP transporter (AAC homolog)	(Mito targeted) 2 genes

### 2.2.3. Modèle dans la mobilité flagellée

*C. reinhardtii* possède deux flagelles de type 9+2 similaires à ceux retrouvés chez de nombreux eucaryotes. Chaque flagelle est composé de 9 paires de microtubules externes, nommées (a) et (b), qui forment un tube autour d'une paire centrale. Les flagelles sont ancrés en tête de cellule par l'intermédiaire du corps basal. Une zone de transfert permettant l'excision du flagelle est insérée entre ce dernier et le corps basal (Silflow and Lefebvre, 2001). La structure du complexe flagellaire est présentée en figure 6. Plus de 125 mutations ont été identifiées lors de l'étude de la structure et de l'assemblage du flagelle de *C. reinhardtii* (Dutcher, 2000).

Le mouvement du flagelle est conduit par les bras de dynéines présents sur chaque microtubule (a) des paires externes. En consommant une ATP, la dynéine va se lier au microtubule (b) d'une paire voisine et glisser jusqu'à son extrémité, entraînant le mouvement du flagelle (Silflow and Lefebvre, 2001).

Le flagelle intervient lors de deux mécanismes importants dans la vie de *C. reinhardtii*. D'une part, il est activement impliqué dans la phototaxie, permettant à la cellule de détecter et de se diriger vers les conditions de luminosité optimales pour assurer la photosynthèse. Les photons reçus par le stigma induisent un signal transmis aux flagelles par des variations de concentrations intra flagellaires en  $Ca^{2+}$  de l'ordre du micro-molaire, faisant avancer la cellule en spirale vers la source de lumière (Hegemann, 1997). D'autres parts, il est l'élément principal de l'adhésion des gamètes lors de la reproduction sexuée, grâce à la synthèse d'agglutinines sur la surface flagellaire (Goodenough et al., 1993).

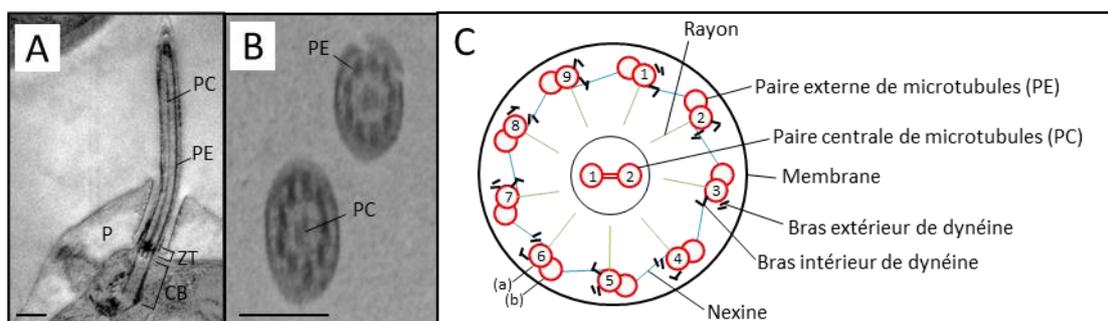


Figure 6 : Le flagelle de *C. reinhardtii*. Coupes longitudinale (A) et transversale (B) de flagelle observées par microscopie électronique à transmission, barre de légende = 300 nm. Légende : CB, corps basal ; P, paroi cellulaire ; PC, paire centrale de microtubules ; PE, paire externe de microtubule ; ZT, zone de transfert. (C) Schéma de la structure en 9+2 d'après (Merchant et al., 2007).

### 2.2.4. Modèle dans l'étude du rythme circadien

Comme la majorité des organismes vivant, *C. reinhardtii* est soumise à un rythme circadien. Au lieu de maintenir en parallèle toutes les activités biologiques, la micro-algue va les répartir selon le cycle jour/nuit.

Ainsi, l'assimilation de l'azote et la photosynthèse sont deux métabolismes nécessaires à tout organisme photosynthétique. Afin de les réaliser dans les conditions optimales, *C. reinhardtii* va favoriser la phototaxie lors des phases claires et l'assimilation de l'azote par chimiotactisme lors des phases obscures (Byrne et al., 1992).

De même, la reproduction asexuée des cellules végétatives est coordonnée par le cycle jour/nuit aboutissant à des cultures synchrones avec une mitose accomplie avant le début de la phase claire (Goto and Johnson, 1995). Cette caractéristique est très pratique dans l'étude de la division cellulaire. Il semblerait que les processus régulés par le rythme circadien, notamment ceux ayant lieu en phase obscure, soient sensibles aux UV, ce qui valide l'hypothèse du « escape from light » (Nikaido and Johnson, 2000).

### 2.2.5. Modèle dans l'étude de la tolérance vis-à-vis des métaux

Depuis des décennies, *C. reinhardtii* est utilisée comme modèle des mécanismes de tolérance contre le stress métallique chez les organismes photosynthétiques (Hanikenne, 2003). Des études toxicologiques ont été menées concernant le mercure, le nickel, le cadmium, le cuivre, le zinc (Cain and Allen, 1980; Jamers et al., 2013a, 2013b; Li et al., 2012; Macfie et al., 1994; Prasad et al., 1998; Stoiber et al., 2010; Visviki and Rachlin, 1994). Classiquement, l'exposition des cellules algales aux métaux entraîne une baisse de la croissance. La toxicité des métaux dépend de leur disponibilité, intimement liée à leur spéciation chimique, et de la souche exposée.

Ainsi, selon le modèle de l'ion libre (free ion activity model(FIAM)), la toxicité serait proportionnelle à l'activité de la forme ionique du métal plutôt qu'à sa concentration totale (Paquin et al., 2002). Afin de prendre en compte la spéciation du métal, la compétition avec les autres cations dans l'interaction avec la paroi et les transporteurs cellulaires, le modèle du ligand biotique (BLM) a été développé (Di Toro et al., 2001) et appliqué sur *C. reinhardtii* (François et al., 2007; Lavoie et al., 2012, 2014).

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

L'impact des métaux sur la structure et la physiologie de *C. reinhardtii* a pu être étudié en isolant des souches résistantes ou sensibles au stress métallique. Il est connu que la paroi cellulaire de la micro-algue, constituée majoritairement de protéines et de glycoprotéines (Imam et al., 1985), présente une grande affinité avec les cations métalliques. Cette propriété est d'ailleurs utilisée en biorémediation afin de diminuer les teneurs métalliques des eaux usées par adsorption sur la paroi de cellules de *C. reinhardtii* (Bayramoğlu et al., 2006; Jiang et al., 2012). La souche CW15, déficiente en paroi cellulaire, reste plus sensible au cadmium, nickel, cuivre et cobalt qu'une souche de type sauvage montrant l'importance de cette première barrière protectrice (Macfie et al., 1994, 1994; Prasad et al., 1998).

Certains mutants résistants au cadmium séquestrent le cadmium de manière performante via les phytochélatines (Hu et al., 2001). D'autres n'accumulent pas l'arsénate grâce à une perméabilité réduite au niveau des transporteurs de la membrane plasmique (Fujiwara et al., 2000). Suite à une mutation, un polypeptide du complexe photosynthétique PSII, en temps normal cible du cadmium, a perdu son affinité pour le métal toxique, conférant un phénotype résistant au cadmium (Voigt et al., 1998).

Afin d'étudier la tolérance aux métaux, des gènes étrangers peuvent être introduits dans les génomes de *C. reinhardtii*. Une métallothionéine de type II appartenant initialement au poulet a pu être exprimée chez la micro-algue, multipliant par deux sa capacité d'accumulation du cadmium par rapport à une souche non modifiée (Cai et al., 1999). De même, le gène de la  $\Delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, impliquée dans la synthèse de proline, a été introduit chez *C. reinhardtii*. La souche transgénique synthétisait deux fois plus de proline et pouvait accumuler quatre fois plus de cadmium qu'une cellule non modifiée (Siripornadulsil et al., 2002). Ainsi, l'utilisation de souches de *C. reinhardtii* dont les mutations seraient impliquées dans les mécanismes de tolérance vis-à-vis des métaux permettrait de caractériser ces mécanismes.

### 3. INTERACTION DU CADMIUM AVEC *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

#### 3.1. Toxicité

Chez les micro-algues, le cadmium est considéré comme non-essentiel. Cependant, il a été signalé que, chez la diatomée *Thalassiosira weissflogii*, l'anhydrase carbonique CDCA1 était capable d'utiliser le cadmium en tant que co-facteur lorsque le zinc venait à manquer (Lane et al., 2005; Park et al., 2007). Des études sur la toxicité du cadmium ont été réalisées chez *C. reinhardtii*. Il en ressort que les souches déficientes en paroi cellulaire sont plus sensibles au cadmium que les souches possédant une paroi (Macfie et al., 1994, 1994; Prasad et al., 1998). De plus, d'après la liste d'études établie en table 2, il semblerait que les cellules algales résisteraient mieux au stress dû au cadmium dans un milieu de culture hétérotrophe/mixotrophe comme le milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP). En milieu autotrophe, la concentration efficace en cadmium responsable de 30 ou 50 % de diminution de croissance ( $CE_{30}$ - $CE_{50}$ ) se situe au niveau du nM (Lavoie et al., 2009a; Macfie et al., 1994; Stoiber et al., 2010, 2012) alors qu'en milieu hétérotrophe/mixotrophe, elle serait plutôt au niveau du  $\mu$ M (Gillet et al., 2006; Jamers et al., 2013b). L'apport d'une source de carbone organique (acétate) fournit une alternative à la fixation du  $CO_2$ , dépendante de la photosynthèse. Ainsi, une souche mutante dont la production d' $O_2$  par le PSII était réduite présentait une résistance au cadmium, désignant le PSII comme cible potentielle de la toxicité du cadmium. Sa croissance était limitée en milieu autotrophe mais pas en présence d'acétate (Voigt et al., 1998).

##### 3.1.1. Compétition avec les ions $Ca^{2+}$

Le cadmium est connu pour prendre la place de certains cofacteurs en se liant aux résidus d'acides aminés (cystéine, aspartate, glutamate ...) des protéines cibles, empêchant leur bon fonctionnement. Caractérisés par un rayon ionique comparable (Ca : 100 pm – Cd : 95 pm), les ions  $Cd^{2+}$  entrent notamment en compétition avec les ions  $Ca^{2+}$  inhibant les réactions enzymatiques ou les messages impliquant le calcium.

Le centre catalytique du photosystème II, réalisant l'oxydation de l'eau, contient 4 ions  $Mn^{2+}$ , 1 ion  $Ca^{2+}$  et 1 à 2 ions  $Cl^-$ . Lors de l'assemblage du PSII, l'unité du centre catalytique est introduite en dernier. Afin de devenir fonctionnel, durant la dernière étape de l'assemblage, le PSII a besoin d'être photoactivé en présence de ses cofacteurs ( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Cl^-$ ) et de lumière, comme présenté en figure 7.

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Table 2 : Liste non exhaustive des études traitant de la toxicité du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Souche de <i>C. reinhardtii</i>	Milieu de culture	[cadmium]	Toxicité	Références
WT (11-32a) de l'université de Göttingen Allemagne	TAP medium	Espèce non mentionnée 8,1 et 114,8 µM de cadmium total	Baisse du taux de croissance : Témoin : 1,78 j <sup>-1</sup> 8,1 µM (total Cd) : 1,82 j <sup>-1</sup> 114,8 µM (total Cd) : 1,64 j <sup>-1</sup>	(Jamers et al., 2013b)
WT n°90 de la collection d'algues UTEX de l'université du Texas	synthetic freshwater media Fraquil	Espèce non mentionnée 0, 10, 20, 50, 80, 100, 130, 150, 175, 200, 225, 250, 300 et 400 nM de cadmium total	EC50 = 0,44 µmol.g <sup>-1</sup> (Cd intra cellulaire) EC50 = 9,7 nM (Cd <sup>2+</sup> )	(Stoiber et al., 2012)
WT n°90 de la collection d'algues UTEX de l'université du Texas	synthetic freshwater media Fraquil	Espèce non mentionnée 0, 20, 40, 60, 80 nM de cadmium total	EC50 = 15 nM (Cd total) EC50 = 14 nM (Cd <sup>2+</sup> )	(Stoiber et al., 2010)
WT UCC11 de la collection de l'université de Toronto	modified High Salt medium	CdNO <sub>3</sub> pour obtenir des concentrations entre 0,7 et 221 nM de Cd <sup>2+</sup>	EC50 = 273 nM (Cd <sup>2+</sup> )	(Lavoie et al., 2009a)
CW15	TAgP medium avec glycerophosphate	CdCl <sub>2</sub> à 150 µM	Diminution de 50 % de la croissance	(Gillet et al., 2006)
WT UCC11 et CW UTCC12 de la collection de l'université de Toronto	modified High Salt medium	CdCl <sub>2</sub> à 0, 5, 10, 20, 30, 50 µM à pH 5 et 6,8	Souche cw plus sensible et toxicité plus élevée à pH 6,8 Wt pH 5 : EC30 = 4,5 µM Wt pH 6,8 : EC30 = 0,1 µM Cw pH 5 : EC30 = 3,5 µM cW pH 6,8 : EC30 = 0,1 µM	(Macfie et al., 1994)

Le cadmium a été montré responsable de l'inhibition de la photosynthèse en prenant la place du  $\text{Ca}^{2+}$  lors de l'activation du PSII (Faller et al., 2005).

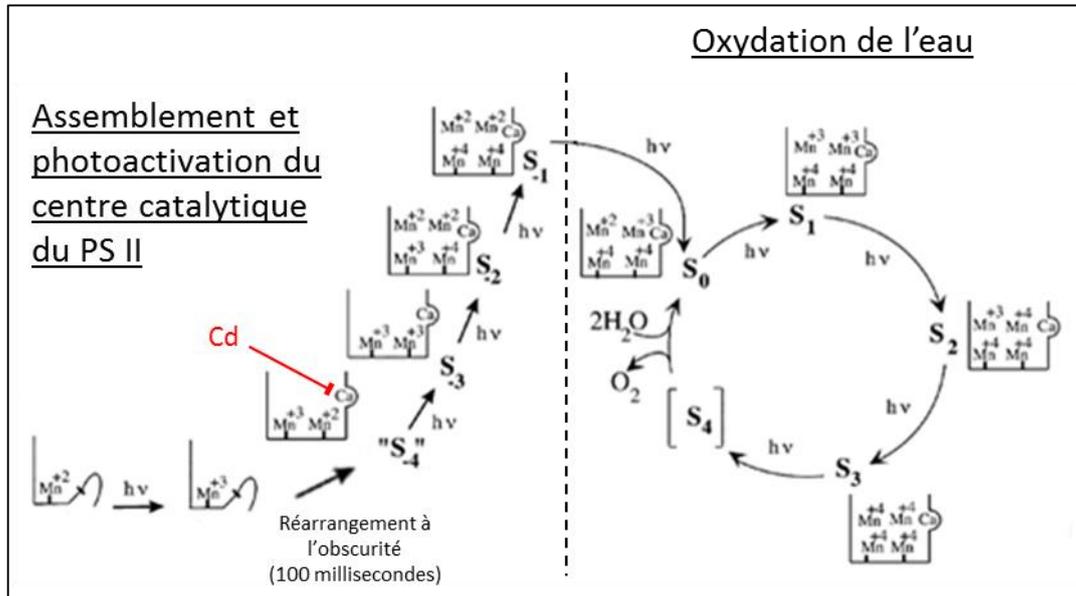


Figure 7 : inhibition de la photo-activation du photosystème II par le cadmium d'après (Burnap, 2004; Faller et al., 2005)

Le calcium est un messenger secondaire couramment utilisé dans les chaînes de transduction de signaux cellulaires. Il pénètre à l'intérieur des cellules ou des organelles par l'intermédiaire de canaux ioniques. Le cadmium, étant chimiquement proche du calcium, possède une grande affinité pour les canaux ioniques du calcium et bloque leur accès (Lansman et al., 1986), perturbant les messages impliquant l'influx ou l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$ . Lors de la reproduction sexuée, les flagelles de gamètes de type différent adhèrent entre elles grâce à la sécrétion d'agglutinines. Suite à l'adhésion, la transduction du signal de fusion cellulaire passe par un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui va être bloqué par le cadmium (Goodenough et al., 1993). De même, le signal amenant à la déflagellation passe par un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ , lui aussi bloqué par le cadmium (Quarmby and Hartzell, 1994).

### 3.1.2. Augmentation du stress oxydatif

Chez les organismes aérobies, la production d'espèces d'oxygène réactives (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) a lieu transitoirement. Les ROS sont toxiques pour la cellule car elles provoquent l'oxydation des protéines, des acides nucléiques ou des lipides (Pinto et al., 2003). En condition normale, leur formation est relativement lente mais elle peut être exacerbée par l'intervention de facteurs de stress exogènes, notamment les UV ou les métaux (cuivre, vanadium, nickel ...) pouvant intervenir lors de réaction d'oxydo-réduction de type Fenton (Stoiber et al., 2013).

Afin de limiter ce stress oxydant, la cellule synthétise le glutathion (GSH) qui réduit les ROS grâce à son groupement thiol. Ce tri-peptide est le produit final de deux réactions enzymatiques. Dans un premier temps, la  $\gamma$ -EC synthétase forme la  $\gamma$ -glutamylcystéine ( $\gamma$ -EC) à partir de glutamate et de cystéine. Dans un second temps, la glutathion synthétase lie une glycine à la  $\gamma$ -EC pour synthétiser le glutathion (Bräutigam et al., 2011).

Le glutathion participe à la réduction des ROS avec l'aide de la Glutathion peroxydase (GPx). La forme oxydée du glutathion (GSSG) qui en résulte est réduite grâce à la GSH réductase afin de régénérer le glutathion (figure 8). En temps normal, la forme réduite du glutathion est 500 fois plus présente que la forme oxydée (Berg et al., 2002). Néanmoins, lors d'un stress oxydatif, le ratio forme réduite sur forme oxydée (GSH/GSSG) diminue.

Bien que le cadmium n'intervienne pas directement dans la production de ROS par les réactions d'oxydo-réduction de type Fenton, il a été montré une diminution du ratio GSH/GSSG, chez *C. reinhardtii* exposée au cadmium (Bräutigam et al., 2011; Siripornadulsil et al., 2002; Stoiber et al., 2013). Le glutathion serait donc impliqué dans les mécanismes de tolérance vis-à-vis du cadmium.

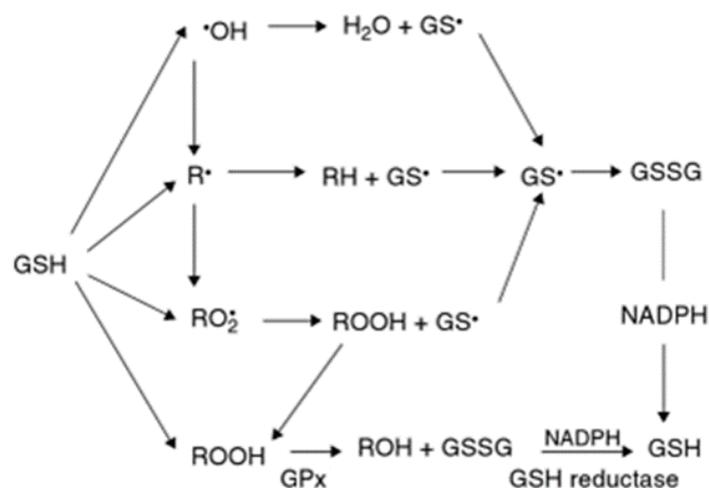


Figure 8 : Réduction des ROS par le glutathion.

### 3.2. Gestion du stress métallique par la micro-algue

Dans le but de diminuer le stress engendré par le cadmium, *Chlamydomonas reinhardtii* met en place différents mécanismes de tolérance. Cela peut passer par une stratégie d'évitement qui empêche le cadmium de pénétrer dans la cellule ou par sa séquestration par des biomolécules pour neutraliser sa toxicité.

#### 3.2.1. La paroi cellulaire comme première barrière

La paroi cellulaire de *C. reinhardtii* riche en glycoprotéines offre de nombreux sites d'adsorption aux métaux. Selon Tüzün et al., 2005, le cadmium pourrait potentiellement se lier aux groupements amines, carboxyles, hydroxyles et carbonyles présents à la surface de l'algue. La formation des sites d'adsorption est constante, ce qui empêche ou réduit fortement le risque de saturation de la paroi cellulaire (Kola et al., 2004). De plus, *C. reinhardtii* excrète des biomolécules (polysaccharides, protéines ...) dans son environnement qui complexent rapidement le cadmium dissout (Kola et al., 2004). Chez *C. reinhardtii*, la déficience en paroi cellulaire induit une plus grande sensibilité au stress métallique (diminution de la croissance) sans pour autant être associée à une accumulation plus importante de cadmium intracellulaire (Macfie and Welbourn, 2000; Macfie et al., 1994).

### 3.2.2. Pénétration du cadmium

Le cadmium peut, suivant son espèce, pénétrer la cellule par simple diffusion ou grâce à des transporteurs spécifiques ou non des métaux. Les espèces lipophiles telles que les complexes neutres  $\text{CdDDC}_2^0$  (DCC : diethyldithiocarbamate) ou  $\text{CdXANT}_2^0$  (XANT : ethylxanthate) sont capables de traverser la membrane plasmique par diffusion. Ces complexes augmentent la biodisponibilité du cadmium par rapport à celle du cadmium libre (Boullemant et al., 2011).

Le cadmium peut pénétrer la cellule accidentellement en se complexant à des ligands assimilables comme le thiosulfate ou le citrate (Errécalde and Campbell, 2000; Hiriart-Baer et al., 2006). Le cadmium est alors internalisé par l'intermédiaire de transporteurs non spécifiques aux métaux.

Rosakis and Köster, 2005 ont montré que l'entrée du cadmium dans la cellule pouvait se faire grâce au transporteur DMT1 de la famille des transporteurs Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein). Ce transporteur est également impliqué dans l'assimilation du fer, du cuivre et du manganèse. De plus, des études *in silico* ont suggéré que des transporteurs de type ZIP (ZRT/IRT-like proteins) interviendrait dans la pénétration du cadmium (Guerinot, 2000; Hanikenne et al., 2005a). Une fois le cadmium présent à l'intérieur de la cellule, différents mécanismes visant à le séquestrer peuvent se mettre en place.

### 3.2.3. Induction de la synthèse de biomolécules

Chez *C. reinhardtii*, la présence de cadmium intracellulaire provoque l'induction de la synthèse de polypeptides thiolés et d'acides aminés. Les phytochélatines sont des polypeptides synthétisés par la phytochélatine synthase (PCS) à partir du glutathion. La figure 9, (A) présente les différents mécanismes mis en jeu lors de sa production. Dans un premier temps, le glutathion se lie au groupement thiol d'une cystéine du site I de la PCS par une réaction d'acylation (1). Il perd ainsi sa glycine (2). Dans un second temps, un glutathion se place sur le site II de la PCS (3) et se lie au dipeptide  $\gamma$ -EC ayant perdu sa glycine pour former une  $\text{PC}_2$  (4).

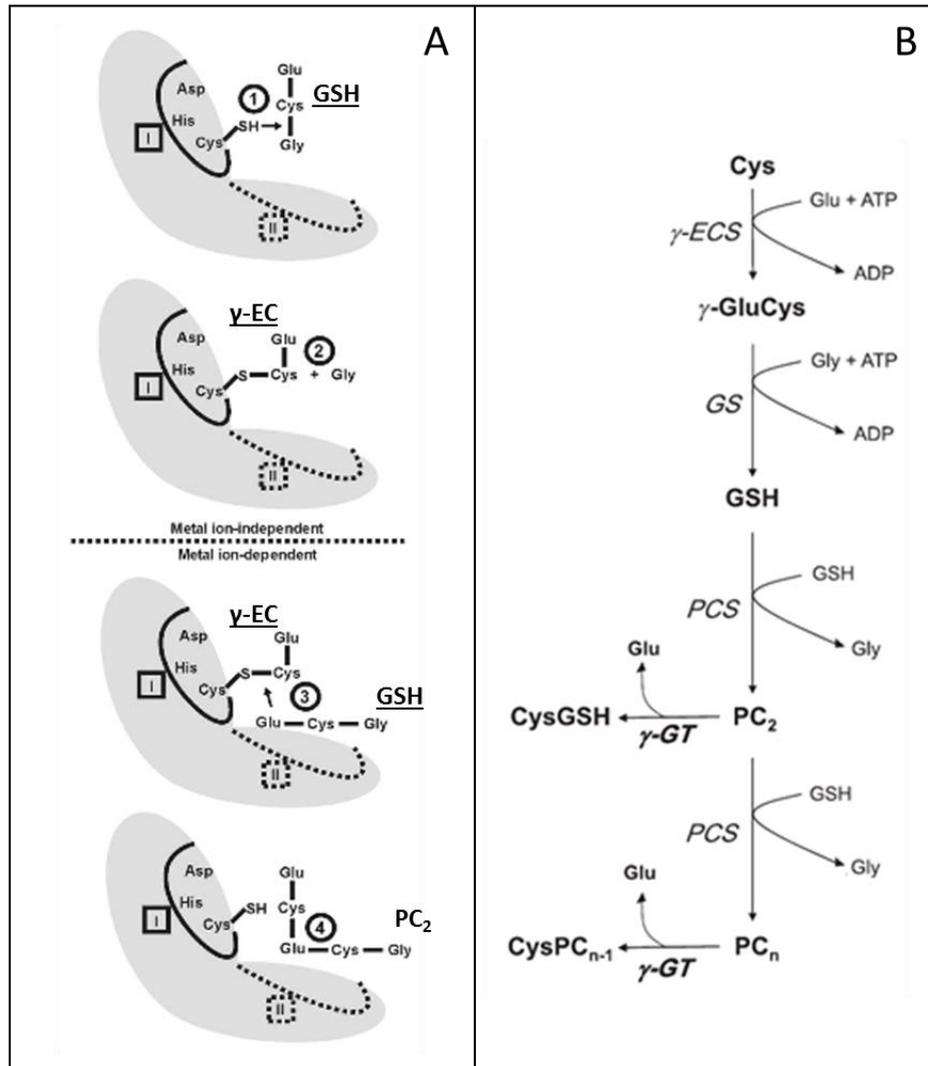


Figure 9 : La synthèse des phytochélatines. (A) Mécanismes hypothétiques impliqués dans la synthèse de phytochélatines (Clemens, 2006b) ; (B) mécanismes hypothétiques impliqués dans la synthèse de CysGSH et Cys PC (Bräutigam et al., 2011).

Selon Bräutigam et al., 2011, les phytochélatines sont déjà détectables 1 heure après le début de l'exposition à 70  $\mu$ M de cadmium. Les formes les plus abondantes sont les formes canoniques PC<sub>2-3</sub>, devant les isoformes CysPC<sub>2-3</sub>. Au cours du temps, la synthèse des isoformes augmente et dépasse celle des formes canoniques. Après 24 heures d'exposition, l'isoforme CysPC<sub>2</sub> devient majoritaire. Enfin, après 48 heures d'exposition, l'isoforme CysPC<sub>3</sub> est la phytochélatine majoritaire et le CysGSH le composé thiolé le plus abondant. Les mécanismes de formation des isoformes CysPC et du CysGSH sont présentés en figure 9, (B).

Les complexes PC<sub>n</sub>-Cd ont pu être isolés et quantifiés chez *C. reinhardtii*, au cours de 96 heures d'exposition à 100  $\mu$ M de cadmium (Hu et al., 2001). En début d'exposition,

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

le cadmium est séquestré par des complexes de haute masse moléculaire (HMW) où les PC<sub>2</sub> sont majoritaires. Il semblerait que les complexes HMW soient des complexes de faible masse moléculaire (LMW) convertis en HMW afin de stabiliser la séquestration du cadmium. Après 96 heures d'exposition, les complexes LMW deviennent majoritaires simultanément avec l'apparition d'un stress oxydatif.

Lors de stress métallique intense, la synthèse de phytochélatines provoque l'épuisement de ses substrats. Ainsi, malgré une disposition suffisante en sulfate, la concentration en cystéine peut diminuer au cours du stress lié au cadmium (Bräutigam et al., 2011; Hu et al., 2001; Nishikawa et al., 2006). De même, la quantité de glutathion impliquée dans le maintien de l'état d'oxydo-réduction de la cellule diminue, souligné par une diminution du ratio GSH/GSSG, laissant place au stress oxydatif (Bräutigam et al., 2011; Nishikawa et al., 2006; Siripornadulsil et al., 2002; Stoiber et al., 2013). Ainsi, le cadmium provoque indirectement un stress oxydatif, en monopolisant les ressources en soufre de la cellule pour sa séquestration. Les étapes d'assimilation du soufre qui sont régulées à la hausse par le cadmium sont présentées en figure 10. Dans l'étude de Nishikawa et al., 2006, la souche de *C. acidophila* la plus résistante au cadmium est celle qui parvient à maintenir son niveau en cystéine et glutathion le plus stable possible durant l'exposition. Les souches n'y parvenant pas voient leur production d'amidon augmenter et finalement, la structure de leur chloroplaste est déstabilisée.

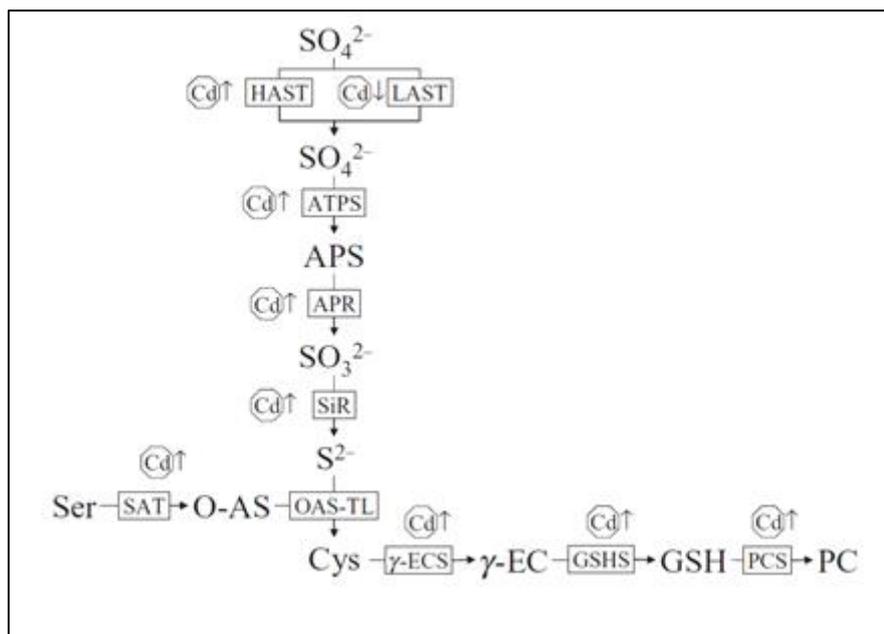


Figure 20 : mécanismes régulés à la hausse par le cadmium, impliqués dans l'assimilation du soufre (Ernst et al., 2008). HAST, high affinity sulfate transporter ; LAST, low affinity sulfate transporter ; ATPS, ATP sulphurylase ; APR, APS reductase ; SiR, sulphite reductase ; SAT, Ser acetyl transferase ; OAS-TL, O-acetyl Ser (thiol) lyase ;  $\gamma$ -ECS,  $\gamma$ -ECS synthetase ; GSHS, GSH synthetase ; PCS, PC synthétase.

### 3.2.4. Séquestration dans les granules

*Chlamydomonas reinhardtii* est connue pour contenir des granules riches en polyphosphate. Ce dernier est un polymère composé de milliers d'orthophosphates (Pi) liés par des liens phosphoanhydrides. Les cations métalliques tels que le  $\text{Ca}^{2+}$ , le  $\text{Mg}^{2+}$  forment des complexes avec les polyphosphates.

Grâce à la microscopie électronique à transmission et des analyses X, du cadmium et du phosphore ont été retrouvés co-localisés dans les vacuoles de *C. acidophila* (Nishikawa and Tominaga, 2001; Nishikawa et al., 2003a, 2006). Lors de l'exposition à 20  $\mu\text{M}$  de cadmium total, en plus de provoquer l'induction de la synthèse de phytochélatines, le cadmium est retrouvé séquestré dans les vacuoles où les granules de polyphosphates sont dégradées en ortho-phosphates.

Suite au fractionnement subcellulaire de *C. reinhardtii* exposée à des concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$  comprises entre 0,7 et 221 nM, 10 à 20% du cadmium intracellulaire a été localisé dans la fraction contenant les granules. Il est à noter que plus la concentration d'exposition était forte, moins la part du cadmium intracellulaire séquestré dans les granules était importante (Lavoie et al., 2009a).

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

La souche cw15 a été particulièrement étudiée pour sa capacité à excréter ses granules de polyphosphates. Ses granules riches en P, Ca et Mg contiennent également une protéine de 70 kDa qui est retrouvée, chez une souche avec paroi, au niveau de cette dernière. Les granules de polyphosphates serviraient donc de véhicule pour transférer cette protéine au niveau de la paroi cellulaire. Son absence provoquerait leur excrétion (Komine et al., 1996, 2000). La reconnaissance des granules de polyphosphates de *C. reinhardtii* comme appartenant à la famille des acidocalcisomes (Ruiz et al., 2001) indique que l'acidocalcisome pourrait jouer un rôle dans la séquestration du cadmium.

La micro-algue *C. reinhardtii* semble utiliser simultanément plusieurs mécanismes de tolérance contre le stress lié au cadmium. Parmi eux, le plus étudié est sans doute la synthèse de polypeptides thiolés, bien qu'il soit difficile de conserver les complexes S-Cd stables après la lyse cellulaire. L'analyse *in situ* de la localisation et de la spéciation du cadmium permettrait de mettre en évidence une hiérarchie au sein des mécanismes de tolérance, suivant les conditions de culture et les souches exposées.

#### 4. LOCALISATION ET SPECIATION INTRACELLULAIRE DES METAUX

Pour évaluer la réponse au stress métallique, il est nécessaire de déterminer la localisation subcellulaire et les espèces chimiques des métaux. La localisation d'un élément au niveau subcellulaire peut être déterminée suite à un fractionnement subcellulaire au niveau de la culture ou *in situ*, par imagerie élémentaire de cellules individuelles. L'utilisation de faisceaux de rayons X, d'électrons, de protons ou d'ions avec une résolution latérale de quelques dizaines de nanomètre permet de capturer un instantané de la distribution élémentaire d'une cellule. Des techniques spectroscopiques telles que l'absorption X donnent accès à la spéciation chimique moyenne d'un élément alors que la spectrométrie de masse permet de déterminer leur structure moléculaire.

##### 4.1. Localisation subcellulaire des métaux

###### 4.1.1. Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire consiste en la séparation des différents compartiments cellulaires par des centrifugations et des ultracentrifugations successives. Cette technique permet une approche de la distribution subcellulaire des métaux lorsqu'elle est suivie du dosage des métaux contenus dans les fractions. Lors de la préparation des échantillons, il est crucial de maintenir l'intégrité des organelles, ainsi que la distribution et la spéciation des métaux. Bien que toujours présents, ces artéfacts peuvent être minimisés en optimisant 3 paramètres : le tampon de lyse, la lyse cellulaire et le fractionnement subcellulaire en lui-même.

Le tampon de lyse doit être à même d'accueillir le contenu cellulaire sans dénaturer les membranes des organelles. Son pouvoir tampon est généralement situé proche du pH physiologie (pH 7). De plus, il doit avoir une osmolarité proche du milieu biologique étudié et une bonne perméabilité aux membranes cellulaires (Scopes, 1994). Les tampons biologiques classiques tels que le tampon Tris-HCl (Hu et al., 2001) et le tampon HEPES, possédant un faible pouvoir complexant sur le cadmium (Soares and Conde, 2000), a déjà été utilisé dans le fractionnement subcellulaire chez *C. reinhardtii* (Lavoie et al., 2009b; Nagel et al., 1996b). Le tampon PBS est à éviter car il peut perturber la spéciation chimique des métaux. L'utilisation d'un milieu de culture dont la force ionique a été diminuée peut également être envisagé en tant que tampon de lyse (Lavoie et al., 2009a).

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Lors de la lyse cellulaire, la paroi cellulaire et la membrane plasmique sont rompues. Des agents chimiques (Komine et al., 2000) ou biologiques (Klein et al., 1983) peuvent être utilisés mais ils risquent de perturber l'intégrité des compartiments cellulaires et la spéciation chimique des éléments lors de la lyse. Dans le cadre de l'étude de la distribution subcellulaire métallique, une lyse physique est à privilégier. Concernant les micro-algues et les plantes en général, la lyse cellulaire se doit d'être agressive pour parvenir à briser les parois cellulaires végétales. De nature physique, elle peut être réalisée par sonication (Joux-Arab et al., 1998; Lavoie et al., 2009a, 2009b; Mendoza-Cozatl et al., 2002), par presse de French (Wong et al., 2001), par broyeur à piston type Potter-Elvehjem (Nagel et al., 1996b) ou par broyeur à billes (Lavoie et al., 2009b; Le Faucheur et al., 2006). Suite à la lyse, l'efficacité de l'homogénéisation est contrôlée afin de s'assurer que toutes les cellules aient bien été détruites. Anciennement réalisé au cours d'une observation qualitative de l'homogénat par microscopie optique, il est de nos jours possible de calculer un rendement de lyse précis et de façon automatisé grâce à un cytomètre de flux.

Les étapes de centrifugations du fractionnement subcellulaires doivent être adaptées aux types d'organelle à séparer. La séparation peut avoir lieu par simples centrifugations différentielles (Lavoie et al., 2009a; Miao and Wang, 2006) ou par centrifugation en gradient de densité au sucrose (Klein et al., 1983; Lavoie et al., 2009b), au percoll (Nagel et al., 1996b). Les séparations par centrifugation en gradient de densité permettent un recouvrement entre fractions moindre. Néanmoins, les séparations par simples centrifugations différentielles sont beaucoup plus simples et introduisent moins d'artéfacts de contaminations dus aux métaux contenus dans les réactifs.

L'attribution des organelles aux différentes fractions séparées peut se faire en mesurant des activités enzymatiques spécifiques aux compartiments cellulaires. A titre d'exemple, Klein et al., 1983 ont mesuré les activités d'enzymes initialement contenues dans le chloroplaste (lyceraldehyde-3-P-dehydrogenase, glucose-6-P-dehydrogenase, FBPase, et fructose-6-P-kinase). De plus, Lavoie et al., 2009a ont suivi l'activité de l'oxidase du cytochrome c, enzyme spécifique à la mitochondrie, afin d'estimer la sélectivité de la séparation de la fraction « organelles » contenant les mitochondries. Des méthodes de fractionnement subcellulaire sont présentées dans la figure 11.

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Le dosage et l'identification des composés métalliques pourront être réalisés par la suite par spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire dans les différentes fractions recueillies.

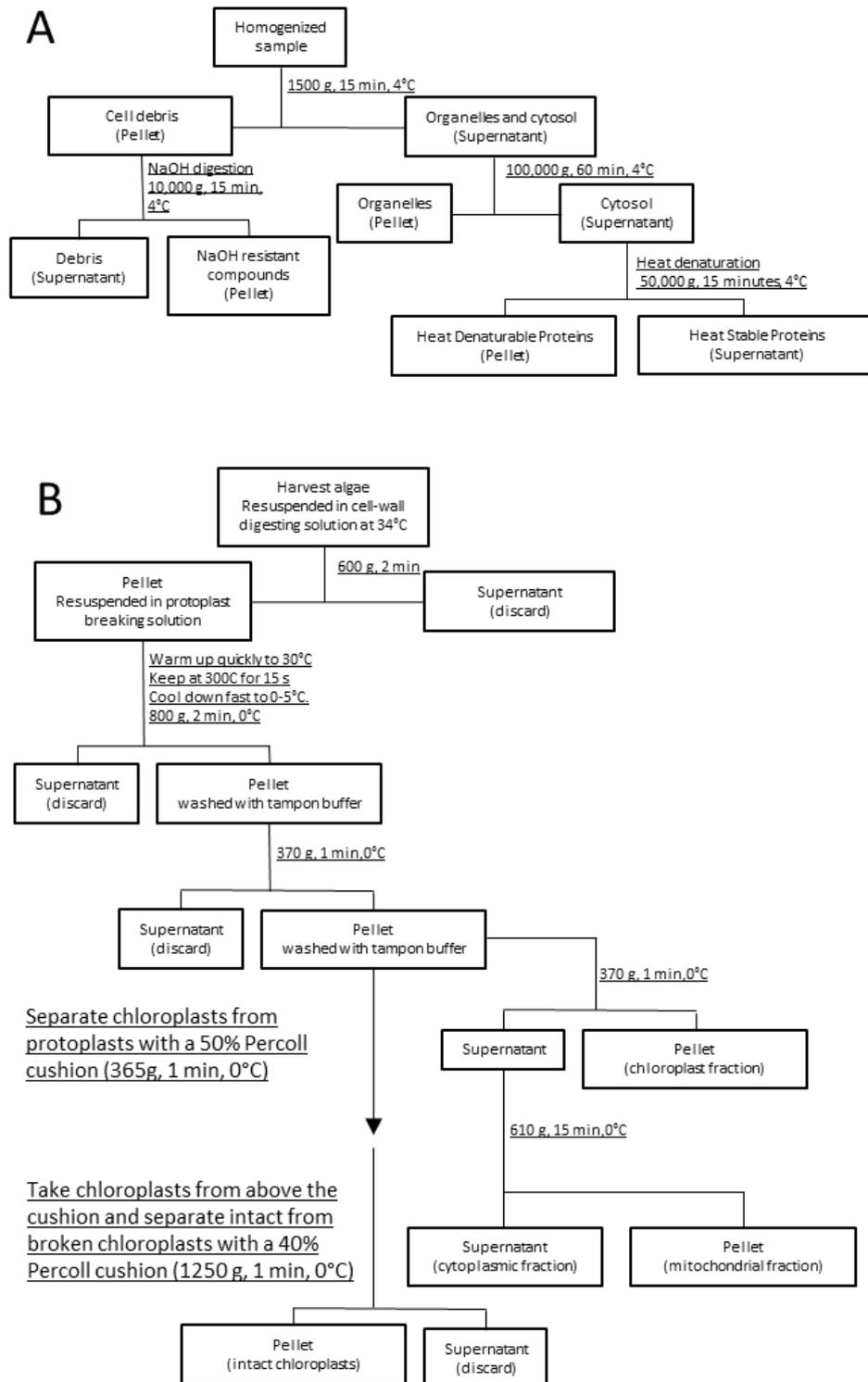


Figure 11 : Méthodes de fractionnement subcellulaire chez *Chlamydomonas reinhardtii* (A) par simples centrifugations différentielles d'après (Lavoie et al., 2009a) ; (B) par centrifugations en gradient de densité d'après (Klein et al., 1983)

### Avantages / Inconvénients



- Analyse globale au niveau de la culture
- Possibilités de réaliser localisation et spéciation dans les fractions



- Lyse cellulaire = redistribution potentielle des éléments
- Séparation des compartiments subcellulaires imprécise

#### 4.1.1. Microscopie électronique à transmission couplée à la micro-analyse X

Créé en 1932 (Knoll and Ruska, 1932), le microscope électronique à transmission permet d'obtenir des images très détaillées de l'ultra structure cellulaire. La longueur d'onde des électrons étant 100.000 fois plus courte que celle de la lumière visible, la capacité résolutive de la microscopie électronique est 1000 fois supérieure à celle de la microscopie photonique.

Brièvement, un faisceau d'électrons est produit au niveau de la cathode du canon à électrons. Les électrons sont ensuite accélérés par une anode et focalisé par des lentilles électromagnétiques à travers un l'échantillon. Plus l'échantillon est lourd et dense, plus l'intensité du faisceau transmis est faible. Ce dernier est ensuite magnifié par un jeu de lentilles électromagnétiques et projeté sur un écran fluorescent. Une caméra CCD permet l'acquisition numérique de l'image. Le schéma d'un TEM classique est présenté en figure 12, (A).

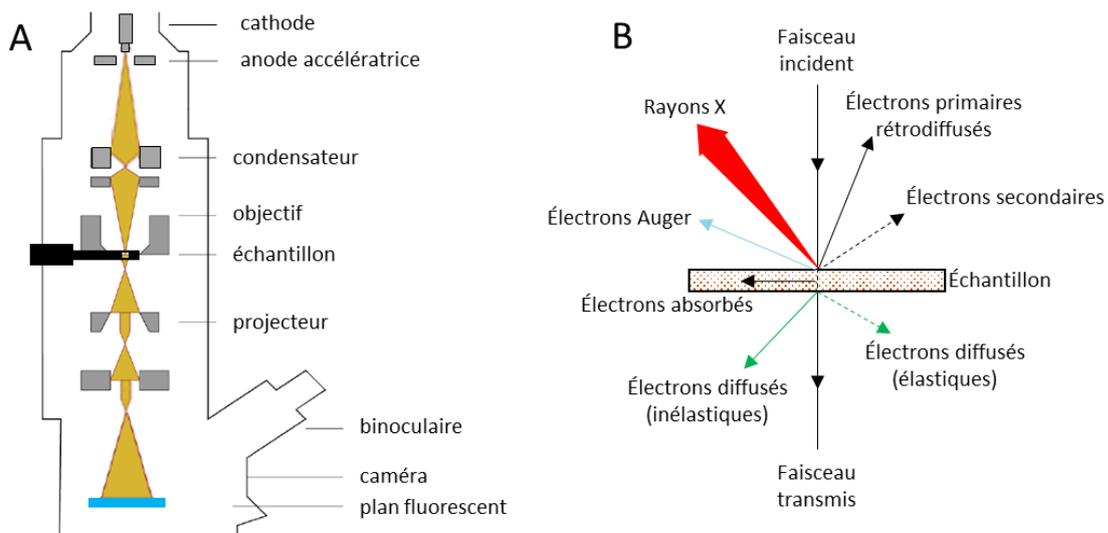


Figure 12 : La microscopie électronique à transmission. (A) Schéma d'un microscope à transmission ; (B) Rayonnements secondaires produits par interaction d'un électron primaire avec l'échantillon.

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Le microscope peut être équipé d'une microsonde électronique X-EDS qui va collecter et déterminer l'énergie des rayons X émis lors de l'interaction du faisceau d'électrons (figure 12, B) focalisé et accéléré à des tensions comprises entre 0,5 et 20 KeV, avec une zone d'intérêt de l'échantillon. L'énergie des photons X est spécifique de l'atome qui les a émis permettant une analyse élémentaire ponctuelle qualitative et semi-quantitative. La pénétration des électrons dans l'échantillon est inférieure au micron. Les éléments légers (H, Li, Be) et peu concentrés (< 0,2%) ne peuvent pas être détectés.

La TEM est généralement appliquée à des échantillons déshydratés et d'épaisseur inférieure à 100 nm pour que le faisceau d'électron puisse les traverser. Cela implique la fixation de l'échantillon, sa déshydratation et son enrobage dans de la résine permettant une découpe à l'ultramicrotome. La fixation d'un échantillon consiste à bloquer les compartiments cellulaires afin de les préserver dans le temps. Elle empêche la dégradation et le déplacement des composés biologiques pour que l'état de la cellule reste le plus près possible de son état natif. La fixation peut être pratiquée par voie chimique ou physique (condition cryogénique).

L'agent de fixation chimique le plus employé est le glutaraldehyde à 1,5-2,5 % dans un tampon hypo osmolaire. Les groupements –CHO vont se lier de façon covalente par réticulation aux groupements amine des protéines. Le tampon hypoosmolaire utilisé dépend du genre d'études menées sur l'échantillon par la suite. Dans le cadre de l'étude des métaux intracellulaires, le tampon PBS est à éviter puisqu'il cause la précipitation des cations divalents. Les tampons HEPES et cacodylate lui seront préférés. Suite à l'incubation avec le glutaraldehyde, l'échantillon va subir une déshydratation par des bains de solvants organiques de plus en plus concentrés tels que l'acétone ou l'éthanol. Ces derniers vont retirer l'eau libre des cellules et solubiliser les lipides, ce qui peut causer la destruction de la structure cellulaire. Afin d'éviter la perte des lipides, le tetroxyde d'osmium ou l'acétate d'uranyle vont se lier de façon covalente aux acides gras insaturés lors d'une deuxième étape de fixation. Le solvant de déshydratation sera substitué, à terme, par la résine d'enrobage. Un protocole utilisé lors de l'étude du stockage du cuivre chez *Chlamydomonas reinhardtii* est présenté dans la table 3. Malgré la fixation des protéines et des lipides, l'utilisation de solvants organiques va perméabiliser les membranes, provoquant la diffusion des petites biomolécules et des ions.

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Table 3 : méthode utilisée pour la fixation chimique de *C. reinhardtii* (Hong-Hermesdorf et al., 2014)

Fixation1	Tampon PBS 0,1 % à pH 7,4 contenant 2% de glutaraldehyde et 2% de paraformaldehyde à 4°C	2 h
Lavage	Tampon PBS 0.1 %	5 fois
Fixation2	Tampon PBS 0,1 % à pH 7,2-7,4 contenant 1% OsO4	1 h
Lavage	Tampon Na-acétate à pH 5,5	4 fois
Déshydratation	Ethanol 50 %	10'
	Ethanol 75 %	10'
	Ethanol 95 %	10'
	Ethanol 100 % x3	10'
	Oxyde de propylène 100 %	2 h
Infiltration	Oxyde de propylène / Epon 812 (1:1)	2 h
	Oxyde de propylène / Epon 812 (1:2)	2 h
	Epon 812	Overnight
Enrobage	Epon 812 à 60°C	48 h

La cryofixation évite la redistribution des petites biomolécules et des ions par une congélation flash. Cette dernière favorise la formation de glace amorphe au lieu de cristaux de glace qui pourrait endommager la structure cellulaire. La cryofixation peut être réalisée de trois manières différentes. La première et la plus simple consiste à plonger l'échantillon dans des gaz liquéfiés tel que le propane ou de l'isopentane pré-refroidit par l'azote liquide. Dans ce cas-là, la glace amorphe va se former sur les 10 premiers  $\mu\text{m}$  d'épaisseur mais des cristaux de glace pourront déstabiliser les structures sur le reste l'échantillon. La seconde méthode appelée congélation par impact va congeler l'échantillon en le laissant tomber en contact avec un bloc de métal refroidit par l'azote liquide. Cette fois-ci, les 20 premiers  $\mu\text{m}$  d'épaisseur seront exploitables. Enfin, la dernière méthode connue sous le nom de congélation à haute pression va vitrifier une épaisseur de 200  $\mu\text{m}$  en quelques millisecondes par un jet d'azote liquide projeté à 2000 bar, en profitant de l'abaissement du point de congélation de l'eau sous haute pression. Suite à la cryofixation, la glace vitreuse est substituée à froid par un solvant comme l'acétone puis par la résine au cours de plusieurs jours (table 3).

Le couplage TEM/X-EDS a été utilisé pour étudier la distribution élémentaire des granules chez *Chlamydomonas*. La nature minérale de ces organelles facilite la

détection des cations comme le calcium et le magnésium liés au polyphosphate (Komine et al., 1996, 2000; Ruiz et al., 2001). De même, du cadmium a pu être détecté dans les granules de micro-algues cultivées en présence de ce métal toxique (Nishikawa et al., 2003a, 2006). Enfin, chez *Coccomyxa actinabiotis* soumise à différentes concentrations d'argent, le TEM/ X-EDS a permis de localiser le métal sur la paroi cellulaire, dans le cytosol, les mitochondries et le chloroplaste (Leonardo et al., 2014).

### Avantages / Inconvénients



- Résolution nanométrique adaptée à la taille de la micro-algue
- Accès à la distribution élémentaire sur des zones ponctuelles de l'échantillon
- Préparation des échantillons en cryo pour limiter la redistribution élémentaire
- Echantillons sous forme de coupes de 100 nm d'épaisseur donnant accès à l'ultrastructure de *C. reinhardtii*



- Impossibilité d'analyser le volume entier d'une cellule
- Préparation d'échantillons lourde

#### 4.1.2. Imagerie par couplage ablation laser-ICP-MS

L'ablation laser couplée à un ICP-MS est une technique d'imagerie qui permet d'apprécier la distribution élémentaire et isotopique à la surface d'un échantillon. Elle fut développée dans les années 80 (Gray, 1985). Adaptée aux échantillons solides, elle est couramment utilisée dans les études géologiques. Depuis une dizaine d'année, elle fait office de technique de choix dans l'étude de la distribution des métaux dans les tissus biologiques (Durrant and Ward, 2005).

En pratique, un rayon laser est focalisé sur l'échantillon. Les lasers les plus courants sont de type Nd:YAG ou Yttrium-Aluminum-Garnet. Chaque pulse ablate du matériel qui est transporté par un gaz porteur vers un ICP-MS. Le schéma d'un dispositif LA-ICP-MS classique est présenté en figure 13. Les systèmes différents systèmes ont été référencés par Mokgalaka and Gardea-Torresdey, 2006.

L'ablation ayant lieu à température et pression atmosphérique, permet l'analyse de tissus frais. La résolution latérale des cartographies peut descendre jusqu'à 4  $\mu\text{m}$ , ce qui est correct pour un tissu biologique mais insuffisant pour une recherche subcellulaire. Grâce à diverses stratégies de calibration, l'analyse quantitative reste possible mais difficile à mettre en œuvre (Mokgalaka and Gardea- Torresdey, 2006; Punshon et al., 2004). Récemment, un système de cryostat utilisant l'effet Pelletier a été développé afin de faciliter les cartographies quantitatives sur des cryo-sections de cristallin humain (Konz et al., 2014). L'ablation laser couplée à un ICP-MS peut également servir à détecter les métaux dans les protéines séparées par électrophorèse 2D (Lobinski et al., 2006).

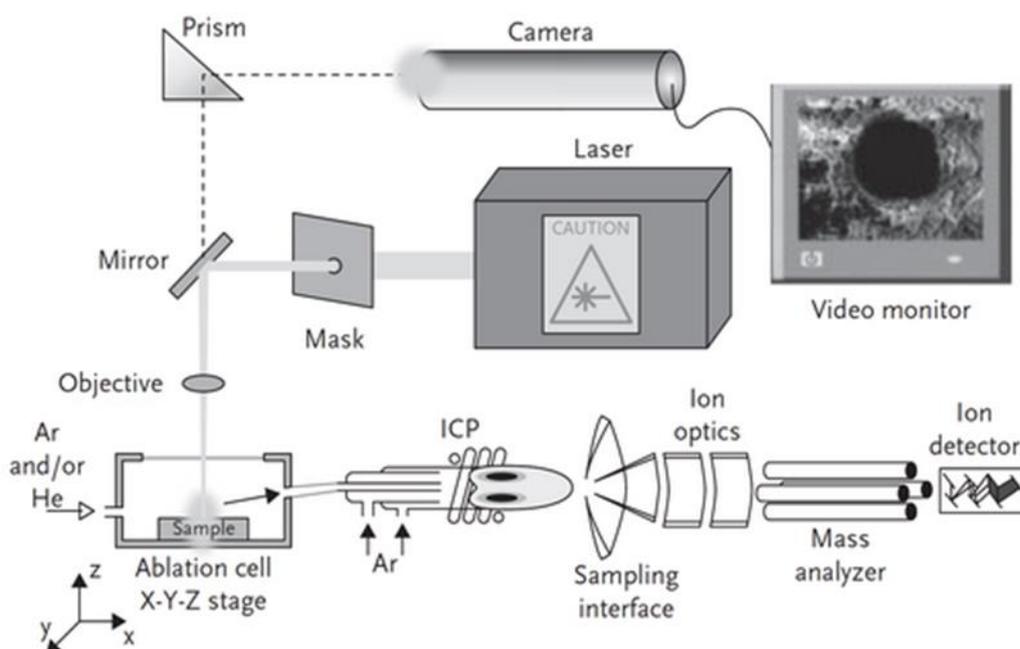


Figure 13 : Schéma d'un système d'ablation laser couplée à l'ICP-MS

### Avantages / Inconvénients



- Analyse élémentaire et isotopique



- Résolution latérale incompatible avec la taille de *C. reinhardtii*
- Impossibilité d'analyser une solution algale

### 4.1.1. Emission de rayons X induite par des protons, à l'échelle du nanomètre

Evoqué pour la première fois en 1970, le PIXE consiste à collecter les photons X émis par l'excitation des atomes de l'échantillon, soumis à un faisceau de protons de quelques MeV. Les éléments dont le numéro atomique est supérieur à 10 peuvent être détectés.

Le PIXE possède une meilleure sensibilité que la microsonde électronique, grâce à une meilleure pénétration des ions dans l'échantillon (10-100  $\mu\text{m}$ ) et un bruit de fond plus faible. Le plus grand avantage du PIXE reste sa capacité d'analyse quantitative lorsqu'elle est couplée à la mesure de la masse de l'échantillon par spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford (RBS) et microscopie ionique à balayage par transmission (STIM) (Devès et al., 2005). De plus, des systèmes cryo ont été récemment développés pour l'analyse d'échantillons frais à froid comme l'épiderme d'oignon (Sakai et al., 2005) ou les feuilles de l'hyperaccumulateur du nickel *Senecio anomalochrous* (Tylko et al., 2007).

De nombreuses applications ont été référencées par Ortega et al., 2009, notamment sur la localisation des métaux chez les cellules résistantes aux chimiothérapies ou impliquées dans les maladies neurodégénératives. Concernant les micro-algues, le couplage nanoPIXE-RBS-STIM a permis la localisation de terres rares ( $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , and  $\text{Er}^{3+}$ ) chez *Euglena gracilis*. Il en ressort que l'erbium est 10 fois plus concentré que les deux autres terres rares et localisé dans le noyau et les chloroplastes (Minqin et al., 2013). De même, le couplage nanoPIXE-RBS a montré la localisation de métaux lourds (Cr, Ni, Ba) chez la micro-algue *Parzlorina morum* et la répartition des éléments (Si, S, P) dans la structure de la diatomée *Stephanopyxis turris* (Watt et al., 1991). D'autres articles font référence au macro-PIXE pour le dosage d'éléments dans des cellules algales (Kuramachi, 2005; Sha et al., 2002).

#### Avantages / Inconvénients



- Analyse quantitative lorsque le nanoPIXE est couplée à la RBS et à la STIM
- Résolution nanométrique adéquate pour travailler sur *C. reinhardtii*



- Technique lourde, difficile à mettre en œuvre

4.1.2. Micro fluorescence X

Le phénomène de fluorescence X intervient lorsqu'un photon X frappe un atome et arrache un de ces électrons de cœur, le faisant entrer dans un état très instable par ionisation des couches électroniques K ou L. L'atome va se stabiliser par «réorganisation interne» : des électrons des couches plus externes que celles d'où ont été éjectés les électrons vont venir combler les trous. Les transitions auront lieu des couches L et M vers K et de la couche M vers L. La différence d'énergie entre les couches de départ et d'arrivée de l'électron est libérée sous forme d'un photon X dont l'énergie est spécifique de la nature de l'atome ionisé. Le phénomène de fluorescence X est résumé dans la figure 14.

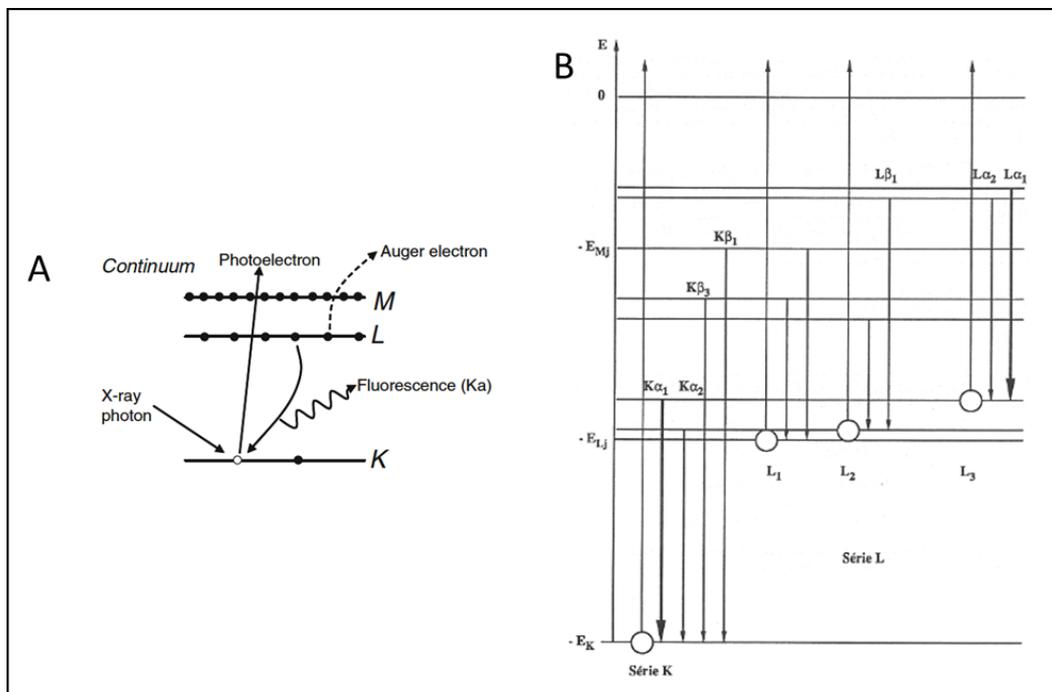


Figure 14 : Schéma de du phénomène de fluorescence X. (A) Excitation d'un atome par un photon X et stabilisation par effet de fluorescence X et effet Auger (Lombi and Susini, 2009) ; (B) Schéma des niveaux d'énergie électronique dans un atome. L'énergie d'ionisation d'un niveau (notée  $E_K$ ,  $E_{L_j}$ ,  $E_{M_j}$  ...) représente l'énergie à apporter pour expulser un électron de ce niveau hors de l'atome.

L'imagerie multi-élémentaire par fluorescence X est une technique permettant d'identifier la distribution élémentaire d'un échantillon. Elle consiste à balayer l'échantillon avec un faisceau X dont l'énergie sera légèrement supérieure à l'énergie nécessaire à l'excitation de l'élément principal recherché. Un spectre de fluorescence X est ainsi acquis au niveau de différents points de l'échantillon, convertis en pixel sur cartographie élémentaire. La limite de détection est de l'ordre fentogramme (Sarret et al., 2013).

En pratique, l'énergie du faisceau X, déterminée par un monochromateur, reste fixe durant l'analyse. Le faisceau X est focalisé par un système de miroirs sur l'échantillon. La résolution latérale du faisceau varie en fonction des lignes de lumière. Actuellement, la meilleure résolution latérale obtenue est de 40x40 nm<sup>2</sup> sur la ligne de lumière ID16 à l'European synchrotron radiation facility (ESRF) situé à Grenoble. Lors du balayage de l'échantillon, le support de l'échantillon se déplace. Atteindre une résolution nanométrique implique une taille de faisceau et un déplacement du support d'échantillon maîtrisé à l'échelle du nanomètre. Un spectre de fluorescence X sera acquis en différents points de l'échantillon. Avant d'extraire la cartographie élémentaire des spectres  $\mu$ XRF, le signal est déconvolué afin de supprimer la superposition des raies de fluorescence voisines (Solé et al., 2007).

L'analyse peut avoir lieu à froid dans un cryostat ce qui permet les expérimentations sur des échantillons congelés limitant les dégâts dus au faisceau X. La localisation élémentaire par  $\mu$ XRF et nanoXRF chez les micro-algues a déjà été réalisée. La nanoXRF a été utilisée pour étudier l'accumulation d'argent et de cobalt par *Coccomyxa actinabiotis*, une micro-algue vivant dans l'eau de refroidissement des réacteurs nucléaires (Leonardo et al., 2014). (Diaz et al., 2009; Leonardo et al., 2014). La localisation du phosphore du calcium et du fer a été étudiée chez *Chlamydomonas sp* (Diaz et al., 2009). Il en ressort que le phosphore était colocalisé avec le calcium et le fer.

### Avantages / Inconvénients



- Possibilité d'analyser des échantillons hydratés en cryostat ce qui limite les dégâts du faisceau X
- Résolution latérale nanométrique adéquate avec la taille des cellules
- Le cadmium est détectable grâce à la raie  $L\alpha_1$  à 3132 eV (Isaure et al., 2006)



- Temps d'analyse limité par la faible accessibilité des infrastructures synchrotron

4.1.3. Spectrométrie de masse à ionisation secondaire, à l'échelle du nanomètre

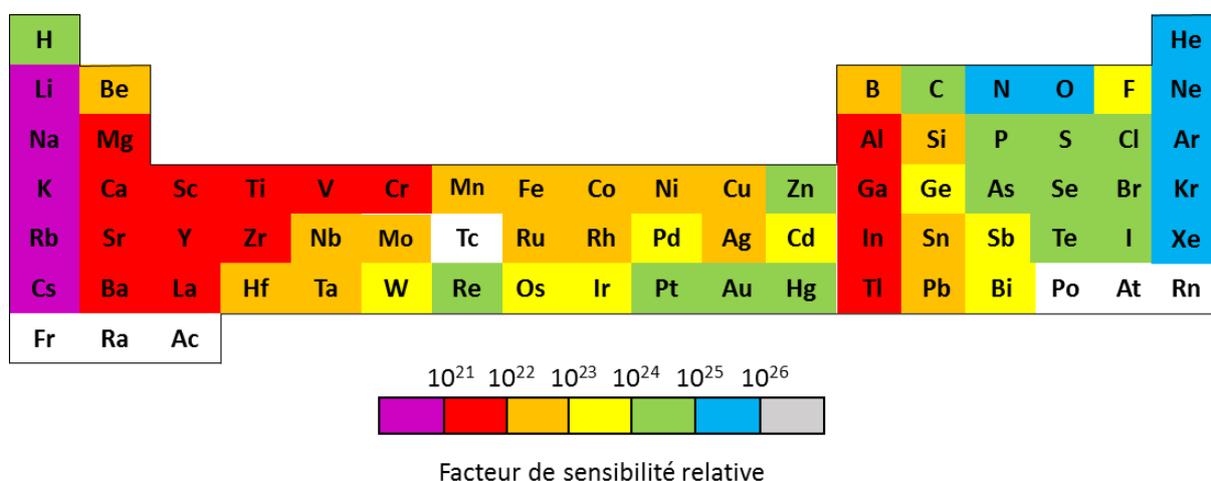
Evoqué pour la première fois en 1962, le principe du SIMS consiste à bombarder la surface d'un échantillon avec un faisceau d'ions primaires (Castaing and Slodzian, 1962). Suite aux collisions entre les ions primaires et les atomes de l'échantillon, des particules et des atomes ionisés sont émises. Ces derniers, appelés ions secondaires, sont accélérés vers un détecteur de masse afin de déterminer la composition élémentaire et isotopique de l'échantillon.

Table 4 : Efficacité d'ionisation en fonction de la nature de la source d'ions primaires d'après (Storms et al., 1977)

Legend:  
■ Source d'ions négatifs  
■ Source d'ions positifs

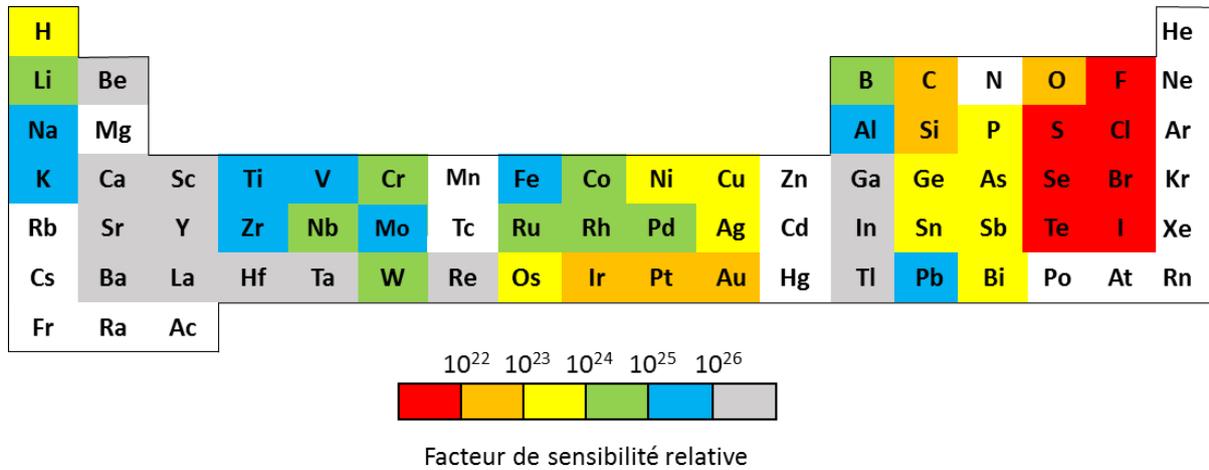
H																				He
Li	Be											B	C	N	O	F				Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl				Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br				Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I				Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At				Rn
Fr	Ra	Ac																		

Table 5 : Facteurs de sensibilité relative mesurés pour un bombardement d'ions primaires d'oxygène (O<sup>+</sup>), des ions secondaires positifs et une matrice de silicium (Wilson, 1995)



## Chapitre I : Etudes bibliographiques

Table 6 : Facteurs de sensibilité relative mesurés pour un bombardement d'ions primaires de césium (Cs<sup>+</sup>), des ions secondaires négatifs et une matrice de silicium (Wilson, 1995)



Le faisceau d'ions primaires peut être soit positif (Cs<sup>+</sup>), soit négatif (O<sup>-</sup>), induisant la formation d'ions secondaires négatifs et positifs, respectivement. Le choix de la source d'ions primaires se fait en fonction de l'efficacité d'ionisation des éléments ciblés, présentée en table 4. Afin de quantifier l'efficacité d'ionisation, un facteur de sensibilité relative (RSF) est déterminé pour chaque élément en fonction de la nature de la source d'ions primaires et de la matrice qui l'entoure. Le RSF est calculé de la manière suivante :

$$\frac{I_M}{C_M} = \text{RSF}_E \frac{I_E}{C_E} \quad \text{RSF}_E = \frac{I_M \cdot C_E}{C_M \cdot I_E}$$

Avec :

- I<sub>E</sub> = intensité de l'ion secondaire de l'élément
- C<sub>E</sub> = concentration de l'élément
- I<sub>M</sub> = intensité de l'ion secondaire de la matrice
- C<sub>M</sub> = concentration de la matrice
- RSF<sub>E</sub> = facteur de sensibilité de l'élément

La concentration de la matrice étant considérée comme identique pour chaque mesure, le RSF<sub>E</sub> et la concentration de la matrice sont combinés dans le facteur de sensibilité. Il est généralement exprimé en nombre d'atomes par cm<sup>3</sup>.

$$\text{RSF} = \text{RSF}_E \cdot C_M = \frac{I_M \cdot C_E}{I_E}$$

Les tables 5 et 6 présentent, respectivement, l'ordre de grandeur du RSF des éléments bombardés par un faisceau d'ions primaires d'oxygène et un faisceau d'ions primaires de césium (Wilson, 1995). Il est à remarquer que le cadmium ne s'ionise pas efficacement avec la source césium et très moyennement avec la source oxygène.

Le premier nanoSIMS, permettant la cartographie élémentaire avec une résolution latérale de 100 nm, a été mis au point par l'entreprise française Cameca (Cameca S.A.S, Gennevilliers, France) (Slodzian et al., 1992). Le modèle le plus courant de nanoSIMS 50 L, présenté dans la figure 15, est muni de deux sources d'ions primaires situées dans la colonne primaire. Le principe de la source Cs repose sur l'ionisation thermique d'atomes de Cs à l'état de vapeur suivie de leur extraction par un champ électrique, tandis que celui de la source duoplasmatron repose sur un plasma à basse pression, confiné magnétiquement, qui est formé par un arc entre une cathode et une anode creuse maintenue à des potentiels différents. Le faisceau d'ions primaires est accéléré et focalisé sur l'échantillon avec une énergie de 16 KeV par un jeu de lentilles électromagnétiques. Les ions secondaires émis depuis l'échantillon sont extraits de manière co-axiale au faisceau d'ions primaires. Les ions secondaires sont ensuite guidés par des lentilles de transfert vers le spectromètre de masse composé de deux filtres de masse successifs. Dans un premier temps, les ions secondaires sont triés selon leur énergie cinétique par un secteur électrostatique. Par la suite, un secteur magnétique permet de sélectionner les ions de ratios  $m/z$  recherchés et de les dévier vers 7 détecteurs de type multiplicateur d'électrons.

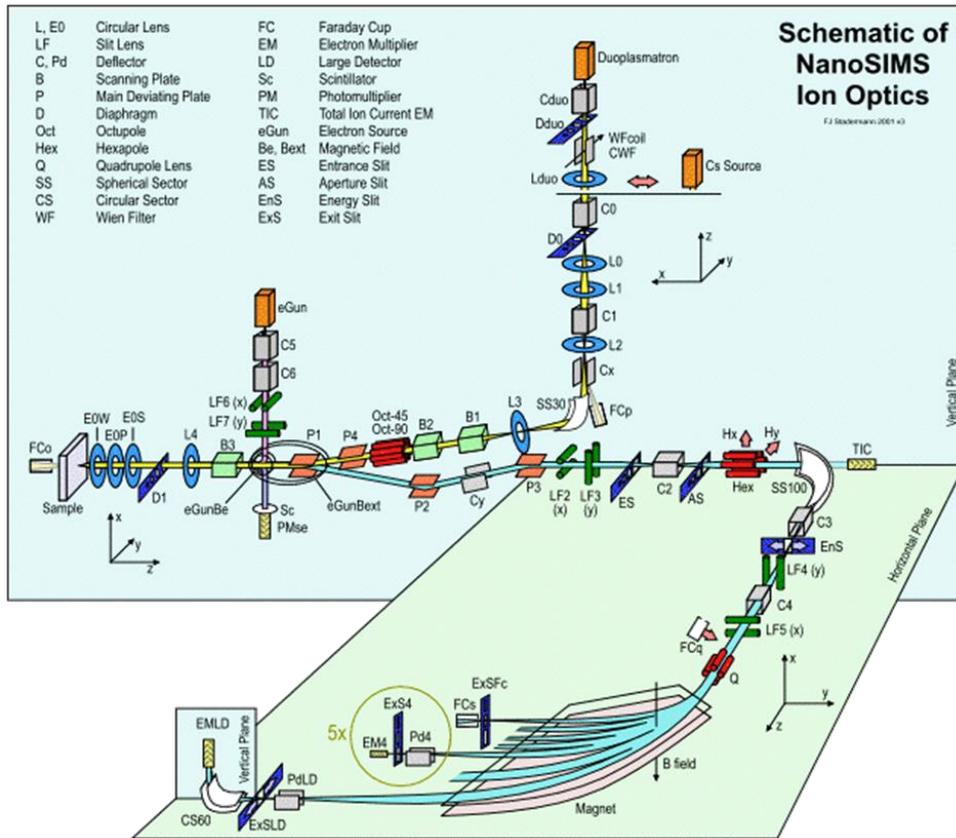


Figure 15 : Schéma du nanoSIMS 50L. Faisceau d'ions primaires en jaune et secondaires en bleu.

Depuis peu, la nouvelle source oxygène Hyperion™ (Keller et al., 2014) fabriquée par l'entreprise Oregon Physics (Hillsboro, OR, USA) est disponible sur les nanoSIMS 50 L et remplacera à terme la source duoplasmatron. Son principe repose sur la production d'un plasma d'oxygène de haute densité et de basse température par excitation par radio fréquence (RF). Comparativement à la source duoplasmatron, le temps de maintenance est quasi-inexistant puisque les ions sortant du plasma ne sont plus assez énergétiques pour dégrader les parois de la source. Pour le nanoSIMS, la qualité principale attendue d'une source d'ions est de faire parvenir des courants ioniques de haute densité sur des zones de quelques nanomètres sur l'échantillon. La source oxygène plasma RF permet d'atteindre une résolution latérale de 35 nm contre 100 nm pour la source duoplasmatron et 50 nm pour la source Cs. De plus, son courant ionique est 10 fois plus dense que celui de la source Cs et 100 fois plus dense que celui de l'ancienne source O<sup>-</sup>. Cette meilleure densité de courant ionique amène une meilleure sensibilité élémentaire pour une résolution latérale donnée (Malherbe et al., en préparation).

Concernant la préparation des échantillons biologiques, elle est identique à celle de microscopie électronique à transmission, en raison du vide poussé nécessaire pour stabiliser le faisceau d'ions primaires. Néanmoins, l'épaisseur des coupes est généralement comprise entre 200 et 400 nm. Il est donc possible de réaliser de la microscopie corrélative, du TEM/X-EDS au nanoSIMS, donnant accès à la localisation des éléments et de leurs isotopes dans l'ultrastructure cellulaire.

En biologie, le nanoSIMS est un outil intéressant lorsqu'il s'agit de suivre l'incorporation de métaux et de nutriments marqués par des isotopes stables ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ...) dans les micro-organismes. Ainsi, l'assimilation séparée de l'azote et du carbone dans des parties différentes d'une colonie de la cyanobactérie *Crocospaera watsonii* a pu être montrée par la cartographie du  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  (Foster et al., 2013). Chez *Escherichia coli*, l'utilisation de plasma froid enrichi en  $^{15}\text{N}$  et  $^{18}\text{O}$  a montré que les espèces réactives oxydantes se fixaient sur les membranes et diffusaient à l'intérieur des cellules (Clément et al., 2011).

Concernant les végétaux, le nanoSIMS a permis de déterminer la localisation tissulaire de métaux lourds dans des grains et des tissus de riz et de blé (Moore et al., 2010, 2012, 2014). Les études impliquant des analyses nanoSIMS sur des micro-algues sont plus rares. Le cuivre a été retrouvé colocalisé avec des protéines et du phosphore chez *Chlorella kesslerii* (Slaveykova et al., 2009). Le stockage du cuivre dans les acidocalcisomes de *Chlamydomonas reinhardtii* durant une période de limitation en zinc a pu être montré grâce aux cartographies nanoSIMS du  $^{40}\text{Ca}$  et du  $^{63}\text{Cu}$  et leur image TEM correspondante (Hong-Hermesdorf et al., 2014).

### Avantages / Inconvénients



- Résolution latérales compatible avec la taille de *C. reinhardtii*
- Détection élémentaire et isotopique de certains métaux et des éléments légers de la structure cellulaire
- Le cadmium serait potentiellement détectable avec la nouvelle source Hypérion O<sup>-</sup> RF



- Analyse du volume entier d'une cellule impossible
- Préparation des échantillons lourde

## 4.2. Spéciation chimique des métaux

### 4.2.1. Couplage de techniques de séparation avec un spectromètre de masse en tant que détecteur pour la spéciation chimique des métaux

L'identification des composés biologiques liés ou contenant des métaux n'est pas chose aisée, notamment lorsqu'il s'agit de complexes. Afin de mettre en valeur leur structure moléculaire, différentes stratégies analytiques impliquant les couplages de techniques de séparations avec un spectromètre de masse en tant que détecteur (figure 16).

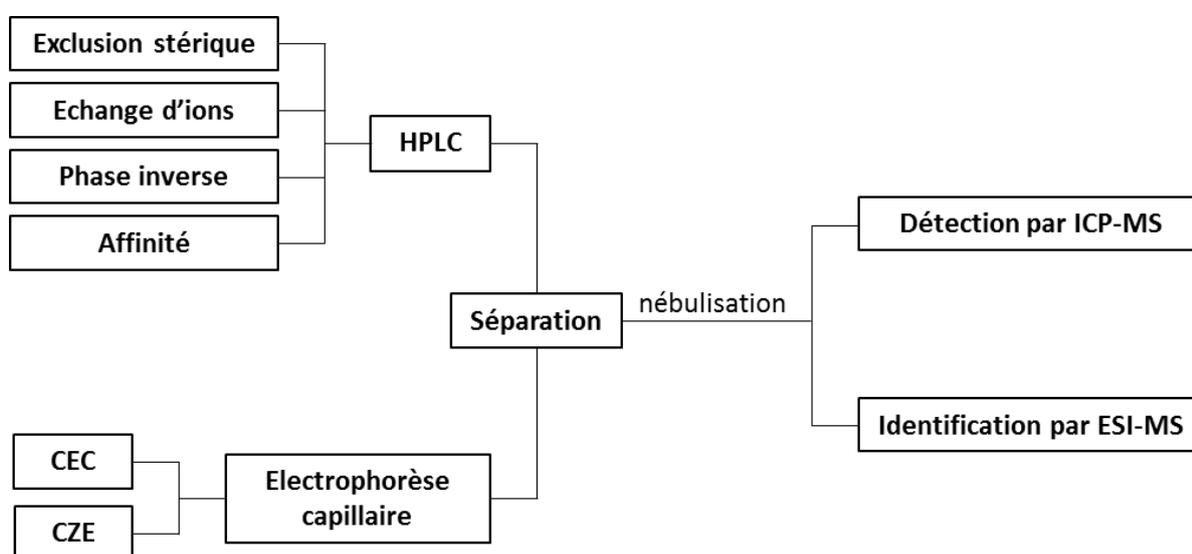


Figure 16 : Couplage de techniques pour la détection et l'identification des composés biologiques liés aux métaux d'après (Lobinski et al., 2006)

L'HPLC et la CE sont deux types de séparation en milieu liquide couramment employés. Avec la première, les analytes sont entraînés par une phase mobile. Le mécanisme de rétention dépend de la phase stationnaire utilisée :

- Exclusion stérique (SEC) : séparation suivant la taille des molécules
- Echange d'ions : séparation suivant la charge des ions
- Phase inverse (RP) : séparation suivant la polarité des molécules
- Affinité : séparation suivant l'affinité des molécules avec la phase stationnaire

Avec la deuxième, les analytes chargés, souvent de nature protéique, sont entraînés par une différence de potentiel électrique. L'électrochromatographie capillaire (CEC)

voit l'intérieur du capillaire tapissé de phases stationnaires similaires à celle rencontrées en HPLC. L'électrophorèse capillaire en zone (CZE) permet une séparation des molécules uniquement en fonction de leur mobilité électrophorétique.

Une fois séparées, les molécules sont analysées par spectrométrie de masse. L'ICP-MS détecte les éléments grâce à sa source d'ionisation destructive. L'ESI-MS permet la détermination des structures moléculaires car sa source d'ionisation, plus douce, ne rompt pas toutes les liaisons interatomiques. L'analyse élémentaire et moléculaire d'un échantillon peut être réalisée en parallèle lorsque l'éluant, en sortie de colonne, est partagé en deux puis introduit simultanément dans l'ICP-MS et l'ESI-MS (Feldmann et al., 2009).

Chez les plantes, les ligands de certains métaux ont pu être déterminés par différents couplages. Le nickel a été trouvé complexé au citrate et à la nicotinamide chez *Sebertia acuminata* grâce à l'utilisation en parallèle des couplages SEC-ICP-MS, CZE-ICP-MS et SEC-ESI-MS (Schaumlöffel et al., 2003). Les ligands thiolés tels que les phytochélatines (PC<sub>2-3</sub>) ont été détectées par CZE-ESI-MS dans les racines de *Glycine max* et de *Oryza sativa* contaminées au cadmium (Mounicou et al., 2001). De même, les complexes As-PC<sub>2-4</sub> ont pu être décrits chez *Helianthus annuus* et *Holcus lanatus* en utilisant le couplage RP-ICP-MS/ESI-MS (Raab et al., 2004, 2007).

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le couplage SEC-ICP-MS a pu mettre en évidence la présence de complexe entre le plomb, le cuivre, le zinc et les PC<sub>2-3</sub> (Scheidegger et al., 2011). De plus, six peptides thiolés (GSH, CysGSH, PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub>, CysPC<sub>2</sub> and CysPC<sub>3</sub>) ont pu être détectés par UPLC(RP)-ESI-MS lorsque la micro-algue était soumise à 70 µM de cadmium (Bräutigam et al., 2010).

Z

### Avantages / Inconvénients



- Détermination de la structure moléculaire des espèces métalliques
- Peut être utilisé à la suite d'un fractionnement subcellulaire



- Limite de détection élevée nécessitant souvent une étape de pré-concentration
- Perte des complexes faibles pendant la préparation des échantillons

#### 4.2.2. Spectroscopie d'absorption X

La spectroscopie d'absorption X est une technique qui donne accès à l'environnement structural. Elle consiste à mesurer l'évolution du coefficient d'absorption ( $\mu$ ) de l'échantillon en fonction de l'énergie du faisceau X incident. Le coefficient d'absorption est calculé de la manière suivant :

- En mode transmission :  $\mu = \ln(I_0/I_t)$
- En mode fluorescence :  $\mu = I_f/I_0$

$I_0$  représente l'intensité du faisceau incident,  $I_t$  et  $I_f$  sont respectivement l'intensité du faisceau transmis et l'intensité de fluorescence. Lorsque le saut de seuil est inférieur à 0,1, l'acquisition des spectres se fait un mode fluorescence. En revanche, lorsque le saut de seuil est supérieur à 0,1, l'enregistrement du signal se fait un mode transmission.

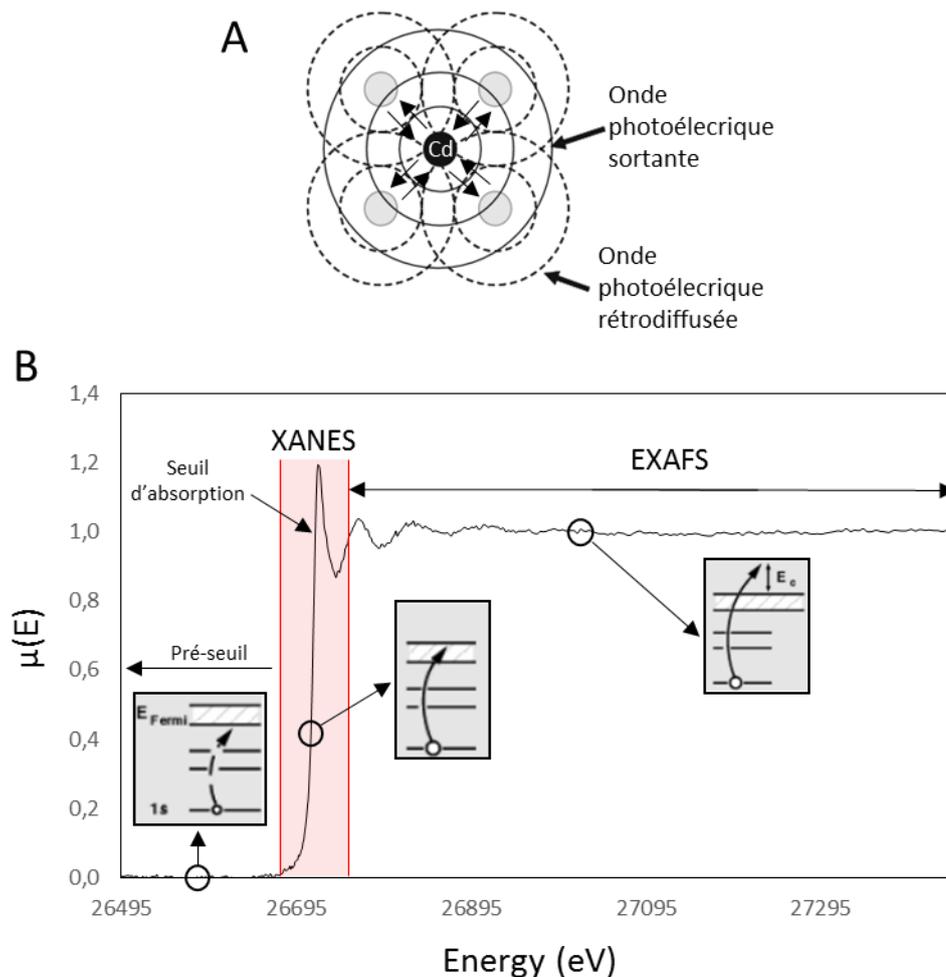


Figure 17 : Principe de la spectroscopie d'absorption X. (A) Phénomène générant les oscillations de l'EXAFS avec l'atome absorbeur en noir et les atomes voisins rétrodiffuseurs en gris ; (B) exemple de spectre d'absorption X du cadmium au seuil K.

Un spectre d'absorption X se décompose en plusieurs régions représentées dans la figure 17. La première région dite de pré-seuil correspond à une zone où l'énergie incidente n'est pas absorbée car elle est inférieure à l'énergie de liaison des électrons de cœur de l'atome étudié.

La seconde région caractérisée par une augmentation brutale de l'absorption est appelée seuil d'absorption. L'énergie nécessaire à atteindre le seuil d'absorption, notée  $E_0$ , est spécifique de la nature de l'élément étudié. Avant d'atteindre  $E_0$ , l'électron de cœur passe de l'état fondamental à excité mais reste en-dessous du niveau de Fermi. Cette région du spectre renseigne sur la structure électronique de l'atome étudié. A  $E_0$ , l'énergie incidente est égale à l'énergie de liaison des électrons de cœur. L'électron de cœur est éjecté dans le continuum. La région autour du seuil d'absorption ( $E_0 \pm 50$  eV) est appelée X-ray absorption Near Edge Structure Spectroscopy (XANES).

La troisième région comprise entre 50 eV et 1000 eV après le seuil d'absorption est caractérisée par des oscillations de l'absorption. Dans ces énergies, l'énergie cinétique du photoélectron est suffisante pour le considérer comme libre. L'onde photoélectrique émise va sonder l'espace ( $< 4$  Å) autour de l'atome absorbeur. Dans une molécule, la sphère de coordination de l'atome étudié contient d'autres atomes : l'onde du photoélectron éjecté est rétrodiffusée par les atomes voisins et interfère avec l'onde émergente, donnant lieu à des oscillations de l'absorption dites oscillations EXAFS. L'équation du signal EXAFS tenant compte d'une onde sphérique et de la diffusion simple peut s'écrire :

$$\chi(k) = -S_0^2 \sum_i N_i \frac{|f(\pi, k)|}{kR_i^2} e^{(-2\sigma^2 k^2)} e^{i\left(\frac{2R_i}{\lambda(k)}\right)} \sin(2kR_i + 2\delta_i + \Phi_i(\pi, k))$$

Avec :

- $S_0^2$  : Facteur de réduction d'amplitude dû aux effets multiélectroniques.
- $N_i$  : Nombre d'atomes présents dans la couche  $i$ .
- $|f(\pi, k)|$  : Facteur d'amplitude de rétrodiffusion produit par un atome de la couche  $i$ .
- $R_i$  : Distance effective entre les atomes appartenant à la couche  $i$  et l'atome absorbeur.

- $\sigma^2$  : Facteur de Debye-Waller ou facteur de désordre. Le désordre peut être dû à une agitation des atomes (désordre thermique) ou être structural (répartition désordonnée des atomes autour de l'atome cible). Plus le désordre est grand, plus les oscillations EXAFS sont atténuées.
- $\lambda$  : Libre parcours moyen dans le matériau pour un électron d'une énergie moyenne.
- $\delta_i$  : Déphasage dû aux couches électroniques des atomes composants la couche  $i$ .
- $\Phi_i(\pi, k)$  : Déphasage produit par la rétrodiffusion.

L'analyse du signal EXAFS permet de connaître l'environnement atomique de l'atome étudié. Il est possible d'avoir des informations sur le nombre d'atomes voisins, leur nature et les distance interatomiques entre l'atome absorbeur et les atomes rétro-diffuseurs.

### 4.2.3. $\mu$ XRF et $\mu$ XAS en tandem

La Fluorescence X et la spectroscopie d'absorption X sont complémentaires lorsqu'il s'agit d'étudier la distribution, la structure électronique et les sphères de coordination atomique des métaux *in situ*, contenus dans les végétaux. Elles peuvent être utilisées en tandem. La  $\mu$ XRF donne accès à la distribution élémentaire au niveau subcellulaire. Il est tout à fait possible d'acquérir des spectres  $\mu$ XANES sur les spots d'intérêt repérés sur la cartographie élémentaire, donnant accès à la structure électronique et à l'environnement atomique des métaux, directement dans les compartiments cellulaires.

Les applications de ces techniques dans l'étude des métaux assimilés par les plantes supérieures sont évoquées dans de multiples reviews (Lombi and Susini, 2009; Lombi et al., 2011a, 2011b; Sarret et al., 2013). Ces techniques synchrotrons ont été également utilisées sur des micro-algues. Ainsi, la localisation du phosphore et ses liaisons avec les métaux ont été étudiés chez *Chlamydomonas sp* (Diaz et al., 2009). Il en ressort que le phosphore fut colocalisé avec du calcium et du fer mais les  $\mu$ XANES au seuil K du phosphore révélèrent que les spots de phosphore correspondaient à des granules de polyphosphates associées au calcium et non au fer. Enfin, l'EXAFS a permis de montrer que le cadmium avait une coordination tétraédrique, avec deux atomes de soufre et deux atomes d'oxygène, suggérant que le cadmium n'était pas

uniquement lié aux phytochélatines dans la souche 29, riche en proline, de *Chlamydomonas reinhardtii* (Siripornadulsil et al., 2002).

### Avantages / Inconvénients



- Détermination de l'environnement structural moyen de l'élément d'intérêt
- Identification de la nature des ligands des métaux au niveau subcellulaire par  $\mu$ XRF/ $\mu$ XAS
- Technique *in situ*



- Pas de détermination de la structure moléculaire dans les matrices biologiques

## 5. CONCLUSION

Les études précédentes chez *Chlamydomonas* montrent que le cadmium inhibe le développement de la micro-algue, en provoquant un stress oxydatif intracellulaire et en déstabilisant le chloroplaste, par l'inhibition de la photo-activation des photosystèmes II (Faller et al., 2005) et la surproduction d'amidon (Nishikawa et al., 2006). De plus, il semble que pour réduire les effets toxiques du cadmium, *C. reinhardtii* met en place des mécanismes de tolérance qui permettent la séquestration du métal par des biomolécules thiolées (glutathion, phytochélatines) dans le cytosol ou à l'intérieur de vacuoles, associé à des granules de polyphosphate. Néanmoins, le dernier mécanisme évoqué n'est pas encore bien compris et peu étudié car il nécessite d'établir la spéciation et la localisation du cadmium à l'intérieur de compartiments cellulaires (ici dans les vacuoles).

Pour déterminer ces mécanismes de séquestration, nous avons opté pour la localisation directe du cadmium par imagerie cellulaire que nous avons comparée à la localisation indirecte obtenue par fractionnement subcellulaire. De plus, nous avons choisi d'étudier la spéciation chimique *in situ* afin de s'affranchir des risques de redistribution élémentaire et de changement de spéciation encourus lors d'une lyse cellulaire.

## Chapitre I : Etudes bibliographiques

La qualité de modèle génétique de *C. reinhardtii* permet de choisir des souches, génétiquement modifiées ou non, dont les mutations seraient impliquées dans un des mécanismes de tolérance vis-à-vis du cadmium. D'un côté, la souche cw15 est déficiente en paroi cellulaire. Sa sensibilité au cadmium (Macfie et al., 1994) et sa capacité à excréter ses granules de polyphosphate (Komine et al., 1996, 2000) mettraient l'accent sur l'importance de la séquestration du cadmium par les granules de polyphosphate. D'un autre côté, la souche pcs1 a été nouvellement mise au point à l'institut de physiologie végétale de l'université Martin-Luther de Halle-Wittenberg en Allemagne. Le gène de la phytochélatine synthase (pcs), situé originellement sur le génome nucléaire, a été cloné dans le génome chloroplastique. Cette souche est ainsi capable de sur-exprimer la PCS au sein de son chloroplaste afin de protéger les photosystèmes du stress lié au cadmium.

Globalement, l'impact toxicologique du cadmium est caractérisé en mesurant des paramètres biologiques sensibles au stress métallique : croissance, quantité de chlorophylle, production d'amidon. Puis, la localisation du cadmium est déterminée suite à un fractionnement subcellulaire. Nos résultats pourront être comparés à ceux existant déjà dans la bibliographie (Lavoie et al., 2009a).

Le TEM/X-EDS et le nanoSIMS sont des techniques d'imageries pouvant être appliquées sur les mêmes échantillons biologiques. Le TEM/X-EDS fournit les détails de l'ultrastructure cellulaire et la composition élémentaire de régions d'intérêt. Le nanoSIMS, apporte des cartographies élémentaires et isotopiques de la cellule. Elle permet de localiser les isotopes du carbone et d'évaluer l'impact du cadmium sur son assimilation. De plus, la nouvelle source Hypérion O<sup>-</sup> RF pourrait potentiellement ioniser de manière efficace le cadmium. La corrélation des données de ces deux techniques permet de localiser le cadmium dans l'ultrastructure cellulaire et de connaître son effet sur les structures cellulaires.

L'environnement structural du cadmium au niveau de la culture est déterminé par XAS. Le  $\mu$ XRF et le  $\mu$ XANES, utilisées en tandem, permettent de connaître la nature des ligands dans des zones subcellulaires riches en cadmium ( $\mu$ XANES), repérées sur une cartographie élémentaire ( $\mu$ XRF).

La complémentarité de ces quatre techniques est résumée en table 7.

# Chapitre I : Etudes bibliographiques

Table 7 : Complémentarité entre les techniques à faisceau X ( $\mu$ XRF/XAS), d'ions (nanoSIMS) et d'électrons (TEM/X-EDS) pour l'étude du stress métallique chez *Chlamydomonas reinhardtii*

	<b>Techniques synchrotron</b> (faisceau X)	<b>nanoSIMS</b> (faisceau d'ions)	<b>TEM/X-EDS</b> (faisceau d'électrons)
<b>A l'échelle de la culture</b>			
	<b>XAS</b> Environnement structural du Cd dans culot cellulaire	-	-
<b>A l'échelle de la cellule individuelle</b>			
	<b><math>\mu</math>XRF</b> Imagerie élémentaire <b>Tandem</b> <b><math>\mu</math>XAS</b> Nature des ligands du Cd sur zones repérées en $\mu$ XRF	Imagerie élémentaire et isotopique <b>Imagerie corrélative</b>	<b>X-EDS</b> Localisation élémentaire ponctuelle <b>TEM</b> Ultrastructure
<b>Résolution spatiale</b>	Submicrométrique	50 nm	nanométrique
<b>Sensibilité</b>	$\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g.g}^{-1}$	100 - 1000 $\mu\text{g.g}^{-1}$
<b>Cryofixation</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Cryostat</b>	Oui	Non	Non



# CHAPITRE II :

## MATERIEL ET METHODES

<b>1. CULTURE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i></b> .....	<b>55</b>
<b>2. MESURE DE LA TOXICITE</b> .....	<b>57</b>
2.1. <u>Mesure de la croissance</u> .....	57
2.2. <u>Mesure de la production de chlorophylle</u> .....	58
2.3. <u>Mesure de la production d'amidon</u> .....	59
2.4. <u>Détermination de la spéciation du cadmium et des métaux essentiels dans les milieux de culture</u> .....	59
2.5. <u>Tests statistiques</u> .....	60
<b>3. DOSAGE DES METAUX DANS LA BIOMASSE DE <i>C. REINHARDTII</i></b> .....	<b>60</b>
3.1. <u>Lavage des cellules</u> .....	60
3.2. <u>Dosage des métaux</u> .....	61
<b>4. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE</b> .....	<b>61</b>
<b>5. PURIFICATION DES GRANULES</b> .....	<b>63</b>
<b>6. IMAGERIE PAR TEM ET NANOSIMS</b> .....	<b>64</b>
6.1. <u>Préparations des échantillons</u> .....	64
6.1.1. <u>Cryofixation</u> .....	64
6.1.2. <u>Cryosubstitution</u> .....	65
6.1.3. <u>Ultramicrotomie</u> .....	66
6.2. <u>Analyse TEM/X-EDS</u> .....	67
6.3. <u>Analyse nanoSIMS</u> .....	68
<b>7. TECHNIQUES SUR RAYONNEMENT SYNCHROTRON</b> .....	<b>69</b>
7.1. <u>Préparation des échantillons</u> .....	69
7.1.1. <u>Analyse subcellulaire par <math>\mu</math>XRF et <math>\mu</math>XANES</u> .....	69
7.1.2. <u>Analyse au niveau de la culture</u> .....	69
7.1.3. <u>Synthèse du standard Cd-Phytate</u> .....	70
7.2. <u>Analyse XANES et EXAFS au seuil K du cadmium sur BM30B (ESRF)</u> .....	<b>70</b>
7.2.1. <u>Présentation de la ligne de lumière</u> .....	70
7.2.2. <u>Acquisition des données</u> .....	71
7.2.3. <u>Traitement des données</u> .....	71
7.2.4. <u>Exploitation des données</u> .....	72
7.3. <u>Analyse <math>\mu</math>XRF et <math>\mu</math>XANES/XANES au seuil L<sub>III</sub> du cadmium sur ID21 (ESRF)</u> .....	<b>73</b>
7.3.1. <u>Présentation de la ligne de lumière</u> .....	73
7.3.2. <u>Acquisition des données</u> .....	74
7.3.3. <u>Traitement et exploitation des données</u> .....	75



## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### 6. CULTURE DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Les souches de *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (wt 11/32b), déficiente en paroi cellulaire (cw15) et surexprimant la PCS dans le chloroplaste (pcs1) ont été obtenues auprès de l'institut de physiologie végétale de l'université Martin-Luther de Halle-Wittenberg en Allemagne. La souche de type sauvage a été utilisée en tant que souche témoin. La souche cw15 qui est déficiente en paroi cellulaire a été choisie pour sa capacité à excréter les granules de polyphosphate. La souche pcs1 qui surexprime la phytochélatine synthase (PCS) directement dans son chloroplaste a été sélectionnée car elle pourrait potentiellement protéger ses photosystèmes de l'impact toxique du cadmium. Les micro-algues ont été cultivées mixotrophiquement en milieu liquide Tris-Acétate-Phosphate (TAP) dont la composition est présentée en table 8.

Table 8 : Composition du milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP) d'après (Harris, 2009)

Composé	Concentration finale (g.l <sup>-1</sup> )
Tris base	2,420
NH <sub>4</sub> Cl	0,400
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,100
CaCl <sub>2</sub>	0,050
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,056
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,108
NaCl	0,025
EDTA	50 x10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 x10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22 x10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57 x10 <sup>-3</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98 x10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,06x10 <sup>-3</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,61x10 <sup>-3</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,10x10 <sup>-3</sup>
Acide acétique glacial (pH7)	1ml

## Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce milieu contient deux sources de carbone : l'acétate comme source de carbone organique et du CO<sub>2</sub> dissout en tant que source de carbone inorganique, assurant une croissance importante de *C. reinhardtii*. Il contient également une quantité d'EDTA assez importante pour maintenir les métaux essentiels en solution. Cependant, cet agent chélateur partage avec le cadmium une constante d'affinité relativement élevée ( $\log K_1 (\text{CdEDTA}^{2-}) = 16,46$ ), ce qui pourrait provoquer une faible disponibilité du cadmium. Afin de diminuer la complexation du cadmium due à l'importante concentration en EDTA du milieu TAP, l'EDTA et le sulfate de Fer ont été remplacés par le complexe Fe(EDDHA) dans le milieu TAP modifié. La composition du milieu TAP modifié est présenté en table 9.

Table 9 : Composition du milieu Tris-acétate-phosphate modifié à partir de la formule de (Harris, 2009)

Composé	Concentration finale (g.l <sup>-1</sup> )
Tris base	2,420
NH <sub>4</sub> Cl	0,400
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,100
CaCl <sub>2</sub>	0,050
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,056
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,108
NaCl	0,025
Fe(EDDHA)	7,45 x10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 x10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22 x10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57 x10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,06x10 <sup>-3</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,61x10 <sup>-3</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,10x10 <sup>-3</sup>
Acide acétique glacial (pH7)	1ml

Les cultures ont eu lieu sous illumination constante (2 néons cool white + 1 néon warm white light) et agitation constante (120 rpm) à température ambiante (20-24°C) (voir figure 18). Les milieux frais ont été inoculés à partir d'une culture stock en fin de croissance exponentielle de façon à obtenir une densité optique initiale à 730 nm

( $DO_{730nm}$ ) de 0,040. Pour les cultures contaminées au cadmium, le métal a été introduit 24 heures après l'inoculation sous forme de  $CdCl_2$  afin de laisser le temps aux cellules de démarrer leur croissance. Afin de maintenir les cultures axéniques, tout le matériel a été stérilisé et les micro-algues ont été manipulées sous hotte à flux laminaire. Enfin, pour éviter toutes contaminations dues aux métaux, la verrerie a été lavée avec de l'acide nitrique à 5% puis rincée avec de l'eau MilliQ avant utilisation.

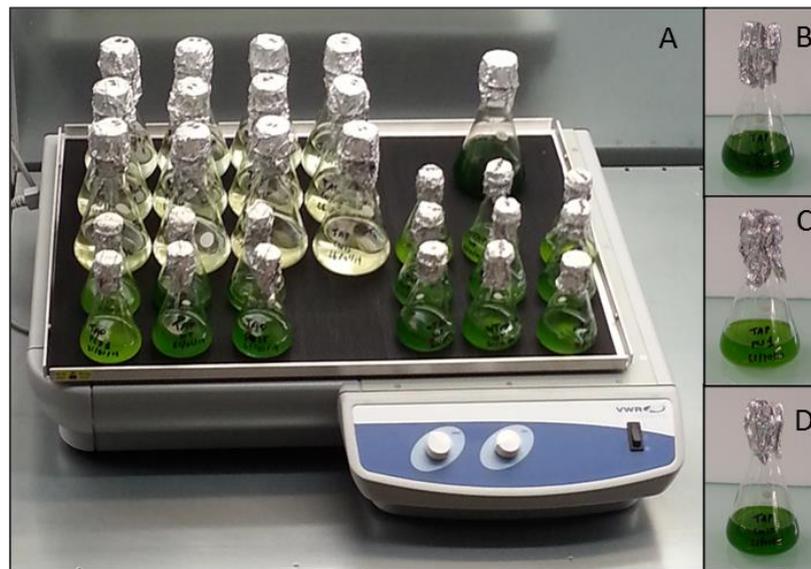


Figure 18 : Culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en milieu liquide. (A) Cultures liquides de *C. reinhardtii* sur tapis d'agitation elliptique (B) Souche wt 11/32 b, (C) Souche pcs1 et (D) souche cw15 en fin de phase exponentielle de croissance.

## 7. MESURE DE LA TOXICITE

La toxicité du cadmium a été mesurée afin de déterminer la mutation de *C. reinhardtii* apportant la plus grande tolérance au stress métallique. La croissance a été surveillée dans le but de déterminer l'impact du cadmium sur la division asexuée de la micro-algue. La teneur en chlorophylle a été contrôlée pour détecter un effet toxique sur la photosynthèse (Faller et al., 2005). Enfin, la production d'amidon a été quantifiée car la micro-algue *C. acidophila* a montré une augmentation de la production d'amidon lorsqu'elle était stressée par une exposition au cadmium (Nishikawa et al., 2006).

### 7.1. Mesure de la croissance

Les milieux de culture ont été contaminés par du  $CdCl_2$  de manière à obtenir une concentration finale de 10, 20, 30, 40, 50 et 70  $\mu M$  de cadmium. Au cours de la culture, des échantillons ont été prélevés en triplicats toutes les 12 heures pendant 5 jours sur

lesquels la densité optique à 730 nm a été mesurée par spectrophotométrie. Le taux de croissance ( $\mu$ ) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\mu = \frac{(\ln N_f - \ln N_i)}{\Delta t}$$

$N_f$  est la  $DO_{730nm}$  mesurée en fin de croissance exponentielle,  $N_i$  est la  $DO_{730nm}$  mesurée en début de la phase exponentielle de croissance et  $\Delta t$  est la durée de la phase exponentielle exprimée en jour. La macro Excel REGTOX (<http://eric.vindimian.9online.fr/>) a été utilisée pour calculer la concentration efficace à partir de laquelle 50 % du taux de croissance est inhibé ( $CE_{50}$ ) par l'approche de Hill :

$$f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + CE_{50}^{nH}}$$

Avec  $nH$  qui est le nombre de Hill qui caractérise la pente de la relation dose-réponse au point d'inflexion et  $EC_{50}$  est la concentration ou la dose d'effet médian.

## 7.2. Mesure de la production de chlorophylle

Les milieux de culture ont été contaminés par du  $CdCl_2$  de manière à obtenir une concentration finale de 10, 20, 30, 40, 50 et 70  $\mu M$  de cadmium. Au bout de 48 heures d'exposition au cadmium, la quantité de chlorophylle (a et b) a été mesurée par spectrophotométrie à 652 nm dans 80% d'acétone. Brièvement, les micro-algues provenant d'1 ml de culture ont été culotées par centrifugation à 13000 g pendant 1 minute. Elles ont ensuite été resuspendues dans 1 ml d'acétone à 80% et lysées par vortexation pendant 2 minutes. Enfin, les débris cellulaires ont été écartés suite à une centrifugation à 13000 g pendant 4 minutes et l'absorbance à 652 nm ( $Abs_{652nm}$ ) de la chlorophylle solubilisée a été mesurée avec un spectrophotomètre. La concentration en chlorophylle (a et b), notée  $C$  et exprimée en  $mg.ml^{-1}$ , est calculée en fonction de la formule :

$$C = \frac{Abs_{652nm} \times 1000}{34.5}$$

Le nombre de cellules de *C. reinhardtii* par ml de culture a été déterminé via une cellule de Thoma. Une droite d'étalonnage reliant la  $DO_{730nm}$  au nombre de cellules

par ml de culture a été utilisée. La teneur en chlorophylle est exprimée en pg de chlorophylle a et b par cellule.

### 7.3. Mesure de la production d'amidon

Les micro-algues de cultures témoins et exposées à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium durant 48 heures ont été récupérées par centrifugation à 3000 g pendant 3 minutes et resuspendues dans 1,5 ml d'eau MilliQ. La masse sèche de cellules algales a été mesurée en pesant la biomasse contenue dans un aliquote de 0,5 ml est séché à 60°C pendant 24 heures. Les micro-algues du ml restant ont été lavées une fois avec de l'eau MilliQ et une fois avec de l'éthanol à 80% avant d'être bouillies pendant 10 minutes. La quantité d'amidon a été mesurée dans cet extrait brut par l'intermédiaire du kit enzymatique HK (Sigma Aldrich) dont les principales réactions sont résumées en figure 19. (1) l'amidon est phosphorylé en glucose par l'amyloglucosidase. (2) en présence d'ATP, le glucose est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par une hexokinase. (3) le GP6 est oxydé en 6-phosphogluconate en présence de NAD par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Au cours de l'oxydation, le NAD est réduit en NADH. La quantité de NADH, dont l'absorbance est mesurée à 340 nm, augmente proportionnellement à la quantité de glucose.

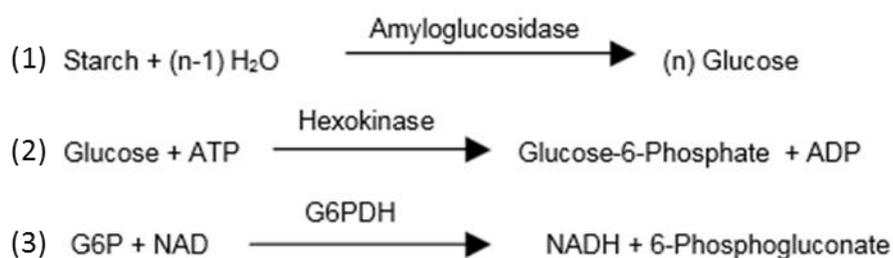


Figure 19 : réactions enzymatiques ayant lieu au cours du dosage de l'amidon par le kit enzymatique HK (Sigma Aldrich).

### 7.4. Détermination de la spéciation chimique du cadmium et des métaux essentiels dans les milieux de culture

La spéciation des métaux dans le milieu de culture est importante puisqu'elle va déterminer leur disponibilité. La toxicité du cadmium va dépendre de sa spéciation chimique. De plus, l'introduction du cadmium et la modification du milieu TAP classique pourrait perturber les concentrations en métaux libres disponibles. La spéciation a été calculée avec le logiciel Visual Minteq (Visual MINTEQ 3.0) en utilisant les constantes thermodynamiques de la Lindsay's database.

### **7.5. Tests statistiques**

Des tests statistiques ont été menés par ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Fisher, sur les mesures de croissance et les dosages en chlorophylle, en amidon pour mettre en évidence des différences significatives ( $p < 0,05$ ) dues conditions de cultures.

## **8. DOSAGE DES METAUX DANS LA BIOMASSE DE *C. REINHARDTII***

Le cadmium et les métaux essentiels ont été dosés dans la biomasse algale afin de déterminer l'accumulation en cadmium des trois différentes souches de *C. reinhardtii* et de déterminer un potentiel effet du cadmium sur l'assimilation des métaux essentiels (fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt et molybdène).

### **8.1. Lavage des cellules**

Dans un premier temps, les cellules sont lavées des métaux adsorbés à leur paroi cellulaire pour être certain de ne doser que les métaux intracellulaires par la suite. Après 72 heures de culture (soit 48 h d'exposition au Cd), les cellules algales sont récupérées par centrifugations à 3000 g pendant 3 minutes. Le culot cellulaire est lavé selon la méthode employée par Macfie et al., 1994. Il est lavé une première fois dans 10 ml d'eau MilliQ puis deux fois dans 10 ml d'une solution du mélange  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  à 1 mM et  $\text{CaCl}_2$  à 3.77 mM et enfin, une dernière fois dans 10 ml d'eau MilliQ. Les cellules sont récupérées entre chaque lavage par centrifugation à 3000 g pendant 3 minutes. Le culot lavé est séché à 60°C durant 24 heures puis pesé.

L'impact de la présence de la paroi cellulaire sur l'accumulation du cadmium a été étudié en dosant le cadmium intracellulaire et adsorbé à la paroi. Ainsi, le cadmium adsorbé à la paroi est la somme du cadmium contenu dans les 2 solutions de lavage à l'EDTA et la dernière solution de lavage à l'eau. Celui présent dans la biomasse après lavage est considéré comme cadmium intracellulaire (protocole détaillé en figure 20).

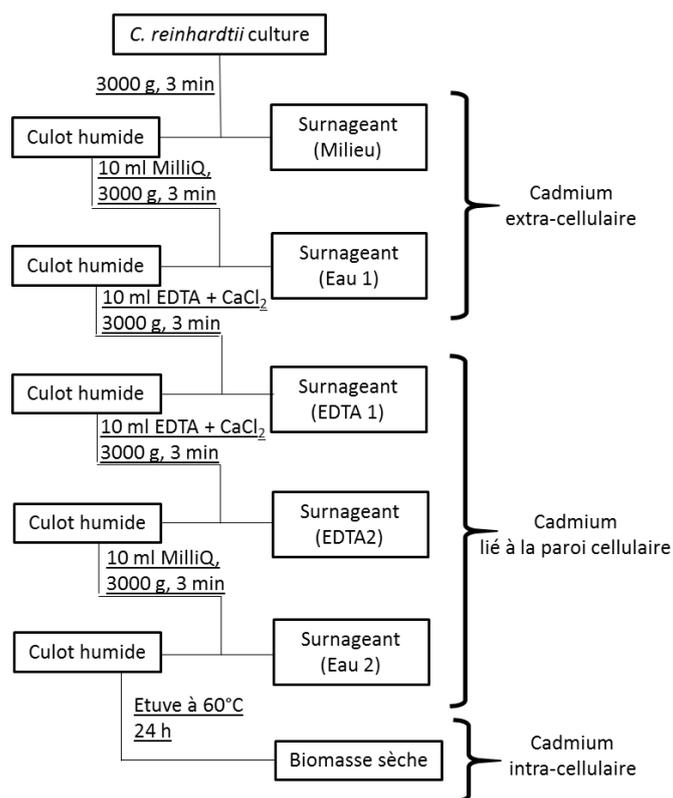


Figure 20 : organigramme du protocole de lavage de *C. reinhardtii* d'après Macfie et al., 1994

## 8.2. Dosage des métaux

Les culots cellulaires secs sont minéralisés dans un mélange d'1 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% (v/v)) et d'1 ml d'HNO<sub>3</sub> (70% (v/v)) porté à 80°C pendant 3 heures. La solution de minéralisation est ensuite filtrée à 0,2 µm et diluée de façon à obtenir une concentration en HNO<sub>3</sub> de 2% (v/v). Les solutions de lavages sont filtrées à 0,2 µm et acidifiées à 2% d'HNO<sub>3</sub> (v/v). Les dosages en cadmium, fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt et molybdène ont été réalisés par ICP-MS (modèle 7500, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) en ajoutant de l'Yttrium en tant que standard interne juste avant les analyses.

## 9. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

Le fractionnement subcellulaire permet de localisation subcellulaire du cadmium au niveau de la culture en séparant des fractions contenant des compartiments cellulaires spécifiques.

La lyse et le fractionnement subcellulaire de *C. reinhardtii* ont été adaptées en fonction des protocoles optimisés de Lavoie et al., 2009a. Après les étapes de lavage détaillées ci-dessus en partie II.3.1., les cellules ont été resuspendues dans 1,5 ml de solution

## Chapitre II : Matériel et méthodes

de rinçage de milieu « high salt » modifié (MHSM-R) composé de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $5,00 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $2,00 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $1,00 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,77 \text{ mg.l}^{-1}$ ), et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $1,48 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Cette solution sans EDTA et éléments traces permet de minimiser la redistribution du cadmium pendant le fractionnement. La concentration intracellulaire en cadmium total a été déterminée dans un aliquote de 0,5 ml comme décrit en II.3.2. Les micro-algues restantes ont été lysées dans la glace par sonication (puissance = 22 W, pulse = 0,2/s, durée = 4 minutes). L'efficacité de la lyse a été vérifiée par microscopie optique. L'organigramme du protocole de fractionnement est présenté en figure 21.

A partir du lysat, 5 fractions subcellulaires ont été séparées par ultracentrifugation différentielle : la fraction « débris » contenant les parois cellulaires, les membranes plasmiques et le noyau ; la fraction contenant les composés résistants à la digestion par NaOH (NaOH resistant compounds (NRC)) ; la fraction « organelle » contenant mitochondries, réticulum endoplasmique, appareils de Golgi et microsomes ; la fraction contenant les protéines résistantes au choc thermique (heat stable proteins (HSP)) dont le glutathion et les phytochélatines ; la fraction contenant les protéines sensibles au choc thermique (Heat denaturable proteins (HDP)).

Ainsi, le lysat a été centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes à 4°C pour séparer le culot de débris cellulaires du cytosol. D'un côté, le culot de débris cellulaires a été resuspendu et chauffé successivement, dans l'eau MilliQ à 100°C pendant 2 minutes puis dans NaOH à 0,5 M à 65°C pendant 1 heure. Après une centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C, la fraction NRC (culot) est séparée de la fraction « débris » (surnageant). De l'autre côté, à partir du cytosol, la fraction « organelle » est culotée suite à une ultracentrifugation à 100000 g pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant cytosolique restant est ensuite chauffé à 80°C pendant 10 minutes puis refroidi dans la glace pendant 1 heure. Après une ultracentrifugation à 50000 g pendant 15 minutes à 4°C, la fraction HDP (culot) est séparée de la fraction HSP (surnageant). Suite au fractionnement, toutes les fractions ont été minéralisées en vue du dosage du cadmium par ICP-MS, comme détaillé en partie II.3.2.

## Chapitre II : Matériel et méthodes

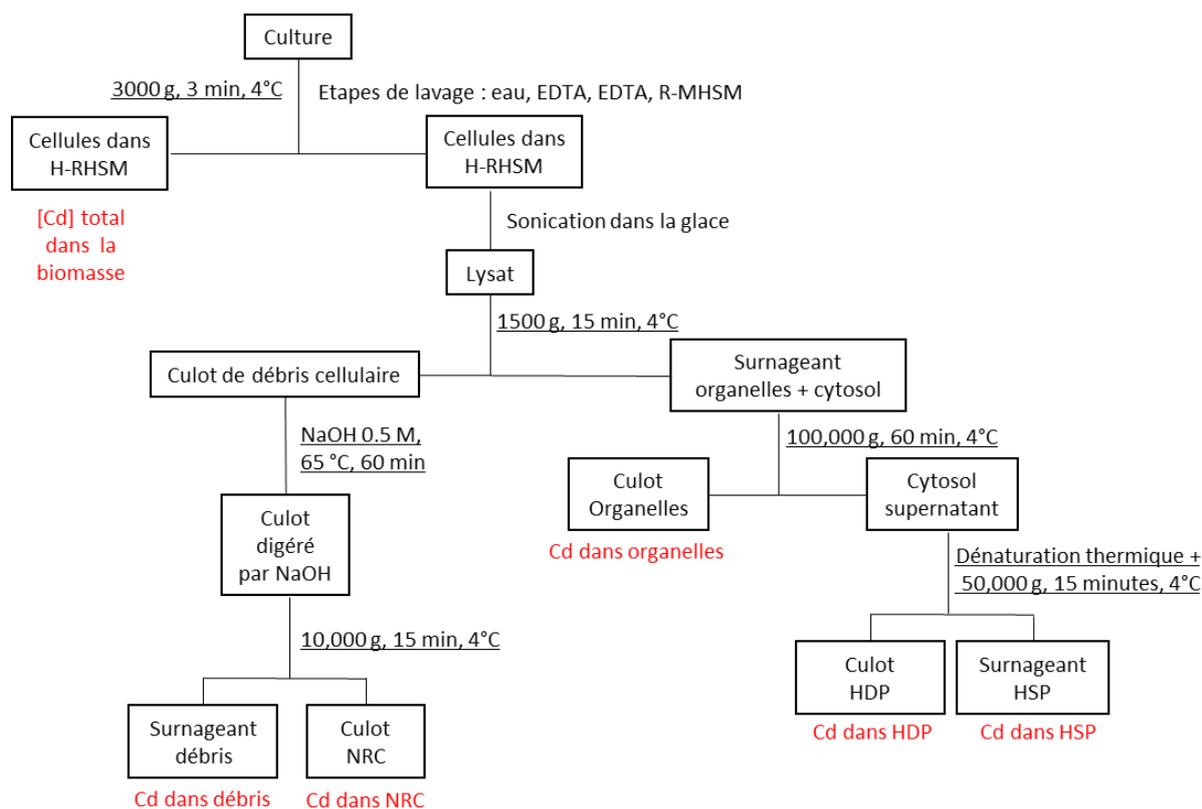


Figure 21 : protocole de fractionnement subcellulaire de *C. reinhardtii* d'après (Lavoie et al., 2009a). NRC : NaOH resistant compounds

### 10. PURIFICATION DES GRANULES

Les granules de polyphosphate qui pourraient correspondre aux acidocalcisomes (Ruiz et al., 2001) devraient être isolées dans la fraction « Organelles » en même temps que les microsomes. Pourtant, selon la méthode développée par (Lavoie et al., 2009a), elles ne sont recherchées que parmi le culot de débris cellulaires.

En parallèle du fractionnement subcellulaire, les granules de polyphosphate ont été purifiées à partir de cultures indépendantes, comme décrit par Komine et al., 2000. Le protocole de purification des granules est identique à celui du fractionnement subcellulaire jusqu'à l'obtention des fractions de débris cellulaires et de surnageant cytosolique. L'organigramme du protocole de purification des granules est présenté en figure 22.

D'un côté, le culot de débris cellulaire a été resuspendu dans 1 ml de solution MHSM-R contenant 1% de Triton X-100. D'un autre côté, 1% de Triton X-100 a été ajouté à 1 ml de surnageant cytosolique. Les deux fractions ont ensuite été centrifugées à

## Chapitre II : Matériel et méthodes

10000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots ont été suspendus dans une solution de MHSM-R contenant 0,73 M de sucrose. Les granules de polyphosphate ont été culotées en passant à travers une couche de sucrose à 1,5 M à 400 g pendant 90 secondes. Suite à la purification, les granules ont été minéralisés en vue du dosage du cadmium par ICP-MS, comme détaillé en partie II.3.2.

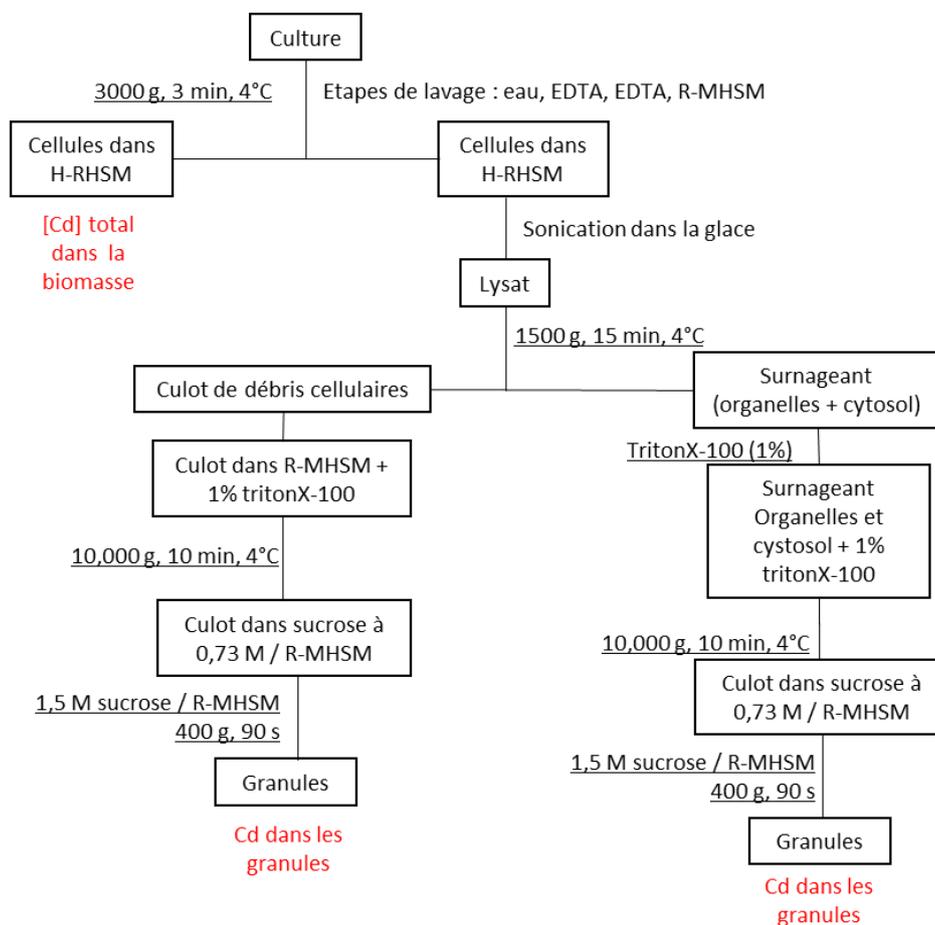


Figure 22 : protocole de purification des granules de polyphosphate adapté d'après (Komine et al., 2000)

## 11. IMAGERIE PAR TEM ET NANOSIMS

### 11.1. Préparations des échantillons

#### 11.1.1. Cryofixation

La préparation des échantillons a été réalisée au Bordeaux Imaging Center. Les cultures de *C. reinhardtii* ont été centrifugées à 3000 g durant 3 minutes. Avant la congélation sous haute pression, le culot a été incubé dans une solution de mannitol à 150 mM pendant 1 heure à l'obscurité. A la suite d'une centrifugation à 3000 g

pendant 3 minutes, le culot cellulaire a été inclus dans de l'agarose à 2%. Le culot a été plongé dans l'1-hexadécène agissant comme cryo-protecteur. La fixation des culots cellulaires par cryofixation a été choisie car elle évite la redistribution des petites biomolécules et des ions par une congélation flash. Cette dernière favorise la formation de glace amorphe au lieu de cristaux de glace qui pourraient endommager la structure cellulaire. La méthode de congélation à haute pression a été effectuée (EM HPM 100, Leica Microsystems). Elle consiste à vitrifier une épaisseur de 200 µm en quelques millisecondes par un jet d'azote liquide projeté à 2000 bar, en profitant de l'abaissement du point de congélation de l'eau sous haute pression.

### *11.1.2. Cryosubstitution*

Suite à la cryofixation, la glace vitreuse est substituée à froid par l'acétone puis par la résine. La substitution à froid a été réalisée suivant le protocole établi par (O'Toole, 2010) avec quelques modifications, dans un appareil de Cryo-substitution automatisé AFS2 (Leica microsystems, Vienna, Austria). Les échantillons congelés ont été plongés dans de l'acétone anhydre avec 1% de tetroxide d'osmium et 0,25% de glutaraldehyde. Ils ont ensuite été conservés dans l'AFS2 à -90°C pendant 3 jours puis amenés jusqu'à -30°C au cours d'une période de 8 heures. Ils ont été maintenus à 0°C pendant 1 heure puis lavés avec de l'acétone anhydre.

Les échantillons ont été réchauffés à température ambiante puis imprégnés de résine par infiltration progressive de résine et d'acétone. L'infiltration et la polymérisation ont été réalisées de façon automatisée par un Automatic Microwave Tissue Processor pour microscopie électronique (AMW Leica microsystems, Vienna, Austria). Les étapes d'infiltration résumées en table 10 ont été appliquées : ratio acétone/résine de 3 pour 1 pendant 300 secondes à 37°C, ratio acétone/résine de 1 pour 1 pendant 300 secondes à 40°C, ratio acétone/résine de 1 pour 3 pendant 420 secondes à 45°C et 3 bains de 100% de résine pendant 420 secondes à 50°C. Concernant la polymérisation, les échantillons enduits de résine ont été transférés dans des moules spécifiques à l'AMW et polymérisés pendant 3 heures.

Table 10 : étapes d'infiltration des échantillons

<b>Etapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Temps</b>	<b>Température</b>
T1	Acétone/résine (3 :1)	300 secondes	37°C
T2	Acétone/résine (1 :1)	300 secondes	40°C
T3	Acétone/résine (1 :3)	420 secondes	45°C
T4	résine	420 secondes	50°C
T5	résine	420 secondes	50°C
T6	résine	420 secondes	50°C

### 11.1.3. Ultramicrotomie

La découpe des échantillons a été réalisée sur un ultra-microtome (EM Ultracut-UC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Des coupes de 70 nm d'épaisseur ont été faites pour être observées par microscopie électronique à transmission (TEM). Elles ont été déposées sur une grille de cuivre ou de nickel à membrane carbonée. Des coupes de 300 nm d'épaisseurs ont été réalisées dans le but d'être analysées par nanoSIMS. Elles ont été déposées sur un support de silice (Wafer solution, Le Bourget du lac, France).

Pour un jeu d'échantillon observable en microscopie corrélative, plusieurs coupes successives d'épaisseurs différentes d'un même bloc ont été réalisées : 70 nm / 70 nm / 300 nm // 300 nm / 70 nm / 70 nm (voir figure 23). Les coupes de 70 nm d'épaisseur sont destinées à être observées par TEM/X-EDS, celles de 300 nm d'épaisseur sont analysées par nanoSIMS.

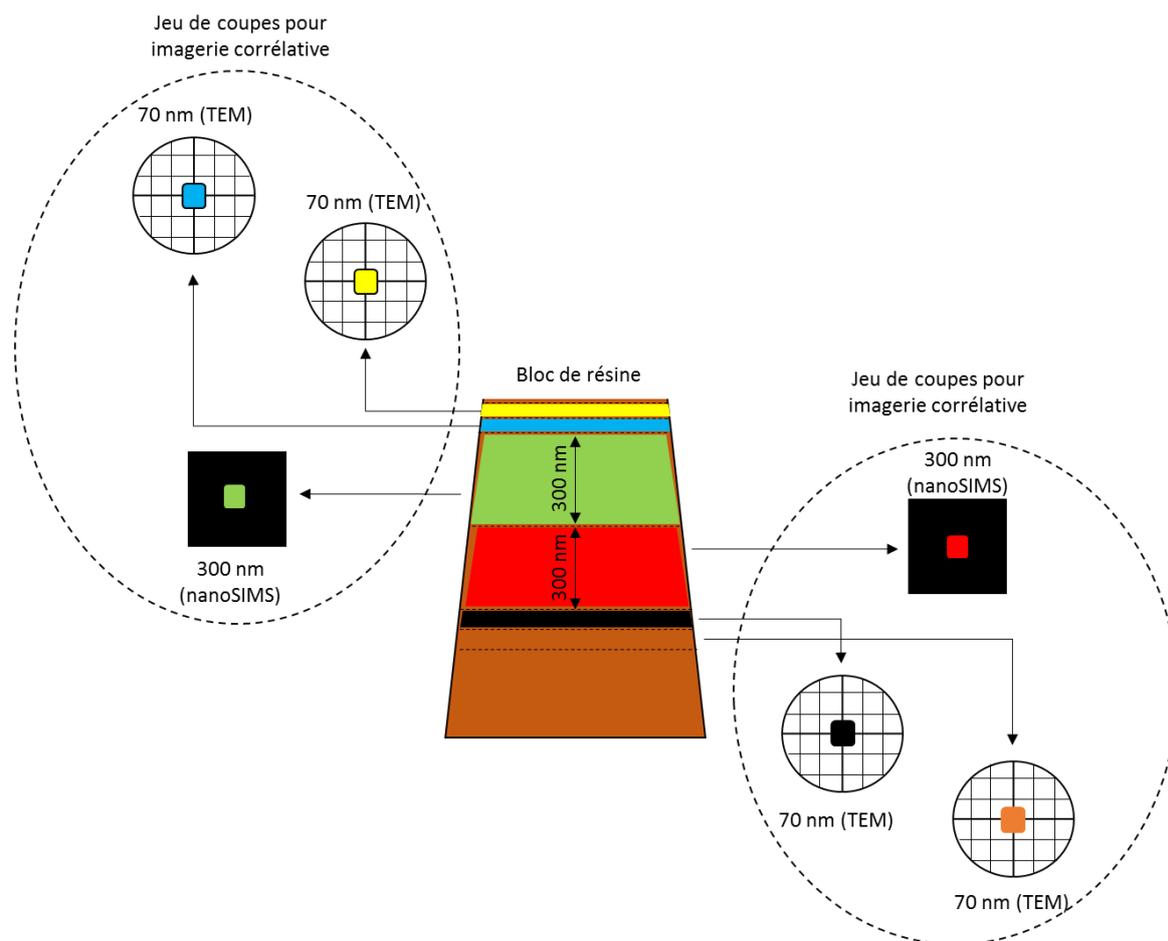


Figure 23 : Procédure de découpe du bloc de résine afin d'obtenir des coupes successives utilisées en imagerie corrélative TEM/nanoSIMS. Les différentes coupes sont séparées par des traits en pointillés. Un jeu de coupes utilisable en imagerie corrélative est composé de 2 coupes successives de 70 nm d'épaisseur déposées sur des grilles en cuivre pour l'observation TEM et d'une coupe de 300 nm d'épaisseur déposée sur un support de silice pour l'analyse nanoSIMS

### 11.2. Analyse TEM/X-EDS

Les observations de l'ultrastructure des micro-algues ont été faites sur un microscope électronique à transmission FEI Tecnai 12 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) équipé d'un filament LaB6, d'une caméra digitale Olympus et d'une sonde X-EDS (X-Flash 6T 60, Bruker). En mode fond clair contrasté, la tension d'accélération est de 120 KeV. L'analyse X-EDS a été réalisée en mode nanosonde (taille de sonde de 50 nm de diamètre) permettant une acquisition pendant 3 minutes avec un temps mort de 10 %.

L'imagerie TEM a permis l'observation de l'ultrastructure des micro-algues et de déterminer si l'exposition au cadmium avait un impact sur la morphologie de *C. reinhardtii*. Les nano-analyses X ont été réalisées sur des zones d'intérêts comprenant les organelles suivantes : noyau, pyrénoloïde, thylakoïde, granules, vacuoles pulsatiles.

Les cellules dont l'ultrastructure a été la mieux conservée ont été repérées sur les coupes TEM de 70 nm d'épaisseur en vue d'être analysées par nanoSIMS sur la coupe de 300 nm d'épaisseur correspondante.

### 11.3. Analyse nanoSIMS

L'imagerie élémentaire et isotopique par nanoSIMS a permis de localiser les isotopes constituant la structure cellulaire ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{S}$ ) avec une résolution de 50 nm grâce à la source d'ions primaire césium. Afin d'étudier l'assimilation du carbone en période de stress métallique chez *C. reinhardtii*, les micro-algues ont été cultivées dans un milieu TAP modifié où l'acide acétique a été remplacé par de l'acétate de sodium marqué au  $^{13}\text{C}$  (99% des carbones de l'acétate sont des  $^{13}\text{C}$ ). Ainsi, les cartographies du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  permettront de mettre en évidence les compartiments cellulaires où l'assimilation du carbone a été perturbée par le cadmium.

La localisation des métaux essentiels pour *C. reinhardtii* et de leurs isotopes a été déterminée grâce à la nouvelle source Hypériorion  $\text{O}^-$  RF (radio-fréquence). Comparativement à l'ancienne source  $\text{O}^-$  Duoplasmatron, le temps de maintenance de la source Hypériorion est quasi inexistant. De plus, la résolution spatiale a été améliorée (100 nm  $\Rightarrow$  35 nm) et son courant ionique 100 fois plus dense que celui de l'ancienne source  $\text{O}^-$  amène une meilleure sensibilité élémentaire pour une résolution latérale donnée (Malherbe et al., en préparation). Ainsi, l'augmentation de la sensibilité pourrait potentiellement permettre de détecter le cadmium, ce qui n'était pas le cas avec la source Duoplasmatron. Les cartographies élémentaires et isotopiques de  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{66}\text{Zn}$  et  $^{114}\text{Cd}$  ont été acquises.

Lors des analyses, la résolution massique a été optimisée pour résoudre les problèmes d'interférences entre les éléments étudiés (puissance de résolution de masse de 5000). Le nanoSIMS était équipé de 7 détecteurs multiplicateurs d'électrons en parallèle. Les échantillons ont été scannés par les faisceaux d'ions primaires sur des rasters de 256x256 pixels sur 10  $\mu\text{m}$  de côté environ.

Les données ont été traitées avec le logiciel ImageJ équipé du plugin OpenMIMS développé à la National Resource for Imaging Mass Spectrometry (NRIMS, Cambridge, USA). Les cartographies ioniques ont été corrigées au niveau du temps mort des détecteurs, du biais de masse et du décalage entre les différents plans lors de l'addition des plans. De plus, la cartographie du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  a pu être faite afin

d'apprécier l'assimilation des carbones de l'acétate marqué isotopiquement dans les compartiments cellulaires.

## 12. TECHNIQUES SUR RAYONNEMENT SYNCHROTRON

La microfluorescence X ( $\mu$ XRF) et la spectroscopie d'absorption X (XAS) sur rayonnement synchrotron ont été utilisées sur des cellules congelées de *C. reinhardtii*. La stratégie de mesures consistait à localiser le cadmium au niveau subcellulaire par imagerie élémentaire  $\mu$ XRF. Par la suite, l'environnement structural moyen du cadmium a été déterminé par XAS à deux d'échelles différentes :

- A l'échelle de la culture, afin d'avoir une information globale sur la nature des ligands du cadmium
- A l'échelle subcellulaire, la nature des ligands du cadmium a été déterminée au niveau de zones subcellulaires riches en Cd, repérées sur les cartographies élémentaires  $\mu$ XRF.

### 12.1. Préparation des échantillons

Les cellules ont été centrifugées à 3000 g durant 3 minutes. Elles ont ensuite été resuspendues et lavées 3 fois dans de l'eau MilliQ pour retirer le maximum de composés organiques et de métaux adsorbés sur les parois cellulaires.

#### 12.1.1. Analyse subcellulaire par $\mu$ XRF et $\mu$ XANES

Pour les analyses subcellulaires par  $\mu$ XRF et  $\mu$ XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) au seuil  $L_{III}$  du cadmium, 10  $\mu$ l de solution de micro-algues ont été déposés sur du film Ultralene® de 4  $\mu$ m d'épaisseur. L'enjeu de la préparation est d'obtenir une densité cellulaire suffisante pour parvenir à distinguer des cellules individualisées sans former de tapis cellulaire. La densité cellulaire idéale est atteinte lorsque la  $DO_{730nm}$  de la solution algale est comprise entre 1,5 et 2. Après une période de 10 minutes de décantation, le maximum d'eau a été retiré avec du papier absorbant et le dépôt est rapidement congelé dans l'isopentane préalablement refroidi à  $-120^{\circ}C$  dans l'azote liquide.

#### 12.1.2. Analyse au niveau de la culture

Pour les analyses XANES au seuil  $L_{III}$  du cadmium et, XANES et EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) au seuil K du cadmium, les micro-algues ont été

congelées dans l'azote liquide, homogénéisées et pressées pour obtenir des pastilles congelées de 5 mm de diamètre. Tous les échantillons ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur transfert en cryostat où ils ont été analysés congelés dans leur état hydraté.

### 12.1.3. Synthèse du standard Cd-Phytate

Une solution de Cd-Phytate à  $500\text{ mg/L}^{-1}$  de cadmium a été préparée à pH 10,4 avec un ratio ligand/métal de 10. La solution de standard de Cd-Phytate a été mélangée à 25% (v/v) de glycérol afin de prévenir la formation de cristaux de glace pendant la congélation.

## 12.2. Analyse XANES et EXAFS au seuil K du cadmium sur BM30B (ESRF)

### 12.2.1. Présentation de la ligne de lumière

La ligne FAME est dédiée à la spectroscopie d'absorption X dans des systèmes hautement dilués appartenant aux domaines des sciences environnementales, chimiques et biologiques. Ce type d'étude nécessite un flux de photons important sur l'échantillon, un système de détection de fluorescence très sensible et une très bonne stabilité du faisceau afin d'optimiser le rapport signal/bruit. En tête de ligne, un monochromateur composé de deux cristaux Si(220) scanne l'énergie de rayons X comprise entre 4,8 et 40 KeV. La fluorescence est détectée par un détecteur Canberra 30 élément au germanium. Un cryostat à hélium liquide permet de réaliser l'analyse d'échantillons hydratés congelés à 15 K afin de diminuer les dommages dus à l'irradiation. La configuration de l'optique la ligne est montrée en figure 24.

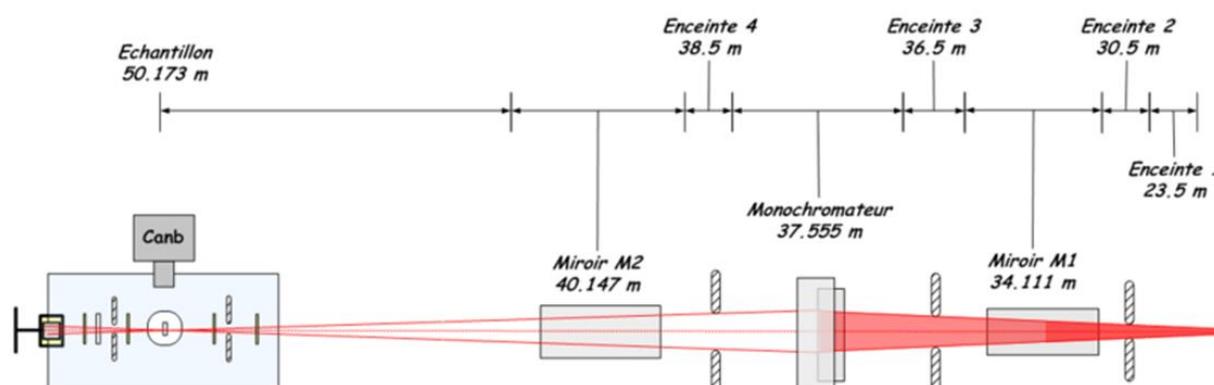


Figure 24 : Configuration de la ligne de lumière FAME (ESRF).  
(<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/CRG/BM30B/DetailsTechniques.html>)

12.2.2. Acquisition des données

Les spectres EXAFS au seuil K du cadmium (26711 eV) ont été enregistrés à froid, en mode fluorescence entre 26500 et 27450 eV. Dix ou vingt scans ont été enregistrés à différents endroits des pastilles de micro-algues congelées et sommés pour améliorer le rapport signal/bruit.

12.2.3. Traitement des données

Dans un premier temps les spectres sont calibrés en énergie avec en général une feuille métallique de référence. Les spectres ont été normalisés à la hauteur du saut d'absorption en utilisant une fonction linéaire pour l'avant seuil ( $\mu_0$ ) et en divisant le spectre obtenu par la hauteur du seuil ( $\Delta\mu$ ) (voir figure 25). Une fonction spline composée de polynômes du troisième degré joints entre eux reproduisant l'absorption de l'atome excité sans voisin  $\mu$ .

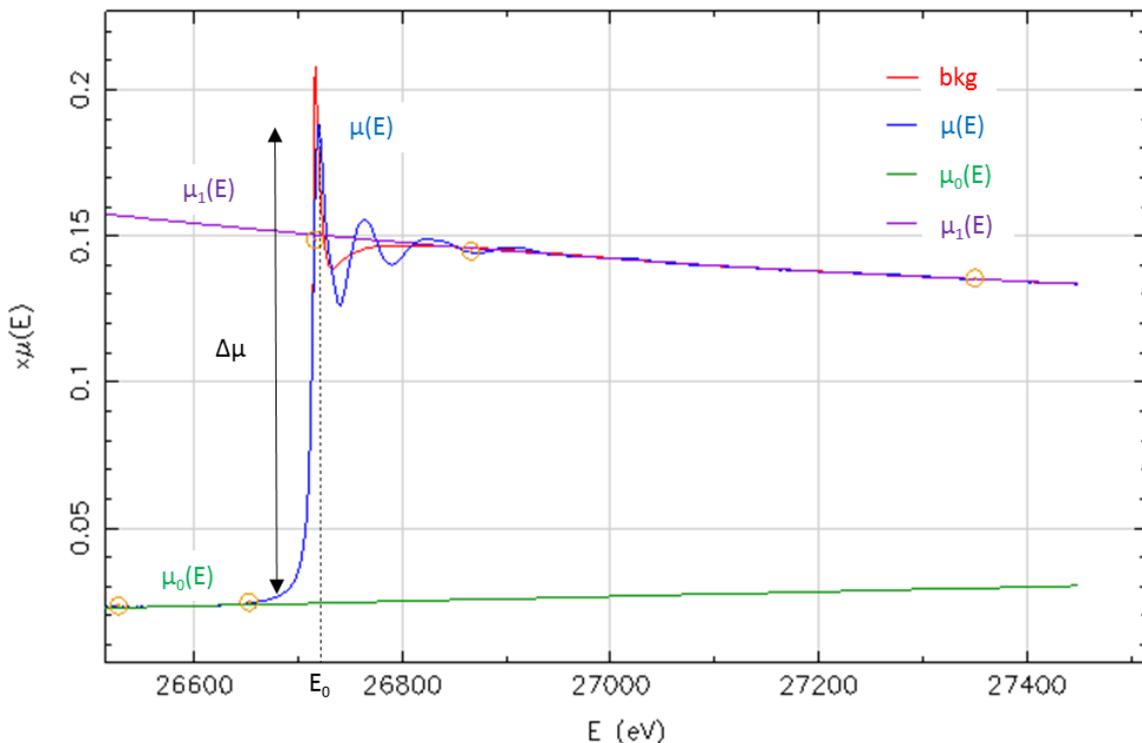


Figure 25 : Spectre d'absorption du Cd-Phytate avant normalisation

La fonction  $\mu(E)$  a été obtenue selon l'équation :

$$\mu(E) = \frac{\mu_{\text{exp}}(E) - \mu_1(E)}{\mu_1(E) - \mu_0(E)}$$

Par la suite, un changement d'abscisse est effectué en transposant les énergies mesurées en vecteur d'onde grâce à la formule :

$$k(\text{\AA}^{-1}) = \sqrt{\frac{8\pi^2 m_e (E - E_0)}{h^2}}$$

où  $m_e$  est la masse de l'électron,  $E_0$  et  $E$  sont les énergies mesurées et  $h$  est la constante de Planck.

Le signal EXAFS a donc été extrait avec la fonction  $\chi(k)$  comme en figure 26 :

$$\chi(k) = \frac{\mu - \mu_0}{\mu_1 - \mu_0}$$

Du fait que l'oscillation EXAFS décroît fortement avec l'énergie, il est souvent utile de multiplier la fonction  $\chi$  par une puissance de  $k$  ( $k$ ,  $k^2$  ou  $k^3$ ) de façon à renforcer le signal à haut  $k$ , avec l'inconvénient d'augmenter également la contribution du bruit dans cette région.

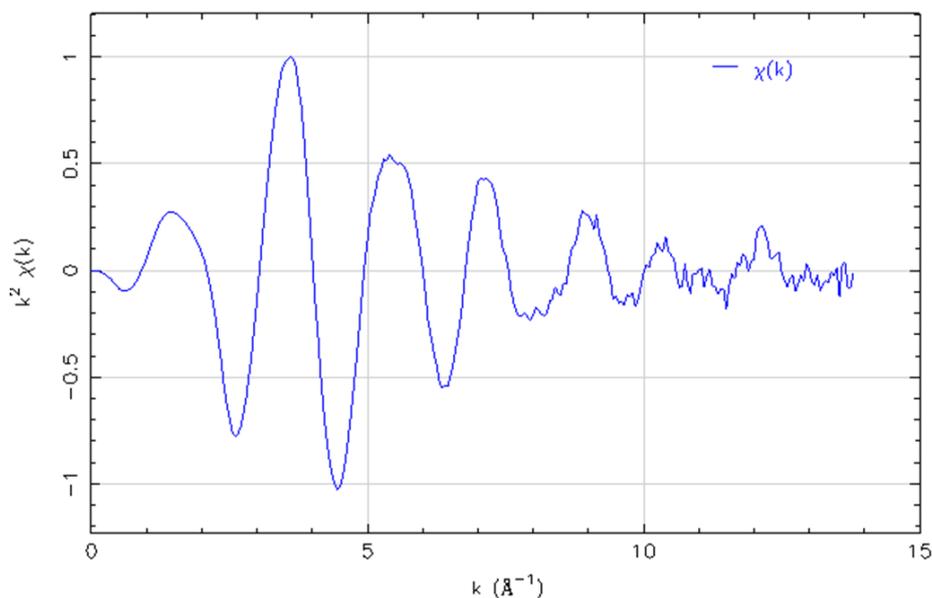


Figure 26 : Spectre EXAFS correspondant au spectre d'absorption en figure 24 après changement d'abscisse

#### 12.2.4. Exploitation des données

La détermination des espèces chimiques du cadmium a été réalisée par combinaisons linéaires. En effet, la partie XANES du spectre d'absorption et le signal EXAFS ont été

considérés comme une somme pondérée des contributions de chaque espèce chimique du cadmium présente dans les micro-algues comme ce fut le cas dans d'autres études environnementales (Huguet et al., 2012; Isaure et al., 2006, 2015; Sarret et al., 2009).

Cette méthode nécessite un grand nombre de composés standards pouvant potentiellement être retrouvés chez *C. reinhardtii*. Les spectres de composés référence ont déjà été enregistrés. La base de donnée contient les complexes Cd-phosphate, Cd-malate, Cd-acétate, Cd-cystéine, Cd-glutathion et Cd-phytochélatine 2 (Huguet et al., 2012). Les spectres du standard du Cd-phytate a été acquis à partir de la solution décrite en partie II.7.1.3.

L'identification des composants a été faite en comparant pour chaque échantillon les combinaisons linéaires obtenues à n et n+1 composantes à l'aide du programme fit600. Lorsque la somme normalisée des carrés des résidus ( $NSS = \frac{\sum(\text{Spectre}_{\text{experimental}} - \text{Spectre}_{\text{fit}})^2}{\sum(\text{Spectre}_{\text{experimental}})^2} \times 100$ ) diminuait de plus de 20% entre la reconstruction à n et n+1 composants, alors les reconstructions à n+1 composantes était retenues. La sensibilité de cette approche est généralement estimée à  $\pm 10\%$ , c'est-à-dire qu'une espèce chimique représentant moins de 10% du Cd total n'est pas détectée.

L'approche par simulation numérique n'a pas été utilisée dans ce travail.

### **12.3. Analyse $\mu$ XRF et $\mu$ XANES/XANES au seuil $L_{III}$ du cadmium sur ID21 (ESRF)**

#### *12.3.1. Présentation de la ligne de lumière*

La ligne ID21 est dédiée à la microscopie et les micro-analyses X dans les domaines des matériaux, de l'environnement, de la biologie et de l'archéométrie. Elle permet de localiser les éléments sur des cartographies  $\mu$ XRF 2D et de réaliser des analyses  $\mu$ XANES sur les zones d'intérêt repérées sur les cartographies. De plus, elle est équipée d'un cryostat à azote liquide qui maintient la chambre d'analyse à 100 K, permettant l'analyse d'échantillons hydratés congelés tout en diminuant les dommages dus à l'irradiation. La configuration de la ligne est montrée en figure 27. Le rayonnement synchrotron rencontre un monochromateur, constitué de 2 cristaux Si(111) qui permet de sélectionner ou de scanner l'énergie des rayons X entre 2 et 9 KeV. Le faisceau monochromatique est ensuite focalisé par une plaque à zones de Fresnel suivie d'un diaphragme, fournissant une résolution spatiale de  $0,3 \times 0,7 \mu\text{m}^2$ .

L'échantillon est aligné avec le plan focal du système de focalisation. Lors des cartographies, le support de l'échantillon se déplace grâce à des moteurs piézo-électriques, assurant le scan de l'échantillon. Le signal peut être enregistré par transmission par un détecteur à photodiodes en silice. La ligne est également équipée d'un détecteur à fluorescence au germanium de haute pureté à 1 ou 7 élément (Princeton-Gamma Tech, US).

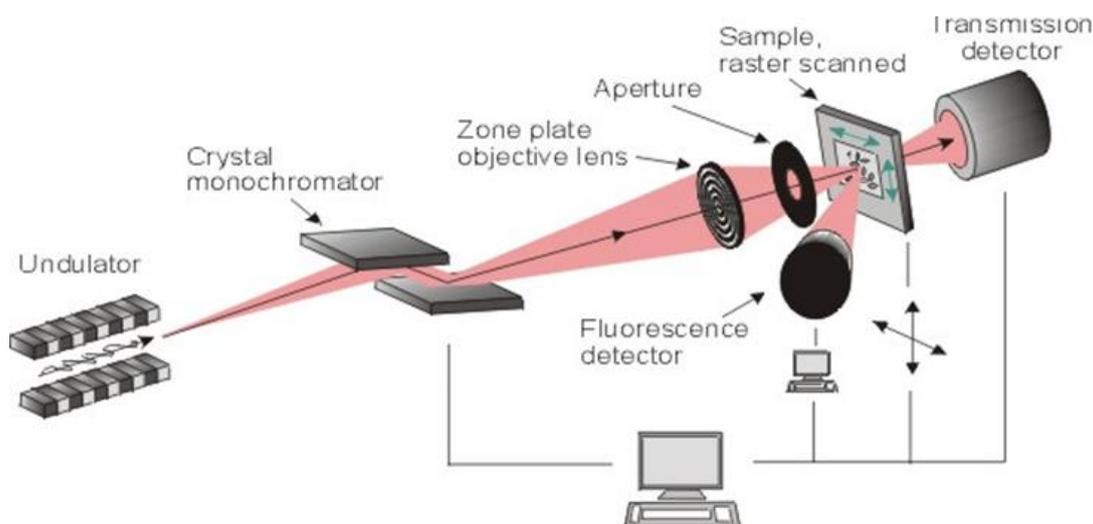


Figure 27 : Configuration de la ligne de lumière ID21 (ESRF).  
(<http://www.esrf.eu/home/UsersAndScience/Experiments/XNP/ID21/Sxm.html>)

### 12.3.2. Acquisition des données

Les analyses  $\mu$ XRF ont été réalisées à froid. Puisque les micro-algues contiennent de grosses quantités de potassium, les cartographies du phosphore, soufre, chlore et cadmium ont été enregistrées avec une énergie incidente de 3,57 KeV, car la raie d'émission de fluorescence  $K_{\beta}$  du potassium (3314 eV) chevauche la raie d'émission de fluorescence du cadmium  $L_{\alpha 1}$  (3133 eV). Les cartographies du potassium et du calcium ont été enregistrées à 4,1 KeV. Suivant les performances disponibles lors des différentes sessions expérimentales, la taille de faisceau était comprise entre 0,2x0,6 et 0,4x0,7  $\mu\text{m}^2$ . De même, le pas d'analyse était choisi entre 0,2 et 0,5  $\mu\text{m}$  suivant la taille du faisceau. Enfin, le temps d'analyse en chaque point de la cartographie variait entre 300 et 500 ms en fonction de la concentration en cadmium des échantillons.

Les analyses  $\mu$ XANES ont été réalisées sur des zones d'intérêt, repérées sur les cartographies élémentaires  $\mu$ XRF. Le faisceau avait la même focalisation qu'en  $\mu$ XRF

afin d'acquérir des spectres  $\mu$ XANES sur des zones de taille inférieure au  $\mu\text{m}$ . Les analyses XANES ont été pratiquées sur les pastilles de micro-algues congelées avec un faisceau défocalisé de taille  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . Dans les deux cas, le signal a été acquis en mode fluorescence. Les spectres représentant une somme de 30 scans ont été enregistrés dans la gamme d'énergie située entre 3,5 et 3,6 KeV.

### *12.3.3. Traitement et exploitation des données*

Les spectres XANES au seuil  $L_{III}$  du cadmium ont été normalisés conformément à la procédure décrite plus haut. La détermination des espèces chimiques du cadmium a été également réalisée par combinaisons linéaires. Les spectres XANES au seuil  $L_{III}$  du cadmium des complexes Cd-phosphate, Cd-malate, Cd-acétate, Cd-cystéine, Cd-glutathion et Cd-phytochélatine 2 ont été collectés précédemment (Isaure et al., 2006, 2015). Le spectre du standard Cd-phytate a été enregistré à partir de la solution décrite en partie II.7.1.3.



# CHAPITRE III :

## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>1. DISPONIBILITE DU CADMIUM ET DES ELEMENTS TRACES DANS LES MILIEUX DE CULTURE</b>	<b>79</b>
<b>2. TOXICITE DU CADMIUM</b>	<b>81</b>
<b>2.1. Choix des concentrations d'exposition au cadmium.</b>	<b>81</b>
<b>2.2. Impact du cadmium sur la vitalité de <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>82</b>
2.2.1. <i>Croissance et teneur en chlorophylle</i>	82
2.2.2. <i>Production d'amidon</i>	84
<b>2.3. Accumulation du cadmium</b>	<b>85</b>
<b>3. LOCALISATION DU CADMIUM AU NIVEAU SUBCELLULAIRE</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Localisation du cadmium dans l'ultrastructure cellulaire par TEM/X-EDS</b>	<b>91</b>
3.1.1. <i>Souche wt en milieu TAP classique</i>	91
3.1.2. <i>Souche pcs1 en milieu TAP classique</i>	94
3.1.3. <i>Souche cw15 en milieu TAP classique</i>	96
3.1.4. <i>Souche wt en milieu TAP modifié</i>	98
<b>3.2. Localisation du cadmium par SR-<math>\mu</math>XRF</b>	<b>100</b>
3.2.1. <i>Localisation du cadmium dans la souche wt</i>	101
3.2.2. <i>Localisation du cadmium dans les souches mutantes</i>	103
<b>3.3. Localisation du cadmium par fractionnement subcellulaire</b>	<b>105</b>
<b>4. SPECIATION CHIMIQUE DU CADMIUM IN SITU CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> PAR SR-XAS</b>	<b>111</b>
4.1. <b>Spéciation du Cd à l'échelle subcellulaire par <math>\mu</math>XANES au seuil L<sub>III</sub> du Cd</b>	<b>111</b>
4.2. <b>Spéciation globale du cadmium par SR-XAS au seuil L<sub>III</sub> et K du cadmium</b>	<b>114</b>
<b>5. IMPACT DU CADMIUM SUR L'ASSIMILATION DU CARBONE PAR IMAGERIE NANOSIMS</b>	<b>121</b>
<b>6. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES METAUX ESSENTIELS</b>	<b>131</b>
<b>6.1. Impact du cadmium sur l'assimilation des métaux essentiels</b>	<b>131</b>
6.1.1. <i>En milieu TAP classique</i>	132
6.1.2. <i>En milieu TAP modifié</i>	133
<b>6.2. Localisation subcellulaires des métaux essentiels par imagerie nanoSIMS</b>	<b>135</b>



## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. DISPONIBILITE DU CADMIUM ET DES ELEMENTS TRACE DANS LES MILIEUX DE CULTURE

La spéciation chimique des éléments traces et du cadmium dans le milieu TAP classique et sa version modifiée a été simulée par le logiciel Visual Minteq. En effet, il est important de connaître les concentrations en ions libres des métaux car ce sont les espèces chimiques sous lesquelles ils sont le plus susceptibles d'être assimilés (Campbell, 1995; Kola and Wilkinson, 2005). La figure 28 montre la concentration en ions libres du cadmium et des éléments traces en fonction de la quantité en cadmium total ajoutée.

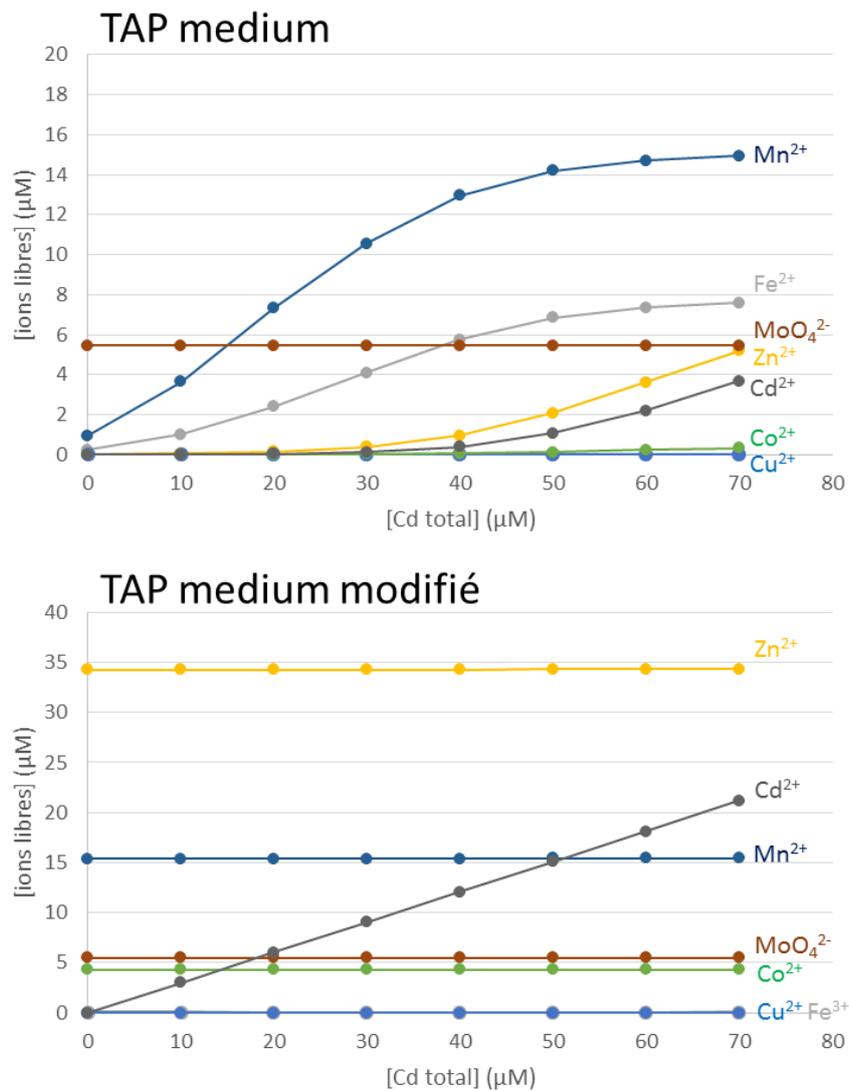


Figure 28 : Concentrations en ions libres des éléments trace et du cadmium suivant l'ajout en cadmium total dans les milieux TAP classique et modifié, calculée avec le logiciel Visual Minteq.

### Chapitre III : résultats et discussion

Dans le milieu TAP classique non contaminé par le cadmium, le principal ligand des métaux est l'EDTA. Plus de 99 % du  $\text{Cu}^{2+}$ , du  $\text{Zn}^{2+}$  et du  $\text{Co}^{2+}$  est chélaté par l'EDTA en raison de la constante de stabilité très élevée de ces complexes (voir table 11). Lors de l'introduction du cadmium, une faible partie du cadmium total reste sous forme ionique libre, de 59 nM pour 10  $\mu\text{M}$  de Cd total à 3,671  $\mu\text{M}$  pour 70  $\mu\text{M}$  de Cd total, le Cd restant étant chélaté par l'EDTA. La constante de stabilité du complexe  $\text{CdEDTA}^{2-}$  est la troisième plus élevée (18,1) parmi les complexes présents dans le milieu. Ainsi, l'ajout de cadmium modifie la spéciation chimique des autres métaux en entrant en compétition avec eux dans la formation de complexe avec l'EDTA. Les concentrations en  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  libres augmentent avec l'ajout de quantités croissantes de cadmium. La concentration en  $\text{Cu}^{2+}$  libre ne varie pas avec l'ajout de cadmium puisque son complexe avec l'EDTA est le plus stable ( $\log K_1 = 20,90$ ).

Table 11 : Constantes de stabilité des complexes entre les métaux du milieu TAP classique et l'EDTA ainsi qu'entre les métaux du milieu TAP modifié et l'EDDHA (lindsay's database).

Complexes	$\text{CuEDTA}^{2-}$	$\text{CdEDTA}^{2-}$	$\text{CoEDTA}^{2-}$	$\text{ZnEDTA}^{2-}$	$\text{FeEDTA}^{2-}$	$\text{MnEDTA}^{2-}$
Log $K_1$	20,9	18,1	18,6	18	16,01	15,6
Complexes	$\text{CuEDDHA}^{2-}$	$\text{CdEDDHA}^{2-}$	$\text{CoEDDHA}^{2-}$	$\text{ZnEDDHA}^{2-}$	$\text{FeEDDHA}^{2-}$	$\text{MnEDDHA}^{2-}$
Log $K_1$	24	14,84	21,6	18,51	36,47	19,5

Dans le milieu TAP modifié, le fer (II) et l'EDTA ont été remplacés par le complexe fer (III) EDDHA. La fraction de métaux libres y est bien plus importante que dans le milieu TAP classique, excepté pour le  $\text{Fe}^{3+}$  qui a une grande affinité pour l'EDDHA ( $\log K_1 = 36,47$ ). La concentration en  $\text{Cd}^{2+}$  libre représente 30 % de la concentration en Cd total, soit 3,010  $\mu\text{M}$  pour 10  $\mu\text{M}$  de Cd total et 21,147  $\mu\text{M}$  pour 70  $\mu\text{M}$  de Cd total. En l'absence de compétition entre les cations métalliques pour un même ligand, les concentrations en ions métalliques libres restent stables malgré l'ajout de cadmium.

La modification du milieu TAP semble entraîner une disponibilité des ions  $\text{Cd}^{2+}$  libres plus importante dans la version modifiée que dans la version classique. De plus, les concentrations des autres cations métalliques libres ne varient pas en fonction de la quantité de cadmium ajoutée, ce qui fait du milieu TAP modifié un milieu adapté dans l'étude de la toxicité du cadmium.

Il faut toutefois souligner que lors des expérimentations, le cadmium est ajouté au milieu de culture 24 heures après l'inoculation des micro-algues. La simulation de spéciation ne tient ainsi pas compte, ni de l'adsorption des métaux sur les parois cellulaires, ni de la complexation des métaux par les exsudats excrétés par les cellules.

## 2. TOXICITE DU CADMIUM

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, il a été montré que le cadmium provoquait une augmentation du stress oxydatif (Stoiber et al., 2013), une inhibition de la photo activation du photosystème II (Faller et al., 2005) et une augmentation de la production d'amidon (Nishikawa et al., 2006). Dans un premier temps, l'étude de l'effet du cadmium sur la croissance de la souche wt de *C. reinhardtii* a été évaluée afin de sélectionner les concentrations d'exposition au cadmium qui seront utilisées au cours de ce travail. Par la suite, la croissance cellulaire, la production de chlorophylle et d'amidon ainsi que l'accumulation du cadmium ont été suivies chez les trois souches de *C. reinhardtii* dans les conditions d'exposition sélectionnées afin de comparer la tolérance au Cd des trois phénotypes.

### 2.1. Choix des concentrations d'exposition au cadmium.

La souche wt a été cultivée en milieu TAP classique et modifié contaminés par 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium. Les mesures quotidiennes de la densité optique à 730 nm ont permis de tracer les courbes de croissances présentées en annexe 1 et de calculer les taux de croissance dans chaque condition. *C. reinhardtii* a montré une chute de croissance uniquement en milieu TAP modifié, ce qui a permis de calculer les concentrations efficaces qui inhibe X % de la croissance ( $\text{CE}_x$ ) en fonction de la courbe concentration-réponse présentée en figure 29. En milieu TAP modifié, la  $\text{CE}_5$  du cadmium sur la souche wt de *C. reinhardtii* est de 15  $\mu\text{M}$  [7-24  $\mu\text{M}$  avec un intervalle de confiance de 95% ( $\text{IC}_{95\%}$ )] et la  $\text{CE}_{50}$  est de 73  $\mu\text{M}$  [63-90  $\mu\text{M}$  avec  $\text{IC}_{95\%}$ ].

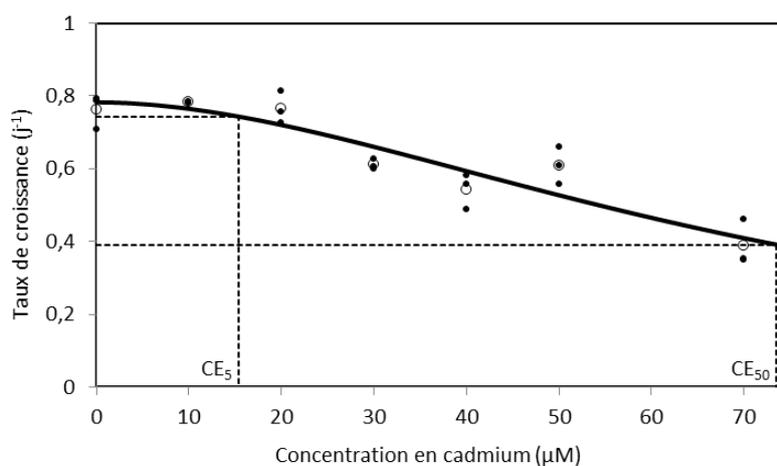


Figure 29 : Courbes concentration-réponse calculée en fonction des taux de croissance de la souche wt de *C. reinhardtii* exposées à 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié. Les points noirs représentent les réplicats et les points blancs représentent les taux de croissances moyens. Les concentrations efficaces pour l'inhibition de 5 % et 50 % de la croissance sont montrées par les droites en pointillées.

Pour la suite de ce travail, la concentration d'exposition de 10  $\mu\text{M}$  de Cd a été choisie car elle est inférieure à la  $\text{CE}_5$  en milieu TAP modifié. Dans cette condition, l'impact du cadmium est très faible. La concentration d'exposition de 70  $\mu\text{M}$  de Cd a été sélectionnée car, en plus d'être très proche de la  $\text{EC}_{50}$  en milieu TAP modifié et elle correspond à la concentration en Cd total la plus élevée mesurée dans l'eau de sol suite à une pollution industrielle (Lee et al., 2004).

## 2.2. Impact du cadmium sur la vitalité de *C. reinhardtii*

### 2.2.1. Croissance et teneur en chlorophylle

Les souches wt, pcs1 et cw15 ont été cultivées en milieu TAP classique et modifié contaminés par 0, 10 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium. Le taux de croissance de la micro-algue a été calculé pendant la phase exponentielle de croissance et la teneur en chlorophylle a été mesurée après 48 heures d'exposition au cadmium. En conditions témoins, les trois souches ont des taux de croissance et des teneurs en chlorophylle différentes, comme le montre la table 12.

Table 12 : Taux de croissance et teneur en chlorophylle après 72 heures de culture en milieux TAP classique et modifié des souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii*.

Souche	wt		pcs1		cw15	
	TAP	mTAP	TAP	mTAP	TAP	mTAP
Milieu de culture						
Taux de croissance ( $\text{j}^{-1}$ )	$1,15 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,05$	$1,72 \pm 0,08$	$1,06 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,04$
Teneur en chlorophylle ( $\text{pg.cellule}^{-1}$ )	$0,80 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,01$

Globalement, les taux de croissance et les teneurs en chlorophylle des cellules sont plus faibles lorsqu'elles sont cultivées en milieu TAP modifié plutôt qu'en milieu TAP classique. Les souches wt et cw15 ont un taux de croissance et une teneur en chlorophylle similaires quel que soit le milieu de culture utilisé. La souche pcs1 diffère des deux autres avec une croissance plus rapide mais une teneur en chlorophylle plus faible qui se maintient lors de sa culture en milieu TAP modifié ( $0,41 \pm 0,04 \text{ pg.cellule}^{-1}$  en milieu TAP classique et  $0,34 \pm 0,03 \text{ pg.cellule}^{-1}$  en milieu TAP modifié).

## Chapitre III : résultats et discussion

Afin de comparer les trois souches qui diffèrent de par leur taux de croissance et leur teneur en chlorophylle dans les conditions témoins, ces deux paramètres ont été exprimés en pourcentage par rapport aux conditions témoin, dans la figure 30.

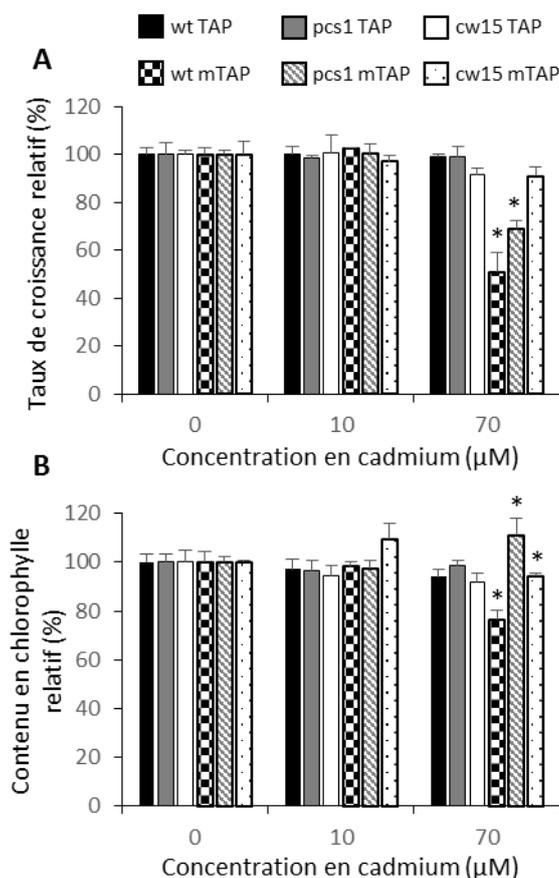


Figure 30 : Impact du cadmium sur *C. reinhardtii*. Taux de croissance et teneur en chlorophylle après 48 heures d'exposition, exprimés en pourcentage par rapport aux conditions témoin, des souches wt, pcs1 et cw15 exposées à 0, 10 et 70 µM de cadmium en milieu TAP classique et modifié. Les différences statistiquement significatives (p < 0,05) avec les conditions témoin sont marquées par un \* (n=3).

En milieu TAP classique, pour les 3 souches de micro-algues, la croissance et la production de chlorophylle ne sont pas différentes dans les conditions témoins, à 10 et à 70 µM de Cd. En milieu TAP modifié, l'impact du cadmium à 70 µM est particulièrement important sur la croissance et la teneur en chlorophylle de la souche wt ( $50.7 \pm 8.2$  % de la croissance témoin et  $76.4 \pm 3.9$  % de la production de chlorophylle témoin) (p < 0,05). Pour la souche pcs1, en dépit d'une baisse significative de croissance de  $30.9 \pm 3.44$  % (p < 0,05), la teneur en chlorophylle n'est pas modifiée et reste faible. Enfin, la souche cw15 semble la plus tolérante avec une croissance non affectée et une légère diminution de la production de chlorophylle ( $5.7 \pm 1.2$  %) (p < 0,05).

Dans les deux concentrations de cadmium testées, les trois souches de *C. reinhardtii* ne présentent pas de signe de toxicité en milieu TAP classique. Ceci pourrait être expliqué par la faible disponibilité du cadmium en milieu TAP classique par rapport au milieu TAP modifié, comme vu dans la partie précédente III.3.1. Chez la souche pcs1, la surexpression de la phytochélatine synthase (PCS) dans le chloroplaste semble protéger la chlorophylle du stress lié au cadmium. Étrangement, la souche cw15 est la plus tolérante au Cd des trois. Des études ont pourtant montré que la déficience en paroi cellulaire rendait *C. reinhardtii* plus sensible au stress métallique (Macfie and Welbourn, 2000; Macfie et al., 1994). Cependant, dans ces deux études, les microalgues sont cultivées autotrophiquement (pas d'acétate) ce qui suggérerait que la souche cw15 est plus tolérante au stress lié au cadmium quand elle est cultivée en conditions mixotrophes.

### 2.2.2. Production d'amidon

La production d'amidon a été mesurée après 48 heures d'exposition à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium (figure 31). La souche pcs1 est la souche qui accumule le plus l'amidon avec  $133.6 \pm 3.1 \text{ mg.g}^{-1}$  en condition témoin et la production d'amidon ne change pas suite à l'exposition à 70  $\mu\text{M}$  de Cd. La teneur en amidon chez la souche wt est plus faible en condition témoin mais augmente significativement en milieu TAP modifié exposé au Cd (de  $47.6 \pm 4.7 \text{ mg.g}^{-1}$  en condition témoin à  $87.8 \pm 3.2 \text{ mg.g}^{-1}$  quand soumise au Cd), suggérant que le stress lié au cadmium induit la production d'amidon.

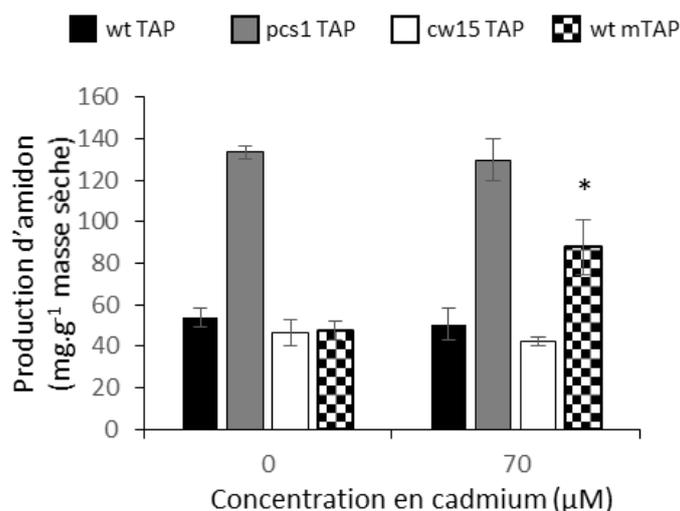


Figure 31 : Impact du cadmium sur *C. reinhardtii*. Teneur en amidon après 48 heures d'exposition des souches wt, pcs1 et cw15 exposées à 0 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique et modifié. Les différences statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) avec les conditions témoin sont marquées par un \* ( $n=3$ ).

L'accumulation de l'amidon pendant un stress lié au cadmium a déjà été rapportée. Chez *Chlamydomonas acidophila*, l'exposition à 60  $\mu\text{M}$  de cadmium induit l'augmentation de la taille des granules d'amidon contenues dans le chloroplaste des micro-algues, ce qui provoque une désorganisation du chloroplaste (Nishikawa et al., 2006). De plus, les souches produisant le plus d'amidon sont celles qui synthétisent le plus de phytochélatines (Nishikawa et al., 2006). Similairement, dans notre étude, les cellules algales accumulant l'amidon devraient produire des quantités importantes de phytochélatines. En effet, la souche wt cultivée en milieu TAP modifié contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd a montré des signes de toxicité (voir partie III.2.2.1) et devrait synthétiser des phytochélatines (Bräutigam et al., 2011). De même, la souche pcs1 surexprime la PCS ce qui devrait impliquer une production de phytochélatines importante, même en condition témoin.

Plus généralement, chez *C. reinhardtii*, l'accumulation de l'amidon est induite par une carence en azote, phosphore ou soufre (Ball et al., 1990; Cakmak et al., 2012). La production de phytochélatines a déjà été montrée comme responsable de l'augmentation du stress oxydatif en monopolisant son substrat, le glutathion (Bräutigam et al., 2011; Nishikawa et al., 2006; Siripornadulsil et al., 2002; Stoiber et al., 2013). Il est possible que la synthèse de phytochélatines perturbe le métabolisme global du soufre en monopolisant ses substrats thiolés, induisant l'accumulation de l'amidon.

### 2.3. Accumulation du cadmium

La teneur en cadmium intracellulaire a été mesurée chez les trois souches de *C. reinhardtii* cultivées en milieu TAP classique et modifié, contaminés par 10 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium pendant 48 heures (figure 32). Sans surprise, la teneur en cadmium augmente dans les trois souches avec l'augmentation des concentrations d'exposition en cadmium. Les teneurs en Cd sont également plus élevées dans les cellules cultivées en milieu mTAP, en accord avec l'importante disponibilité du Cd dans ce milieu, comparé au milieu classique (voir partie III.1). Pour toutes les conditions d'exposition, les teneurs en Cd de la souche wt sont similaires à celles de la souche pcs1. Dans les deux milieux de culture contaminés par 10  $\mu\text{M}$  de Cd, la souche cw15 accumule le plus de Cd ( $2.80 \pm 0.53 \mu\text{g.g}^{-1}$  en milieu TAP et  $343.7 \pm 35.2 \mu\text{g.g}^{-1}$  en milieu mTAP) ( $p < 0,05$ ). Ceci est également observé en milieu mTAP contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd mais de manière non significative statistiquement. Ceci suggère que la

### Chapitre III : résultats et discussion

déficiance en paroi cellulaire permet une entrée du cadmium plus importante. Cependant, en milieu TAP contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd, la teneur en Cd de la souche cw15 est plus basse que celles des souches wt et pcs1.

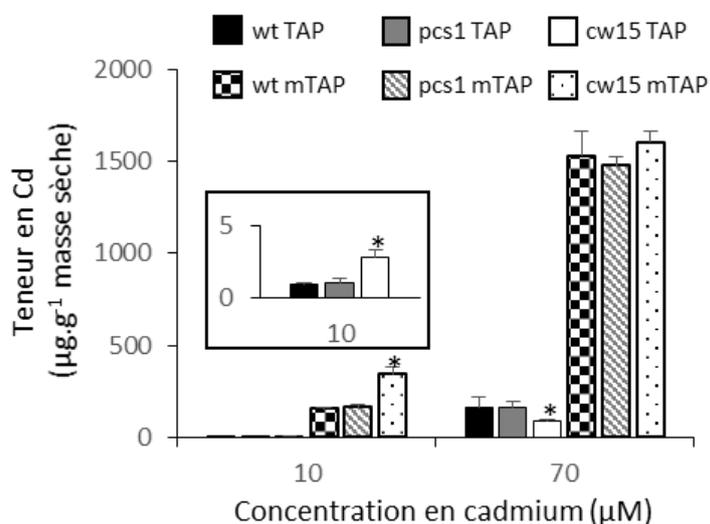


Figure 32 : Accumulation du cadmium par les souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii* exposées à 10 et 70  $\mu\text{M}$  de cadmium pendant 48 heures dans les milieux TAP classique et modifié. Les différences statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) avec la souche wt sont marquées par un \* ( $n=4$ ).

D'après les résultats du dosage du cadmium intracellulaire dans les trois souches, il apparaît que la souche cw15, déficiente en paroi cellulaire, n'accumule pas le Cd de la même manière que les deux autres souches possédant une paroi cellulaire. Dans le but d'étudier l'adsorption du cadmium sur les parois des cellules, les concentrations de cadmium intracellulaires et lié à la paroi ont été mesurées chez les souches wt et cw15 cultivées en milieu TAP contaminé par 10 et 70  $\mu\text{M}$  de Cd (Table 13), en dosant le cadmium dans les solutions de lavages et dans la biomasse sèche.

## Chapitre III : résultats et discussion

Table 13 : Impact de la paroi cellulaire sur l'accumulation du cadmium. Le cadmium cellulaire est considéré comme étant la somme du cadmium intracellulaire et adsorbé à la paroi cellulaire. Les pourcentages du cadmium intracellulaire et adsorbé par rapport au cadmium cellulaire sont donnés entre parenthèses

Souche	Concentration d'exposition en cadmium	Cadmium intracellulaire ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Cadmium adsorbé à la paroi cellulaire ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Total du cadmium cellulaire ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	% de cadmium cellulaire par rapport au cadmium total ajouté à la culture
Souche wt	10 $\mu\text{M}$	0,92 $\pm$ 0,26 (13)	5,98 $\pm$ 1,42 (87)	6,90 $\pm$ 1,46	0,15
	70 $\mu\text{M}$	211,69 $\pm$ 39,69 (14)	1338,46 $\pm$ 59,88 (86)	1550,15 $\pm$ 79,48	6,55
Souche cw15	10 $\mu\text{M}$	2,80 $\pm$ 0,53 (63)	1,65 $\pm$ 1,05 (37)	4,45 $\pm$ 1,55	0,11
	70 $\mu\text{M}$	90,98 $\pm$ 5,56 (30)	210,48 $\pm$ 50,00 (70)	301,46 $\pm$ 40,04	1,08

Chez la souche cw15, bien que montrant une déficience en paroi cellulaire, de faibles quantités de cadmium ont été mesurées dans les solutions de lavage (1,65  $\pm$  1,05  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de Cd pour une exposition à 10  $\mu\text{M}$  de Cd et 210,48  $\pm$  50,00  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pour 70  $\mu\text{M}$  de Cd), montrant une adsorption du cadmium sur la cellule. Il est à noter que le cw15 ne prélève pas tout le Cd<sup>2+</sup> disponible dans le milieu TAP classique. La souche wt, exposée à 10 et 70  $\mu\text{M}$  de Cd, montre 6 fois plus de cadmium adsorbé à la paroi cellulaire que de cadmium ayant pénétré la cellule, montrant le rôle de barrière de protection de la paroi cellulaire. De plus, contrairement à la souche cw15, le total de la quantité de cadmium cellulaire (Cd cellulaire = Cd adsorbé + Cd intracellulaire) est très proche de la quantité d'ions Cd<sup>2+</sup> libres dans le milieu. En effet, en milieu TAP contaminé par 10  $\mu\text{M}$  et 70  $\mu\text{M}$ , respectivement 0,06 % et 5,3 % du Cd total de la culture est sous forme ionique libre. Ces parts de cadmium libre sont relativement proches des parts en Cd cellulaire, à savoir 0,15 % et 6,55 % du Cd total des cultures exposée à 10 et 70  $\mu\text{M}$  de Cd, suggérant que tout le Cd<sup>2+</sup> libre présent dans la culture entre en contact avec les cellules.

L'hypothèse selon laquelle la paroi cellulaire de *C. reinhardtii* améliore sa tolérance au cadmium à faible concentration en cadmium (Macfie and Welbourn, 2000) n'a pas été vérifiée dans ce travail car la toxicité n'a pas été observée dans le mutant déficient en paroi cellulaire. Néanmoins, la souche cw15 cultivée en milieu TAP et mTAP

### Chapitre III : résultats et discussion

contaminés par 10  $\mu\text{M}$  de Cd montre une accumulation du cadmium importante, attestant que la paroi cellulaire restreint l'entrée du Cd. A très haute concentration d'exposition au Cd (mTAP à 70  $\mu\text{M}$ ), aucune différence dans l'accumulation du Cd n'est notée entre les trois souches, indiquant que les sites d'adsorption du Cd sur la paroi cellulaire pourraient être saturés.

Pour la souche wt, la totalité du  $\text{Cd}^{2+}$  libre présent dans le milieu de culture semble avoir été retenue par les cellules, soit en s'adsorbant sur la paroi cellulaire, soit en pénétrant dans la cellule, ce qui n'est pas le cas pour la souche cw15. Cette différence pourrait être expliquée par l'adsorption du  $\text{Cd}^{2+}$  sur du matériel excrété par les cellules. En effet, selon (Macfie et Welbourn, 2000) le cadmium serait adsorbé dans le milieu de culture sur du matériel de paroi cellulaire excrété par la souche cw15. De plus, la souche cw15 est connue pour excréter des granules de polyphosphate (Komine et al., 1996, 2000). Le cadmium pourrait être séquestré par ces granules de polyphosphate, à l'intérieur de la cellule, puis excrété dans le milieu de culture.

La toxicité du cadmium a été étudiée chez les souches wt, pcs1 et cw15 en déterminant l'impact du cadmium sur la croissance, la production de chlorophylle et d'amidon ainsi que l'accumulation du cadmium. Les trois souches ne répondent pas au stress lié au cadmium de la même manière :

- La souche wt est la souche référence de l'étude. Lorsqu'elle est exposée à 70  $\mu\text{M}$  de Cd dans le milieu TAP modifié (21,147  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  libre), sa croissance chute et sa teneur en chlorophylle diminue, montrant une atteinte de la photosynthèse. Dans le même temps, sa production d'amidon augmente, ce qui pourrait être attribué à la perturbation du métabolisme global du soufre par la production de grandes quantités de phytochélatines (Bräutigam et al., 2011). Son accumulation du cadmium est identique à celle de la souche pcs1. En milieu TAP classique, la totalité du  $\text{Cd}^{2+}$  libre dans le milieu est séquestré par la biomasse. Six fois plus de cadmium reste adsorbé sur la paroi cellulaire que ne pénètre la cellule.
- La souche pcs1 surexprime la phytochélatine synthase (PCS) dans son chloroplaste. Exposée à une forte concentration en cadmium (70  $\mu\text{M}$  de Cd dans le milieu mTAP), la croissance de la souche pcs1 diminue moins que celle de la souche wt et sa production de chlorophylle reste stable. La surexpression de la PCS dans le chloroplaste semble protéger la photosynthèse de la micro-algue. Néanmoins, la production d'amidon de cette souche est importante qu'elle soit exposée ou non au cadmium. La surexpression de la PCS devrait entraîner la production de grande quantité de phytochélatines, perturbant le métabolisme global du soufre et induisant la production d'amidon. Son accumulation du cadmium est identique à la souche wt.
- La souche cw15 est déficiente en paroi cellulaire. Contre toute attente, elle est la souche la plus tolérante au cadmium et ne montre pas de signe de toxicité. Contrairement à la souche wt qui possède une paroi cellulaire normale, elle ne séquestre pas tout le  $\text{Cd}^{2+}$  libre dans le milieu TAP avec des quantités de cadmium adsorbées à la paroi cellulaire faibles.



### **3. LOCALISATION DU CADMIUM AU NIVEAU SUBCELLULAIRE**

La détermination de la localisation subcellulaire du cadmium apporte des informations supplémentaires pouvant expliquer la toxicité du cadmium ou les mécanismes de tolérance mis en place par la cellule. D'après les données sur l'accumulation du cadmium, il a été choisi d'étudier les trois souches exposées à 70  $\mu\text{M}$  de Cd en milieu TAP classique et la souche wt exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié afin de comparer des conditions avec et sans signes de toxicité tout en ayant une teneur en cadmium intracellulaire supérieure compatible avec la spectroscopie d'absorption X.

Le cadmium a été localisé à l'intérieur des cellules de *C. reinhardtii* par plusieurs techniques complémentaires. La microscopie électronique à transmission couplée à la micro-analyse X permet de montrer les détails de l'ultrastructure cellulaire et de détecter le Cd, le P, le Ca, le S et le K par des analyses ponctuelles élémentaires dans des organelles choisies. De plus, les éléments cités plus haut ont été également localisés sur des cartographies élémentaires par micro fluorescence X sur rayonnement synchrotron ( $\mu\text{XRF}$ ). Enfin, la répartition du cadmium observée en imagerie a été comparée à celle obtenue par fractionnement subcellulaire.

#### **3.1. Localisation du cadmium dans l'ultrastructure cellulaire par TEM/X-EDS**

Les souches wt, pcs1 et cw15 exposées ou non à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium, ont été observées par microscopie électronique à transmission. L'impact du cadmium sur l'ultrastructure de la micro-algue est dans un premier temps discuté, puis le cadmium est recherché dans les organelles suivantes : noyau, thylakoïde, granule et pyrénéoïde.

##### *3.1.1. Souche wt en milieu TAP classique*

Les images TEM et les spectres des microanalyses X pratiqués sur la souche wt de *C. reinhardtii* cultivée pendant 48 heures en milieu TAP contaminé ou non par 70  $\mu\text{M}$  de cadmium sont présentées dans la figure 33. D'autres images TEM où l'ultrastructure de *C. reinhardtii* est particulièrement bien conservée sont présentées en annexe 2.

Il est important de noter que l'ultrastructure de la micro-algue n'a pas été altérée par l'exposition au cadmium. Des dépôts particulièrement dense aux électrons sont visibles et pourraient correspondre aux granules de polyphosphate.

### Chapitre III : résultats et discussion

Les analyses X-EDS ont été effectuées sur les thylakoïdes, le noyau, le pyrénéoïde et les granules mais le cadmium n'a été détecté significativement que sur les 2 dernières organelles. Le pyrénéoïde contient S, K, Ca et Cd et les granules sont riches en S, P, K, Ca et Cd. Le cadmium est principalement situé dans les granules où il est colocalisé avec du phosphore et du calcium, suggérant que le cadmium serait séquestré dans les granules de polyphosphate. Le rapport Cd/P est de 0,25 dans les granules et il servira par la suite à comparer la quantité de cadmium localisé dans les granules chez les trois souches. Ce mécanisme de séquestration a déjà été observé chez *Chlamydomonas acidophila*. Dans cette espèce, le cadmium a été localisé dans des dépôts denses aux électrons situés dans des vacuoles. L'exposition au Cd induisait la disparition des polyphosphates vacuolaires et l'augmentation de la concentration des ortho-phosphates vacuolaires (Nishikawa et al., 2003). *C. reinhardtii* est connue pour avoir de petites vacuoles acides, remplies de granules de polyphosphate et de calcium, avec la même composition élémentaire que les granules de notre étude. Ces organelles pourraient servir de moyen de transport pour amener des protéines de paroi-cellulaire jusqu'à la paroi cellulaire (Komine et al., 1996, 2000). Des vacuoles acides similaires ont été décrites (Hong-Hermesdorf et al., 2014; Ruiz et al., 2001) et comparées aux acidocalcisomes, à cause de leur composition élémentaire (riches en P et Ca) et de la présence de pompe à proton pyrophosphatase ( $H^+$ -PPase) et de pompe à proton ATPase vacuolaire (V- $H^+$ -ATPase) dans leur membrane. En considérant la colocalisation du Cd, P et Ca dans notre étude, l'hypothèse selon laquelle le Cd serait séquestré par les acidocalcisomes peut être faite. Le cadmium a été également localisé dans le pyrénéoïde ou le rapport Cd/K servira à comparer la quantité de cadmium localisé dans le pyrénéoïde chez les trois souches. Essentiellement composé de ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), le pyrénéoïde entouré par une carapace d'amidon est le siège de l'assimilation du  $CO_2$ . Le cadmium est connu pour réduire l'activité de la Rubisco, empêchant l'assimilation du  $CO_2$  par les plantes supérieures comme *Lactuca sativa* (Dias et al., 2012) et *Nicotiana rustica* (Afef et al., 2011). Cependant, en milieu TAP classique, *C. reinhardtii* ne montre aucun signe de toxicité.

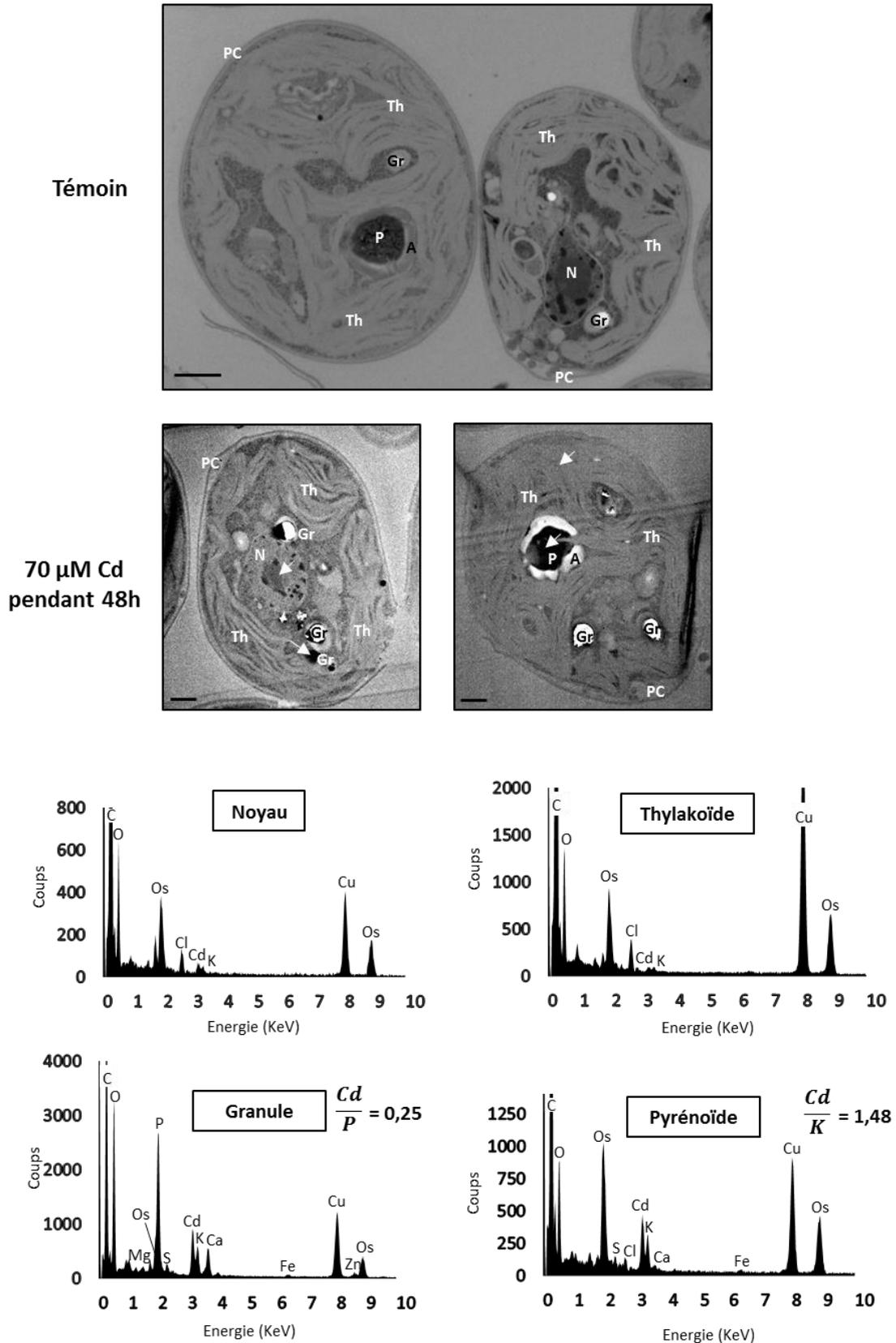


Figure 33 : Localisation du cadmium chez la souche wt de *C. reinhardtii* exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique. Les images de l'ultrastructure ont été obtenues par TEM, les flèches blanches montrent les zones analysées par X-EDS, la barre d'échelle représente 1  $\mu\text{m}$ . Légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrénoïde ; Th, thylakoïde. Sur les spectres X-EDS, le signal du cuivre et de l'osmium est dû au cuivre de la grille et l'osmium de la solution de contraste. Les rapports entre les intensités du signal du Cd/P et Cd/ K ont été calculés, respectivement sur les granules et le pyrénoloïde.

### 3.1.2. Souche *pcs1* en milieu TAP classique

Les images TEM et les spectres des microanalyses X pratiquées sur la souche *pcs1* de *C. reinhardtii* cultivée pendant 48 heures en milieu TAP contaminé ou non par 70  $\mu\text{M}$  de cadmium sont présentées dans la figure 34. L'ultrastructure de la souche *pcs1* est similaire à celle de la souche wt, excepté pour le pyrénioïde qui est de taille plus importante et entouré d'une épaisse couche d'amidon. De plus, des plaques d'amidon sont visibles dans le chloroplaste, suggérant une production importante d'amidon.

Similairement à la souche wt, le cadmium ne semble pas altérer l'ultrastructure de l'algue. Pourtant, les analyses X-EDS ont permis de détecter du cadmium dans le noyau, les granules, le pyrénioïde comme pour le wt mais également sur les thylakoïdes et légèrement sur l'amidon. Le rapport Cd/P des granules ne diffère pas de celui des granules du wt, ce qui montre que la séquestration du cadmium par les granules occupe la même place dans la stratégie de tolérance mise en place par ces deux souches.

D'après les résultats du dosage de l'amidon synthétisé par les différentes souches, il est apparu que la souche *pcs1* produisait le plus d'amidon, qu'elle soit exposée au cadmium ou non. L'observation de grandes plaques d'amidon dans le chloroplaste et autour du pyrénioïde confirme bien que la souche *pcs1* accumule l'amidon dans son chloroplaste (voir partie III.2.2.2). Si l'accumulation d'amidon est considérée comme un signe de toxicité lié au cadmium (Nishikawa et al., 2006), alors la souche *pcs1* présente un signe de stress sans pour autant être exposée au cadmium.

Les mesures des teneurs en chlorophylle ont montrées que la quantité de chlorophylle produite par la souche *pcs1* était plus faible que celle produite par la souche wt mais restait stable, malgré l'exposition au cadmium (voir partie III.2.2.1). Pourtant, du cadmium a été détecté dans les thylakoïdes qui sont les organelles contenant les photosystèmes II, cibles de la toxicité du cadmium (Faller et al., 2005).

Enfin, comme chez le wt, le cadmium est localisé dans le pyrénioïde et dans les granules de polyphosphates qui pourraient être contenues dans les acidocalcisomes (Hong-Hermesdorf et al., 2014; Ruiz et al., 2001).

### Chapitre III : résultats et discussion

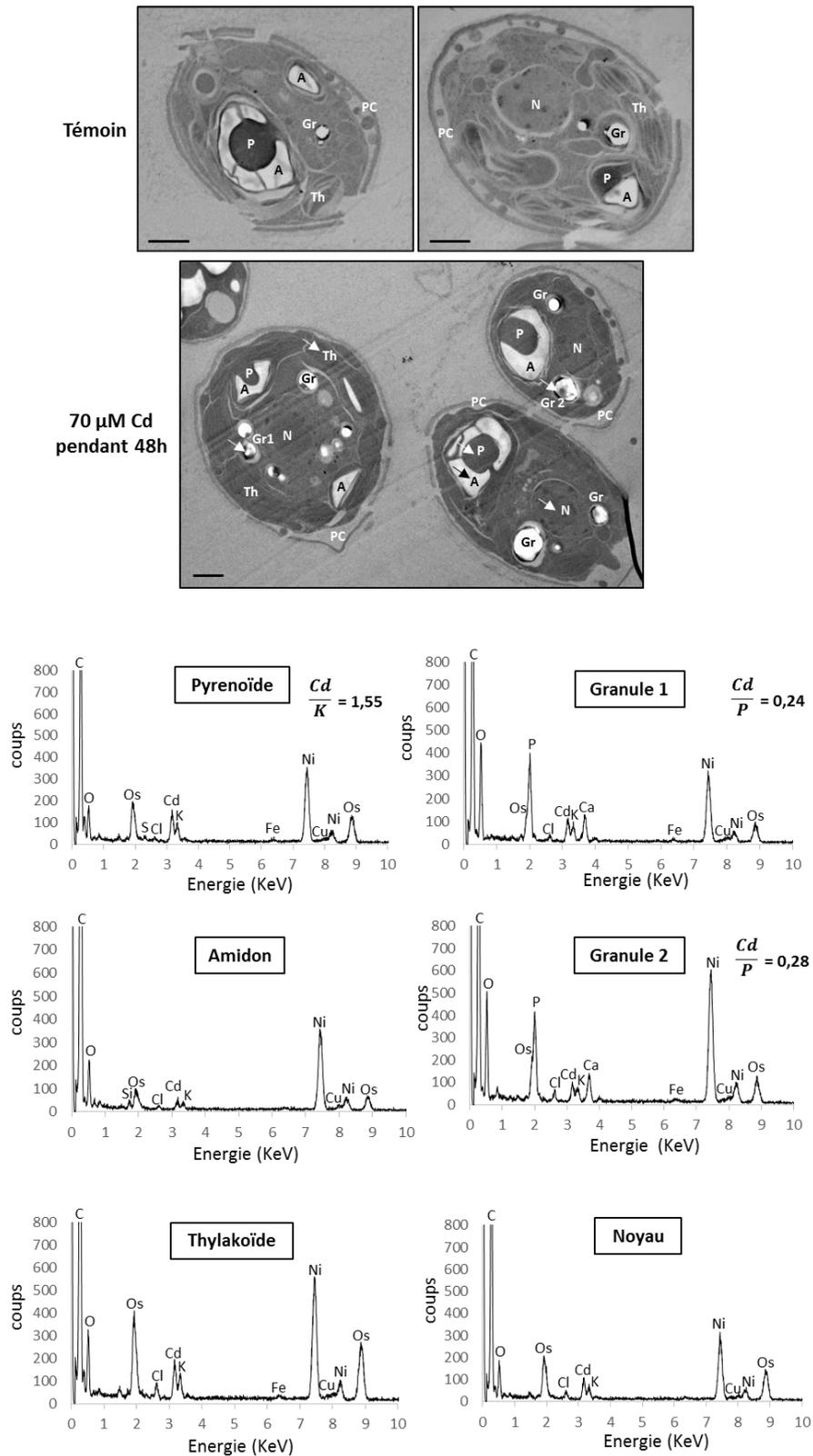


Figure 34 : Localisation du cadmium chez la souche pcs1 de *C. reinhardtii* exposée à 70 µM de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique. Les images de l'ultrastructure ont été obtenues par TEM, les flèches montrent les zones analysées par X-EDS, la barre d'échelle représente 1 µm. Légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrenoïde ; Th, thylakoïde. Sur les spectres X-EDS, le signal du nickel et de l'osmium est dû au nickel de la grille et l'osmium de la solution de contraste. Les rapports entre les intensités du signal du Cd/P et Cd/ K ont été calculés, respectivement sur les granules et le pyrénoïde. Les rapports entre les intensités du signal du Cd/P et Cd/ K ont été calculés, respectivement sur les granules et le pyrénoïde

### 3.1.3. Souche cw15 en milieu TAP classique

Les images TEM et les spectres des microanalyses X pratiquées sur la souche cw15 de *C. reinhardtii* cultivée pendant 48 heures en milieu TAP contaminé ou non par 70  $\mu\text{M}$  de cadmium sont présentées dans la figure 35. L'ultrastructure de cw15 reste similaire à celle du wt si ce n'est une paroi cellulaire plus fine. La cellule cultivée en milieu TAP contaminé par 70  $\mu\text{M}$  présente deux pyrénoides. Au vue de sa grande taille, cette cellule est en phase de mitose. En effet, le choix de ne pas avoir cultivé *C. reinhardtii* de manière synchrone avec un cycle jour/nuit a maximisé la croissance mais rendu la division cellulaire aléatoire dans le temps. A l'instar du wt, l'exposition au cadmium n'a pas altéré son ultrastructure. De plus, le cadmium a été localisé dans les thylakoïdes, le noyau, le pyrénouïde et les granules. Néanmoins, au niveau des granules, il est intéressant de noter que le rapport Cd/P est plus faible que dans celles du wt. A l'inverse le rapport Cd/K du pyrénouïde est plus élevé chez le cw15.

D'après les résultats des analyses TEM/X-EDS, le Cd est localisé de la même façon chez la souche wt et cw15. Chez cw15, le fait que les granules séquestrent moins de Cd peut être expliqué par l'accumulation du Cd plus faible de cette souche par rapport aux deux autres. En revanche, contrairement à l'étude de (Komine et al., 1996), aucune excrétion de granule n'a été constatée parmi les coupes de micro-algues observées.

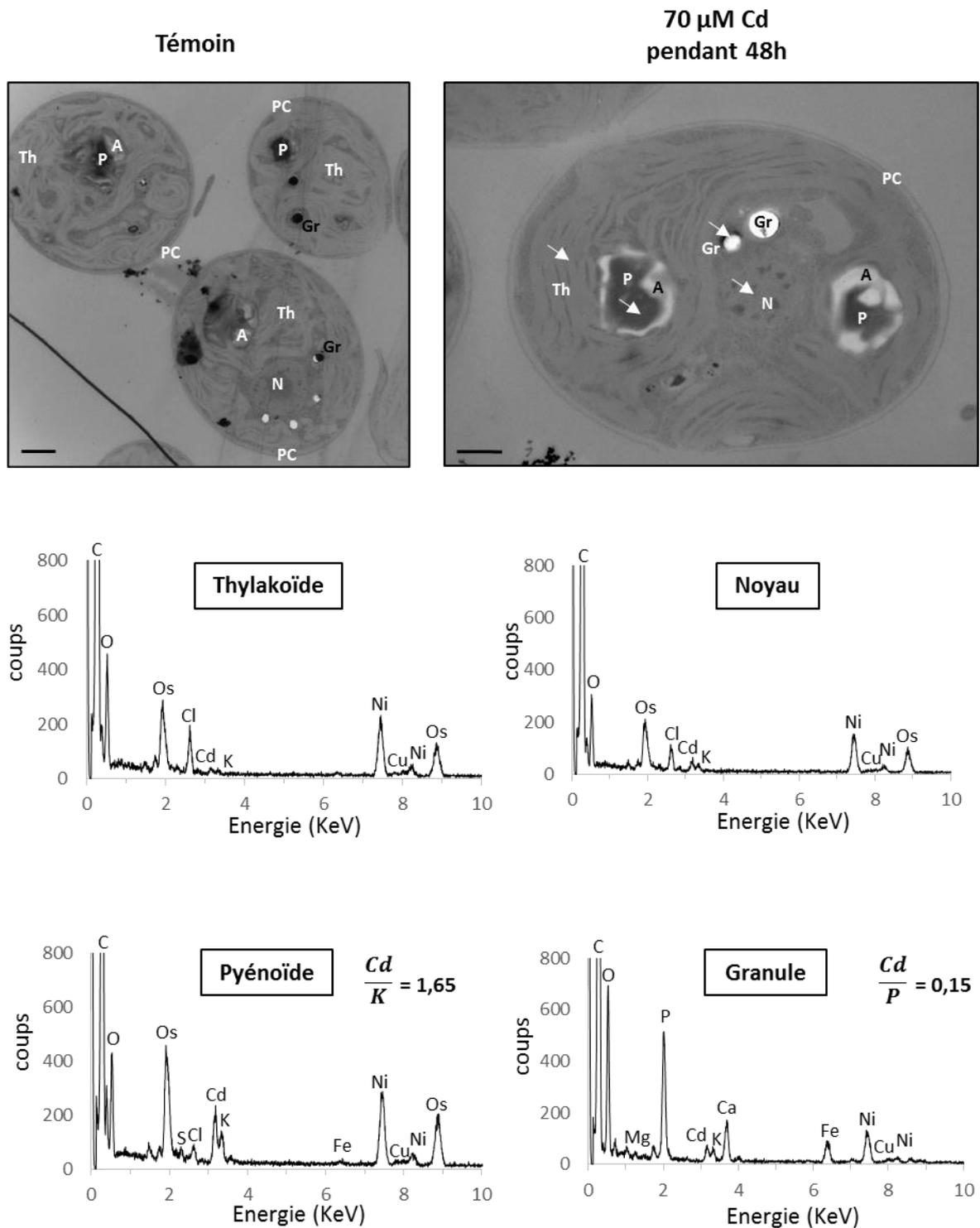


Figure 35 : Localisation du cadmium chez la souche cw15 de *C. reinhardtii* exposée à 70 μM de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique. Les images de l'ultrastructure ont été obtenues par TEM, les flèches montrent les zones analysées par X-EDS, la barre d'échelle représente 1 μm. Légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrénoïde ; Th, thylakoïde. Sur les spectres X-EDS, le signal du nickel et de l'osmium est dû au nickel de la grille et l'osmium de la solution de contraste. Les rapports entre les intensités du signal du Cd/P et Cd/ K ont été calculés, respectivement sur les granules et le pyrénolde.

#### 3.1.4. Souche wt en milieu TAP modifié

Les images TEM et les spectres des microanalyses X effectuées sur la souche wt de *C. reinhardtii* cultivée pendant 48 heures en milieu TAP modifié contaminé ou non par 70  $\mu\text{M}$  de cadmium sont présentées dans la figure 36. Les cellules de la souche wt présentent des différences au niveau de l'ultrastructure lorsqu'elles sont cultivées dans le milieu TAP classique ou dans sa version modifiée. Tout d'abord, en condition témoin dans le milieu modifié, le wt montre de grandes vacuoles d'1  $\mu\text{m}$  de diamètre contenant des dépôts dense aux électrons, ce qui n'est pas le cas en milieu TAP classique où les vacuoles sont plus petites (0,25-0,50  $\mu\text{m}$ ) et remplies entièrement par une granule. Ensuite, exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium, la structure du chloroplaste est désorganisée avec un pyrénnoïde sans carapace d'amidon qui perd sa forme sphérique et des plaques d'amidon disséminées dans le chloroplaste. Concernant la localisation du cadmium, elle reste identique à celle des cellules cultivées en milieu classique. Cependant, les dépôts denses aux électrons ne semblent pas séquestrer autant de Cd que les granules observées en milieu classique alors que le pyrénnoïde pourrait contenir plus de cadmium.

La déstabilisation du chloroplaste peut expliquer les signes de toxicité constatés précédemment, c'est-à-dire la diminution de la croissance et de la teneur en chlorophylle. En effet, la perturbation de la structure du pyrénnoïde empêcherait l'assimilation du  $\text{CO}_2$  ce qui ralentirait la croissance des cellules. De plus, étant donné les effets du cadmium sur le chloroplaste, la culture en milieu mixotrophe de *C. reinhardtii* permettrait de diminuer l'impact toxique du Cd sur les cultures en fournissant une source de carbone organique facultative. Ceci pourrait expliquer, en partie, que les  $\text{CE}_{30}$ - $\text{CE}_{50}$  mesurée en milieu autotrophe se situe au niveau du nM (Lavoie et al., 2009a; Macfie et al., 1994; Stoiber et al., 2010, 2012) alors qu'en milieu hétérotrophe/mixotrophe, elle serait plutôt au niveau du  $\mu\text{M}$  (Gillet et al., 2006; Jamers et al., 2013b).

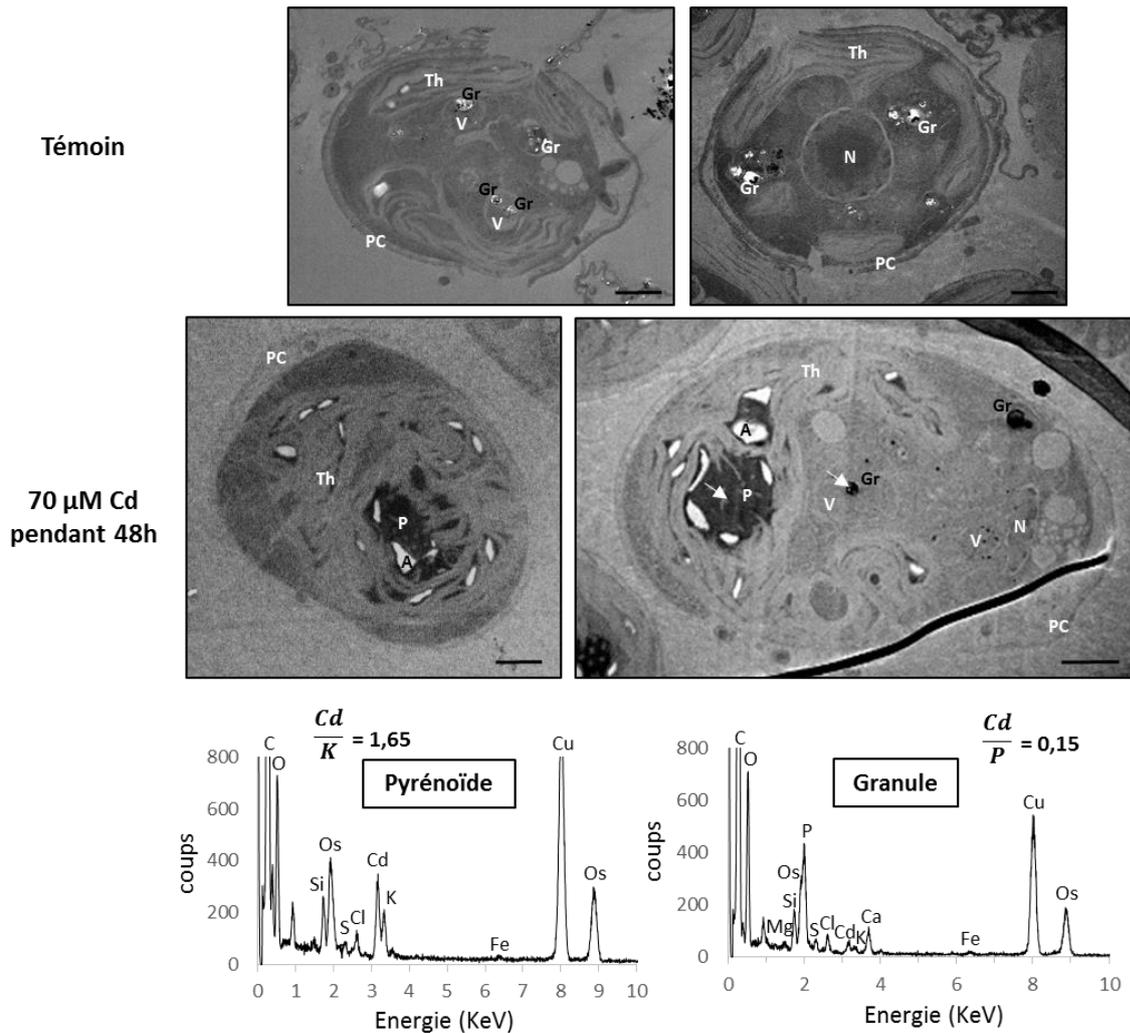


Figure 36 : Localisation du cadmium chez la souche wt de *C. reinhardtii* exposée à 70 µM de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP modifié. Les images de l’ultrastructure ont été obtenues par TEM, les flèches montrent les zones analysées par X-EDS, la barre d’échelle représente 1 µm. Légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrénoïde ; Th, thylakoïde ; V, vacuole. Sur les spectres X-EDS, le signal du cuivre et de l’osmium est dû au cuivre de la grille et l’osmium de la solution de contraste.

Il est également à noter que l’exposition à 70 µM de cadmium en milieu modifié a entraîné le stockage du carbone sous forme de plaques d’amidon réparties dans tout le chloroplaste. Cela explique l’augmentation de la teneur en amidon évoquée en partie III.2.2.2. Concernant les vacuoles contenant des dépôts denses aux électrons riche en Cd, P et Ca, le rapport Cd/ P est faible par rapport au wt et au pcs1. Les vacuoles pourraient être comparées à celles évoquées dans les études de (Nishikawa et al., 2003b, 2006) où il a été montré que l’exposition au cadmium provoquait une diminution de la quantité de polyphosphates vacuolaires et une augmentation de la concentration en ortho-phosphates vacuolaires. Etant donné que les vacuoles de *C. reinhardtii* ont été comparées aux acidocalcisomes (Ruiz et al., 2001) connus pour posséder une exopolyphosphatase vacuolaire (Docampo et al., 2010), l’absence

d'une granule de polyphosphate occupant la totalité du volume de la vacuole pourrait être expliquée par l'hydrolyse des polyphosphates en orthophosphates par l'exopolyphosphatase.

Bien que le couplage TEM/X-EDS ait révélé la localisation du cadmium dans le pyrénoloïde et les granules de *C. reinhardtii*, la présence du cadmium semble très faible dans le reste de la cellule. Pourtant, l'hypothèse impliquant la séquestration du cadmium par des peptides thiolés tels que les phytochélatines dans le cytoplasme et le chloroplaste a été évoquée au cours de plusieurs études (Bräutigam et al., 2011; Hu et al., 2001; Nagel et al., 1996b; Nishikawa et al., 2006; Siripornadulsil et al., 2002; Stoiber et al., 2013). Le manque de sensibilité de la sonde X-EDS (limite de détection : 500 ppm) peut expliquer la difficulté à détecter le cadmium dans toute la cellule. De plus, la préparation des échantillons a impliqué une cryo-substitution qui, même limitant la redistribution élémentaire, a pu modifier la localisation subcellulaire du cadmium. Il est donc important de comparer ces résultats avec ceux de techniques plus sensibles au niveau de la détection des éléments chimiques et qui permet l'analyse de micro-algues fraîches.

### **3.2. Localisation du cadmium par SR- $\mu$ XRF**

La micro-fluorescence X sur rayonnement synchrotron (SR- $\mu$ XRF) permet de cartographier les éléments chimiques sur des échantillons frais avec une sensibilité de l'ordre du femto gramme. La SR- $\mu$ XRF a été effectuée sur la ligne de lumière ID21 de l'ESRF sur des cellules de *C. reinhardtii* congelées avec une résolution comprise entre 0,2x0,6 et 0,4x0,7  $\mu\text{m}^2$ . Avec une énergie incidente de 3570 eV, la micro fluorescence X a permis de détecter le phosphore, le soufre et le cadmium, puis le calcium à 4100 eV. En effet, ces trois éléments semblent intervenir dans la séquestration du Cd, d'une part dans les granules riches en P et Ca, et d'autres parts par les polypeptides thiolés (S). Bien que cette technique ne donne pas accès à l'ultrastructure des micro-algues, elle peut être utilisée en tandem avec la micro spectroscopie d'absorption X ( $\mu$ XAS) qui permet de déterminer la nature des ligands du cadmium dans les zones d'intérêt riches en Cd observées sur les cartographies. Les résultats de spéciation de la  $\mu$ XAS seront détaillés ultérieurement. De plus, un article en préparation intégrant ces résultats est présenté en annexe 4.

### 3.2.1. Localisation du cadmium dans la souche wt

Les échantillons de la souche wt ont été choisis afin d'étudier l'évolution de la répartition du cadmium et des trois autres éléments en fonction du temps d'exposition au Cd et de la concentration en Cd<sup>2+</sup> libre du milieu de culture. Ainsi, les cellules cultivées en milieu TAP avec une durée d'exposition courte de 2 heures et longue de 48 heures ont été analysées. Leurs cartographies ont été comparées à celle de cellules montrant des signes de toxicité après une exposition de 48 heures en milieu TAP modifié contaminé par 70 µM de Cd en figure 37.

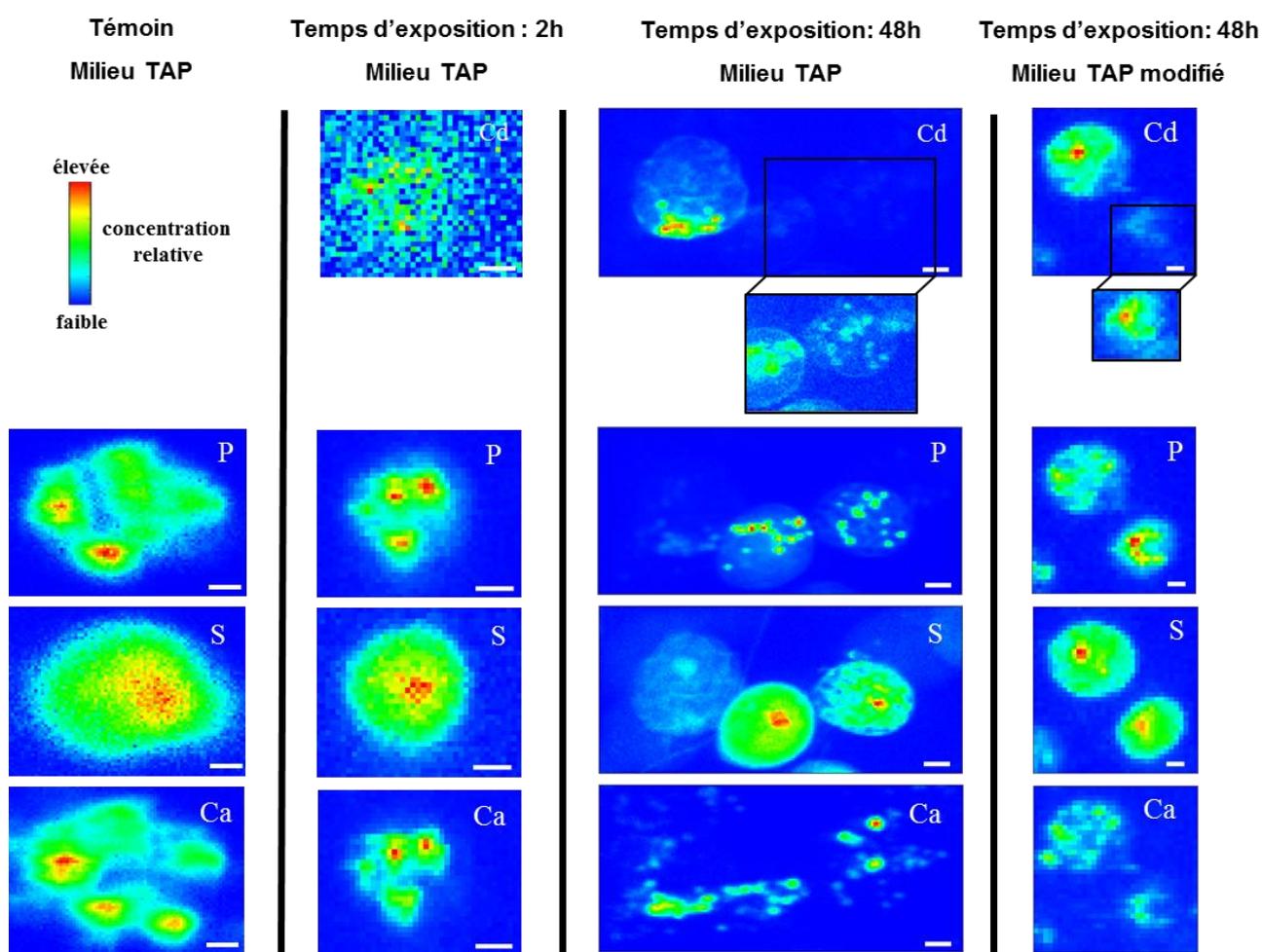


Figure 37 : Cartographies élémentaires de Cd, P, S et Ca par µXRF chez la souche wt de *C. reinhardtii* exposée à 70 µM de cadmium pendant 2 et 48 heures dans le milieu TAP classique et modifié. Les cartographies du Cd, P et S ont été acquises avec une énergie incidente de 3570 eV et celles du Ca avec une énergie incidente de 4100 eV. Les cartographies du Cd au temps d'exposition de 48 heures sont montrées sous deux échelles de contraste différentes afin de pouvoir visualiser le Cd dans chaque cellule. La résolution varie d'une condition d'exposition à l'autre : 0,2x0,6 µm<sup>2</sup> pour le témoin et 48 heures d'exposition en milieu TAP, 0,4x0,7 µm<sup>2</sup> pour le témoin et 2 heures d'exposition en milieu TAP et 48 heures en milieu TAP modifié. Barre d'échelle représente 2 µm.

De manière générale, il est intéressant de noter que les cellules cultivées dans les quatre conditions différentes partagent des distributions élémentaires communes. Le soufre est ainsi réparti uniformément dans les micro-algues et concentré en un seul spot de 1 à 2  $\mu\text{m}$  dont la taille pourrait correspondre au pyrénôïde. De plus, le phosphore et le calcium sont co-localisés sous la forme de spots dont la taille varie suivant les conditions d'expositions, rappelant les granules de polyphosphates observées par TEM/X-EDS. La localisation du Cd dépend des conditions d'exposition. De plus, la concentration en cadmium intracellulaire est très hétérogène entre les cellules puisque l'intensité du signal du cadmium entre cellules n'est pas similaire alors que celui de S et P l'est. Le contraste a donc été forcé sur les cartographies afin de pouvoir visualiser le cadmium dans les cellules les moins concentrées. En milieu TAP, après 2 heures d'exposition, le cadmium est co-localisé avec P et Ca dans des spots de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre. Néanmoins, comparé au temps d'exposition plus long, l'intensité du signal du cadmium est plus faible, indiquant une faible accumulation du Cd. Au bout de 48 heures, il est co-localisé avec P et Ca sous la forme de spots de 0,5  $\mu\text{m}$  ainsi qu'avec le soufre, de manière diffuse dans le reste de la cellule. En milieu TAP modifié, le cadmium intracellulaire semble diffus dans une grosse partie de la cellule qui pourrait correspondre au chloroplaste. Le phosphore et le calcium sont positionnés dans la même partie que le Cd mais sous la forme de spots d'1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre. Au sein de ce qui pourrait être le chloroplaste, le Cd est concentré et co-localisé avec le soufre dans une zone dont la taille et la forme pourrait correspondre au pyrénôïde.

Globalement, les résultats de la localisation par SR- $\mu\text{XRF}$  confirment les résultats obtenus précédemment par TEM/X-EDS. La cellule séquestre le cadmium dans des granules riches en P et Ca dont la taille et la composition correspondent aux granules de polyphosphates et donc par hypothèse, aux acidocalcisomes. De plus, en milieu TAP modifié, le cadmium semble situé dans le chloroplaste et en particulier dans le pyrénôïde. La taille importante des spots riches en P et Ca pourrait correspondre à celle des vacuoles contenant les dépôts denses aux électrons observés en TEM/X-EDS. Néanmoins, la résolution des cartographies des cellules exposées pendant 2 heures au Cd et des cellules cultivées en milieu TAP modifié est plus faible que pour les cartographies des deux autres conditions, ce qui pourrait expliquer la taille importante des granules. Enfin, contrairement au couplage TEM/X-EDS, la basse

limite de détection de la SR- $\mu$ XRF a permis de mettre en évidence la présence diffuse de cadmium dans toute la cellule.

### 3.2.2. Localisation du cadmium dans les souches mutantes

La répartition du cadmium a été étudiée chez les souches *pcs1* et *cw15* cultivées en milieu TAP contaminé ou non par 70  $\mu$ M de cadmium afin de déterminer l'impact des mutations des deux souches sur la gestion du cadmium. Les cartographies SR- $\mu$ XRF sont présentées en figure 38.

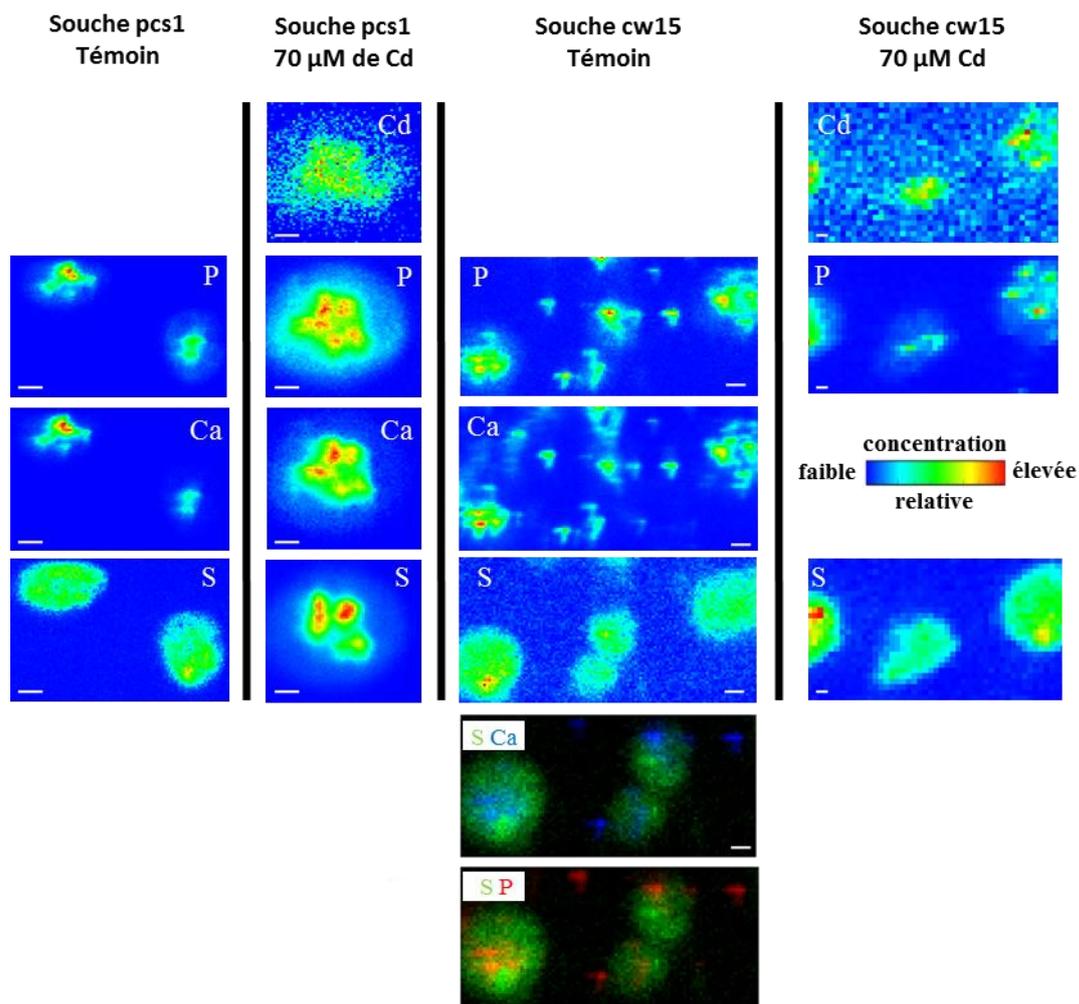


Figure 38 : Cartographies élémentaires de Cd, P, S et Ca par  $\mu$ XRF chez les souches *pcs1* et *cw15* de *C. reinhardtii* exposée à 70  $\mu$ M de cadmium pendant 48 heures dans le milieu TAP classique. Les cartographies du Cd, P et S ont été acquises avec une énergie incidente de 3570 eV et celles du Ca avec une énergie incidente de 4100 eV. Les cartographies bicolores montrent les cellules témoins *cw15* grâce au signal du soufre. Les granules de polyphosphates riches en P et Ca sont observées à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. La résolution est 0,2x0,6  $\mu$ m<sup>2</sup> pour la souche *pcs1* exposée au cadmium et de 0,4x0,7  $\mu$ m<sup>2</sup> pour les trois autres séries de cartographies. Barre d'échelle représente 2  $\mu$ m.

## Chapitre III : résultats et discussion

Les deux souches mutantes présentent des distributions élémentaires différentes. Chez la souche *pcs1*, le phosphore, le calcium et le soufre sont co-localisés dans la majeure partie de la cellule, de manière diffuse. De plus, P et Ca sont co-localisés dans des spots de forte intensité de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, pouvant rappeler les granules de polyphosphate. Le cadmium est lui aussi co-localisé avec P, Ca et S dans la majeure partie de la cellule pouvant correspondre au chloroplaste. Chez la souche *cw15*, comme chez le wt, le phosphore et le calcium sont co-localisés dans des spots d'1  $\mu\text{m}$  de diamètre pouvant correspondre aux granules de polyphosphate. Le soufre est réparti uniformément dans toutes les cellules avec un spot plus intense pouvant correspondre au pyrénioïde. Malgré un signal du cadmium faible, il apparaît que le Cd est colocalisé avec le phosphore. Enfin, il est intéressant de noter que dans la condition témoin, les spots de P et Ca sont présents à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, montrant que *cw15* pourrait excréter ses granules.

A nouveau, la répartition des éléments déterminée par SR- $\mu\text{XRF}$  semble confirmer celle observée par TEM/X-EDS et permet de détecter des teneurs plus faibles. Chez la souche *pcs1*, le Cd, P, S et Ca pourraient être localisés dans le chloroplaste. La surexpression de la phytochélatine synthase dans le chloroplaste induirait bien la synthèse de phytochélatines en grande quantité, expliquant l'enrichissement du chloroplaste en soufre et suggérant la séquestration par les polypeptides thiolés. Néanmoins, la forte présence de P et Ca dans le chloroplaste pourrait être due à la production importante de plaques d'amidon, constatée en TEM/X-EDS ce qui n'exclut pas une séquestration du cadmium par des ligands autres que les polypeptides thiolés. Concernant la souche *cw15*, la localisation du cadmium a été difficile du fait de la faible accumulation du Cd par cette souche constatée en partie III.2.3. En condition témoin, la présence de spots de P et Ca de 1 $\mu\text{m}$  de diamètre à l'extérieur de la cellule pourrait correspondre à l'excrétion des granules de polyphosphate constatée par (Komine et al., 1996). Cependant, la présence des spots de P et Ca à l'extérieur des cellules n'a pas été constatée sur l'échantillon contaminé par le cadmium. La faible concentration en Cd intracellulaire pourrait être due à l'excrétion du Cd lié aux granules de polyphosphate au cours de la préparation de l'échantillon.

La SR- $\mu\text{XRF}$  a permis de localiser le cadmium dans les trois souches de *C. reinhardtii*. Néanmoins, le faisceau X incident traverse complètement les cellules. Les cartographies fournies par cette technique correspondent donc à l'image d'une cellule

entière en 3 dimensions projetée sur un plan en 2 dimensions. La perte de l'information de la profondeur de la cellule rend l'interprétation des cartographies délicates puisque, par exemple, une granule de polyphosphate située dans le cytoplasme peut être traversée par le faisceau en même temps que le pyrénocène situé dans le chloroplaste, superposant leur composition élémentaire sur la cartographie en 2D.

### **3.3. Localisation du cadmium par fractionnement subcellulaire**

La localisation du cadmium au niveau subcellulaire a été abordée jusqu'à présent par des techniques d'imagerie élémentaires semi-quantitatives. Il est intéressant de comparer ces résultats à ceux d'un fractionnement subcellulaire qui permet l'analyse quantitative du cadmium dans les fractions isolées par dosage du Cd par ICP-MS. Cette méthode peut permettre de fixer l'ordre de priorité des mécanismes de tolérance mis en place par les différentes souches et les compartiments subcellulaire ciblés par l'effet toxique du Cd.

Les souches wt, pcs1 et cw15 ont été exposées à 70  $\mu\text{M}$  de Cd pendant 48 heures en milieux TAP classique et modifié. La biomasse a été fractionnée en 5 fractions :

- Les composés résistants à la digestion par la soude (NRC) qui incluent notamment les granules de polyphosphate
- Les débris cellulaires digérés par la soude contenant les parois cellulaires et les noyaux
- Les organelles dont les mitochondries, appareils de Golgi, réticulum endoplasmiques et microsomes
- Les protéines dénaturées par un choc thermique (HDP), soit les protéines de masse molaire conséquente
- Les protéines insensibles au choc thermique (HSP), soit les protéines de faible masse molaire et les métabolites dont les phytochélatines et le glutathion.

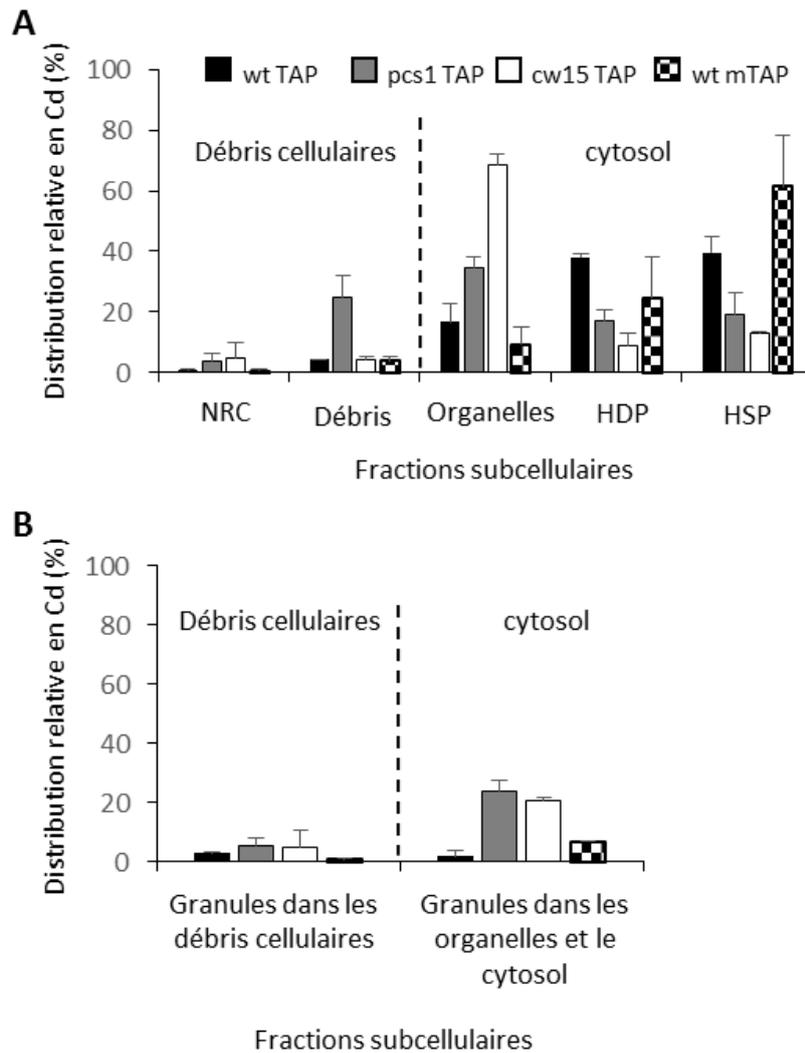


Figure 39 : Localisation du cadmium par fractionnement subcellulaire. (A) Distribution subcellulaire du cadmium en pourcentage du cadmium total chez les souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii* exposée à 70 µM de cadmium pendant 48 heures dans les milieux TAP classique et modifié. Abréviations : NRC, composés résistants à NaOH ; HDP, protéines dénaturées par le choc thermique ; HSP, protéines insensibles au choc thermique. (B) Proportions du cadmium total lié aux granules. La ligne en pointillés sépare les fractions subcellulaires obtenues à partir des débris cellulaire et du cytosol. Les fractionnements (A) et (B) sont indépendants (n=3 ou 4 ± sd).

Les résultats obtenus suite à ce fractionnement sont présentés en figure 39 (A). En premier lieu, un bilan de masse a été réalisé afin de s'assurer que la somme du cadmium contenu dans les 5 fractions soit similaire à la quantité totale de cadmium accumulée par la biomasse. Les rendements sont de 100,9 ± 10,0 % pour le wt, 94,2 ± 6,5 % pour le cw15, 82,2 ± 2,6 % pour le pcs1 en milieu TAP classique et de 108,8 ± 13,6 % pour le wt en milieu TAP modifié. La méthode utilisée a ainsi permis de fractionner la majeure partie du cadmium intracellulaire.

La distribution subcellulaire du cadmium varie d'une souche et d'une condition d'exposition à l'autre. Chez la souche wt cultivée en milieu TAP classique, le cadmium

### Chapitre III : résultats et discussion

est séquestré dans les fractions HDP ( $38,1 \pm 1,1$  %) et HSP ( $39,7 \pm 5,1$  %). Lorsque la teneur en cadmium intracellulaire est augmentée en cultivant le wt en milieu TAP modifié, la proportion en Cd lié aux composés de la fraction HSP augmente ( $61,4 \pm 16,6$  %). Pour la souche pcs1, le cadmium est principalement localisé dans les fractions organelles ( $34,6 \pm 3,6$  %) et débris ( $24,9 \pm 7,0$  %). Enfin, chez la souche cw15, la fraction organelle constitue le principal pool de Cd ( $68,4 \pm 3,5$  %).

Les granules de polyphosphate observées par TEM/X-EDS chez *C. reinhardtii* sont contenues dans de petites vacuoles apparentées aux acidocalcisomes qui pourraient similairement aux microsomes être isolés dans la fraction organelle. Afin de déterminer la quantité de Cd liée spécifiquement aux granules de polyphosphate, le Cd a été dosé dans les fractions isolées suite à la purification des granules de polyphosphate dans les débris cellulaires et dans le cytosol. Les résultats sont présentés dans la figure 39, B). Le total des granules de polyphosphate purifiées contiennent  $28,9 \pm 8,6$  % du Cd total pour la souche pcs1 et  $25,9 \pm 5,8$  % pour la souche cw15. Le wt séquestre moins de Cd dans les granules avec  $5,2 \pm 3,2$  % du Cd total en milieu classique et  $6,9 \pm 1,1$  % en milieu modifié.

Concernant la souche wt, le transfert du Cd vers la fraction HSP lors d'une augmentation du stress lié au Cd a déjà été observé (Lavoie et al., 2009a), indiquant que les molécules comme les phytochélatines et/ou le glutathion connues pour leur propriété de détoxification sont impliquées majoritairement dans la séquestration du cadmium. Au contraire, l'enrichissement en Cd de cette fraction est mineure pour les souches pcs1 et cw15, suggérant la mise en œuvre de mécanisme de détoxification différents.

Durant la lyse cellulaire, les chloroplastes sont brisés, libérant leur contenu qui est redistribué dans les différentes fractions.

- L'amidon a été détecté dans les débris cellulaires par un test qualitatif de coloration au lugol (figure 40)
- Les protéines sont réparties dans les fractions HDP et HSP suivant leur résistance au choc thermique
- Les membranes des thylakoïdes sont culotées avec les organelles donnant une couleur verte au culot de par la chlorophylle

### Chapitre III : résultats et discussion

- Le pyrénioïde pourrait se trouver dans deux fractions différentes. Si sa structure est détruite, la Rubisco devrait précipiter dans la fraction HDP suite au choc thermique. S'il est intact ou partiellement détruit, il devrait être retrouvé dans la fraction débris grâce à son importante densité.



Figure 40 : Culot de débris cellulaire à gauche. Culot de débris cellulaire mis en présence de lugol à droite. La coloration marron foncée indique la présence d'amidon.

Chez la souche *pcs1* qui surexprime la PCS, le chloroplaste est riche en phytochélatines et en amidon avec un pyrénioïde de grande taille. Si le cadmium avait été lié aux phytochélatines, la fraction HSP devrait être enrichie en cadmium, or ce n'est pas le cas ici. Le cadmium est principalement retrouvé dans les débris cellulaires contenant l'amidon et potentiellement le pyrénioïde et lié aux granules de polyphosphate. Ainsi, bien que cette souche produise une grande quantité de phytochélatines, la séquestration du Cd par les polypeptides thiolés ne semble pas être le mécanisme de tolérance dominant.

Pour la souche *cw15*, la fraction organelle est la plus riche en Cd. Elle contient le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les granules de polyphosphate pouvant être comparées aux acidocalcisomes (Ruiz et al., 2001). Le fonctionnement de ces organelles est lié dans le but de transporter des protéines vers la membrane plasmique ou la paroi cellulaire (Docampo et al., 2010; Marchesini et al., 2002; Ruiz et al., 2001). La séquestration du cadmium, complexé aux granules de polyphosphate des acidocalcisomes semble être le mécanisme de tolérance principal de *cw15*. L'excrétion des granules reportée par (Komine et al., 1996) et constatée en imagerie élémentaire par SR- $\mu$ XRF pourrait expliquer l'absence de signes de toxicité lorsque cette souche est exposée au Cd.

L'étude de la localisation du cadmium par TEM/X-EDS, SR- $\mu$ XRF et fractionnement subcellulaire chez les souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii* a permis de mettre en évidence des mécanismes de tolérance envers le cadmium différents selon le phénotype des cellules :

- La souche wt semble privilégier la séquestration du cadmium par les polypeptides thiolés tels que les phytochélatines dans l'ensemble de la cellule. De façon mineure, le cadmium est également séquestré dans les granules de polyphosphate. La toxicité du cadmium entraîne la désorganisation du chloroplaste avec une déstructuration du pyrénéoïde, riche en cadmium et une production d'amidon anormale.
- La souche pcs1 surexprime la phytochélatine synthase entraînant une production importante d'amidon et une augmentation de la taille du pyrénéoïde. Le cadmium est séquestré à l'intérieur du chloroplaste et dans les granules de polyphosphate. Bien que cette souche soit censée produire des quantités importantes de phytochélatines, la séquestration du Cd par ces dernières ne semble pas être la principale stratégie de tolérance au stress lié au Cd.
- La souche cw15 montre une paroi cellulaire plus fine que le wt et une excrétion des granules de polyphosphate. La séquestration du Cd dans ces granules de polyphosphate semble être la principale stratégie de tolérance vis-à-vis du Cd.

**Plus la part de cadmium séquestré par les granules de polyphosphate est grande, meilleure est la tolérance de la micro-algue contre le Cd**



#### **4. SPECIATION DU CADMIUM *IN SITU* CHEZ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* PAR SR-XAS**

La spectroscopie d'absorption X sur rayonnement synchrotron (SR-XAS) a été utilisée sur les cellules fraîches de *C. reinhardtii* afin de déterminer la nature des ligands du cadmium intracellulaire par combinaisons linéaires. En effet, la partie XANES du spectre d'absorption expérimental et le signal EXAFS peuvent être considérés comme une somme pondérée des contributions de chaque espèce chimique du cadmium présente dans les micro-algues. Les étapes du traitement des spectres par combinaisons linéaires est présentés pour chaque spectre en annexes 3.

La spéciation du Cd a été étudiée à deux échelles différentes de taille. La première échelle correspond au niveau subcellulaire avec un faisceau X incident focalisé dont la taille submicrométrique est identique à celle utilisée en SR- $\mu$ XRF. La nature des ligands du Cd est ainsi déterminée au niveau des zones d'intérêts riches en Cd d'une cellule individuelle préalablement observée par SR- $\mu$ XRF. A l'échelle supérieure, la SR-XAS est pratiquée sur une pastille congelée de culot cellulaire avec un faisceau X incident défocalisé, permettant la détermination globale de la nature des ligands du Cd au niveau d'une culture cellulaire.

##### **4.1. Spéciation du Cd à l'échelle subcellulaire par $\mu$ XANES au seuil $L_{III}$ du Cd**

Les analyses  $\mu$ XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd ont été effectuées en tandem avec les cartographies élémentaires SR- $\mu$ XRF sur les cellules de souche wt, pcs cultivées en milieux TAP classique et modifié contaminés par 70  $\mu$ M de cadmium pendant 48 heures. La faible concentration en Cd de la souche cw15 n'a pas permis l'acquisition de spectres  $\mu$ XANES. Les cartographies élémentaires montrant les zones étudiées riches en Cd, les spectres  $\mu$ XANES expérimentaux et des standards ainsi que les résultats des combinaisons linéaires sont présentés en figure 41.

Au cours du traitement des données par combinaisons linéaires, les spectres expérimentaux ont été reconstruits à partir de spectres de standards de complexes entre Cd et ligands organiques décrits chez *C. reinhardtii*. Les spectres XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd permettent de distinguer la coordination du Cd par des atomes de soufre ou d'oxygène. Avec un pré-pic typique à 3539 eV (ligne en pointillée sur la figure 41), les spectres des espèces Cd-O peuvent être facilement différenciés des spectres des espèces Cd-S qui n'en présentent pas.

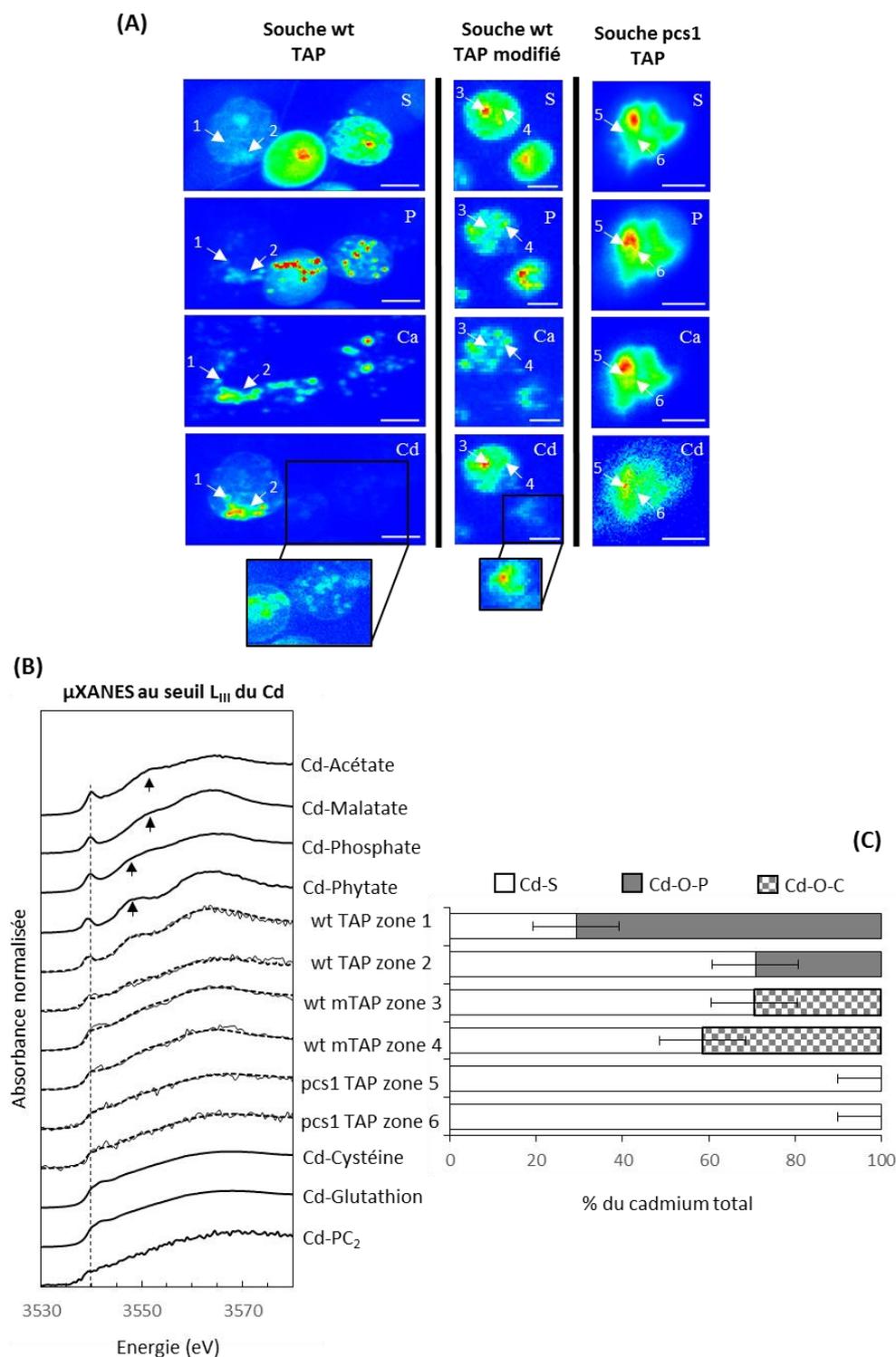


Figure 41 : Spéciation du cadmium à l'échelle subcellulaire par  $\mu$ XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd chez les souches wt et pcs1 exposées à 70  $\mu$ M de Cd pendant 48 heures. (A) Les cartographies du Cd, P et S ont été acquises avec une énergie incidente de 3570 eV et celles du Ca avec une énergie incidente de 4100 eV. Les cartographies du Cd de la souche wt sont montrées sous deux échelles de contraste différentes afin de pouvoir visualiser le Cd dans chaque cellule. Les flèches blanches montrent les zones analysées par  $\mu$ XANES. La résolution est 0,2x0,6  $\mu$ m<sup>2</sup> pour la souche wt et pcs1 exposée au cadmium dans le milieu TAP classique et de 0,4x0,7  $\mu$ m<sup>2</sup> pour le wt cultivé en milieu TAP modifié. Barre d'échelle représente 4  $\mu$ m. (B) Les spectres  $\mu$ XANES expérimentaux et des standards sont montrés en ligne pleine, les meilleures reconstructions à deux composantes par combinaison linéaire sont montrées en pointillés. Les flèches noires mettent en évidence le décalage en énergie de la première oscillation. (C) Distribution des ligands du cadmium après normalisation des pourcentages à 100 %. L'incertitude est estimée à 10 %.

### Chapitre III : résultats et discussion

La différenciation entre les espèces Cd-S (Cd-PC<sub>2</sub>, Cd-glutathion et Cd-cystéine) est délicate car les spectres ont des caractéristiques similaires. Il est donc impossible de déterminer la nature exacte des ligands thiolés. Au contraire, chez les ligands donneurs d'oxygène, les spectres de complexes entre Cd et acides organiques comme le Cd-acétate et le Cd-malate présentent une seconde oscillation décalée vers une plus haute énergie que les spectres des complexes entre Cd et phosphates comme le Cd-phosphate et le Cd-phytate (flèche noire sur la figure 41). Ainsi, les résultats des combinaisons linéaires ont été exprimés en proportions d'espèces Cd-S, Cd-O-P et Cd-O-C.

Le spectre  $\mu$ XANES acquis sur la zone 1 riche en Cd, P et Ca de la cellule de souche wt cultivée en milieu TAP classique indique que le Cd est majoritairement coordonné par des ligands O-P. Les caractéristiques du spectre correspondent avec la structure du spectre du standard Cd-phytate et la meilleure correspondance a été obtenue avec  $76 \pm 10 \%$  de Cd-phytate et  $31 \pm 10 \%$  de Cd-cystéine. *A contrario*, dans la zone 2 où la présence du Cd est plus diffuse et co-localisée avec le soufre, la proportion de ligands thiolés augmente avec  $66 \pm 10 \%$  de Cd-S et  $27 \pm 10 \%$  de Cd-O-P.

Pour le wt cultivé en milieu TAP modifié, sur les deux zones étudiées, le Cd est majoritairement complexé par des ligands thiolés et particulièrement sur la zone riche en S (zone 3) pouvant correspondre au pyrénoloïde avec  $76 \pm 10 \%$  de Cd-S. Il est à noter que contrairement au wt cultivé en milieu classique, les ligands oxygène qui correspondent le mieux lors de la reconstitution des spectres expérimentaux sont les acides organiques (zone 3 :  $32 \pm 10 \%$  Cd-malate, zone 4 :  $42 \pm 10 \%$  Cd-malate).

Enfin, pour la souche pcs1, les spectres  $\mu$ XANES des zones analysées 5 et 6 ont le meilleur accord avec uniquement des ligands thiolés.

Concernant la souche wt, la spéciation *in situ* dans les cellules ne présentant pas de signes de toxicité (TAP classique) montre que le cadmium serait complexé par des phosphates dans les zones riches en P et Ca qui correspondent aux granules de polyphosphate. Dans le reste de la cellule, le cadmium serait séquestré par des ligands thiolés comme les phytochélatines. Chez les cellules wt montrant des signes de toxicité (TAP modifié), le cadmium serait lié au soufre dans le pyrénoloïde qui constitue d'un amalgame de Rubisco. La toxicité du cadmium pourrait être attribuée à l'inactivation de la Rubisco, empêchant la fixation du CO<sub>2</sub>. De plus, l'apparition des signes de

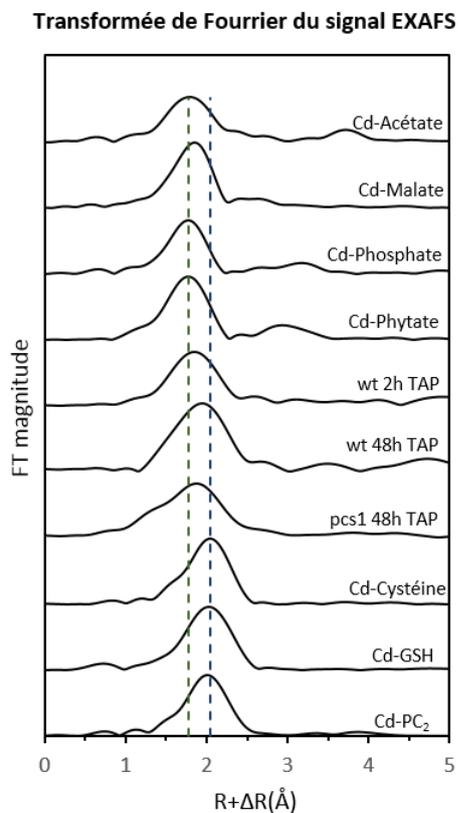
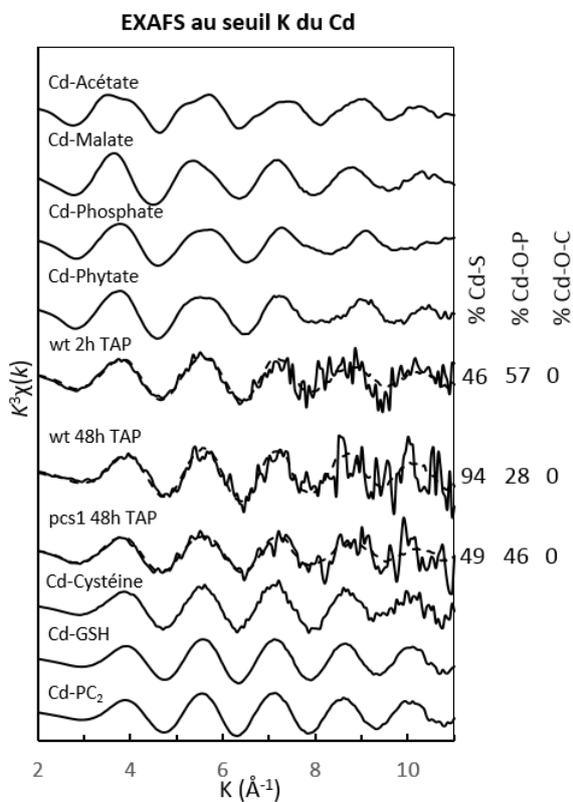
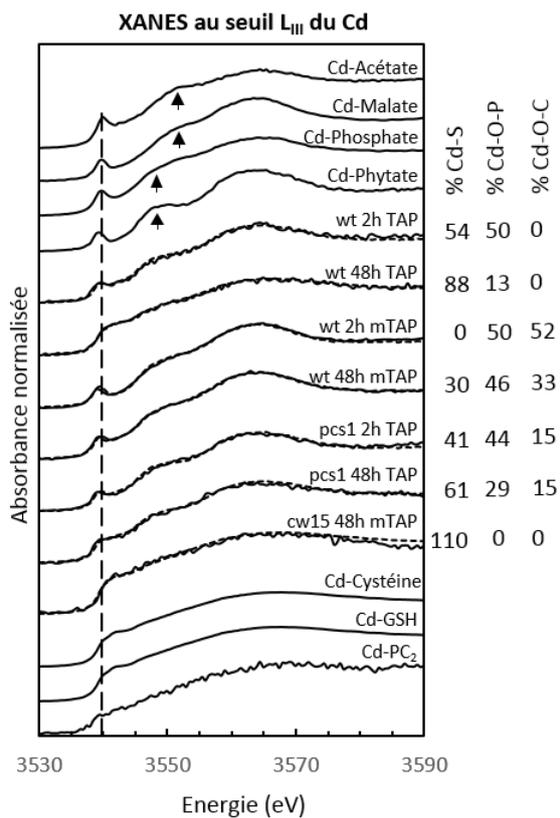
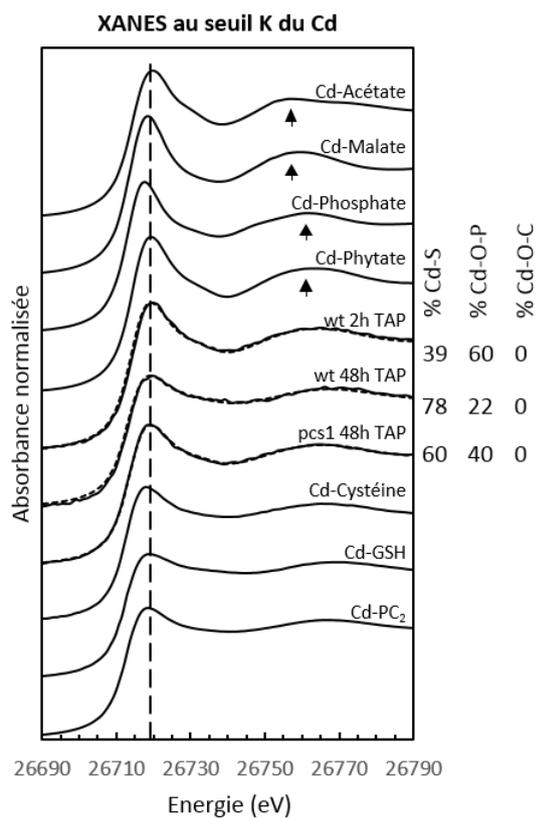
toxicité chez le wt s'accompagne d'un changement de ligands oxygène, passant d'une séquestration par les phosphates en milieu TAP classique à une complexation du Cd par les ligands de type O-C en milieu TAP modifié. Ce changement pourrait être attribué à l'augmentation du stress oxydatifs constaté chez *C. reinhardtii* exposée au Cd (Stoiber et al., 2013; Vega et al., 2006). Enfin, la souche pcs1, de par la surexpression de la phytochélatine synthase, séquestrerait le Cd complexé par les phytochélatines dans le chloroplaste. Néanmoins, les résultats du fractionnement subcellulaire montrant que la majorité du cadmium n'est pas retrouvé dans la fraction HSP, censée contenir les phytochélatines, ne sont pas en accord avec la spéciation du Cd établie ici.

### **4.2. Spéciation globale du cadmium par SR-XAS au seuil L<sub>III</sub> et K du cadmium**

Les culots cellulaires des souches wt, pcs1 et cw15 cultivées en milieux TAP classique et modifié ont été récupérés après 2 et 48 heures d'exposition à 70  $\mu$ M de Cd afin d'étudier l'évolution de la spéciation du Cd au niveau de la culture entre un temps d'exposition court et long. Les analyses XAS ont été effectuées à deux seuils d'absorption du Cd différents : au seuil L<sub>III</sub> (3538 eV) et K du Cd (26711 eV). Les spectres XAS et les résultats des combinaisons linéaires sont présentés sur la figure 42.

Pour le XANES et l'EXAFS au seuil K du Cd, il est également possible de différencier les spectres des complexes Cd-S, Cd-O-P et Cd-O-C. Pour le XANES au seuil K du Cd, les ligands donneur d'oxygène induisent une raie blanche (le pic d'absorption le plus intense après le seuil, en pointillé sur la figure 42) plus intense que les ligands donneur de soufre. De plus, la seconde oscillation pour les standards Cd-phosphate est décalée vers une plus haute énergie que celle des standards Cd-acide organique (flèches noires sur la figure 42). Concernant les spectres EXAFS, la fréquence d'oscillation des complexes Cd-S est plus importante que celles des ligands oxygène, ce qui entraîne un décalage du premier pic de la transformée de Fourier vers des valeurs de  $R+\Delta R$  plus élevées. En outre, les complexes Cd-phosphate montrent une forme typique de leur seconde oscillation.

# Chapitre III : résultats et discussion



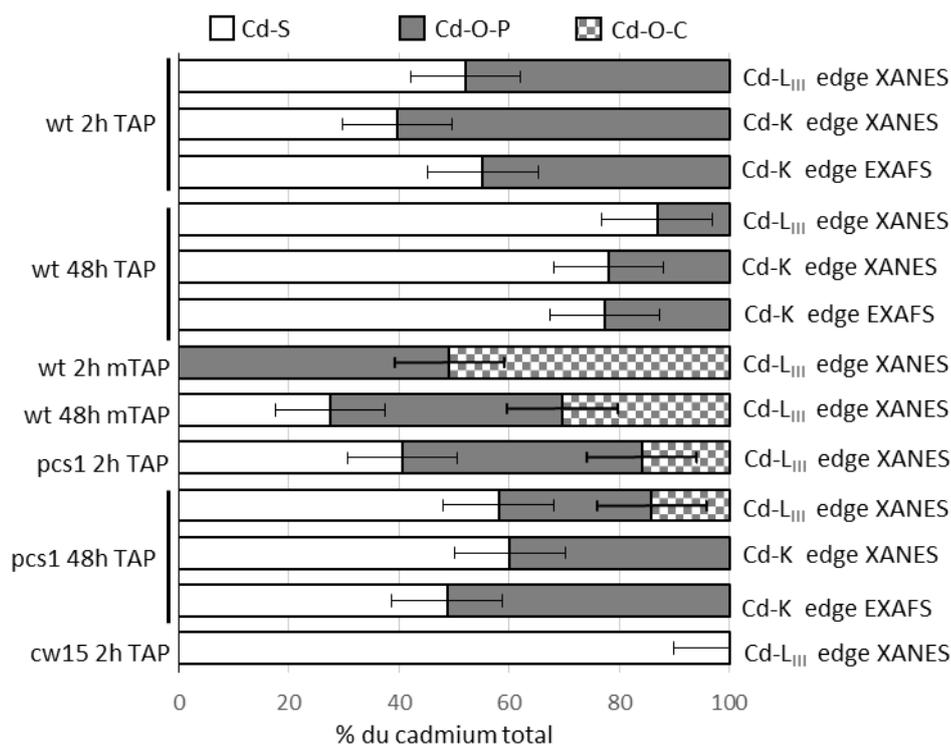


Figure 42 : Spéciation globale du cadmium à l'échelle de la culture par XANES au seuil L<sub>III</sub> du Cd, par XANES et EXAFS au seuil K du Cd chez les souches wt, pcs1 et cw15 exposées à 70  $\mu$ M de Cd pendant 2 et 48 heures en milieu TAP classiques et modifié. Les spectres expérimentaux et des standards sont montrés en ligne pleine, les meilleures reconstructions à une, deux ou trois composantes par combinaison linéaire sont montrées en pointillés. Les flèches noires mettent en évidence le décalage en énergie des oscillations entre les spectres Cd-O-P et Cd-O-C. Les lignes en pointillés montrent les différences entre les spectres Cd-S et Cd-O. Les résultats des combinaisons linéaires sont exprimés en pourcentages de ligands après normalisations des pourcentages à 100%. L'incertitude est estimée à 10 %.

Les combinaisons linéaires (CL) réalisées sur les spectres XANES et EXAFS aux seuils L<sub>III</sub> et K du Cd montrent des résultats similaires en pourcentages de ligands S et ligands O. Néanmoins, les CL faites au seuil L<sub>III</sub> du Cd mettent en jeu les ligands O-C, ce que ne font pas celles effectuées au seuil K du Cd.

Globalement, la proportion de complexes Cd-S augmente lorsque le temps d'exposition au cadmium augmente, dans n'importe quelle condition de culture. Concernant le wt, le pourcentage de Cd lié aux ligands donneur de soufre est plus important lorsqu'il est cultivé en milieu classique (88  $\pm$  10 % de Cd-glutathion) plutôt qu'en milieu modifié (30  $\pm$  10 % de Cd-glutathion), après 48 heures d'exposition. De plus, chez le wt en milieu classique, le Cd est lié de manière mineure aux ligands phosphate (13  $\pm$  10 % Cd-phytate) alors qu'en milieu modifié il est complexé majoritairement par des ligands O-P et O-C (33  $\pm$  10 % Cd-malate + 46  $\pm$  10 % Cd-phytate). Chez la souche pcs1, la proportion en complexes Cd-S augmente très légèrement avec le temps d'exposition alors que la proportion en ligands O-P diminue.

### Chapitre III : résultats et discussion

La proportion de ligands O-C reste stable ( $15 \pm 10 \%$ ). Enfin, pour la souche cw15, l'analyse XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd n'a pu être réalisée que sur les cellules exposées au Cd pendant 48 heures car la quantité de Cd intracellulaire était trop faible pour la durée d'exposition la plus courte. Tout le Cd est séquestré par les ligands thiolés après 48 heures d'exposition.

Chez le wt cultivé en milieu classique, le cadmium semble majoritairement être séquestré par des polypeptides thiolés et de façon mineure par les granules de polyphosphate. Ces résultats sont confortés par la distribution du cadmium sur les cartographies SR- $\mu$ XRF ainsi que par la distribution du cadmium obtenue par fractionnement subcellulaire où il est peu concentré dans la fraction « granule » et en quantité plus importante dans la fraction HSP contenant les phytochélatines.

Lorsque les cellules wt montrent des signes de toxicité en milieu modifié, la nature du ligand majoritaire du Cd n'est plus la même, avec un mélange de Cd-O-P et Cd-O-C. Les complexes Cd-O-P peuvent être attribués à la séquestration du Cd par les polyphosphates ou ortho-phosphates contenus dans les vacuoles observées en TEM/X-EDS et SR- $\mu$ XRF. Similairement aux résultats de  $\mu$ XANES, les ligands O-C pourrait correspondre à l'environnement cellulaire oxydé, suite à l'augmentation du stress oxydatif constaté chez *C. reinhardtii* exposée au Cd (Stoiber et al., 2013; Vega et al., 2006). Néanmoins, lors du fractionnement subcellulaire, l'enrichissement en Cd de la fraction HSP indiquerait que le Cd serait complexé par les polypeptides thiolés. Or, la spéciation globale par SR-XAS montre les ligands oxygène majoritaires. Cette différence d'interprétation entre les deux techniques suggérerait que le Cd isolé dans la fraction HSP ne serait pas lié au phytochélatines présentes dans cette fraction.

Puisque la souche pcs1 surexprime la phytochélatine synthase même en l'absence de Cd, le niveau de polypeptides thiolés ne devrait pas fortement augmenter avec l'augmentation du temps d'exposition au Cd. Cette hypothèse est vérifiée avec la faible augmentation de la part de Cd complexé par les ligands thiolés, au bout de 48 heures d'exposition. Néanmoins, conformément aux résultats du fractionnement subcellulaire, les ligands thiolés ne sont pas les ligands majoritaires du cadmium. Quel que soit la durée d'exposition, 15 % du Cd est complexé par des ligands O-C, qui pourraient correspondre à la grande quantité d'amidon présente dans le chloroplaste.

### Chapitre III : résultats et discussion

La souche cw15 présente la plus faible capacité d'accumulation du cadmium des trois souches. D'après les résultats de spéciation par SR-XAS, le cadmium serait séquestré uniquement par des ligands thiolés. Or, d'après les résultats du fractionnement subcellulaire, le cadmium serait séquestré majoritairement par les granules de polyphosphate et dans les organelles. Une explication possible serait que, lors de la préparation des échantillons pour les analyses SR- $\mu$ XRF (dépôt cellulaire) et XAS (culot cellulaire), une partie du Cd intracellulaire soit perdu par excrétion. Le protocole de fractionnement subcellulaire implique la minimisation des pertes en Cd afin d'obtenir la distribution en Cd, mais une redistribution entre les fractions est possible.

A l'exception du wt cultivé en milieu TAP classique, la spéciation du Cd établie à partir des  $\mu$ XANES à l'échelle subcellulaire diffère souvent de la spéciation globale, observée au niveau des cultures. Ces différences pourraient être expliquées par l'hétérogénéité des quantités en Cd intracellulaire observée sur les cartographies élémentaires par SR- $\mu$ XRF. De plus, il ne faut pas oublier que, lors des analyses  $\mu$ XANES, le faisceau X incident traverse complètement les cellules congelées de *C. reinhardtii*. Par exemple, les résultats de spéciation acquis lorsque le faisceau X est focalisé sur une granule de polyphosphate englobent la spéciation du Cd dans la granule mais également du Cd rencontré par le faisceau X dans la cellule, avant et après la granule.

La Rubisco catalise la fixation du CO<sub>2</sub> à l'intérieur du pyrénnoïde. Cette réaction enzymatique nécessite l'intervention de la Rubisco Activase qui, par son activité ATPase, va libérer le site actif de la Rubisco de ses inhibiteurs comme le pentodiulose bisphosphate (Jr, 2003). L'activité de la Rubisco activase est régulée par le rapport ADP/ATP ainsi que par l'état redox de ses cystéines 411 et 392, lui-même régulé par la thioredoxine f (Zhang and Portis, 1999). La régulation de la fixation du CO<sub>2</sub> dépend donc de l'état redox de groupement thiols de nombreuses protéines (Rubisco activase, thioredoxine f) qui peuvent être de potentiels sites de fixation du cadmium. Cela expliquerait que le cadmium soit complexé à  $71 \pm 10$  % par des ligands thiolés dans le pyrénnoïde (voir partie III.4.1).

L'étude de la spéciation chimique du cadmium *in situ* chez *C. reinhardtii*, par SR-XAS, a permis de confirmer la majorité des mécanismes de tolérance et de toxicité du cadmium mis en évidence par imagerie :

- La souche wt semble privilégier la séquestration du cadmium par les polypeptides thiolés tels que les phytochélatines dans l'ensemble de la cellule. De façon mineure, le cadmium est également séquestré dans les granules de polyphosphate. Les signes de toxicité présentés par les cellules exposées à une forte concentration en  $\text{Cd}^{2+}$  libre sont associés à un changement global de nature des ligands majoritaires du Cd. La part importante de Cd complexé par les ligands O-C montre une augmentation du stress oxydatif. Au niveau subcellulaire, le Cd semble être lié aux groupements thiol de la Rubisco, à l'intérieur du pyrénoloïde, empêchant l'assimilation du  $\text{CO}_2$ .
- La souche pcs1 surexprime la phytochélatine synthase entraînant une synthèse de phytochélatines potentiellement forte ainsi qu'une production importante d'amidon. Il en résulte une séquestration du Cd par les polypeptides thiolés (50-60% du Cd), le reste étant séquestré par les granules de polyphosphate et potentiellement complexé par l'amidon.
- La souche cw15 accumule moins de cadmium que les deux autres souches, ce qui rend l'analyse par SR-XAS délicate. Néanmoins, le Cd semble lié uniquement à des ligands thiolés après 48 heures d'exposition. L'absence de Cd séquestré par les granules de polyphosphates observées en TEM/X-EDS, SR- $\mu$ XRF et fractionnement subcellulaire peut être expliquée par la perte du Cd lié aux granules de polyphosphate lors de leur excrétion.



## 5. IMPACT DU CADMIUM SUR L'ASSIMILATION DU CARBONE PAR IMAGERIE NANO-SIMS

Chez *C. reinhardtii*, l'impact du cadmium sur la photosynthèse a été étudié, montrant l'inhibition de la photoactivation du photosystème II (Faller et al., 2005). Cet effet du cadmium peut expliquer la baisse de croissance observée chez les micro-algues en ralentissant la production d'ATP lors de la photosynthèse et, par la même occasion, la fixation du CO<sub>2</sub>. En milieu TAP, les cellules ont à leur disposition deux sources de carbone : le CO<sub>2</sub> en tant que source de carbone inorganique et l'acétate en tant que source de carbone organique. Cela permet aux cellules mutantes de *C. reinhardtii* ne pouvant pas réaliser la photosynthèse de se développer (Nagel and Voigt, 1995; Voigt et al., 1998) en assimilant l'acétate par le cycle métabolique du glyoxylate puis par celui de la néoglucogénèse (Johnson and Alric, 2013).

Afin d'étudier l'impact du cadmium sur la source de carbone privilégiée par les cellules, la souche wt a été exposée ou non à 70 µM de cadmium en milieu TAP modifié dont l'acide acétique a été remplacé par de l'acétate de sodium marqué isotopiquement au <sup>13</sup>C (99 % des carbones de l'acétate sont des <sup>13</sup>C). Le milieu de culture contient également du CO<sub>2</sub> dissout dont l'abondance isotopique du carbone est celle observée dans la nature (98,9 % de <sup>12</sup>C et 1,1 % de <sup>13</sup>C). Par la suite, l'assimilation du carbone a été observée par imagerie élémentaire nanoSIMS (source Cs<sup>+</sup>). Les cartographies du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C permettent de localiser les régions de la cellule dont le carbone proviendrait préférentiellement de la source de carbone inorganique (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C faible) ou organique (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C élevé). La source Cs<sup>+</sup> a également permis la localisation de l'azote (<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N), du <sup>32</sup>S et du <sup>31</sup>P afin de définir la structure cellulaire. La source Hypériorion O<sup>-</sup> RF a été utilisée pour déterminer la distribution en <sup>24</sup>Mg, <sup>40</sup>Ca, <sup>56</sup>Fe, <sup>63</sup>Cu et <sup>66</sup>Zn. Le cadmium n'a pas pu être localisé par nanoSIMS à cause de la faible efficacité d'ionisation de la nouvelle source O<sup>-</sup> RF sur cet élément. En effet, malgré une efficacité d'ionisation améliorée par rapport à la sonde duoplasmatron, le signal détecté du cadmium reste faible et souffre de nombreuses interférences. Par microscopie corrélative, les cartographies élémentaires nanoSIMS ont pu être complétées par la localisation du cadmium et la définition de l'ultrastructure, réalisées par couplage TEM/X-EDS sur une coupe adjacente à celle analysée par nanoSIMS.

La figure 43 montre les cartographies élémentaires du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C de cellules exposées ou non à 70 µM de cadmium. Il apparaît que le rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C est plus

élevé au niveau du pyrénioïde et des granules d'amidon des cellules témoins et exposée au cadmium, montrant la localisation du carbone provenant de l'acétate dans les zones de fixation (pyrénioïde) et de stockage (amidon) du carbone. Il est important de noter que le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  est trois à quatre fois plus élevé dans le pyrénioïde et l'amidon des cellules exposées au cadmium que dans ceux des cellules témoin. Etant donné la baisse de la teneur en chlorophylle (voir partie III.2.2.1) des cellules exposées à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié, l'augmentation du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  peut être expliquée par l'inhibition de la photosynthèse, favorisant l'assimilation du carbone provenant de l'acétate.

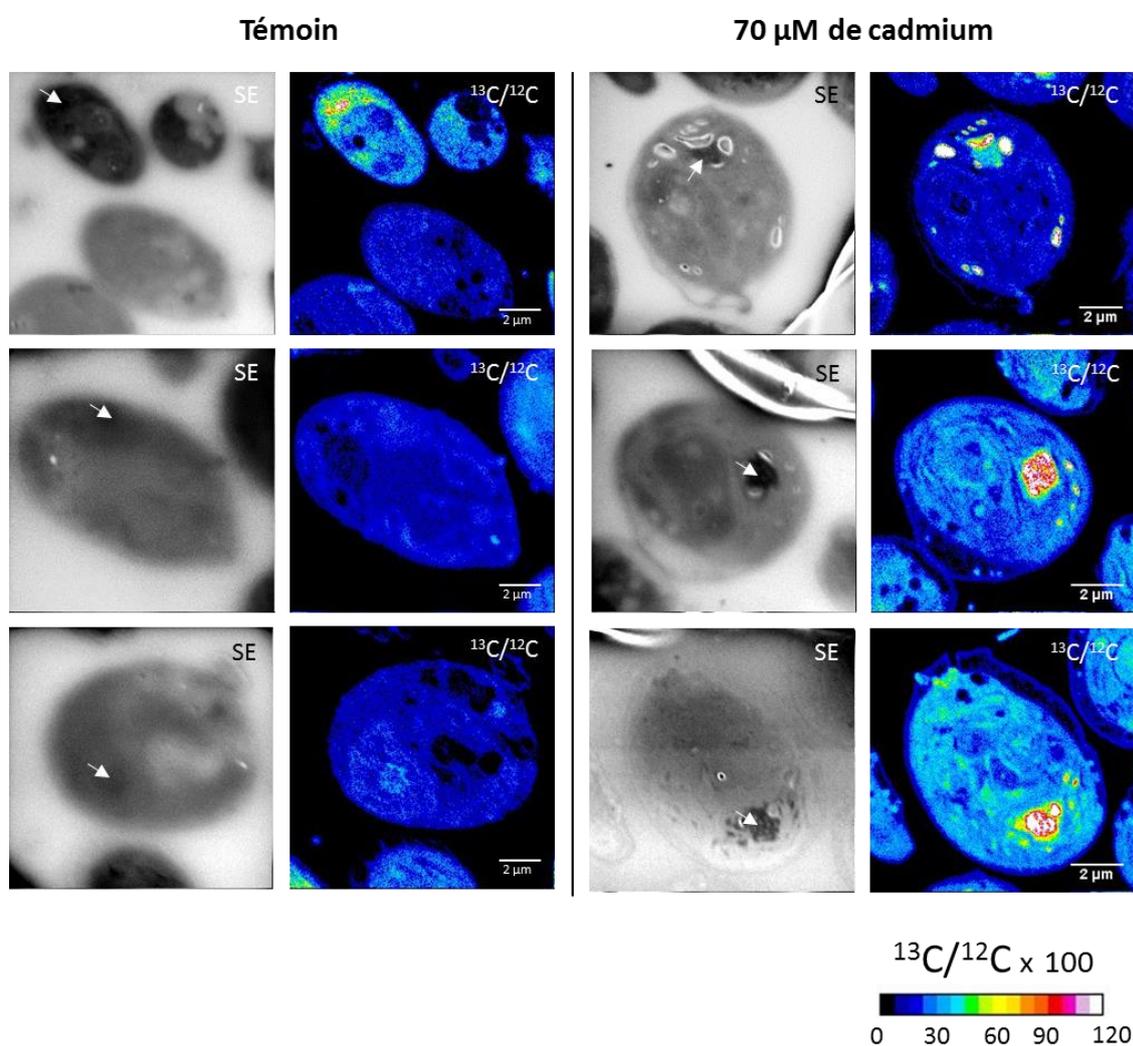


Figure 43 : Cartographies élémentaires du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et images des électrons secondaires (SE) correspondantes réalisées par nanoSIMS (source  $\text{Cs}^+$ ) chez la souche wt de *C. reinhardtii* exposée ou non à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié où l'acétate est marqué au  $^{13}\text{C}$ . Les champs analysés de 256x256 pixels mesurent, de haut en bas, 12, 8, 10  $\mu\text{m}$  de côté pour les cellules témoins et 12, 10, 10  $\mu\text{m}$  de côté pour les cellules exposées, avec un temps de comptage de 10 ms par pixel. Les flèches blanches montrent le pyrénioïde, la barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$  et l'échelle de contraste du ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  est la même pour les six cartographies.

### Chapitre III : résultats et discussion

Les figures 44 et 45 présentent l'imagerie corrélative de deux cellules indépendantes exposées à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié avec, d'une part les cartographies élémentaires nanoSIMS du  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ , du  $^{31}\text{P}$ , du  $^{32}\text{S}$ , du  $^{24}\text{Mg}$ , du  $^{40}\text{Ca}$ , du  $^{56}\text{Fe}$ , du  $^{63}\text{Cu}$  et du  $^{66}\text{Zn}$ , d'autre part l'image TEM et les spectres X-EDS associés.

En premier lieu, il apparaît que la corrélation des images nanoSIMS et TEM n'est pas parfaite. En effet, ces deux techniques ont été employées sur des coupes adjacentes d'épaisseur différentes. Les images correspondent donc à des plans successifs d'une même cellule. Les cartographies élémentaires nanoSIMS montrent que le pyrénioïde est riche en  $^{32}\text{S}$ , confirmant l'attribution de cet organelle au spot de soufre observé en  $\mu\text{XRF}$  (partie III.3.2.1). Il est à noter que les vacuoles sont également riches en  $^{32}\text{S}$ . Cela pourrait être expliqué par une accumulation de complexes  $\text{Cd-PC}_n$  dans les vacuoles, déjà évoquée dans le modèle de (Cobbett, 2000) traitant du rôle des phytochélatines chez les plantes supérieures. Le  $^{31}\text{P}$  et le  $^{40}\text{Ca}$  sont localisés de façon homogène dans le cytosol et en faible quantité dans le chloroplaste. De plus, ils sont colocalisés avec  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{66}\text{Zn}$  dans les précipités présents dans les vacuoles. La composition élémentaire des vacuoles contenant les précipités denses aux électrons est similaire à celle déterminée dans les acidocalcisomes (Docampo and Moreno, 2011; Hong-Hermesdorf et al., 2014; Ruiz et al., 2001). Les cartographies des métaux ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{66}\text{Zn}$ ) résultant de l'analyse d'un seul scan ne sont pas suffisamment détaillées pour distinguer la distribution élémentaire hors des granules de polyphosphate. Des cartographies nanoSIMS provenant de la somme de plusieurs scans seront présentées ultérieurement en partie III.6.2 afin de déterminer la localisation subcellulaire de ces métaux.

Les spectres X-EDS ont permis de localiser le cadmium qui est présent dans le pyrénioïde et les vacuoles. Il est à noter que le magnésium observé dans les vacuoles sur la cartographie nanoSIMS est également détecté par X-EDS. Comparativement aux mesures effectuées sur les souches wt, pcs1 et cw15 cultivées en milieu TAP classique (partie III.3.1), les rapports des pics Cd/K dans le pyrénioïde sont ici les plus élevés montrant une forte accumulation du cadmium dans le pyrénioïde. Les rapports Cd/P dans les précipités denses aux électrons sont faibles mais le rapport Cd/P dans la vacuole (figure 45) est aussi élevé que ceux mesurés dans les granules des autres souches. Cela indique que le cadmium serait séquestré dans la vacuole par du phosphate mais ne serait pas lié aux précipités de polyphosphate.

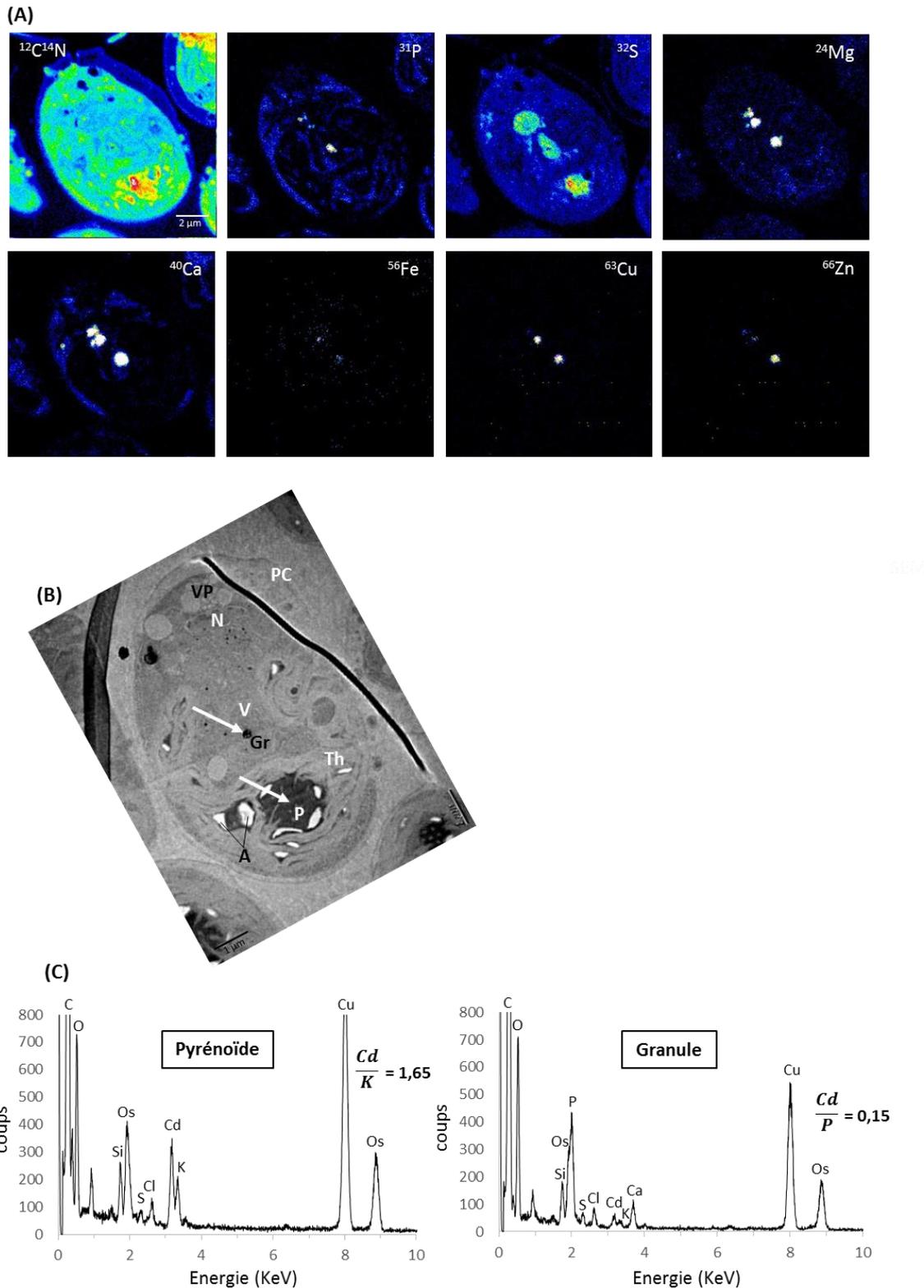


Figure 44 : Imagerie corrélative par nanoSIMS et TEM/X-EDS de la souche wt de *C. reinhardtii* exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié où l'acétate est marqué au  $^{13}\text{C}$ . (A) Cartographies élémentaires du  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ , du  $^{31}\text{P}$  (source  $\text{Cs}^+$ ) et, du  $^{24}\text{Mg}$ , du  $^{40}\text{Ca}$ , du  $^{56}\text{Fe}$ , du  $^{63}\text{Cu}$  et du  $^{66}\text{Zn}$  (source Hypériorion O<sup>-</sup> RF) par nanoSIMS. Le champ analysé de 256x256 pixels mesure 10  $\mu\text{m}$  de côté avec un temps de comptage de 10 ms par pixel, la barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$ . (B) Image TEM de la cellule, la barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$ , les flèches blanches montrent les zones analysées par X-EDS. Légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrénoïde ; Th, thylakoïde ; V, vacuole ; VP, vacuole pulsatile. (C) Spectres X-EDS collectés sur les zones décrites en (B), le signal du cuivre et de l'osmium est dû au cuivre de la grille et l'osmium de la solution de contraste.

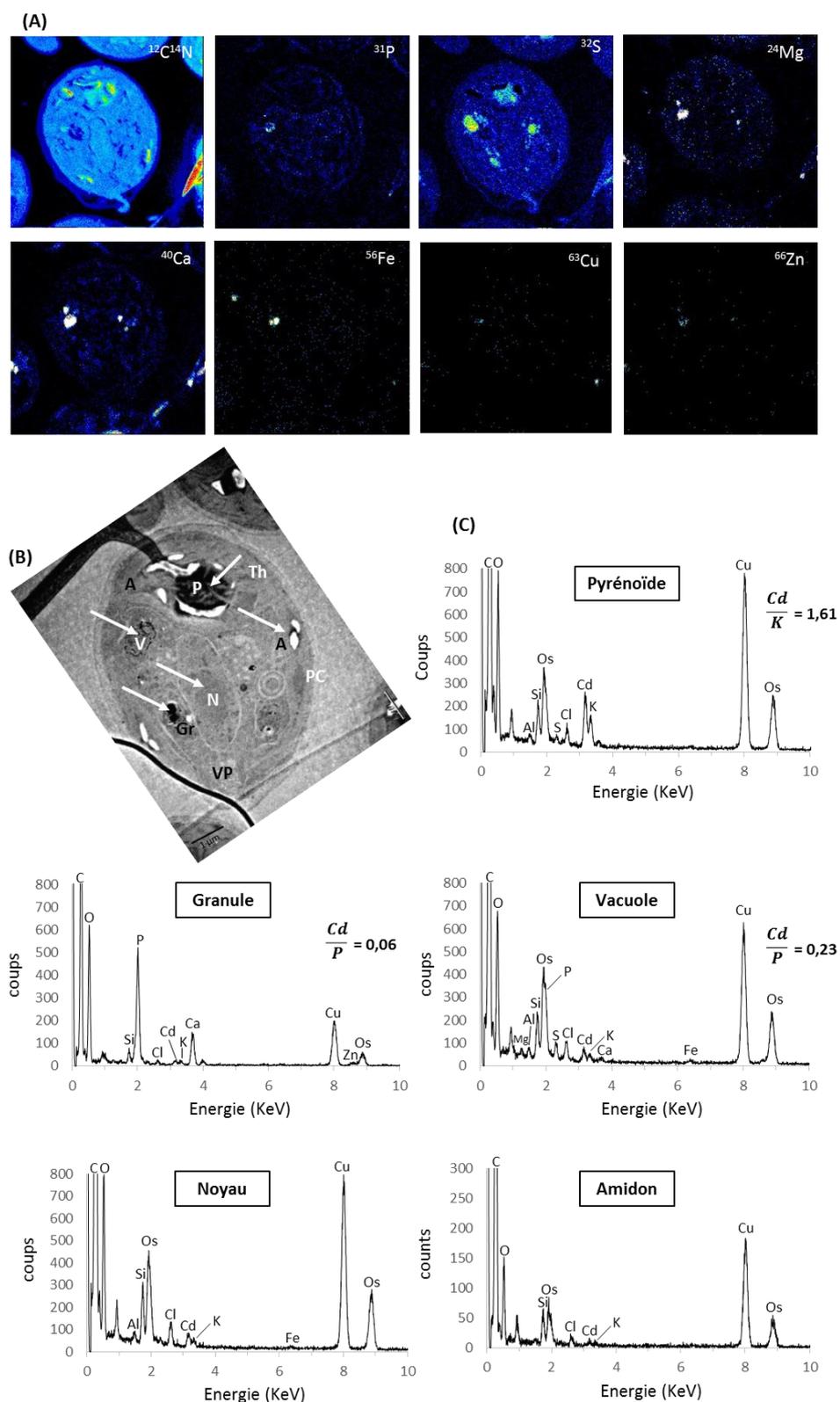
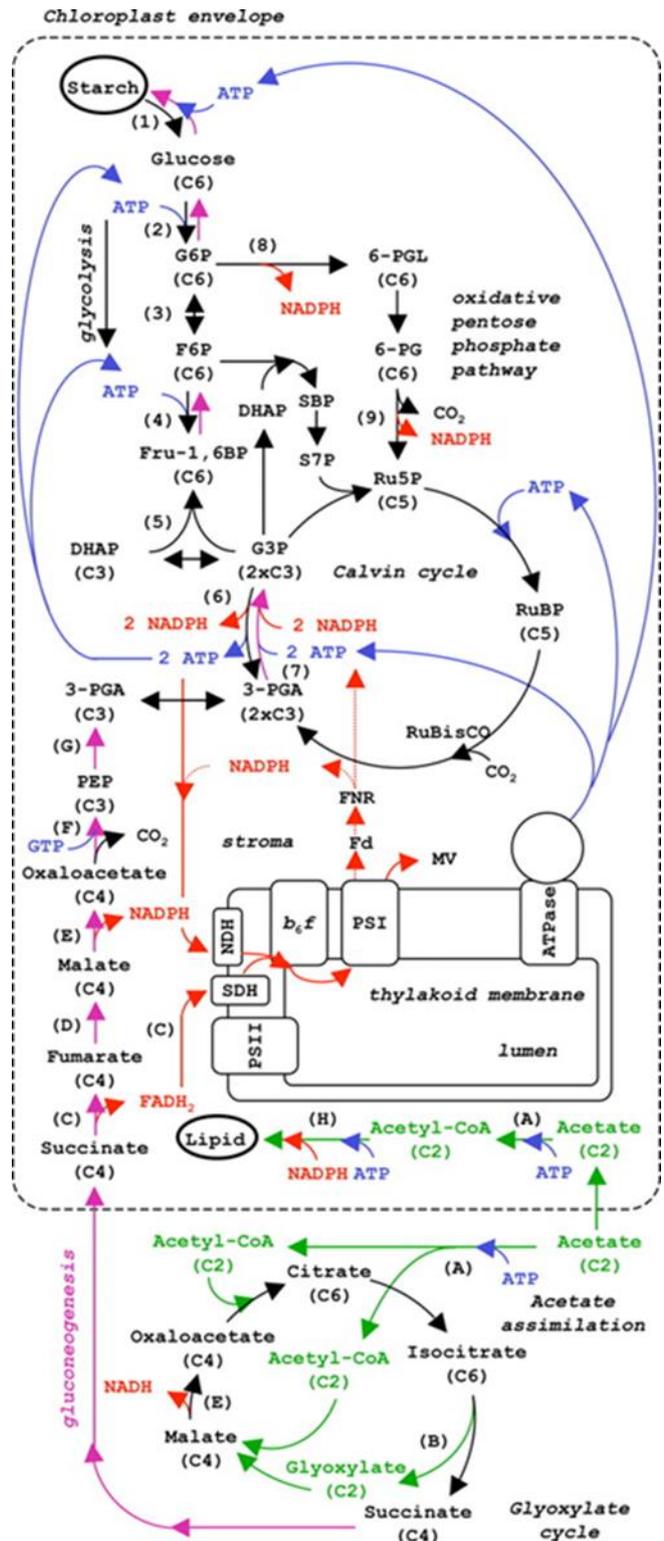


Figure 45 : Imagerie corrélative par nanoSIMS et TEM/X-EDS de la souche wt de *C. reinhardtii* exposée à  $70 \mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié où l'acétate est marqué au  $^{13}\text{C}$ . (A) Cartographies élémentaires du  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ , du  $^{31}\text{P}$  (source Cs<sup>+</sup>) et, du  $^{24}\text{Mg}$ , du  $^{40}\text{Ca}$ , du  $^{56}\text{Fe}$ , du  $^{63}\text{Cu}$  et du  $^{66}\text{Zn}$  (source Hypérior RF) par nanoSIMS. Le champ analysé de  $256 \times 256$  pixels mesure  $12 \mu\text{m}$  de côté avec un temps de comptage de 10 ms par pixel, la barre d'échelle représente  $2 \mu\text{m}$ . (B) Image TEM de la cellule, la barre d'échelle représente  $2 \mu\text{m}$ , les flèches blanches montrent les zones analysées par X-EDS. Légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrénoïde ; Th, thylakoïde ; V, vacuole ; VP, vacuole pulsatile. (C) Spectres X-EDS collectés sur les zones décrites en (B), le signal du cuivre et de l'osmium est dû au cuivre de la grille et l'osmium de la solution de contraste.

Figure 46 : Schéma simplifié des voies métaboliques chez *C. reinhardtii* (Johnson and Alric, 2013). Le flux d'électrons dans le stroma est représenté en rouge, celui d'ATP en bleu. L'assimilation de l'acétate est colorée en vert et la néoglucogénèse en violet. Les nombres entre parenthèse correspondent aux enzymes de la glycolyse : (1), amylase, phosphorylase ; (2), hexokinase ; (3), phosphoglucose isomerase ; (4), PFK ; (5), aldolase, triosephosphate isomerase ; (6), GAPDH ; (7), phosphoglycerate kinase (PGK). Les enzymes de la voie des pentoses phosphates sont : (8), G6P déshydrogénase ; (9), 6-phosphogluconate déshydrogénase. Les lettres correspondent aux enzymes de l'assimilation de l'acétate, du cycle du glyoxylate et des premières étapes de la néoglucogénèse : (A), acetyl-CoA synthase or acetate kinase and phosphate acetyl transferase ; (B), isocitrate lyase ; (C), succinate déshydrogénase (SDH) ; (D), fumarase ; (E), malate déshydrogénase (MDH) ; (F), PEP carboxykinase ; (G), enolase and phosphoglycerate-mutase. G3P, glyceraldehyde 3-phosphate ; 6-PG, 6-phosphogluconate ; Fd, ferredoxin ; FNR, ferredoxin NADP reductase ; NDH, NADPH déshydrogénase ; MV, methylviologen.



Ce résultat peut être expliqué par l'étude de (Nishikawa et al., 2003b) qui montre que les granules de polyphosphate vacuolaires sont hydrolysés en ortho-phosphates vacuolaires lorsque *C. acidophila* est exposée au cadmium. De plus, l'analyse XANES présentée en partie III.4.2 suggère que  $42 \pm 10$  % du cadmium serait lié à des ligands phosphatés.

### **Accumulation du carbone issu de l'assimilation de l'acétate dans l'amidon**

Le  $^{13}\text{C}$  provenant de l'assimilation de l'acétate est concentré dans l'amidon lorsque le wt est exposé à  $70 \mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié. Dans cette condition, le cadmium a été localisé dans le pyrénioïde par TEM/X-EDS et  $\mu\text{XRF}$  (voir III.3.2.1). Ainsi, la présence de cadmium dans le pyrénioïde perturberait la fixation du  $\text{CO}_2$ , ce qui favoriserait l'assimilation de l'acétate par la cellule. Les voies métaboliques impliquées dans l'assimilation du carbone depuis l'acétate jusqu'à l'amidon sont présentées en figure 46. L'acétate, une fois lié au coenzyme A, peut être métabolisé par le cycle du glyoxylate, produisant du succinate. Ce dernier sert alors de substrat à la néoglucogénèse ayant lieu dans le chloroplaste, aboutissant à la synthèse d'amidon (Johnson and Alric, 2013).

### **Accumulation du carbone issu de l'assimilation de l'acétate dans le pyrénioïde**

Le pyrénioïde est également riche en  $^{13}\text{C}$  bien que de façon moins prononcée par rapport à l'amidon. L'accumulation du carbone issu de l'acétate dans le pyrénioïde peut être expliquée par une diminution de l'activité de carboxylation de la Rubisco par le cadmium, limitant la fixation du  $\text{CO}_2$  formé à partir de l'acétate. En effet, dans le cytosol, l'acétate est lié au coenzyme A par l'acétylCoA synthase pour former l'acétylCoA (figure 46). Une partie de cet acétylCoA est métabolisé dans le cycle de Krebs se déroulant dans la matrice de la mitochondrie (Johnson and Alric, 2013). Après deux tours de cycle de Krebs, les carbones de l'acétate ont été transférés sur les molécules de  $\text{CO}_2$  qui sont libérés dans la mitochondrie (Singh et al., 2014). Le  $\text{CO}_2$  mitochondrial va alors être transféré vers le pyrénioïde par l'intermédiaire du mécanisme de concentration du  $\text{CO}_2$  (CCM).

Lorsque *C. reinhardtii* est confrontée à de faibles concentrations en  $\text{CO}_2$  dissout, elle met en place le mécanisme de concentration du  $\text{CO}_2$ , afin de maintenir la Rubisco en présence de  $\text{CO}_2$  dans le pyrénioïde. Le CCM est présenté en figure 47. Le  $\text{CO}_2$  pénètre dans la cellule de manière passive. Le bicarbonate, plus abondant dans

### Chapitre III : résultats et discussion

l'environnement aquatique, ne peut pénétrer à l'intérieur de la cellule que par transport actif car les membranes cellulaires lui sont imperméables. En condition de faible concentration en CO<sub>2</sub> dissout, les anhydrases carbonique extracellulaires Cah1 et Cah8 (Moroney et al., 2011) régule la quantité de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> extracellulaire qui pénètre dans le cytosol par les transporteurs de carbone inorganique : High Light-Activated 3 (HLA3) (Im and Grossman, 2002) et Low-CO<sub>2</sub> inducible 1 (LCI1) (Burow et al., 1996). A l'intérieur de la mitochondrie, les anhydrases carboniques 4 et 5 (Cah4/5) convertissent le CO<sub>2</sub> provenant du cycle de Krebs en bicarbonate qui va rejoindre le pool de bicarbonate cytosolique (Raven, 2001). Dans le cytosol, le pool de bicarbonate est maintenu par la Cah9 (Moroney et al., 2011). Le bicarbonate cytosolique pénètre dans le stroma du chloroplaste par l'intermédiaire des transporteurs de carbone inorganique : LCIA (Miura et al., 2004), Chloroplast Carrier Protein 1 et 2 (CCP1 / CCP2) (Pollock et al., 2004). Dans le stroma, la Cah6 (Moroney et al., 2011) convertit le CO<sub>2</sub> en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> qui est transporté dans les thylakoïdes. Enfin, la Cah3 (Moroney et al., 2011) présente dans le lumen des thylakoïdes convertit le bicarbonate en CO<sub>2</sub> qui va diffuser dans le pyrénôïde et restera piégé grâce au complexe protéique LCIB/LCIC par un mécanisme encore inconnu (Yamano et al., 2010). En présence de cadmium, la perturbation de l'assimilation du CO<sub>2</sub> par la Rubisco provoquerait ainsi l'accumulation du CO<sub>2</sub> dans le pyrénôïde.

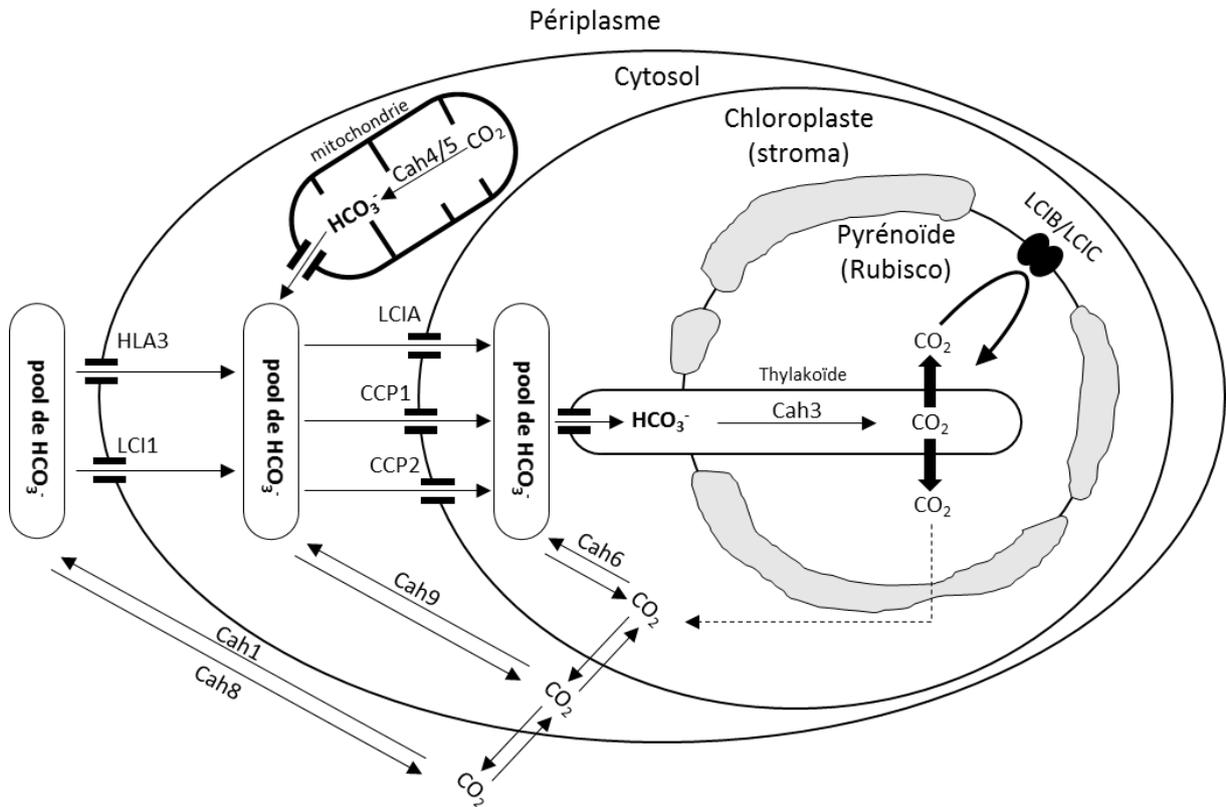


Figure 47 : Modèle hypothétique du mécanisme de concentration du  $\text{CO}_2$  chez *C. reinhardtii* adapté de (Meyer and Griffiths, 2013). Les anhydrases carboniques 1, 3, 4, 5, 6, 8 et 9 convertissent le  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCO}_3^-$  et inversement. HLA3, LCI1, LCIA, CCP1 et CCP2 sont des transporteurs de carbone inorganique

L'imagerie corrélative TEM / X-EDS / nanoSIMS a montré que le cadmium était localisé dans le pyrénoïde lorsque le wt était exposé à  $70 \mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié. De plus, étant donné que :

- Le  $^{13}\text{C}$  provenant de l'acétate est accumulé dans l'amidon
- Le  $^{13}\text{CO}_2$  issu de la métabolisation de l'acétate par le cycle de Krebs est accumulé dans le pyrénoïde

Il apparaît alors que le cadmium fait diminuer l'assimilation du  $\text{CO}_2$ .



## 6. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES METAUX ESSENTIELS

La première partie du chapitre « résultats et discussion » traitait de la variation des concentrations en métaux essentiels sous forme ionique libre suivant la quantité de cadmium ajouté au milieu de culture. Il a été montré que l'ajout de quantités croissantes de cadmium dans le milieu TAP classique provoquait l'augmentation de la concentration en  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Co^{2+}$ , ce qui pourrait modifier leur assimilation.

Le dosage des métaux intracellulaires a été réalisé chez les trois souches afin de mettre en évidence l'impact de l'exposition au cadmium sur l'assimilation des métaux essentiels. Puis, les métaux ont été localisés au niveau subcellulaire par imagerie élémentaire nanoSIMS.

### 6.1. Impact du cadmium sur l'assimilation des métaux essentiels

Les souches wt, pcs1 et cw15 ont été exposée à 10 et 70  $\mu M$  de cadmium pendant 48 heures en milieu TAP classique et modifié. La teneur en fer, manganèse, cuivre, zinc, cobalt et molybdène a été mesurée dans la biomasse algale. Les résultats des dosages sont présentés en figure 48 et seront comparés aux concentrations en ions libres des métaux (part disponible) référencées dans la table 14.

Table 14 : Concentrations en ions libres des métaux présents dans les milieux TAP classique et modifié contaminés par 10 et 70  $\mu M$  de cadmium, calculées avec Visual Minteq.

	Milieu TAP classique			Milieu TAP modifié		
	témoin	10 $\mu M$	70 $\mu M$	témoin	10 $\mu M$	70 $\mu M$
[Cd total]						
[Fe <sup>2+</sup> libre] ( $\mu M$ )	0,239	1,027	7,592	-	-	-
[Fe <sup>3+</sup> libre] ( $\mu M$ )	-	-	-	0,007	0,007	0,007
[Mn <sup>2+</sup> libre] ( $\mu M$ )	0,946	3,663	14,932	15,366	15,375	15,427
[Cu <sup>2+</sup> libre] ( $\mu M$ )	$3 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$
[Zn <sup>2+</sup> libre] ( $\mu M$ )	0,012	0,057	5,190	34,241	34,254	34,328
[Co <sup>2+</sup> libre] ( $\mu M$ )	$7 \times 10^{-4}$	0,004	0,346	4,303	4,304	4,312
[MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> libre] ( $\mu M$ )	5,460	5,458	5,458	5,455	5,455	5,454
[Cd <sup>2+</sup> libre] ( $\mu M$ )	-	0,006	3,671	-	3,010	21,147

6.1.1. En milieu TAP classique

Globalement, en milieu TAP classique témoin, les trois souches de *C. reinhardtii* présente une assimilation similaire des métaux essentiels. Ces derniers peuvent être classés en 3 groupes selon l'ordre de grandeur de leur concentration intracellulaire :

- le fer est accumulé de manière importante (teneur > 275  $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
- le manganèse, le cuivre et le zinc sont accumulés dans des teneurs de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (entre 20 et 50  $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
- le cobalt et le molybdène sont présents en faible quantité dans les cellules de *C. reinhardtii* (teneur < 1  $\mu\text{g.g}^{-1}$ )

Exposées à des quantités de cadmium de plus en plus fortes, les souches wt et cw15 accumulent des quantités plus importantes de manganèse, de cuivre, de zinc et de cobalt, ce qui peut être expliqué par l'augmentation de la disponibilité de ces métaux (voir table 13). L'hypothèse d'une compétition entre le zinc, le cuivre et le cadmium au niveau des sites de fixation impliqués dans leur assimilation peut être envisagée. En effet, il a été suggéré que le zinc et le cadmium partageaient les mêmes transporteurs (Lavoie et al., 2012). De même, la présence de 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  provoque la diminution de l'accumulation de cadmium par une hypothétique compétitivité (Hutchins et al., 2010).

Les cellules exposées à 10  $\mu\text{M}$  de cadmium présentent une accumulation du fer et du molybdène plus importante que dans les deux autres conditions de culture. La disponibilité du fer et du molybdène ne semblant pas intervenir dans l'assimilation de ces deux métaux, l'induction de leur accumulation par la présence d'une faible quantité de cadmium paraît être l'hypothèse la plus probable. En 2002, Rubinelli et al. ont étudié la réponse transcriptionnelle au stress induit par 20  $\mu\text{M}$  de cadmium par affichage différentiel des ARNm. Il est apparu que l'exposition au cadmium induisait l'expression du gène H43 suspectée d'intervenir lorsque *C. reinhardtii* présentait une carence en fer.

Le cadmium influence uniquement l'assimilation du manganèse et du cobalt de la souche pcs1 cultivée en milieu TAP classique, qui est multipliée par 4 lorsque les cellules sont exposées à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium. Ceci peut être expliqué par l'augmentation de la disponibilité du Mn et du Co (table 13). La stabilité de l'assimilation des autres métaux malgré l'augmentation de leur disponibilité pourrait jouer un rôle

dans la tolérance de cette souche vis-à-vis du cadmium (voir l'étude de toxicité en partie III.2.2.1).

### 6.1.2. En milieu TAP modifié

En milieu TAP modifié, la fraction de métaux libres est bien plus importante que dans le milieu TAP classique, excepté pour le Fer, mais elles ne varient pas lors de l'ajout de cadmium. En condition témoin, la teneur en fer du wt ( $169 \pm 11 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) est inférieure à celle mesurée dans les cellules cultivée en milieu TAP classique témoin ( $379 \pm 49 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), ce qui est en accord avec la disponibilité moins élevée du fer en milieu TAP modifié. A l'inverse, les teneurs du wt en zinc ( $446 \pm 33 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) et cobalt ( $15 \pm 1 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) ont été accentuées suite à l'augmentation de la disponibilité en zinc et cobalt engendrée par la modification du milieu TAP (table 11). Enfin, l'assimilation du manganèse, du cuivre et du molybdène par les cellules wt en milieu TAP modifié témoin est similaire à celle mesurée chez les cellules exposées à  $70 \mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique, car ces deux conditions de cultures présentent des concentrations en  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{MoO}_4^{2-}$  libres similaires.

Lors de l'exposition des cellules wt à des concentrations en cadmium croissante, il est attendu que la teneur en métaux ne varie pas, conformément à la disponibilité des métaux dans le milieu TAP modifié. Cela n'est vérifié que pour le zinc, dont la teneur reste stable malgré l'ajout de cadmium, ainsi que pour le manganèse qui est cependant légèrement moins assimilé en condition d'exposition à  $70 \mu\text{M}$  de cadmium. Les autres métaux essentiels sont accumulés de façon croissante avec l'augmentation de la concentration d'exposition au cadmium.

En milieu TAP modifié contaminé par  $70 \mu\text{M}$  de cadmium, l'accumulation importante du cadmium ( $1505 \pm 49 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) par le wt semble provoquer l'augmentation de l'assimilation du fer, du cuivre, du cobalt et du molybdène. La haute teneur en fer est probablement due à l'induction par la cadmium d'un mécanisme d'assimilation du fer (Rubinelli et al., 2002). De même, la forte accumulation des 3 autres métaux semble plus correspondre à l'induction par le cadmium de leur assimilation plutôt qu'à une compétitivité entre le cuivre, le cobalt, le molybdène et le cadmium, pour des transporteurs communs.

## Chapitre III : résultats et discussion

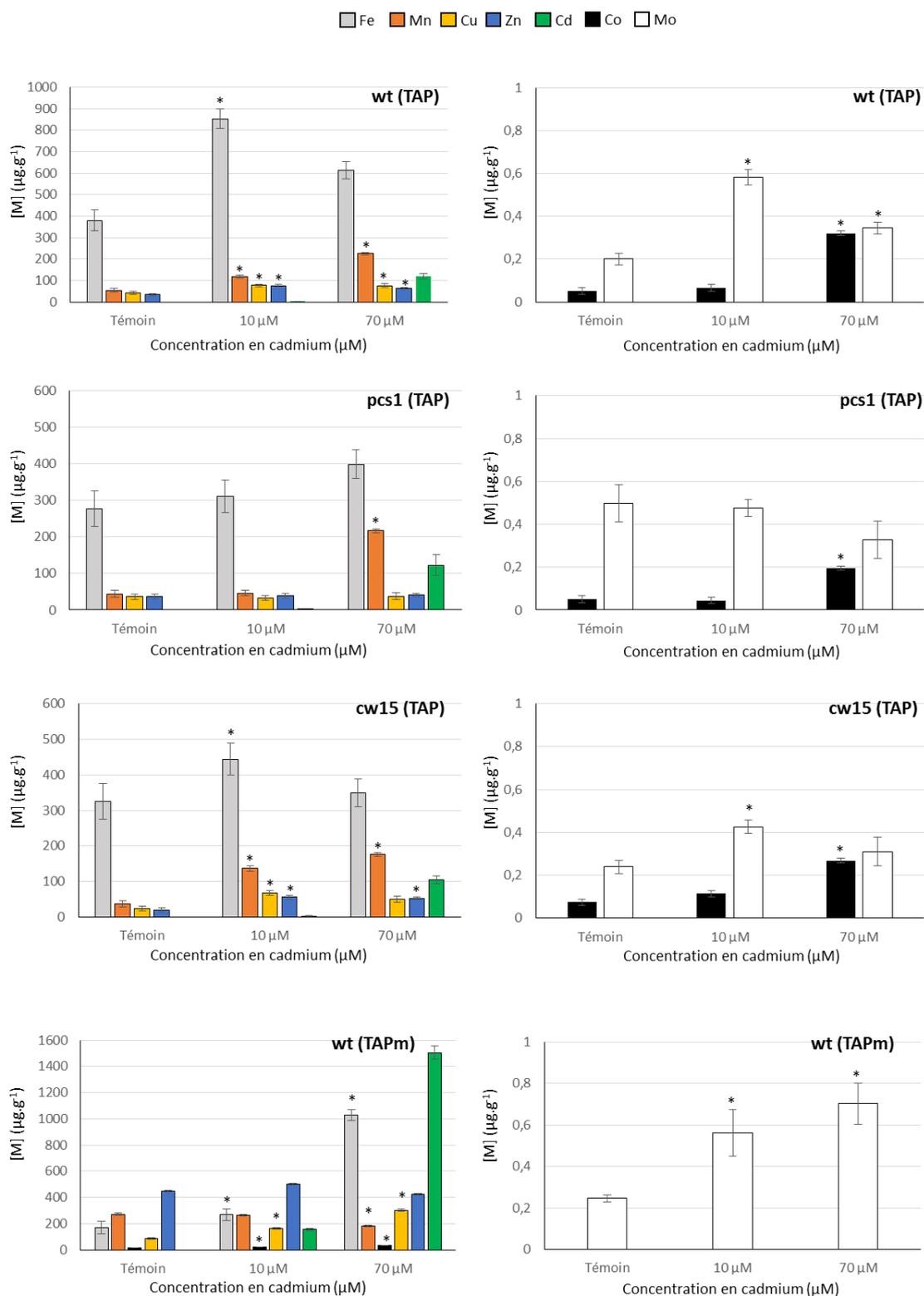


Figure 48 : Teneurs en métaux essentiels des souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii* exposée à 10 et 70 µM de cadmium pendant 48 heures en milieu TAP classique et modifié. Les métaux analysés sont : le fer (gris), le manganèse (orange), le cuivre (jaune), le zinc (bleu), le cadmium (vert), le cobalt (noir) et le molybdène (blanc). Les différences statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) avec les conditions témoin sont marquées par un \* ( $n=3$ ).

## 6.2. Localisation subcellulaires des métaux essentiels par imagerie nanoSIMS

Les cartographies nanoSIMS du  $^{31}\text{P}$ , du  $^{24}\text{Mg}$ , du  $^{40}\text{Ca}$ , du  $^{56}\text{Fe}$ , du  $^{63}\text{Cu}$  et du  $^{66}\text{Zn}$  présentées en partie III.5. n'étaient pas assez détaillées pour déterminer précisément la localisation subcellulaire de ces métaux en dehors des granules de polyphosphate, en raison du faible signal fourni lors de l'acquisition d'un seul scan avec la source Hypérion O<sup>-</sup> RF. L'imagerie corrélative TEM / nanoSIMS a donc été réalisée sur des cellules wt et pcs1, exposées ou non au cadmium dans l'unique but de localiser  $^{31}\text{P}$ ,  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{66}\text{Zn}$  dans la structure cellulaire en sommant plusieurs scans d'une même zone. Les résultats sont présentés en figures 49 et 50.

La souche wt cultivée en milieu TAP modifié témoin présente une colocalisation des 5 éléments dans les vacuoles et non plus uniquement dans les granules (voir partie III.5.). Cela est dû à la meilleure sensibilité obtenue avec l'accumulation de plusieurs scans. Le  $^{31}\text{P}$  est détecté au niveau de l'ADN présent dans le noyau et est également co-localisé avec le  $^{40}\text{Ca}$  et le  $^{66}\text{Zn}$  de manière diffuse dans le cytosol. Le  $^{56}\text{Fe}$  est concentré au niveau du chloroplaste et le  $^{63}\text{Cu}$  est réparti dans toute la cellule de manière diffuse.

La souche pcs1 (figure 50) exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique montre la même localisation subcellulaire de  $^{31}\text{P}$ ,  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{66}\text{Zn}$  que la souche wt non exposée (figure 52). Les 5 éléments sont co-localisés dans les granules de polyphosphates. Le  $^{31}\text{P}$  est localisé dans le noyau en position centrale ainsi que dans le cytosol. Le  $^{40}\text{Ca}$  est situé dans le cytosol et au niveau de l'amidon entourant le pyrénioïde, marqué par un spot de soufre. Le  $^{66}\text{Zn}$  est localisé dans le cytosol tandis que le fer est concentré dans le chloroplaste qui est positionné en bordure de cellule, contre la paroi cellulaire. Enfin, le  $^{63}\text{Cu}$  est contenu dans toute la cellule de manière homogène.

La localisation du fer est probablement due aux protéines à cœur fer-soufre impliquées dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse (complexe des cytochromes, ferrédoxines). Les ferrédoxines sont également impliquées dans la régulation de l'activité des enzymes du cycle de Calvin, ayant lieu dans le chloroplaste.

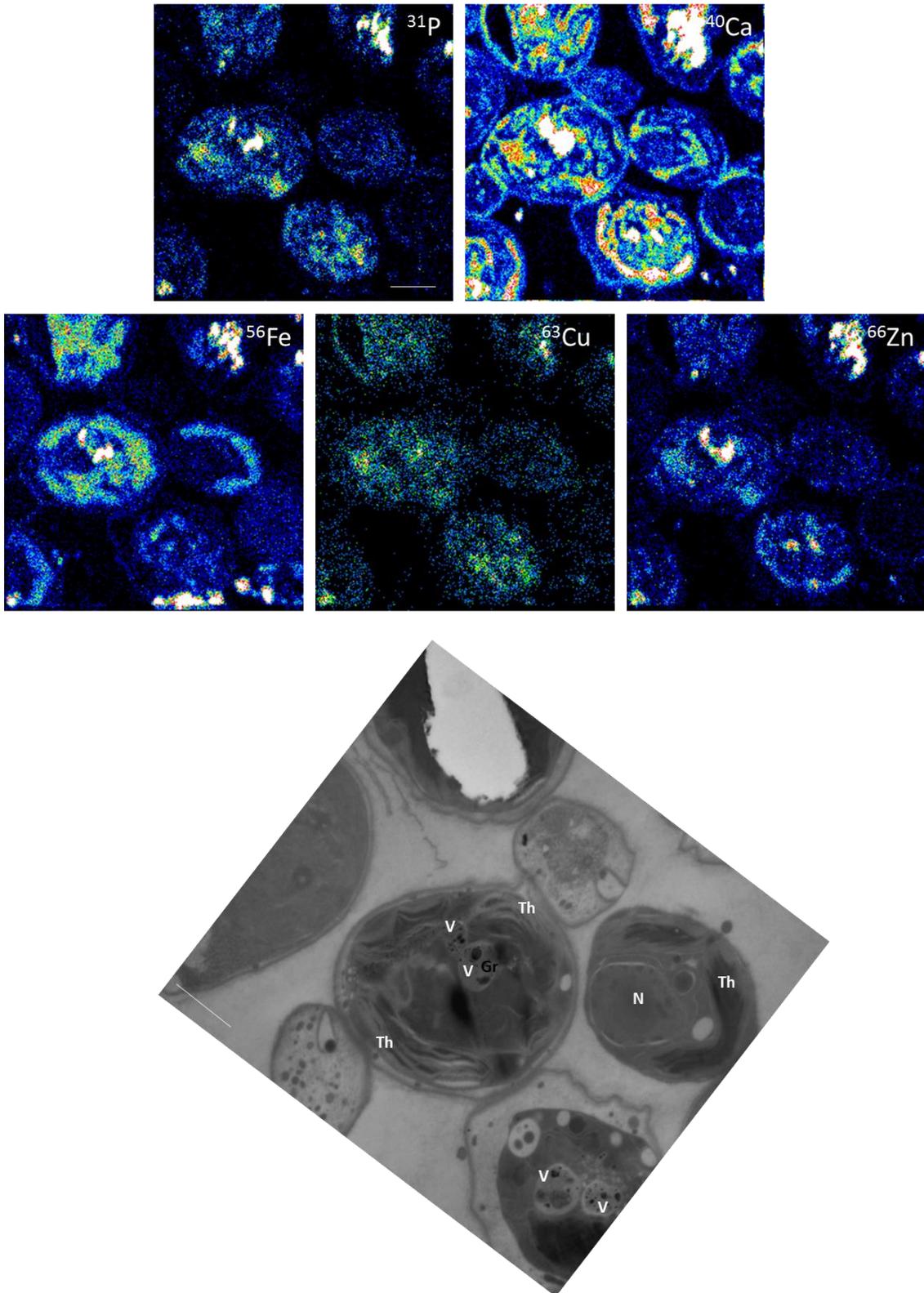


Figure 49 : Localisation subcellulaire des métaux essentiels par imagerie corrélative TEM / nanoSIMS de la souche wt de *C. reinhardtii* cultivée en milieu TAP modifié. Cartographies élémentaires du  $^{31}\text{P}$ , du  $^{40}\text{Ca}$ , du  $^{56}\text{Fe}$ , du  $^{63}\text{Cu}$  et du  $^{66}\text{Zn}$  (source Hypériorion O<sup>-</sup> RF) par nanoSIMS. Le champ analysé de 256x256 pixels mesure 13  $\mu\text{m}$  de côté avec un temps de comptage de 15 ms par pixel, chaque cartographie est la somme de 15 scans, barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$ . (B) Image TEM correspondant aux cellules observées par nanoSIMS, la barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$ , légende : Gr, granule ; N, noyau ; Th, thylakoïde ; V, vacuole.

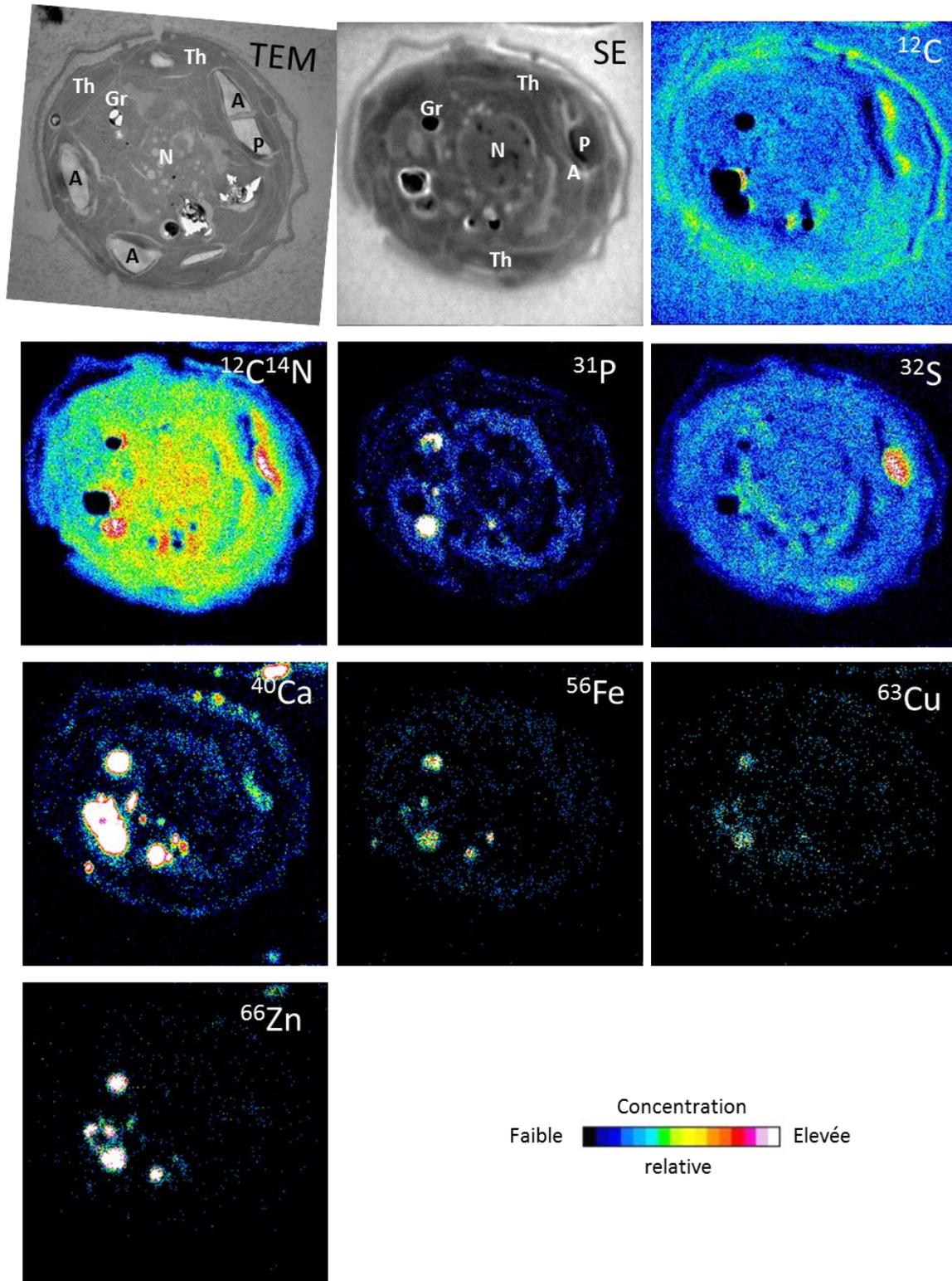


Figure 50 : Localisation subcellulaire des métaux essentiels par imagerie corrélative TEM / nanoSIMS de la souche pcs1 de *C. reinhardtii* exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique. Cartographies élémentaires du  $^{12}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ , du  $^{31}\text{P}$ , du  $^{32}\text{S}$  et électrons secondaires (SE) (source  $\text{Cs}^+$ ) et du  $^{40}\text{Ca}$ , du  $^{56}\text{Fe}$ , du  $^{63}\text{Cu}$  et du  $^{66}\text{Zn}$  (source Hypériorion O<sup>-</sup> RF) par nanoSIMS. Le champ de 256x256 pixels analysé à l'aide de la source  $\text{Cs}^+$  mesure 8  $\mu\text{m}$  de côté avec un temps de comptage de 5 ms par pixel et est issu d'un scan unique. Le champ de 256x256 pixels analysé à l'aide de la source Hypériorion O<sup>-</sup> RF mesure 8  $\mu\text{m}$  de côté avec un temps de comptage de 10 ms par pixel et représente la somme de 4 scans, barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$ . (B) Image TEM correspondant à la cellule observée par nanoSIMS, la barre d'échelle représente 2  $\mu\text{m}$ , légende : A, amidon ; Gr, granule ; N, noyau ; P, pyrénoloïde ; Th, thylakoïde.

Le dosage des métaux intracellulaires a permis de montrer que l'exposition de *C. reinhardtii* au cadmium provoquait une modification dans l'assimilation des métaux essentiels pour deux raisons :

- En milieu TAP classique, l'ajout de cadmium augmente la disponibilité des autres métaux en entrant en compétition avec eux dans la formation de complexes avec l'EDTA. L'assimilation du Mn, du Zn, du Cu et du Co est alors augmentée.
- En milieu TAP modifié, le remplacement de l'EDTA par l'EDDHA permet de maintenir les concentrations en métaux libres constantes malgré l'ajout de cadmium. Pourtant, l'assimilation du Fe, Cu, Co et Mo augmente lorsque les cellules sont exposées à des concentrations croissantes en cadmium. Les modifications dans l'assimilation de ces métaux ne peuvent être expliquées que par un mécanisme biologique induit par la forte accumulation en cadmium dans les cellules.

L'imagerie corrélative par TEM / nanoSIMS a permis de localiser au niveau subcellulaire phosphore, calcium, fer, cuivre et zinc :

- Les 5 éléments sont colocalisés dans les granules de polyphosphate
- P, Ca, et Zn sont co-localisés dans le cytoplasme de manière diffuse
- P est localisé dans le noyau au niveau de l'ADN
- Ca est concentré au niveau de l'amidon qui entoure le pyrénioïde
- Fe est majoritairement situé dans le chloroplaste
- Cu est réparti uniformément dans toute la cellule

# **CONCLUSION GENERALE**



## CONCLUSION GENERALE

Ce travail visait à mettre en évidence les mécanismes de tolérance mis en œuvre par la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* afin de réduire le stress métallique induit par le cadmium. Trois souches de *C. reinhardtii* ont été exposées au cadmium en condition mixotrophe (CO<sub>2</sub> + Acétate) dans le milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP). Une souche de type sauvage a été utilisée en tant que souche témoin. La souche cell-wall less (cw15) a été choisie pour sa déficience en paroi cellulaire. La souche pcs1 surexprime la phytochélatine synthase (PCS) directement dans son chloroplaste a été sélectionnée car elle pourrait potentiellement protéger ses photosystèmes de l'impact toxique du cadmium.

Les objectifs de ce travail consistaient à :

- Etablir un bilan toxicologique par la mesure de paramètres physiologiques impactés par le cadmium (croissance cellulaire, teneur en chlorophylle et en amidon) ainsi que par le dosage de l'accumulation du cadmium.
- Localiser le cadmium au niveau subcellulaire
- Déterminer la spéciation chimique *in situ* du cadmium
- Déterminer l'effet du cadmium sur l'assimilation du carbone et des métaux essentiels

L'étude toxicologique a permis de sélectionner deux concentrations d'exposition au cadmium, 10 µM (< CE<sub>5</sub>) et 70 µM (≈ CE<sub>50</sub>), en cultivant la souche wt en milieu TAP modifié où l'EDTA présent en milieu TAP classique a été remplacé par l'EDDHA, dans le but d'augmenter la disponibilité du cadmium. De plus, la tolérance des trois souches vis-à-vis du cadmium a pu être comparée.

La localisation du cadmium au niveau subcellulaire a été réalisée par une approche multi techniques et multi-échelles. A l'échelle de la culture, le fractionnement subcellulaire a permis la localisation globale du cadmium dans des compartiments cellulaires spécifiques, isolés à partir de la biomasse algale. L'implication d'une lyse cellulaire dans le protocole de fractionnement a pu introduire des biais de redistribution des métaux. Les informations apportées par cette technique ont donc nécessité d'être complétées par des analyses *in situ*.

## Conclusion générale

A l'échelle de la cellule, l'utilisation de techniques d'imagerie élémentaire complémentaires a permis de localiser les métaux dans l'ultrastructure de *C. reinhardtii* et de mettre en évidence des associations élémentaires. La distribution subcellulaire du cadmium a été déterminée par microscopie électronique à transmission couplée à la micro-analyse X (TEM/X-EDS) (haute résolution spatiale) ainsi que par micro-fluorescence X sur rayonnement synchrotron ( $\mu$ XRF) qui possède une limite de détection beaucoup plus basse que celle du TEM/X-EDS. L'imagerie isotopique par nano spectrométrie de masse à ionisation secondaire (nanoSIMS) n'a pas permis de détecter le cadmium malgré le développement récent d'une nouvelle source d'ion  $O^-$  plus performante. Néanmoins, l'imagerie corrélative entre les cartographies nanoSIMS et les données TEM/X-EDS a donné la possibilité d'étudier l'impact du cadmium sur l'assimilation du carbone et des métaux essentiels à *C. reinhardtii*. Un inconvénient des techniques d'imagerie réside dans la représentativité des co-localisations élémentaires identifiées. Il convient alors de comparer ces informations avec des analyses de spéciation chimique.

La spéciation chimique du cadmium a été étudiée *in situ* par spectroscopie d'absorption X sur rayonnement synchrotron. Cette technique donne accès à la spéciation chimique moyenne de l'élément étudié dans le volume de l'échantillon analysé. Dans le cas de ce travail, le cadmium intracellulaire était présent en concentration proche de la limite de détection du XAS dans une matrice biologique de composition élémentaire hétérogène, ce qui a rendu difficile l'interprétation du signal obtenu. Cependant, la nature des ligands du cadmium a pu être déterminée par simulation par combinaison linéaire de composés de référence. Les analyses XAS ont été réalisées au niveau de la culture ainsi qu'au niveau subcellulaire ( $\mu$ XAS), dans les zones riches en cadmium repérées sur les cartographies  $\mu$ XRF.

A partir des études toxicologiques, de la localisation subcellulaire et de la spéciation chimique du cadmium, il a été montré que chaque souche de *C. reinhardtii* adoptait une stratégie de séquestration du cadmium différente, conférant une tolérance au stress métallique induit par le Cd plus ou moins efficace. Ces stratégies sont détaillées dans les paragraphes suivants.

## Conclusion générale

### **Souche de type sauvage**

La souche de type sauvage (wt) est la souche témoin de ce travail. Les mécanismes de tolérance au cadmium mis en place par cette souche sont présentés schématiquement en figure 51.

Premièrement, le wt possède une paroi cellulaire qui remplit le rôle de première barrière de protection contre le stress induit par le cadmium. Une partie du cadmium disponible du milieu de culture est immobilisée en s'adsorbant à la paroi cellulaire.

Exposé à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique, le wt ne présente pas de signes de toxicité en raison de la faible disponibilité du cadmium (3,671  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ). Dans cette condition, chez la micro-algue, le cadmium est majoritairement associé à des ligands soufre ( $87 \pm 10 \%$ ) qui appartiennent probablement à des phytochélatines, dans la globalité de la cellule. De manière minoritaire, le cadmium est localement séquestré par les granules de polyphosphate ( $13 \pm 10 \%$ ) pouvant être contenues dans les acidocalcisomes (Ruiz et al., 2001). Ces derniers sont des vacuoles acides de diamètre inférieur au micron impliquées dans le stockage des phosphates.

Exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium (21,147  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ) en milieu TAP modifié, la souche wt est la plus sensible au stress métallique des 3 souches. Elle montre d'importants signes de toxicité avec un taux de croissance réduit de 50 % et une teneur en chlorophylle diminuée de 24 % par rapport à la condition témoin. De plus, la production d'amidon est doublée, ce qui est un signe de stress observé chez les micro-algues synthétisant une grande quantité de phytochélatines (Nishikawa et al., 2006). Au niveau subcellulaire, le cadmium est principalement localisé dans le chloroplaste et dans des vacuoles. Globalement, il est majoritairement associé à des ligands oxygène, notamment aux phosphates observés dans des vacuoles ( $42\% \pm 10 \%$ ) et à des carboxyles ( $30\% \pm 10 \%$ ), ce qui pourrait être le signe d'un fort stress oxydatif. Le cadmium est également concentré à l'intérieur du pyrénnoïde dont la structure a été altérée. Il en résulte une production anarchique d'amidon, réparti sous forme de granules dans le chloroplaste. De plus, au niveau du pyrénnoïde, le cadmium semble bloquer l'assimilation du  $\text{CO}_2$  par la Rubisco en se liant à des groupements thiols, favorisant l'assimilation de l'acétate. En effet, la régulation du cycle de Calvin fait intervenir le système ferrédoxine/thiorédoxine qui module l'état redox des enzymes grâce à leurs résidus cystéine.

## Conclusion générale

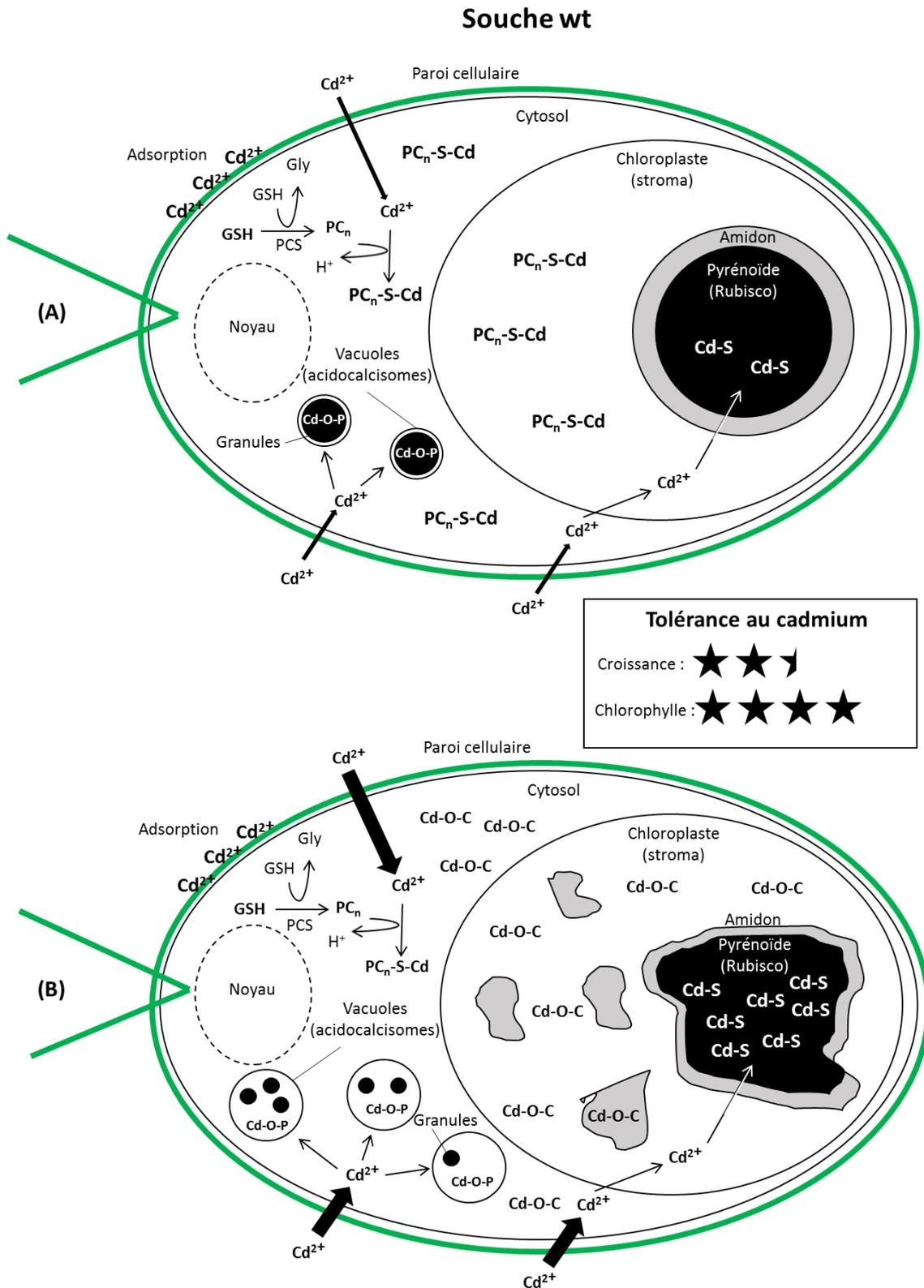


Figure 51 : Stratégie de séquestration du cadmium mise en place par la souche wt de *C. reinhardtii*, exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique (A) et modifié (B). Légende : GSH, glutathion ; Gly, glycine ;  $\text{PC}_n$ , phytochélatine ; PCS, phytochélatine synthase, Cd-O-C, complexe Cd-carboxyle ; Cd-O-P, complexe Cd-phosphate ; Cd-S, complexe Cd-thiol. L'amidon est coloré en gris et le pyrénoloïde en noir. L'épaisseur des flèches montrant l'entrée du  $\text{Cd}^{2+}$  varie en fonction de l'accumulation. La tolérance au cadmium mesurée en milieu TAP modifié contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd par le taux de croissance et la teneur en chlorophylle est notée sur 5 étoiles.

## Conclusion générale

### Souche pcs1

La souche pcs1 surexprime la phytochélatine synthase dans son chloroplaste. Cette capacité pourrait assurer la protection des photosystèmes du stress lié au cadmium, constaté par Faller et al., 2005. Les mécanismes de tolérance contre le cadmium mis en place par cette souche sont présentés schématiquement en figure 52.

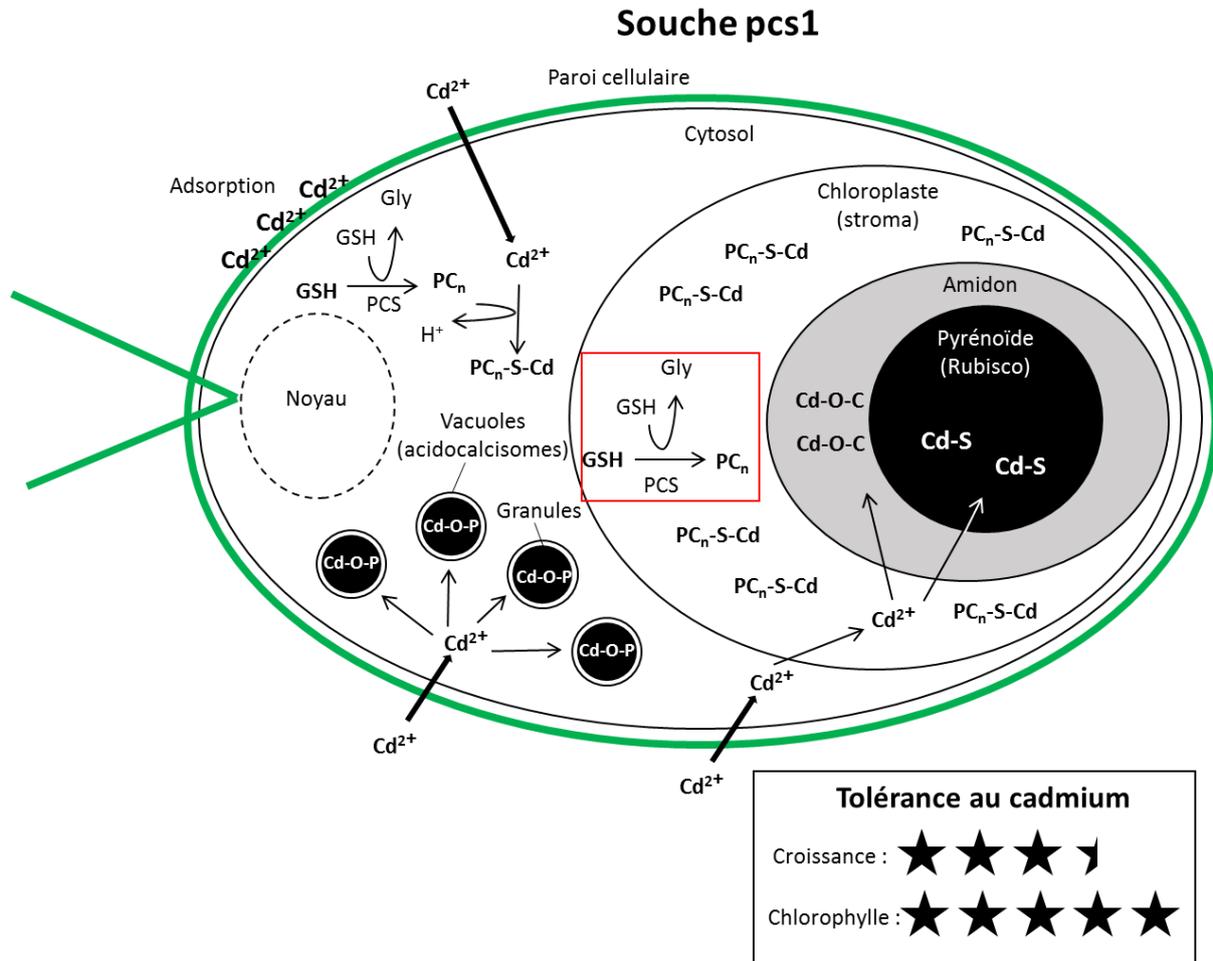


Figure 52 : Stratégie de séquestration du cadmium mise en place par la souche pcs1 de *C. reinhardtii* exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique. La surexpression de la phytochélatine synthase dans le chloroplaste entraîne une production de phytochélatines chloroplastiques qui est encadrée en rouge. Légende : GSH, glutathion ; Gly, glycine ; PC<sub>n</sub>, phytochélatine ; PCS, phytochélatine synthase, Cd-O-C, complexe Cd-carboxyle ; Cd-O-P, complexe Cd-phosphate ; Cd-S, complexe Cd-thiol. L'amidon est coloré en gris et le pyrénoïde en noir. La tolérance au cadmium mesurée en milieu TAP modifié contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd par le taux de croissance et le teneur en chlorophylle est notée sur 5 étoiles.

A l'instar du wt, la souche pcs1 possède une paroi cellulaire qui ne favorise pas l'entrée du Cd<sup>2+</sup>. Lorsqu'elle est exposée à 70  $\mu\text{M}$  de Cd en milieu TAP modifié, la croissance cellulaire est diminuée de 30 % mais la teneur en chlorophylle reste stable. Cela

## Conclusion générale

montre que la surexpression de la PCS dans le chloroplaste protège bien l'appareil photosynthétique du stress lié au cadmium.

La production d'amidon de cette souche est deux fois plus importante que celle du wt et n'est pas impactée par l'exposition au cadmium. Au niveau subcellulaire, cela se traduit par la formation d'une épaisse carapace d'amidon autour du pyrénôïde. Exposée à 70  $\mu\text{M}$  de Cd en milieu classique, la souche pcs1 ne présente pas de signes de toxicité. Malgré la surexpression de la PCS, seulement  $58 \pm 10 \%$  du cadmium est complexé par des ligands soufre, potentiellement des phytochélatines, au niveau du chloroplaste. Le reste du cadmium intracellulaire est séquestré à  $28 \pm 10 \%$  dans les granules de polyphosphate potentiellement des acidocalcisomes et à  $14 \pm 10 \%$  par des ligands carboxyles pouvant correspondre à l'amidon.

### **Souche cw15**

La souche cw15 est déficiente en paroi cellulaire mais excrète les granules de polyphosphate (Komine et al., 1996). Les mécanismes de tolérance contre le cadmium mis en place par cette souche sont présentés schématiquement en figure 53.

Contrairement au wt qui possède une paroi cellulaire normale, la souche cw15 ne prélève pas tout le  $\text{Cd}^{2+}$  libre dans le milieu TAP classique, ce qui se traduit par une accumulation en cadmium plus faible. Exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP modifié, cw15 ne présente pas de signes de toxicité. Dans ce travail, elle est la souche testée la plus tolérante au cadmium.

Des granules de polyphosphates ont été observées à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, confirmant la capacité d'excrétion des granules. Le cadmium intracellulaire est lié majoritairement à des ligands soufre, potentiellement des phytochélatines mais il a été localisé dans les granules de polyphosphates potentiellement des acidocalcisomes et le pyrénôïde. L'hypothèse de l'excrétion du cadmium via les granules de polyphosphates pourrait expliquer la faible concentration en cadmium intracellulaire constatée.

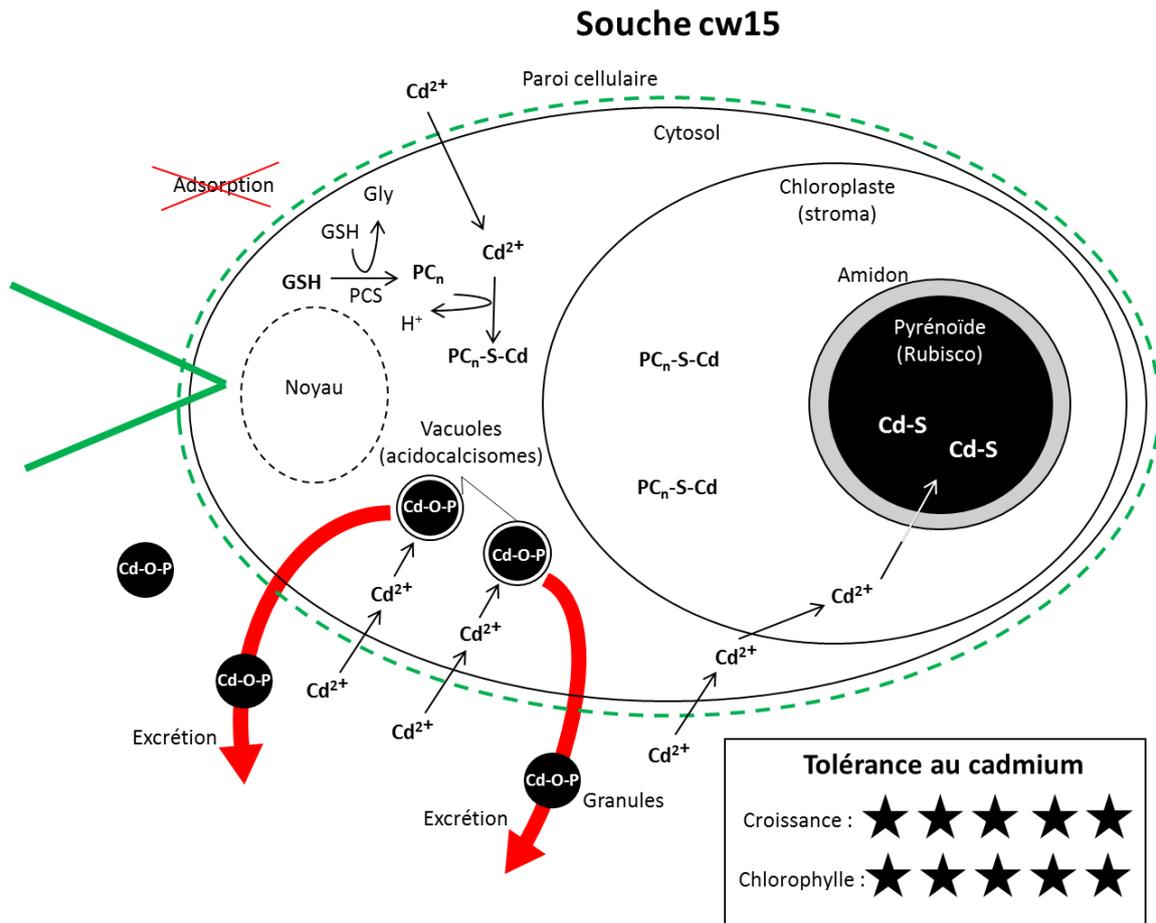


Figure 53 : Stratégie de séquestration du cadmium mise en place par la souche cw15 de *C. reinhardtii* exposée à 70  $\mu\text{M}$  de cadmium en milieu TAP classique. Cette souche est déficiente en paroi cellulaire et elle excrète des granules de polyphosphate. Légende : GSH, glutathion ; Gly, glycine ; PC<sub>n</sub>, phytochélatine ; PCS, phytochélatine synthase, Cd-O-C, complexe Cd-carboxyle ; Cd-O-P, complexe Cd-phosphate ; Cd-S, complexe Cd-thiol. L'amidon est coloré en gris et le pyrénioïde en noir. La tolérance au cadmium mesurée en milieu TAP modifié contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd par le taux de croissance et le teneur en chlorophylle est notée sur 5 étoiles.

En résumé, les trois souches de *C. reinhardtii* ont développé trois stratégies différentes de tolérance au cadmium en associant des mécanismes de séquestration du cadmium par les polypeptides thiolés et les granules de polyphosphate. Bien que la séquestration du Cd par les polypeptides thiolés soit le mécanisme majoritaire, il semblerait que plus la part de cadmium séquestré par les granules de polyphosphates est importante, plus la tolérance au cadmium en milieu mixotrophe est forte.

## Conclusion générale

A la suite de ce travail, plusieurs perspectives se dégagent.

L'étude toxicologique mériterait d'être complétée par le dosage des biomolécules thiolées (cystéines, GSH, phytochélatines ...) synthétisées par les 3 souches en réponse au stress induit par le cadmium. Le recueil de ces informations aurait notamment permis de mieux caractériser la souche *pcs1* dont la mutation consiste à surexprimer la phytochélatine synthase. La quantification des biomolécules thiolées a cependant déjà été réalisée pour la souche *wt* en milieu TAP classique contaminé par 70  $\mu\text{M}$  de Cd (Bräutigam et al., 2009, 2011).

Du point de vue méthodologique, le potentiel du fractionnement subcellulaire n'a pas été utilisé au maximum. Pour chaque fraction recueillie, la détermination de la spéciation chimique du cadmium par couplage HPLC-ICP-MS et HPLC-ESI-MS aurait pu apporter des informations supplémentaires aux résultats XAS et  $\mu\text{XANES}/\mu\text{XRF}$ .

Au niveau des conditions de culture, il aurait été intéressant de comparer l'effet du cadmium sur *C. reinhardtii* en milieu autotrophe et mixotrophe. La présence d'une source de carbone organique, présente en faible quantité dans l'habitat naturel de *C. reinhardtii*, pourrait diminuer la toxicité du cadmium en proposant une alternative à la fixation du  $\text{CO}_2$  qui est sensible au cadmium (Faller et al., 2005).

Enfin, le nombre de cellules étudiées par imagerie électronique (TEM/X-EDS) et élémentaire ( $\mu\text{XRF}$  et nanoSIMS) est relativement faible. La question de la représentativité des résultats obtenus se pose. Malheureusement, le temps d'accès aux grands instruments étant limité et la durée d'analyse étant relativement importante (plusieurs heures pour le repérage et l'acquisition d'une cartographie élémentaire ou d'une série de spectres X-EDS), les échantillons étudiés ont été sélectionnés en nombre restreint. Néanmoins, les résultats obtenus par les différentes techniques sur des échantillons indépendants convergent vers des interprétations similaires, ce qui valide leur représentativité.

En conclusion, ce travail montre pour la première fois l'inhibition de la fixation du  $\text{CO}_2$  provoquée par l'accumulation du cadmium au niveau du pyrénoloïde de *C. reinhardtii*. De plus, il confirme de manière directe que la séquestration du cadmium par des polypeptides thiolés reste le mécanisme de tolérance majoritairement mis en place par la micro-algue. Cependant, la séquestration du cadmium par les granules de

## Conclusion générale

polyphosphates potentiellement contenues dans les acidocalcisomes semble apporter une plus grande tolérance au stress métallique induit par le cadmium.

De manière plus globale, ces résultats donnent des informations sur l'impact du cadmium sur l'environnement aquatique. D'une part, la micro-algue *C. reinhardtii* peut être considérée comme un excellent modèle pour l'étude du stress métallique chez les organismes photosynthétiques aquatiques. Elle présente des mécanismes de tolérance, tels que la séquestration du Cd par les phytochélatines et les granules de polyphosphates, rencontrés chez le phytoplancton et les plantes aquatiques supérieures. Naturellement, la micro-algue semble privilégier la séquestration du cadmium par les polypeptides thiolés, contenus dans la fraction soluble et facilement assimilable par les organismes de niveau trophique supérieur. Ceci peut expliquer les cas de biomagnification du cadmium déjà observés en milieu aquatique. D'autre part, l'effet toxique du cadmium conduisant au blocage de l'activité carboxylase de la rubisco, notamment dû à la liaison du Cd à des groupements thiols à l'intérieur du pyrénoïde, laisse entrevoir l'impact négatif de ce métal sur la fixation du carbone par la biomasse phytoplanctonique.



# **REFERENCES**



## RÉFÉRENCES

- Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R.T., and Traina, S.J. (2002). Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 210, 1–11.
- Afef, N.-H., Leila, S., Donia, B., Houda, G., and Chiraz, C.-H. (2011). Relationship between physiological and biochemical effects of cadmium toxicity in *Nicotiana rustica*. *Am. J. Plant Physiol.* 6, 294–303.
- Arnon, D.I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15.
- Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.-C., and Matagne, R. (1990). Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66, 1–9.
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., and Arica, M.Y. (2006). Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *Int. J. Miner. Process.* 81, 35–43.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (W H Freeman).
- Boullemant, A., Le Faucheur, S., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2011). UPTAKE OF LIPOPHILIC CADMIUM COMPLEXES BY THREE GREEN ALGAE: INFLUENCE OF HUMIC ACID AND ITS pH DEPENDENCE<sup>1</sup>. *J. Phycol.* 47, 784–791.
- Bräutigam, A., Schaumlöffel, D., Krauss, G.-J., and Wesenberg, D. (2009). Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides—a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1737–1747.
- Bräutigam, A., Wesenberg, D., Preud'homme, H., and Schaumlöffel, D. (2010). Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 877–883.
- Bräutigam, A., Schaumlöffel, D., Preud'Homme, H., Thondorf, I., and Wesenberg, D. (2011). Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 34, 2071–2082.
- Burnap, R.L. (2004). D1 protein processing and Mn cluster assembly in light of the emerging Photosystem II structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 4803–4809.
- Burow, M.D., Chen, Z.-Y., Mouton, T.M., and Moroney, J.V. (1996). Isolation of cDNA clones of genes induced upon transfer of *Chlamydomonas reinhardtii* cells to low CO<sub>2</sub>. *Plant Mol. Biol.* 31, 443–448.

## Références

- Byrne, T.E., Wells, M.R., and Johnson, C.H. (1992). Circadian Rhythms of Chemotaxis to Ammonium and of Methylammonium Uptake in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **98**, 879–886.
- Cai, X.-H., Brown, C., Adhiya, J., Traina, S.J., and Sayre, R.T. (1999). Growth and Heavy Metal Binding Properties of Transgenic *Chlamydomonas* Expressing a Foreign Metallothionein Gene. *Int. J. Phytoremediation* **1**, 53–65.
- Cain, J.R., and Allen, R.K. (1980). Use of a cell wall-less mutant strain to assess the role of the cell wall in cadmium and mercury tolerance by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **25**, 792–801.
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y.E., Ozkan, A.D., Elibol, Z., and Tekinay, T. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1947–1957.
- Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between Trace Metals and Aquatic Organisms: A Critique of the Free-Ion Activity Model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier, and D.R. Turner, eds. pp. 45–102.
- Campbell, P.G.C. (2006). Cadmium-A priority pollutant. *Environ. Chem.* **3**, 387–388.
- Castaing, R., and Slodzian, G. (1962). Microanalyse par émission ionique secondaire. *J. Microsc.* 395–410.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475–486.
- Clemens, S. (2006a). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707–1719.
- Clemens, S. (2006b). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* **163**, 319–332.
- Clément, F., Lecoq, E., Duday, D., Belmonte, T., Audinot, J.-N., Lentzen, E., Penny, C., Cauchie, H.-M., and Choquet, P. (2011). NanoSIMS50 analyses of Ar/18O<sub>2</sub> plasma-treated *Escherichia coli* bacteria. *New J. Phys.* **13**.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**, 825–832.
- Croteau, M.-N., Hare, L., and Tessier, A. (1998). Refining and Testing a Trace Metal Biomonitor (*Chaoborus*) in Highly Acidic Lakes. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1348–1353.
- Denning, G.M., and Fulton, A.B. (1989). Electron Microscopy of a Contractile-Vacuole Mutant of *Chlamydomonas Moewusii* (chlorophyta) Defective in the Late Stages of Diastole1. *J. Phycol.* **25**, 667–672.
- Dent, R.M., Han, M., and Niyogi, K.K. (2001). Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Plant Sci.* **6**, 364–371.

## Références

- Devès, G., Isaure, M.-P., Lay, P.L., Bourguignon, J., and Ortega, R. (2005). Fully quantitative imaging of chemical elements in *Arabidopsis thaliana* tissues using STIM, PIXE and RBS. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* *231*, 117–122.
- Dias, M.C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., and Santos, C. (2012). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol. Plant.* *35*, 1281–1289.
- Diaz, J., Ingall, E., Vogt, S., de Jonge, M.D., Paterson, D., Rau, C., and Brandes, J.A. (2009). Characterization of phosphorus, calcium, iron, and other elements in organisms at sub-micron resolution using X-ray fluorescence spectromicroscopy. *Limnol. Oceanogr. Methods* *7*, 42–51.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., and Santore, R.C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* *20*, 2383–2396.
- Docampo, R. (2006). Acidocalcisomes and polyphosphate granules. In *Inclusions in Prokaryotes*, (Springer), pp. 53–70.
- Docampo, R., and Moreno, S.N.J. (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium* *50*, 113–119.
- Docampo, R., Ulrich, P., and Moreno, S.N.J. (2010). Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *365*, 775–784.
- Durrant, S.F., and Ward, N.I. (2005). Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* *20*, 821–829.
- Dutcher, S.K. (2000). *Chlamydomonas reinhardtii*: Biological Rationale for Genomics 1. *J. Eukaryot. Microbiol.* *47*, 340–349.
- Ernst, W.H.O., Krauss, G.-J., Verkleij, J. a. C., and Wesenberg, D. (2008). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ.* *31*, 123–143.
- Errécalde, O., and Campbell, P.G.C. (2000). Cadmium and Zinc Bioavailability to *Selenastrum Capricornutum* (chlorophyceae): Accidental Metal Uptake and Toxicity in the Presence of Citrate. *J. Phycol.* *36*, 473–483.
- Faller, P., Kienzler, K., and Krieger-Liszkay, A. (2005). Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1706*, 158–164.
- Feldmann, J., Salaün, P., and Lombi, E. (2009). Critical review perspective: Elemental speciation analysis methods in environmental chemistry-moving towards methodological integration. *Environ. Chem.* *6*, 275–289.

## Références

- Foster, R.A., Szejtrensus, S., and Kuypers, M.M.M. (2013). Measuring carbon and N<sub>2</sub> fixation in field populations of colonial and free-living unicellular cyanobacteria using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry<sup>1</sup>. *J. Phycol.* *49*, 502–516.
- François, L., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2007). pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* *84*, 123–132.
- Fujiwara, S., Kobayashi, I., Hoshino, S., Kaise, T., Shimogawara, K., Usuda, H., and Tsuzuki, M. (2000). Isolation and Characterization of Arsenate-Sensitive and Resistant Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* *41*, 77–83.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M.H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* *150*, 197–202.
- Gillet, S., Decottignies, P., Chardonnet, S., and Maréchal, P.L. (2006). Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. *Photosynth. Res.* *89*, 201–211.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998). Chloroplast Transformation and Reverse Genetics. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, eds. (Springer Netherlands), pp. 139–149.
- Goodenough, U.W., Shames, B., Small, L., Saito, T., Crain, R.C., Sanders, M.A., and Salisbury, J.L. (1993). The role of calcium in the *Chlamydomonas reinhardtii* mating reaction. *J. Cell Biol.* *121*, 365–374.
- Goto, K., and Johnson, C.H. (1995). Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* *129*, 1061–1069.
- Gray, A.L. (1985). Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst* *110*, 551–556.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1465*, 190–198.
- Hanikenne, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol.* *159*, 331–340.
- Hanikenne, M., Matagne, R.F., and Loppes, R. (2001). Pleiotropic mutants hypersensitive to heavy metals and to oxidative stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiol. Lett.* *196*, 107–111.
- Hanikenne, M., Krämer, U., Demoulin, V., and Baurain, D. (2005a). A Comparative Inventory of Metal Transporters in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the Red Alga *Cyanidioschizon merolae*. *Plant Physiol.* *137*, 428–446.
- Hanikenne, M., Motte, P., Wu, M.C.S., Wang, T., Loppes, R., and Matagne, R.F. (2005b). A mitochondrial half-size ABC transporter is involved in cadmium tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* *28*, 863–873.

## Références

- Harris, E.H. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use* (Academic Press).
- Hegemann, P. (1997). Vision in microalgae. *Planta* 203, 265–274.
- Hiriart-Baer, V.P., Fortin, C., Lee, D.-Y., and Campbell, P.G.C. (2006). Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquat. Toxicol.* 78, 136–148.
- Hong-Hermesdorf, A., Miethke, M., Gallaher, S.D., Kropat, J., Dodani, S.C., Chan, J., Barupala, D., Domaille, D.W., Shirasaki, D.I., Loo, J.A., et al. (2014). Subcellular metal imaging identifies dynamic sites of Cu accumulation in *Chlamydomonas*. *Nat. Chem. Biol.*
- Hu, S., Lau, K.W.K., and Wu, M. (2001). Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 161, 987–996.
- Huang, G., Ulrich, P.N., Storey, M., Johnson, D., Tischer, J., Tovar, J.A., Moreno, S.N.J., Orlando, R., and Docampo, R. (2014). Proteomic Analysis of the Acidocalcisome, an Organelle Conserved from Bacteria to Human Cells. *PLoS Pathog* 10, e1004555.
- Huguet, S., Bert, V., Laboudigue, A., Barthès, V., Isaure, M.-P., Llorens, I., Schat, H., and Sarret, G. (2012). Cd speciation and localization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Environ. Exp. Bot.* 82, 54–65.
- Hutchins, C.M., Simon, D.F., Zerges, W., and Wilkinson, K.J. (2010). Transcriptomic signatures in *Chlamydomonas reinhardtii* as Cd biomarkers in metal mixtures. *Aquat. Toxicol.* 100, 120–127.
- Im, C.S., and Grossman, A.R. (2002). Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 30, 301–313.
- Imam, S.H., Buchanan, M.J., Shin, H.C., and Snell, W.J. (1985). The *Chlamydomonas* cell wall: characterization of the wall framework. *J. Cell Biol.* 101, 1599–1607.
- Isaure, M.-P., Fayard, B., Sarret, G., Pairis, S., and Bourguignon, J. (2006). Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 61, 1242–1252.
- Isaure, M.-P., Huguet, S., Meyer, C.-L., Castillo-Michel, H., Testemale, D., Vantelon, D., Saumitou-Laprade, P., Verbruggen, N., and Sarret, G. (2015). Evidence of various mechanisms of Cd sequestration in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, the non-accumulator *Arabidopsis lyrata*, and their progenies by combined synchrotron-based techniques. *J. Exp. Bot.* erv131.
- Jackson, R.B., Carpenter, S.R., Dahm, C.N., McKnight, D.M., Naiman, R.J., Postel, S.L., and Running, S.W. (2001). Water in a changing world. *Ecol. Appl.* 11, 1027–1045.

## Références

- Jamers, A., Blust, R., Coen, W.D., Griffin, J.L., and Jones, O.A.H. (2013a). Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *BioMetals* 26, 731–740.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., and Jones, O.A.H. (2013b). An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 126, 355–364.
- Jiang, Y., Pan, F., Ji, H., Zhang, X., Zhu, Y., and Hu, X. (2012). Adsorption kinetics and equilibrium isotherms of cadmium removal from wastewater using *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in sodium alginate. In 2012 International Symposium on Geomatics for Integrated Water Resources Management, GIWRM 2012,.
- Johnson, X., and Alric, J. (2013). Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. *Eukaryot. Cell* 12, 776–793.
- Johnson, X., Houille-Vernes, L., and Alric, J. (2011). Screening and studying photosynthetic mutants: Basics and beyond. *Bioenergetics* 239–244.
- Joux-Arab, L., Berthet, B., and Robert, J.M. (1998). Distribution of copper in the diatom *Haslea ostrearia simonsen*. *Mar. Environ. Res.* 46, 555–558.
- Jr, A.R.P. (2003). Rubisco activase – Rubisco’s catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* 75, 11–27.
- Keller, J., Smith, N., Boswell, R., Scipioni, L., Charles, C., and Sutherland, O. (2014). Magnetically enhanced, inductively coupled plasma source for a focused ion beam system.
- Kindle, K.L. (1998). Nuclear Transformation: Technology and Applications. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, eds. (Springer Netherlands), pp. 41–61.
- Klein, U., Chen, C., Gibbs, M., and Platt-Aloia, K.A. (1983). Cellular Fractionation of *Chlamydomonas reinhardtii* with Emphasis on the Isolation of the Chloroplast. *Plant Physiol.* 72, 481–487.
- Knoll, M., and Ruska, E. (1932). Das Elektronenmikroskop. *Z. Für Phys.* 78, 318–339.
- Kola, H., and Wilkinson, K.J. (2005). Cadmium Uptake by a Green Alga Can Be Predicted by Equilibrium Modelling. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3040–3047.
- Kola, H., Laglera, L.M., Parthasarathy, N., and Wilkinson, K.J. (2004). Cadmium adsorption by *chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environ. Chem.* 1, 172–179.
- Komine, Y., Park, H., Wolfe, G.R., and Hooper, J.K. (1996). Secretory granules in the cytoplasm of a wall-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* contain processed light-harvesting complex apoproteins and HSP70. *J. Photochem. Photobiol. B* 36, 301–306.

## Références

- Komine, Y., Eggink, L.L., Park, H., and Hooper, J.K. (2000). Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* 210, 897–905.
- Konz, I., Fernández, B., Fernández, M.L., Pereiro, R., González-Iglesias, H., Coca-Prados, M., and Sanz-Medel, A. (2014). Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 2343–2348.
- Kuramachi, K. (2005). PIXE analysis for bioaccumulation studies of trace elements. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 264, 295–301.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., and Morell, F.M.M. (2005). Biochemistry: A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435, 42.
- Lansman, J.B., Hess, P., and Tsien, R.W. (1986). Blockade of current through single calcium channels by Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup>. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J. Gen. Physiol.* 88, 321–347.
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2009a). Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.* 92, 65–75.
- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., and Campbell, P.G. (2009b). Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 277–286.
- Lavoie, M., Campbell, P.G.C., and Fortin, C. (2012). Extending the Biotic Ligand Model to Account for Positive and Negative Feedback Interactions between Cadmium and Zinc in a Freshwater Alga. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12129–12136.
- Lavoie, M., Campbell, P.G.C., and Fortin, C. (2014). Predicting Cadmium Accumulation and Toxicity in a Green Alga in the Presence of Varying Essential Element Concentrations Using a Biotic Ligand Model. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1222–1229.
- Lee, T.-M., Lai, H.-Y., and Chen, Z.-S. (2004). Effect of chemical amendments on the concentration of cadmium and lead in long-term contaminated soils. *Chemosphere* 57, 1459–1471.
- Le Faucheur, S., Schildknecht, F., Behra, R., and Sigg, L. (2006). Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquat. Toxicol.* 80, 355–361.
- Leonardo, T., Farhi, E., Boisson, A.-M., Vial, J., Cloetens, P., Bohic, S., and Rivasseau, C. (2014). Determination of elemental distribution in green micro-algae using synchrotron radiation nano X-ray fluorescence (SR-nXRF) and electron microscopy techniques – subcellular localization and quantitative imaging of silver and cobalt uptake by *Coccomyxa actinabiotis*. *Metallomics* 6, 316–329.
- Li, M., Wan, C., Pan, X., Zou, Y., Chang, J., and Xie, P. (2012). ACUTE TOXIC EFFECTS OF ZINC, CADMIUM, AND MERCURY ON THE GROWTHS OF THREE

## Références

UNICELLULAR GREEN MICROALGAE WITH RELATIVELY HIGH INITIAL DENSITIES. *IHB OpenIR* 21.

Lobinski, R., Moulin, C., and Ortega, R. (2006). Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* 88, 1591–1604.

Lombi, E., and Susini, J. (2009). Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil* 320, 1–35.

Lombi, E., Scheckel, K.G., and Kempson, I.M. (2011a). In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ. Exp. Bot.* 72, 3–17.

Lombi, E., Hettiarachchi, G.M., and Scheckel, K.G. (2011b). Advanced in situ spectroscopic techniques and their applications in environmental biogeochemistry: Introduction to the special section. *J. Environ. Qual.* 40, 659–666.

Lombi, E., Scheckel, K.G., and Kempson, I.M. (2011c). In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ. Exp. Bot.* 72, 3–17.

Macfie, S.M., and Welbourn, P.M. (2000). The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 413–419.

Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., and Welbourn, P.M. (1994). Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 454–458.

Marchesini, N., Ruiz, F.A., Vieira, M., and Docampo, R. (2002). Acidocalcisomes Are Functionally Linked to the Contractile Vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 277, 8146–8153.

Marín-Navarro, J., and Moreno, J. (2006). Cysteines 449 and 459 modulate the reduction–oxidation conformational changes of ribulose 1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the translocation of the enzyme to membranes during stress. *Plant Cell Environ.* 29, 898–908.

Martell, A., E. (1971). Organic including macromolecules ligands. In *Stability Constants of Metal Ions Complexes, Supplement, Special Publication n°25*, (London: Burlington House), pp. 623–632.

Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., dePamphilis, C.W., Miller, W., Harris, E.H., and Stern, D.B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome Islands of Genes in a Sea of Repeats. *Plant Cell* 14, 2659–2679.

Mendoza-Cozatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., and Moreno-Sánchez, R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115, 276–283.

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., Maréchal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* 318, 245–250.

## Références

- Meyer, M., and Griffiths, H. (2013). Origins and diversity of eukaryotic CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms: lessons for the future. *J. Exp. Bot.* *64*, 769–786.
- Miao, A.-J., and Wang, W.-X. (2006). Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions. *Aquat. Toxicol.* *78*, 114–126.
- Minqin, R., Xiao, C., Yi, Z., Hao, S., Qingguang, R., Yong, L., and Frank, W. (2013). Sub-100-nm STIM imaging and PIXE quantification of rare earth elements in algae cells. *X-Ray Spectrom.* *42*, 237–241.
- Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y., Taniguchi, F., Asamizu, E., Nakamura, Y., Tabata, S., Yamato, K.T., et al. (2004). Expression Profiling-Based Identification of CO<sub>2</sub>-Responsive Genes Regulated by CCM1 Controlling a Carbon-Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* *135*, 1595–1607.
- Mokgalaka, N.S., and Gardea-Torresdey, J.L. (2006). Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Principles and Applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* *41*, 131–150.
- Moon, M., Kim, C.W., Park, W.-K., Yoo, G., Choi, Y.-E., and Yang, J.-W. (2013). Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* *2*, 352–357.
- Moore, K.L., Schröder, M., Lombi, E., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., Hawkesford, M.J., Shewry, P.R., and Grovenor, C.R.M. (2010). NanoSIMS analysis of arsenic and selenium in cereal grain. *New Phytol.* *185*, 434–445.
- Moore, K.L., Zhao, F.-J., Gritsch, C.S., Tosi, P., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., Shewry, P.R., and Grovenor, C.R.M. (2012). Localisation of iron in wheat grain using high resolution secondary ion mass spectrometry. *J. Cereal Sci.* *55*, 183–187.
- Moore, K.L., Chen, Y., van de Meene, A.M.L., Hughes, L., Liu, W., Geraki, T., Mosselmans, F., McGrath, S.P., Grovenor, C., and Zhao, F.-J. (2014). Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytol.* *201*, 104–115.
- Moroney, J.V., and Ynalvez, R.A. (2007). Proposed Carbon Dioxide Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* *6*, 1251–1259.
- Moroney, J.V., Ma, Y., Frey, W.D., Fusilier, K.A., Pham, T.T., Simms, T.A., DiMario, R.J., Yang, J., and Mukherjee, B. (2011). The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynth. Res.* *109*, 133–149.
- Mounicou, S., Vacchina, V., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., and Łobiński, R. (2001). Determination of phytochelatins by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* *126*, 624–632.
- Nagel, K., and Voigt, J. (1995). Impaired photosynthesis in a cadmium-tolerant *Chlamydomonas* mutant strain. *Microbiol. Res.* *150*, 105–110.

## Références

- Nagel, K., Adelmeier, U., and Voigt, J. (1996a). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* *149*, 86–90.
- Nagel, K., Adelmeier, U., and Voigt, J. (1996b). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* *149*, 86–90.
- Nikaido, S.S., and Johnson, C.H. (2000). Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem. Photobiol.* *71*, 758–765.
- Nishikawa, K., and Tominaga, N. (2001). Isolation, Growth, Ultrastructure, and Metal Tolerance of the Green Alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *65*, 2650–2656.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., and Tominaga, N. (2003a). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* *44*, 253–259.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., and Tominaga, N. (2003b). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* *44*, 253–259.
- Nishikawa, K., Onodera, A., and Tominaga, N. (2006). Phytochelatins do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp. *Chemosphere* *63*, 1553–1559.
- Novoselov, S.V. (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* *21*, 3681–3693.
- Nriagu, J.O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* *338*, 47–49.
- Ortega, R., Devès, G., and Carmona, A. (2009). Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J. R. Soc. Interface* *6*, S649–S658.
- O'Toole, E.T. (2010). *Chlamydomonas*. Cryopreparation methods for the 3-D analysis of cellular organelles.
- 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., et al. (2002). The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* *133*, 3–35.
- Park, H., Song, B., and Morel, F.M.M. (2007). Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ. Microbiol.* *9*, 403–413.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003). Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae<sup>1</sup>. *J. Phycol.* *39*, 1008–1018.

## Références

- Pollock, S.V., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Lemaire, S.D., and Moroney, J.V. (2004). The *Chlamydomonas reinhardtii* proteins Ccp1 and Ccp2 are required for long-term growth, but are not necessary for efficient photosynthesis, in a low-CO<sub>2</sub> environment. *Plant Mol. Biol.* *56*, 125–132.
- Prasad, M.N.V., Drej, K., Skawińska, A., and Strałka, K. (1998). Toxicity of Cadmium and Copper in *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-Type (WT 2137) and Cell Wall Deficient Mutant Strain (CW 15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *60*, 306–311.
- Punshon, T., Jackson, B.P., Bertsch, P.M., and Burger, J. (2004). Mass loading of nickel and uranium on plant surfaces: Application of laser ablation-ICP-MS. *J. Environ. Monit.* *6*, 153–159.
- Quarmby, L.M., and Hartzell, H.C. (1994). Two distinct, calcium-mediated, signal transduction pathways can trigger deflagellation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* *124*, 807–815.
- Raab, A., Feldmann, J., and Meharg, A.A. (2004). The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol.* *134*, 1113–1122.
- Raab, A., Ferreira, K., Meharg, A.A., and Feldmann, J. (2007). Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*? *J. Exp. Bot.* *58*, 1333–1338.
- Ramazanov, Z., Rawat, M., Henk, M.C., Mason, C.B., Matthews, S.W., and Moroney, J.V. (1994). The induction of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* *195*, 210–216.
- Ramos, I.B., Miranda, K., Ulrich, P., Ingram, P., LeFurgey, A., Machado, E.A., de Souza, W., and Docampo, R. (2010). Calcium- and polyphosphate-containing acidocalcisomes in chicken egg yolk. *Biol. Cell* *102*, 421–434.
- Ravel, B., and Newville, M. (2005). *ATHENA*, *ARTEMIS*, *HEPHAESTUS*: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using *IFEFFIT*. *J. Synchrotron Radiat.* *12*, 537–541.
- Raven, J.A. (2001). A role for mitochondrial carbonic anhydrase in limiting CO<sub>2</sub> leakage from low CO<sub>2</sub>-grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* *24*, 261–265.
- Rosakis, A., and Köster, W. (2005). Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *Biometals* *18*, 107–120.
- Rubinelli, P., Siripornadulsil, S., Gao-Rubinelli, F., and Sayre, R.T. (2002). Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation. *Planta* *215*, 1–13.
- Ruiz, F.A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, and Docampo, R. (2001). The Polyphosphate Bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* Possess a Proton-pumping

## Références

- Pyrophosphatase and Are Similar to Acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* 276, 46196–46203.
- Ruiz, F.A., Lea, C.R., Oldfield, E., and Docampo, R. (2004). Human Platelet Dense Granules Contain Polyphosphate and Are Similar to Acidocalcisomes of Bacteria and Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 279, 44250–44257.
- Sakaguchi, T., Tsuji, T., Nakajima, A., and Horikoshi, T. (1979). Accumulation of cadmium by green microalgae. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8, 207–215.
- Sakai, T., Oikawa, M., Sato, T., Nagamine, T., Moon, H.D., Nakazato, K., and Suzuki, K. (2005). New in-air micro-PIXE system for biological applications. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 231, 112–116.
- Sarret, G., Willems, G., Isaure, M.-P., Marcus, M.A., Fakra, S.C., Frérot, H., Pairis, S., Geoffroy, N., Manceau, A., and Saumitou-Laprade, P. (2009). Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* × *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. *New Phytol.* 184, 581–595.
- Sarret, G., Smits, E.A.H.P., Michel, H.C., Isaure, M.P., Zhao, F.J., and Tappero, R. (2013). Chapter One - Use of Synchrotron-Based Techniques to Elucidate Metal Uptake and Metabolism in Plants. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 1–82.
- Schaumlöffel, D., Ouerdane, L., Bouyssiere, B., and Łobiński, R. (2003). Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 120–127.
- Scheidegger, C., Sigg, L., and Behra, R. (2011). Characterization of lead induced metal-phytochelatin complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2546–2552.
- Scopes, R.K. (1994). *Protein Purification* (New York, NY: Springer New York).
- Seebaugh, D.R., Goto, D., and Wallace, W.G. (2005). Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar. Environ. Res.* 59, 473–491.
- Semenova, G.A., Chekunova, E.M., and Ladygin, V.G. (2015). LIGHT-DEPENDENT SYNTHESIS OF CELL MEMBRANES IN THE Brc-1 MUTANT OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII. *Tsitologija* 57, 353–359.
- Seufferheld, M., Vieira, M.C.F., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Moreno, S.N.J., and Docampo, R. (2003). Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 278, 29971–29978.
- Sha, Y., Zhang, P., Wang, X., Liu, J., Huang, Y., and Li, G. (2002). Analysis of candidate micro-reference materials of lichen and algae by SRXRF and PIXE. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 189, 107–112.
- Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A. (2001). Assembly and Motility of Eukaryotic Cilia and Flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127, 1500–1507.

## Références

- Simon, D.F., Davis, T.A., Tercier-Waeber, M.-L., England, R., and Wilkinson, K.J. (2011). In situ evaluation of cadmium biomarkers in green algae. *Environ. Pollut.* *159*, 2630–2636.
- Singh, H., Shukla, M.R., Chary, K.V., and Rao, B.J. (2014). Acetate and bicarbonate assimilation and metabolite formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: a <sup>13</sup>C-NMR study. *PloS One* *9*, e106457.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., and Sayre, R.T. (2002). Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *Plant Cell Online* *14*, 2837–2847.
- Slaveykova, V.I., Guignard, C., Eybe, T., Migeon, H.-N., and Hoffmann, L. (2009). Dynamic NanoSIMS ion imaging of unicellular freshwater algae exposed to copper. *Anal. Bioanal. Chem.* *393*, 583–589.
- Slodzian, G., Daigne, B., Girard, F., Boust, F., and Hillion, F. (1992). Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biol. Cell* *74*, 43–50.
- Soares, H.M.V.M., and Conde, P.C.F.L. (2000). Electrochemical investigations of the effect of N-substituted aminosulfonic acids with a piperazinic ring pH buffers on heavy metal processes which may have implications on speciation studies. *Anal. Chim. Acta* *421*, 103–111.
- Solé, V.A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., and Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* *62*, 63–68.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2010). Differential effects of copper and cadmium exposure on toxicity endpoints and gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* *29*, 191–200.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2012). Relationships between surface-bound and internalized copper and cadmium and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* *31*, 324–335.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2013). Induction of reactive oxygen species in *chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environ. Toxicol.* *28*, 516–523.
- Storms, H.A., Brown, K.F., and Stein, J.D. (1977). Evaluation of a cesium positive ion source for secondary ion Mass spectrometry. *Analytical Chem.* *49*, 2023–2030.
- Tessier, A., Carigan, R., and Belzile, N. (1993). Réaction of trace elements near the sediment-water interface in lakes.
- Tüzün, İ., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., and Arıca, M.Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Environ. Manage.* *77*, 85–92.

## Références

- Tylko, G., Mesjasz-Przybyłowicz, J., and Przybyłowicz, W.J. (2007). X-ray microanalysis of biological material in the frozen-hydrated state by PIXE. *Microsc. Res. Tech.* *70*, 55–68.
- Vega, J.M., Garbayo, I., Domínguez, M.J., and Vígara, J. (2006). Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*: Induction of oxidative stress. *Enzyme Microb. Technol.* *40*, 163–167.
- Vercesi, A.E., Moreno, S.N., and Docampo, R. (1994). Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* *304*, 227–233.
- Visviki, I., and Rachlin, J.W. (1994). Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on growth. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *26*, 149–153.
- Voigt, J., Nagel, K., and Wrann, D. (1998). A Cadmium-tolerant *Chlamydomonas* Mutant Strain Impaired in Photosystem II Activity. *J. Plant Physiol.* *153*, 566–573.
- Watt, F., Grime, G.W., Brook, A.J., Gadd, G.M., Perry, C.C., Pearce, R.B., Turnau, K., and Watkinson, S.C. (1991). Nuclear microscopy of biological specimens. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* *54*, 123–143.
- Wilson, R.G. (1995). SIMS quantification in Si, GaAs, and diamond - an update. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* *143*, 43–49.
- Wong, M.-Y., Sauser, K.R., Chung, K.-T., Wong, T.-Y., and Liu, J.-K. (2001). Response of the Ascorbate-Peroxidase of *Selenastrum capricornutum* to Copper and Lead in Stormwaters. *Environ. Monit. Assess.* *67*, 361–378.
- Xue, H., and Sigg, L. (1998). Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. *Anal. Chim. Acta* *363*, 249–259.
- Yamano, T., Tsujikawa, T., Hatano, K., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., and Fukuzawa, H. (2010). Light and low-CO<sub>2</sub>-dependent LCIB-LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* *51*, 1453–1468.
- Zhang, N., and Portis, A.R. (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 9438–9443.
- Rochaix, J., D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. (1998). *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Gustafsson, J., P. (2010) Visual MINTEQ | Visual MINTEQ – a free equilibrium speciation model. KTH Royal Institute of technology, Stockholm, Sweden.

## Références



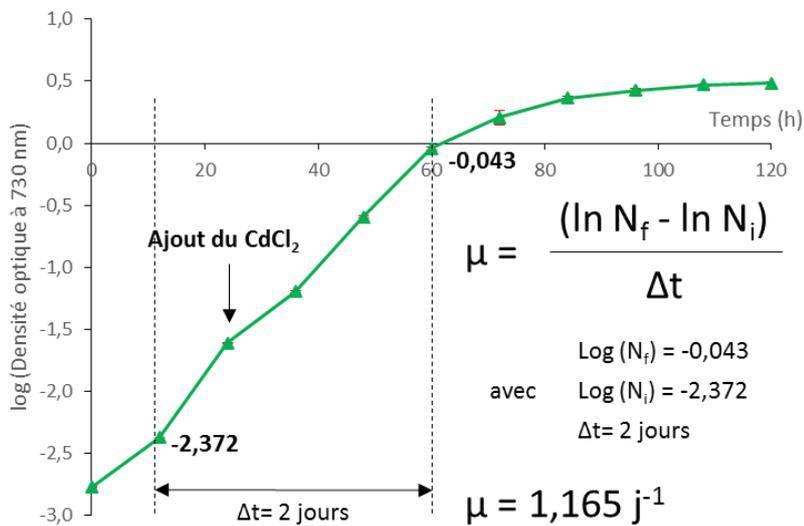
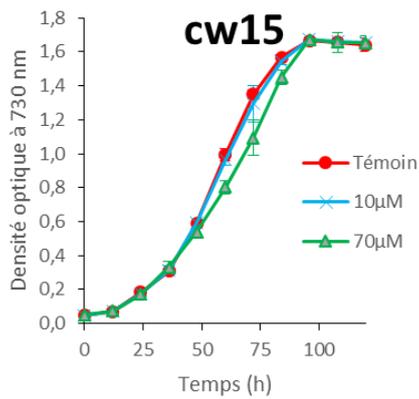
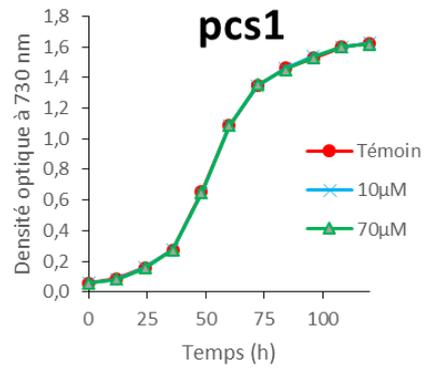
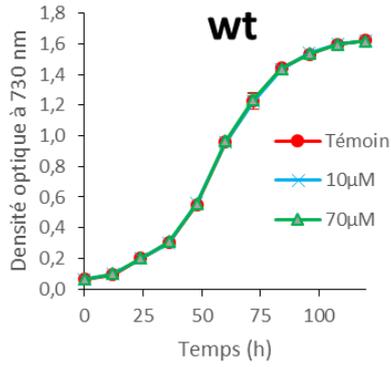
## **ANNEXES**



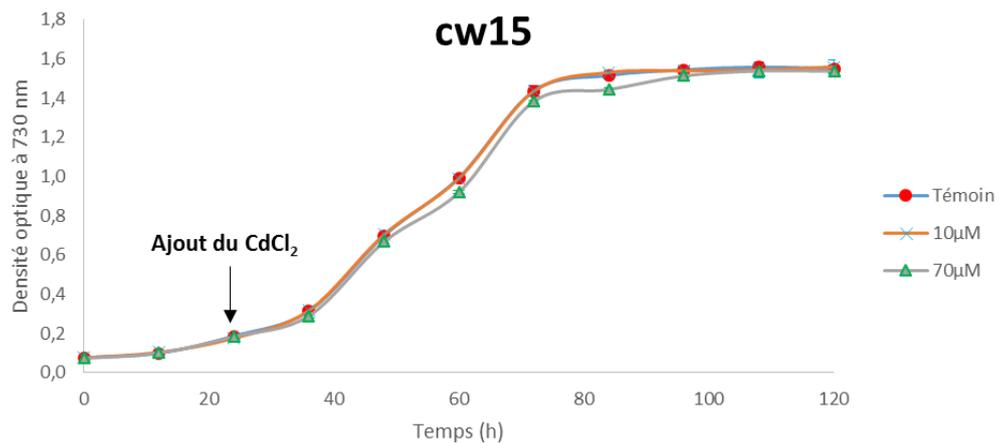
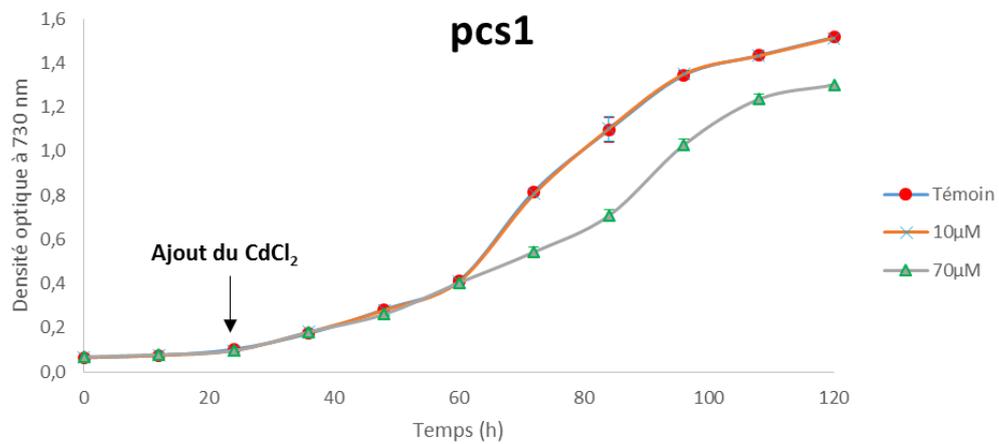
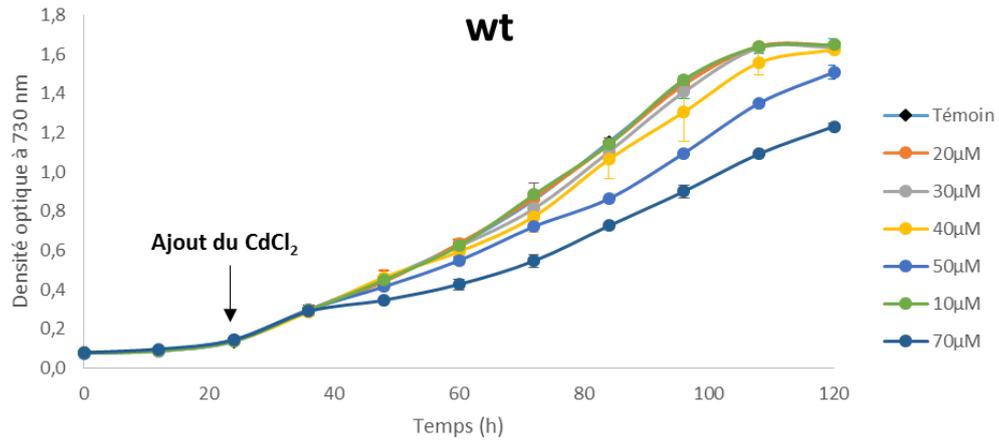
# **TOXICITE DU CADMIUM**

Annexe 1





Courbes de croissance des souches wt, pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii* exposées à 10 et 70 µM de cadmium en milieu TAP classique. La figure du bas montre la manière dont a été calculé le taux de croissance.

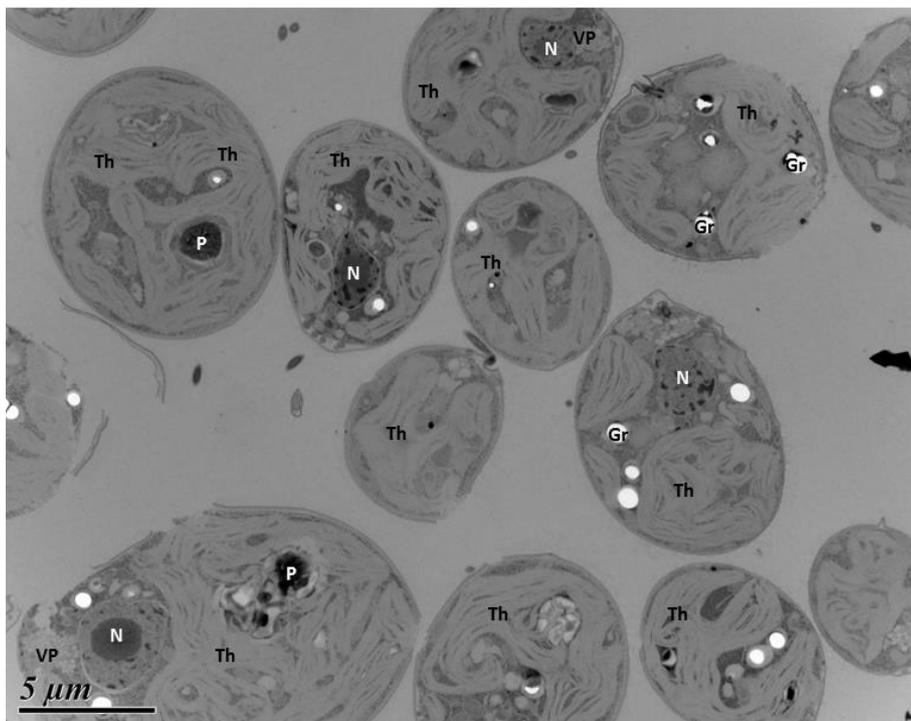


Courbes de croissance des souches pcs1 et cw15 de *C. reinhardtii* exposées à 10 et 70 μM de cadmium en milieu TAP modifié. Le wt a été exposé à 10, 20, 30, 40, 50, 70 μM de cadmium en milieu modifié.

**ULTRASTRUCTURE DE *C. REINHARDTII* PAR  
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION**

Annexe 2





Images de l'ultrastructure de *C. reinhardtii* obtenues par TEM. La souche wt de *C. reinhardtii* a été cultivée en milieu TAP classique témoin. Légende : A, amidon ; G, Appareil de Golgi ; Gr, granule ; N, noyau ; PC, paroi-cellulaire ; P, pyrenoïde ; Th, thylakoïde ; V, vacuole ; VP, vacuole pulsatile.

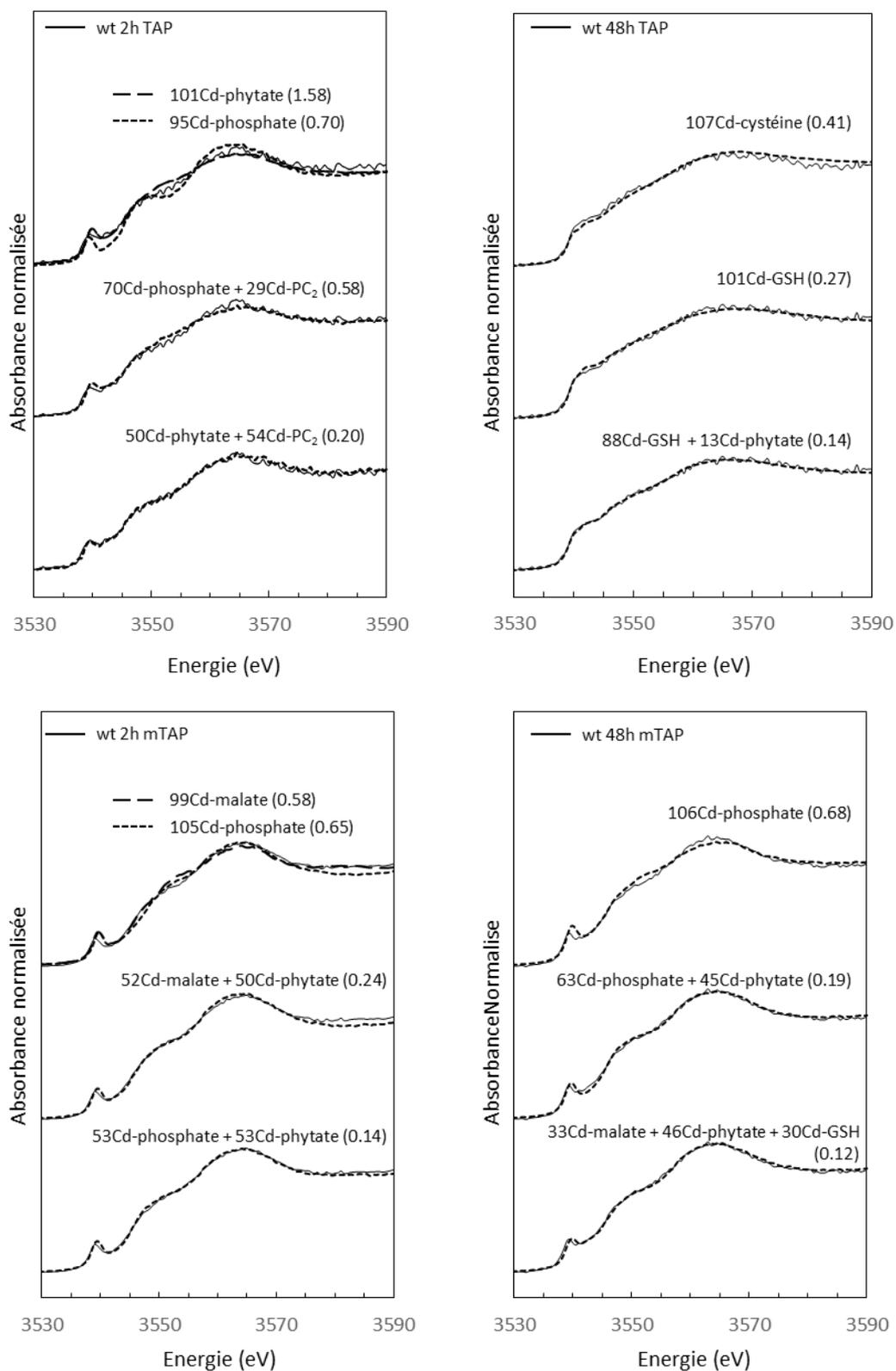


# **TRAITEMENTS DES SPECTRES SR-XAS PAR COMBINAISONS LINEAIRES**

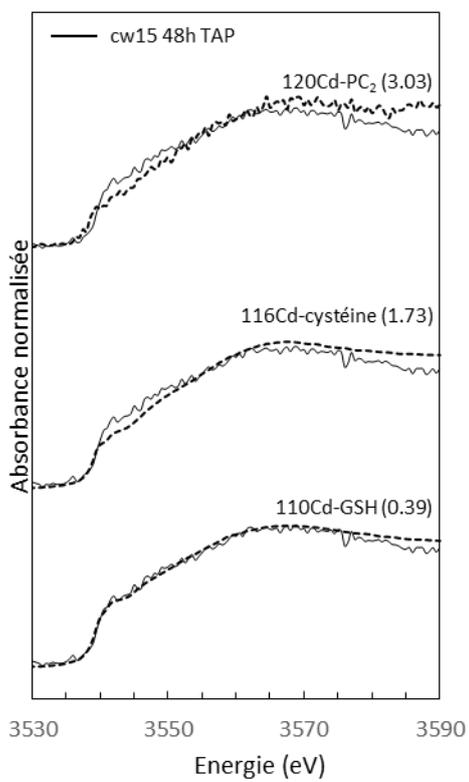
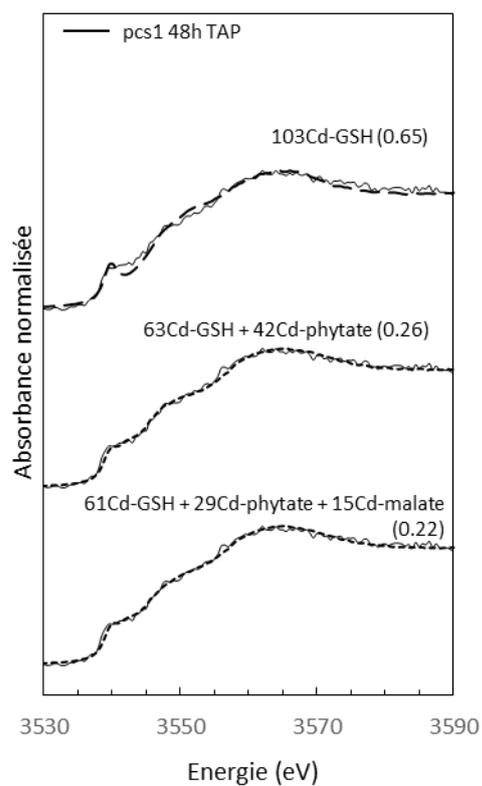
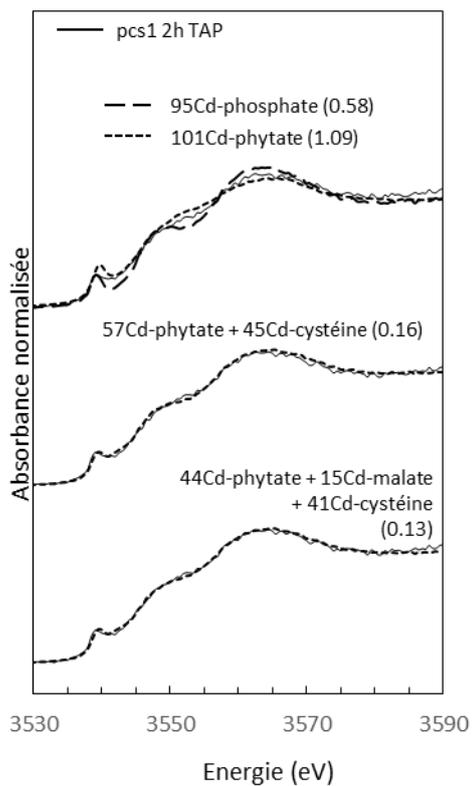
Annexe 3



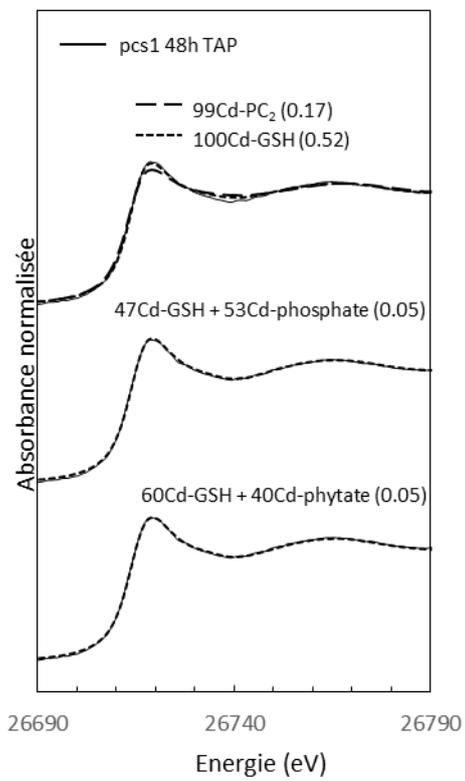
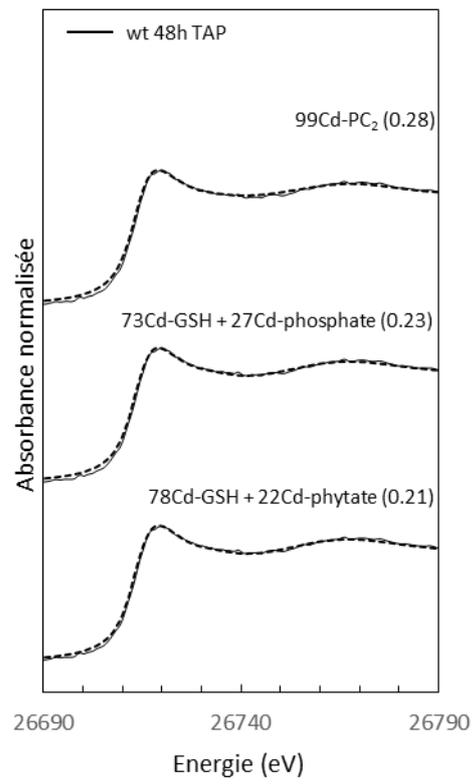
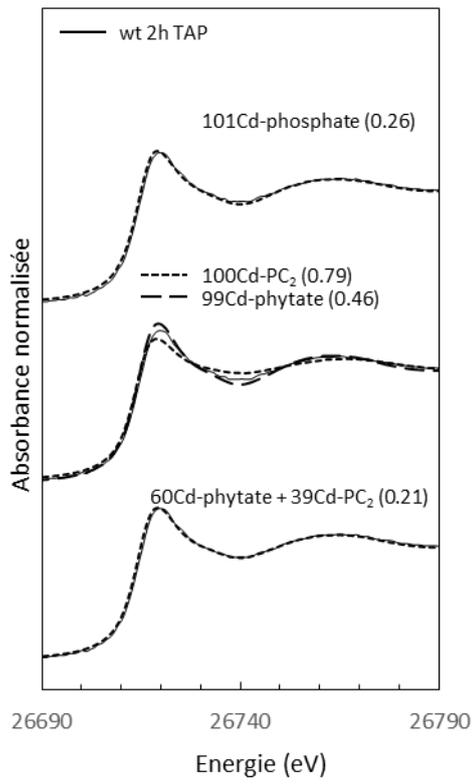
## XANES au seuil $L_{III}$ du cadmium



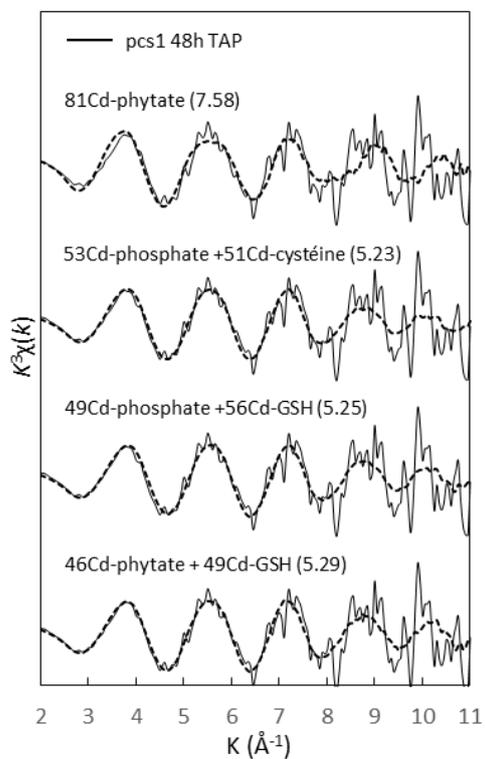
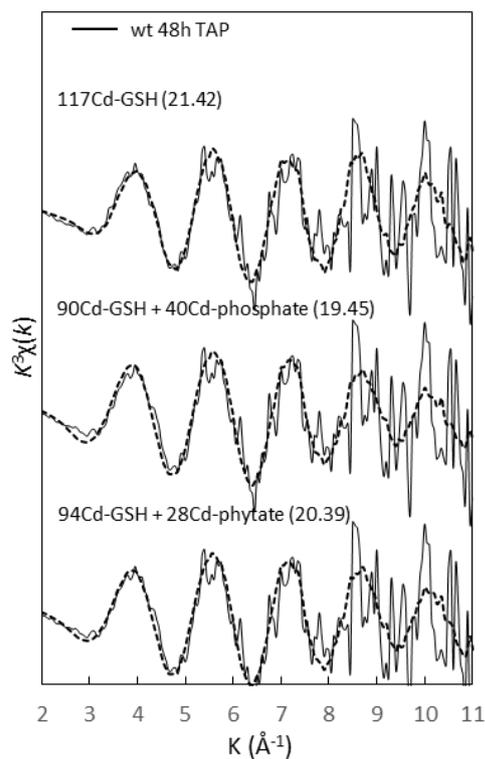
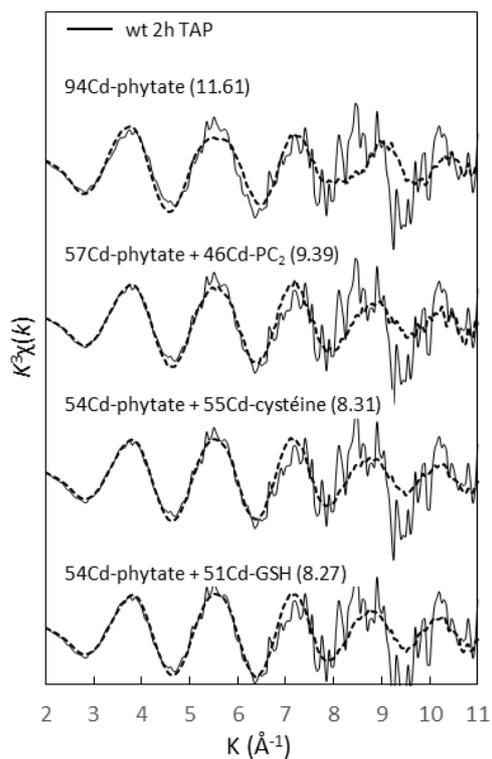
## XANES au seuil $L_{III}$ du cadmium



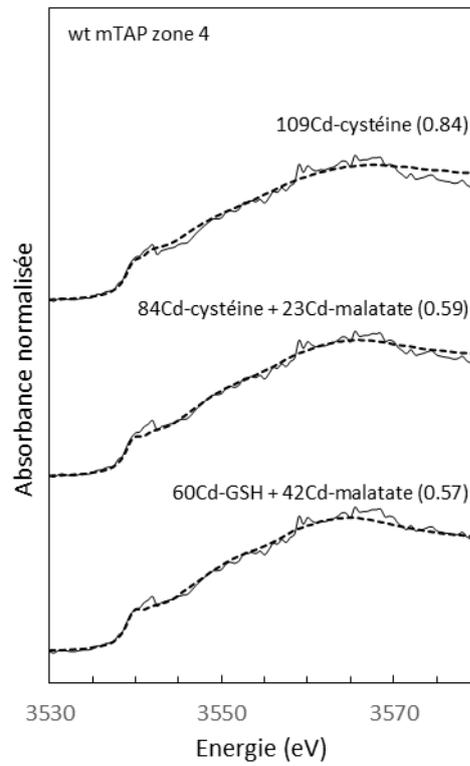
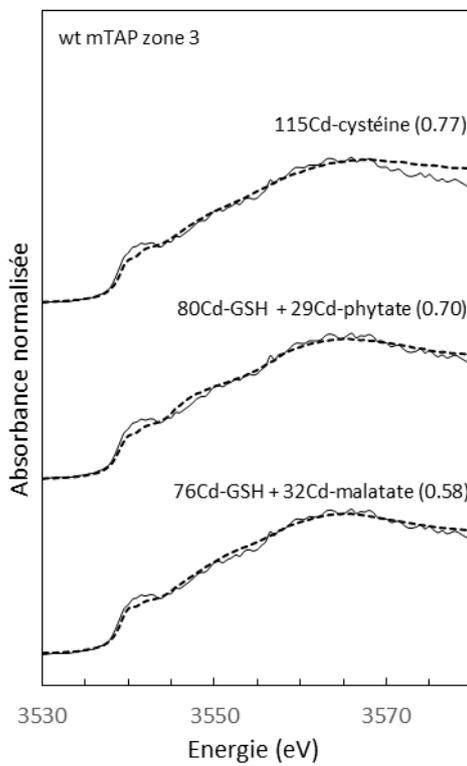
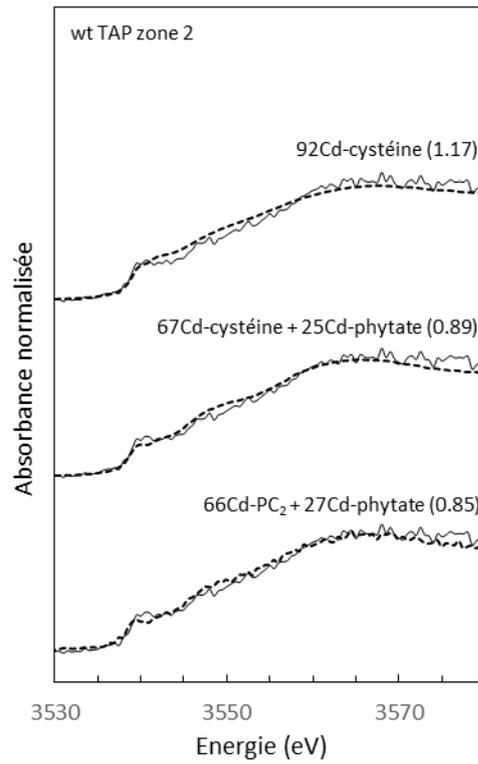
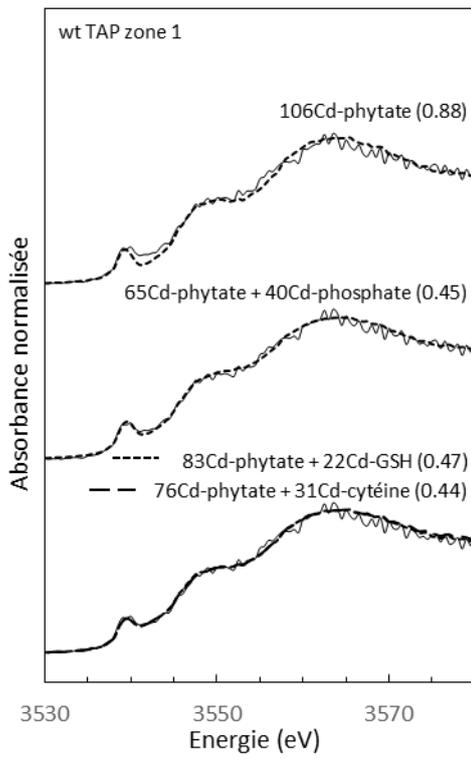
## XANES au seuil K du cadmium



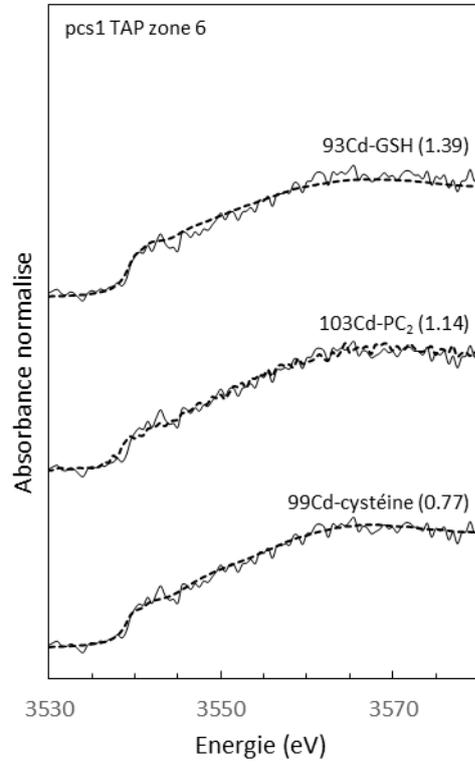
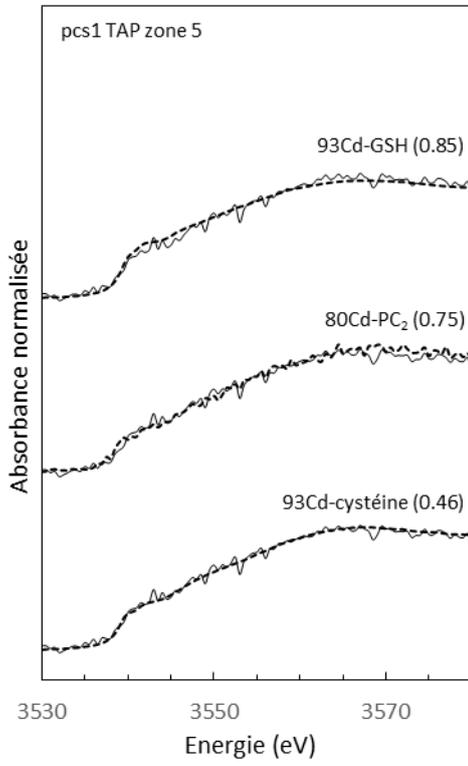
## EXAFS au seuil K du cadmium



## $\mu$ XANES au seuil $L_{III}$ du cadmium



## $\mu$ XANES au seuil $L_{III}$ du cadmium



# **ARTICLE EN PREPARATION**

Annexe 4



# **Cadmium sequestration in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: *in situ* localization and ligands determination by combined synchrotron-based techniques**

F., Penen, M.P., Isaure, H., Castillo, O., Proux, E., Gontier, P., Le Coustumer, I., Bertalan, D., Dobritsch and D., Schaumlöffel

## **INTRODUCTION**

Naturally present in the Earth's crust, cadmium can be released in the environment during soil erosion, volcanic eruptions and wildfires. However, the main source of this toxic metal is anthropogenic with industrial activities (anti-corrosion treatment, Cd-Ni batteries and phosphate fertilizer production). Up to 70  $\mu\text{M}$  Cd has been measured in soil solution extracted from contaminated soils located near an engineering plant in northern Taiwan(Lee et al., 2004).

The unicellular freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was shown to be a relevant model to study metallic stress in eukaryotic photosynthetic organisms(Hanikenne, 2003). This microalga is easily and quickly cultivated. Moreover, all its genomes (nuclear, mitochondrial and chloroplastic) were sequenced(Maul et al., 2002; 1998) and can be transformed to highlight genes involved in metal tolerance(Hanikenne et al., 2001, 2005b). Concerning the Cd stress, its transcriptome, its proteome and its metabolome were analyzed in toxicological studies(Jamers et al., 2013b; Rubinelli et al., 2002). Several consequences of cadmium stress were demonstrated for *C. reinhardtii*: inhibition of the sexual reproduction(Goodenough et al., 1993), inhibition of the photosynthesis activity(Faller et al., 2005) and increasing of oxidative stress(Vega et al., 2006). Among microalgae, *C. reinhardtii* is the most cadmium tolerant(Sakaguchi et al., 1979) species and could be used in phytoremediation. Indeed, *C. reinhardtii* immobilized in alginate beads can remove Cd from aqueous solution by biosorption(Adhiya et al., 2002; Bayramoğlu et al., 2006). Furthermore, the transcription of genes involved in Cd sensitivity can be monitored as genetic biomarker to detect Cd exposure(Hutchins et al., 2010; Simon et al., 2011).

In order to avoid the presence of free  $\text{Cd}^{2+}$  inside the cell, tolerance processes against cadmium stress are implemented by the alga. The first defense is the cell-wall which can adsorb extracellular cadmium (Macfie and Welbourn, 2000). Once inside the cell, cadmium induces the synthesis of thiolated polypeptides, mainly phytochelatins ( $\text{PC}_n$ ) with the structure  $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$  (Gekeler et al., 1988).  $\text{Cd-PC}_n$  complexes were isolated from *C. reinhardtii* (Hu et al., 2001). In the cytosol, the phytochelatin synthase (PCS) uses glutathione (GSH) as a substrate to synthesize  $\text{PC}_n$  (Bräutigam et al., 2011). Thiolated polypeptides would not be the only mechanism for metal sequestration. In *Chlamydomonas acidophila*, cadmium was found co-located within polyphosphate bodies in cytosol (Nishikawa et al., 2003a).

A better understanding of the global strategy developed by *C. reinhardtii* to cope with cadmium stress involves the knowledge of the subcellular localization of cadmium and of its chemical forms. Subcellular fractionation can help to determine cadmium distribution in different subcellular fractions (Lavoie et al., 2009b). In this case, *C. reinhardtii* cell was divided in five fractions. Two of them were associated to detoxication (NaOH resistant fraction, heat stable proteins (HSP) including GSH and phytochelatins), two other fractions were associated to toxicity (organelles including mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and heat denaturable proteins (HDP) or enzymes) and finally the last one was composed of debris including cell nuclei, cell membranes and cell-wall. It was shown that, with increasing free  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations in the culture medium, cadmium was sequestered into the fraction containing phytochelatins (Lavoie et al., 2009a). Furthermore, in another study (Nagel et al., 1996a), more than 50% of intracellular Cd was found into the chloroplastic fraction and 10% in the cytosolic fraction. Nevertheless, fractionation techniques and cellular compounds analysis require a preliminary cell lysis step and chemical extractions that could induce metals redistribution. It is thus useful to combine this approach with an *in situ* analysis of metals to circumvent this bias.

Due to a high flux of photons, X-ray based synchrotron techniques are useful tools to image metal distribution in plants and identify their chemical forms (Sarret et al., 2013). Micro X-Ray Fluorescence ( $\mu\text{XRF}$ ) used in tandem with Micro X-ray Absorption Near the Edge Spectroscopy ( $\mu\text{XANES}$ ) provides a 2D elemental map of the cells and information about the binding atoms of the element of interest in micrometer-sized spots detected on the 2D elemental map. For instance, it has been applied to

characterize cadmium accumulation in plant leaves (Isaure et al., 2006, 2015) and to phosphorus in *Chlamydomonas sp* (Diaz et al., 2009). In this latter study, phosphorus was co-located with calcium and iron but,  $\mu$ XANES at the P K-edge revealed that phosphorus spots corresponded to polyphosphate bodies, where phosphate was associated with calcium and not iron. Moreover, XANES and Extended X-Ray Absorption Fine Structure spectroscopy (EXAFS) can be used with defocused beam on bulk samples to determine the local structural environment of the element of interest in the bulk sample. EXAFS studies at the Cd K-edge of *C. reinhardtii* contaminated by 50  $\mu$ M of cadmium, showed that Cd was tetrahedrally coordinated by two oxygen and two sulfur atoms in the wt strain (Siripornadulsil et al., 2002), suggesting not a unique binding by phytochelatin.

The aim of this study was to clarify the subcellular compartments of Cd accumulation in *C. reinhardtii* and particularly the role of thiolated peptides and polyphosphate granules using mutants. Then, three *C. reinhardtii* strains were selected. Cell-wall deficient (cw) strains seemed to be more sensitive to the cadmium stress than walled strains, in autotrophic conditions (Macfie and Welbourn, 2000; Macfie et al., 1994; Prasad et al., 1998). A specific strain, the cw15 strain was found to excrete granules composed of polyphosphate (Komine et al., 1996, 2000). The newly designed pcs1 strain can highly express PCS directly within the chloroplast and is supposed to protect photosynthesis from cadmium stress. This specificity could enhance the cadmium tolerance process induced by phytochelatin synthesis. Finally, a wild type strain (wt) was used as reference. Cd location was investigated by TEM-EDX,  $\mu$ XRF and subcellular fractionation to compare Cd distribution in single cells and bulk samples, respectively. Cd ligands were determined in some compartments of interest by Cd L<sub>III</sub>-edge  $\mu$ XANES. Furthermore, cadmium speciation was determined by XANES (Cd L<sub>III</sub>-edge and K-edge) and EXAFS (Cd K-edge) on bulk micro-algae after various Cd exposure time to follow the evolution of cadmium species.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Biological material and growth conditions.**

*Chlamydomonas reinhardtii* wild type strain (wt 11/32b), cell-wall less mutant (cw15) and phytochelatin synthase highly expressed in the chloroplast mutant (pcs1) were obtained from the Institute of plant physiology (Martin-Universität Halle-Wittenberg,

Hall, Germany). Micro-algae were grown in tris-acetate-phosphate (TAP) medium (Harris, 2009) composed of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $0.4 \text{ g.l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g.l}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $0.05 \text{ g.l}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $0.108 \text{ g.l}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0.056 \text{ g.l}^{-1}$ ), Tris ( $2.42 \text{ g.l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $22 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $11.4 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $5.06 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $4.99 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $1.61 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $1.57 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $1.10 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $\text{KOH}$  ( $16 \text{ mg.l}^{-1}$ ), glacial acetic acid ( $1 \text{ ml}$ ), final  $\text{pH}=7$ . To decrease the complexation of cadmium in solution, particularly with EDTA, strains were also grown in modified tris-acetate-phosphate (mTAP) medium where EDTA and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  were replaced by Fe-EDDHA complex ( $7.4 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Both cultures were done at  $22^\circ\text{C}$  under constant illumination and constant agitation ( $120 \text{ rpm}$ ). Fresh medium was inoculated with stock culture at the end of exponential phase to reach an initial optical density<sub>730 nm</sub> of 0.040.  $\text{CdCl}_2$  was added 24 hours after the inoculation to a final concentration of 10 and 70  $\mu\text{M}$ . The highest concentration was selected based on the higher Cd contents encountered in natural environments (Lee et al., 2004). Free metal concentrations in the different medium were calculated with the freeware Visual MINTEQ 3.0 ([CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]) using thermodynamic constants from Lindsay's database. To maintain axenic culture, all the material was sterilized and algae were manipulated within laminar box. To avoid metals contamination, all the glassware was washed with 5%  $\text{HNO}_3$  before their use, and, all the solutions were prepared with ultrapure Milli-Q water.

### **Growth and chlorophyll content measurement.**

Algae cultures were sampled every 12 hours for 5 days. Growth rates  $\mu$  were calculated using the formula:  $\mu = (\ln N_f - \ln N_i) / \Delta t$ .  $N_f$  was the optical density of the culture measured at the end of the exponential phase at 730 nm using a spectrophotometer ( $\text{OD}_{730\text{nm}}$ ).  $N_i$  was the  $\text{OD}_{730\text{nm}}$  of the culture at the beginning of the exponential phase and  $\Delta t$  was the duration of the exponential phase (in days). Algal chlorophyll content was determined by spectrophotometry at 652 nm in 80% acetone (Arnon, 1949). Briefly, algae from 1 ml of culture were harvested by centrifugation at 13000 g during 1 minute. Then, they were resuspended in 1 ml of 80% acetone and lysed by intense agitation during 2 minutes. Finally, cellular debris were excluded by centrifugation at 13000 g during 4 minutes and absorbance of solubilized chlorophyll was measured at 652 nm ( $\text{Abs}_{652\text{nm}}$ ). Concentration of chlorophyll a and b (C) was calculated using the formula:  $C = \text{Abs}_{652\text{nm}} \times 1000 / 34.5$

### **Starch content measurement.**

Microalgae from control cultures and cultures exposed to 70  $\mu\text{M}$  (Cd) during 48 hours were harvested by centrifugation at 3000 g for 3 minutes and resuspended in 1.5 ml water. A 0.5 ml aliquot was dried at 60°C for 24 hours and the pellet was weighted, giving the dry biomass. The remaining 1 ml sample of concentrated algae was washed once with water and once with 80% ethanol. The pellet was boiled in 2 ml water for 10 minutes. Starch levels were determined in this extract, using the enzymatic starch assay kit HK (Sigma Aldrich).

### **Cadmium concentrations in algal cells.**

After 48h of cadmium exposure at 10 and 70  $\mu\text{M}$ , microalgae were centrifuged at 3000 g for 3 minutes. The algal pellet was washed a first time with 10 ml water, twice with 10 ml of a mix of Na<sub>2</sub>-EDTA (1 mM) / CaCl<sub>2</sub> (3.77 mM) and a second time with 10 ml water as described in (Bräutigam et al., 2011). The pellet was dried at 60°C for 24 hours and weighted. This dry algal biomass was digested in a mixture of 1 ml 70% (v/v) HNO<sub>3</sub> and 1 ml 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 80°C for 3 hours. Samples were then diluted to reach a 2% HNO<sub>3</sub> concentration. Total cadmium content was measured by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, 7500 model, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

### **Subcellular fractionation.**

*C. reinhardtii* homogenization and subcellular fractionation were adapted from (Lavoie et al., 2009a, 2009b). After washing steps (1x10 ml water, 2x10 ml Na<sub>2</sub>-EDTA (1 mM) / CaCl<sub>2</sub> (3.77 mM) solution, 1x10 ml water) cells were resuspended in 1.5 ml of Modified High Salt Medium Rinsed (MHSM-R) (Lavoie et al., 2009b) solution composed of NH<sub>4</sub>Cl (5.0 mg.l<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2.0 mg.l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (1.0 mg.l<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.48 mg.l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.77 mg.l<sup>-1</sup>). This solution without EDTA and trace elements allowed to minimize cadmium redistribution during the fractionation. Then, total Cd concentration was determined by ICP-MS in a 0.5 ml aliquot as previously described. The remaining concentrated algae were homogenized on ice by sonication (power = 22 W, pulse = 0.2/s, time = 4 minutes). Homogenization efficiency was checked by optical microscopy. From this homogenate, 5 subcellular fractions were separated by differential centrifugation: a debris fraction containing cell-walls, membranes, nuclei; a fraction containing NaOH resistant compounds (NRC); a fraction containing organelles

including mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and microsomes; a fraction containing heat stable proteins from the cytosol (HSP) including GSH and PC<sub>n</sub>; a fraction containing heat denaturable proteins from the cytosol (HDP). The homogenate was centrifuged at 1500 g for 15 minutes at 4°C to separate the cell debris pellet from organelles and cytosol supernatant. NRC fraction (pellet) and debris fraction (supernatant) were separated after the cell debris pellet was successively suspended and heated in water at 100°C for 2 minutes, in 0.5 M NaOH at 65°C for 1 hour, and then, centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at 4°C. Organelles fraction was pelleted from the cytosol supernatant by a centrifugation at 100,000 g for 1 hours at 4°C. HDP fraction (pellet) and HSP fraction (supernatant) were separated after the cytosol supernatant was successively heated at 80°C for 10 minutes, cooled on ice for an hour and centrifuged at 50,000 g or 15 minutes at 4°C. All the fractions were mineralized for the cadmium measurement by ICP-MS as previously described.

### **Purification of granules**

In parallel to the subcellular fractionation, polyphosphate granules were purified from independent cultures, as described in (Komine et al., 2000). Cells were washed, disrupted and total Cd concentration was determined in an aliquot by ICP-MS as for subcellular fractionation. After the first centrifugation at 1500 g for 15 minutes at 4°C, the homogenate was separate in the cell debris fraction (pellet) and the organelle/cytosol fraction (supernatant). The cell debris pellet were suspended in 1 ml of MHSM-R solution containing 1% of Triton X-100 and 1 ml of organelle/cytosol supernatant was supplemented by 1% of Triton X-100. The two fractions were vortexed and centrifuged at 10,000g for 10 minutes at 4°C. The pellets were suspended in MHSM-R solution containing 0.73 M of sucrose. Granules were centrifuged through a layer of 1.5 MHSM-R solution containing 1.5 M of sucrose at 400g for 90s. Finally, the collected granules were mineralized for Cd measurements as previously described.

### **Electron microscopy observation**

#### ***Sample preparation.***

#### ***EDX analysis.***

### **Synchrotron-based techniques**

**Sample preparation.** Microalgae from control cultures and cultures exposed to 70  $\mu\text{M}$  of Cd during 2 hours and 48 hours were harvested by centrifugation at 3,000 g for 3 minutes and rapidly suspended in pure water three times to remove metals and organic compounds weakly adsorbed on the cell-wall. Two sample preparations were used. For  $\mu\text{-XRF}$  and Cd LIII-edge  $\mu\text{-XANES}$ , droplets of microalgae solution were deposited on 4  $\mu\text{m}$ -thick Ultralene® film. After a 10 minutes decantation period, water was removed with a paper and the algal depositse were rapidly frozen into isopentane cooled at  $-120^{\circ}\text{C}$ . For Cd LIII-edge XANES bulk analysis, algae pellet was frozen in liquid  $\text{N}_2$ , homogenized and pressed as a 5 mm frozen pellet. All the samples were kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurements and transferred to the microscope in their hydrated frozen state.

**$\mu\text{-XRF}$  imaging.** Analysis were performed on the ID21 beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The X-ray beam was monochromatized using a fixed exit Si(111) two-crystal monochromator. The X-ray photons were focused by a Fresnel zone plate providing a sub-micron resolution of 0.6  $\mu\text{m}$  (H)  $\times$  0.3  $\mu\text{m}$  (V) FWHM on the sample. Elemental maps were obtained by scanning the samples and recording X-ray fluorescence signal with a one-element solid-state High Purity Germanium detector (Princeton Gamma-Tech, USA). The fluorescence signal was normalized by the incident photon intensity ( $I_0$ ) measured with a photodiode made of a 0.75  $\mu\text{m}$  thick aluminum foil. Because algae contain a large amount of potassium, phosphorus, sulfur, chloride, and cadmium maps were recorded using an incident energy of 3570 eV, below the absorption edge of potassium, while potassium and calcium maps were recorded at 4100 eV.

**Cd LIII-edge  $\mu\text{-XANES}$  and XANES.**  $\mu\text{-XANES}$  Spectra were recorded with the same lateral resolution than for  $\mu\text{-XRF}$  in fluorescence mode on points of interest visualized on the  $\mu\text{-XRF}$  maps. For Cd model compounds and bulk samples, XANES spectra were recorded in fluorescence mode with a defocused beam (100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$ ). All measurements were done in cryogenic conditions using a liquid  $\text{N}_2$  cryostat to limit beam radiation damage and speciation change. All XANES spectra were collected in the energy range 3520-3590 eV. For XANES spectra, a sum of 30 scans was calibrated with a metallic Cd foil, averaged, and normalized according to standard methods using ATHENA software(Ravel and Newville, 2005). Then, experimental normalized spectra were compared to a library of standard spectra that we have

already collected (Isaure et al., 2006, 2015) and with Cd-phytate. A Cd-phytate standard sample was synthesized at a Cd concentration of 500 ppm and a ligand/metal ratio (M/L) of 1/10 at pH 10.4. The liquid was mixed with glycerol (25%, v/v) to prevent ice crystal formation during cooling. A drop was deposited on 4 µm-thick Ultralene® film and immersed in liquid N<sub>2</sub>. A fingerprint approach was used to simulate the unknown spectra by linear combination fits (LCFs) of Cd model compounds as described in (Isaure et al., 2006). The quality of the fits was estimated by the normalized sum-squares residuals  $NSS = \frac{\sum(X_{\text{anes}_{\text{experimental}}} - X_{\text{anes}_{\text{fit}}})^2}{\sum(X_{\text{anes}_{\text{experimental}}})^2} \times 100$ , in the 3520-3580 eV range. Linear combination fits with one, two and three components were tested and the combination with n+1 components was retained if the NSS parameter decreased more than 20% in comparison to the fit with n components. The uncertainty on the amount of Cd species was estimated to ± 10%.

**Cd K-edge XANES and EXAFS.** Cd K-edge measurements were conducted on the FAME (BM30B) beamline at the ESRF. The X-ray beam was monochromatized using a Si(2 2 0) double crystal monochromator. Measurements were at 15 K using an helium cryostat. Spectra were recorded in fluorescence mode using a 30-elements solid-state Germanium detector (Canberra, Lingolsheim, France) in the energy range 26495-27450 eV. Ten or twenty scans collected on various positions of the pellets were summed for each sample. The extraction of XANES and EXAFS signal was performed according to standard methods using ATHENA software. The XANES and k<sup>3</sup>-weighted EXAFS spectra were least-squares fitted, respectively, in the energy range 26690-26790 eV and over a wave vector (k) range of 2.0–11.5 Å<sup>-1</sup>, using a combination of Cd standards spectra previously collected (Huguet et al., 2012). The quality of the fit was estimated by the NSS defined as  $\frac{\sum[k^3 \chi_{\text{exp}} - k^3 \chi_{\text{fit}}]^2}{\sum[k^3 \chi_{\text{exp}}]^2} \times 100$ . Linear combination fits with one, two and three components were tested, and the procedure described for Cd L<sub>III</sub> XANES was applied to retain the best representative fit. The uncertainty on the amount of Cd species was estimated to ± 10%.

### Statistics

Statistical analyses were performed on the data to identify significant differences between the different conditions, using one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test. Results were considered significant for a  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

## Cells vitality

Growth and chlorophyll level were monitored to detect Cd toxicity (Figure 1, A and B). These two parameters depended on the strain, and were thus expressed in relative to control condition for comparison. In TAP medium, growth and chlorophyll content were not different in control condition, in 10  $\mu\text{M}$  Cd and in 70  $\mu\text{M}$  Cd for the three strains. However, in modified TAP medium, the effect on growth and chlorophyll content were particularly strong at 70  $\mu\text{M}$  Cd for wt strain ( $50.7 \pm 8.2$  % of control growth and  $76.4 \pm 3.9$  % of control chlorophyll content) ( $p < 0.05$ ). For pcs1 strain, in spite of a significant growth decrease of  $30.9 \pm 3.44$  % ( $p < 0.05$ ), the chlorophyll was not degraded. Finally, the cw15 strain was the more tolerant with a non-affected growth and a slight decrease of chlorophyll level ( $5.7 \pm 1.2$  %) ( $p < 0.05$ ).

In TAP medium, calculation using Visual MINTEQ showed that most of Cd was complexed by EDTA ( $[\text{Cd}(\text{EDTA})_2^-]$ ) of 9.979  $\mu\text{M}$  and 57.804  $\mu\text{M}$  for 10 and 70  $\mu\text{M}$  total [Cd], thus suggesting a low bioavailability of the metal (free  $[\text{Cd}^{2+}]$  of 41 nM and 3.672  $\mu\text{M}$  for 10 and 70  $\mu\text{M}$  total [Cd]). As expected, in modified TAP medium, Cd bioavailability was increased (free  $[\text{Cd}^{2+}]$  3.010  $\mu\text{M}$  and 21.148  $\mu\text{M}$ ) and could explain the decline in vitality. Due to the overexpression of PCS in the chloroplast, the pcs1 phenotype seemed to protect chlorophyll and better resist to cadmium stress. Surprisingly, the cw15 strain was the most tolerant of the three strains. Generally, the absence of cell-wall was a disadvantage against metallic stress (Macfie et al., 1994; Prasad et al., 1998), but cw15 was reported to be as Cd tolerant as walled strain in a previous study (Cain and Allen, 1980). In these experiments, *C. reinhardtii* was cultivated autotrophically in modified or in classic high salt medium, and thus cw15 strain seemed to be more Cd tolerant when it was cultivated in mixotrophic conditions.

Starch level was measured after 48 hours of cadmium exposition (Figure 1, C). Pcs1 was the most starch accumulative strain with  $133.6 \pm 3.1$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  and the starch content did not change after a 70  $\mu\text{M}$  Cd exposure in TAP medium. For wt, the level of starch was lower in non-contaminated and 70  $\mu\text{M}$  Cd TAP medium but significantly increased in modified TAP medium exposed to Cd (from  $47.6 \pm 4.7$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  in control to  $87.8 \pm 3.2$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  in Cd condition).

Starch accumulation was already reported in *C. acidophila*, during cadmium stress (Nishikawa et al., 2006). In *C. reinhardtii*, starch accumulation could be induced

by nitrogen(Ball et al., 1990; Cakmak et al., 2012), phosphate(Ball et al., 1990) and sulfur(Ball et al., 1990; Cakmak et al., 2012) deprivation. In pcs1 strain, the overexpressed phytochelatin synthase in the chloroplast was likely to enhance phytochelatin synthesis, thereby disturbing sulfur metabolism. Also, we can hypothesize that wt strain strongly stressed in contaminated mTAP medium could produce large amount of phytochelatin, thus disturbing sulfur metabolism and producing starch.

### **Cadmium accumulation**

Intracellular cadmium content was measured to compare Cd accumulation (figure 1, D). Cd concentrations increased in the three strains with increasing Cd exposure. Cd contents were also higher in the modified TAP medium in agreement with a higher bioavailability of Cd compared to the TAP medium. For all conditions, Cd concentration in wt was similar to the one in pcs1 strain. At 10  $\mu\text{M}$  Cd concentration, cw15 strain had always the highest Cd content ( $2.80 \pm 0.53 \mu\text{g.g}^{-1}$  dry weight (dw) in TAP medium and  $343.7 \pm 35.2 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw in mTAP medium). In TAP medium contaminated with 70  $\mu\text{M}$  of cadmium, cw15 strain had the lower Cd content ( $88.1 \pm 5.8 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw versus  $158.8 \pm 55.7 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for pcs1 and  $162.7 \pm 34.7 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for wt). However this decrease for cw15 was not observed in the contaminated modified TAP medium ( $1530.4 \pm 132.5$ ,  $1477.4 \pm 46.4$  and  $1606.2 \pm 60.4 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for wt, pcs1 and cw15 strains, respectively).

The hypothesis that the cell-wall of *C. reinhardtii* enhanced Cd tolerance at low Cd concentration(Macfie and Welbourn, 2000) was not verified in the present study because no signs of toxicity was detected. However, at 10  $\mu\text{M}$  Cd concentration in TAP and mTAP medium, cw15 strain had the highest Cd uptake showing that the cell-wall could restrain Cd entrance. Surprisingly, in TAP medium contaminated by 70  $\mu\text{M}$  Cd, cw15 strain took less Cd than walled strains, as also showed in(Macfie and Welbourn, 2000), but the mechanisms involved in this phenomena are still unknown. At high free Cd concentration (mTAP medium), no differences in Cd uptake was noted between the three strains indicating that Cd binding sites on the cell-wall could be saturated.

### **Cadmium subcellular distribution**

Cadmium subcellular distribution was determined (figure 2, A) in the three *C. reinhardtii* strains grown in TAP medium and in wt strain cultivated in mTAP medium, exposed to 70  $\mu$ M Cd. Cd mass balances (sum of Cd content in all the fractions compared to total intracellular Cd content in microalgae) amounted to 100.9 $\pm$  10.0 % for wt, 94.2 $\pm$  6.5 % for cw15, 82.2 $\pm$  2.6 % for pcs1 in TAP medium and to 108.8 $\pm$  13.6 % for wt in mTAP medium and were thus correct.

In wt strain grown in TAP medium, cadmium was mainly sequestered in both HDP (38.1  $\pm$  1.1 %) and HSP (39.7  $\pm$  5.1 %) fractions. With the enhanced intracellular cadmium resulting from mTAP medium, the proportion of the metal bound to the HSP fraction increased (61.4  $\pm$  16.6 %). In pcs1 strain, Cd was mainly located in organelles (34.6  $\pm$  3.6 %), which contained mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and microsomes, and debris (24.9  $\pm$  7.0 %), containing cell walls, membranes and nuclei. For cw15, the organelle fraction constituted the dominant pool of Cd (68.4  $\pm$  3.5 %). To pinpoint the possible association of Cd with polyphosphate granules, they were purified from the debris and organelle/cytosol fractions, and results showed that they contained 23.9  $\pm$  8.6 % of total Cd for pcs1 and 20.9  $\pm$  5.8 % for cw15 (Figure 2B).

For wt strain, the transfer of Cd to HSP fraction with the increasing of cadmium stress was already observed (Lavoie et al., 2009a), indicating that the molecules such as phytochelatins and/or glutathione, known for detoxification, were involved in Cd trapping. On the contrary, these fractions were minor for both pcs1 and cw15 strains, suggesting different mechanisms of detoxification. Chloroplasts were broken during the cell lysis of the fractionation protocol, and thus their content is dispatched into the various fractions. Phytochelatins overexpressed in the chloroplasts for pcs1 are expected to concentrate in the HSP fraction while pyrenoid and starch, also present in the chloroplasts for the three strains are expected to be found in debris due to their relative high density. For pcs1 and cw15 strains, the purification of polyphosphate granules using specific protocol showed that they contained more than 20 % of intracellular Cd, showing that poly-P granules played an important role in the Cd sequestration.

## Cadmium localization in the wt strain ultrastructure by TEM-EDX

TEM images (figure 3, A and B) of wt strain contaminated by 70  $\mu\text{M}$  Cd in TAP medium provided ultrastructural details and punctual EDX analysis allowed to determine elemental distribution in specific organelles. Compared to wt grown in control TAP medium, the ultrastructure was not altered by the Cd exposure (data not shown). X-Ray Analysis were performed on thylakoids, starch, nucleus, pyrenoid and electron-dense bodies but Cd was only detected on the three last organelles. The Nucleus (figure 3, spectra D) contained Cd and Pyrenoid (figure 3, spectra E) contained S, K, Ca and Cd. Electron-dense vacuoles (figure 3, spectra C) contained S and K but were particularly rich in P, Ca and Cd.

Cadmium was mainly found in electron-dense vacuoles co-located with P and Ca, suggesting a sequestration into polyphosphate bodies. This mechanism of Cd sequestration was already observed in *Chlamydomonas acidophila*. In this species, Cd was found as electron-dense deposit into vacuoles and Cd exposure induced the disappearance of vacuolar polyphosphate and the increase of vacuolar short-chain phosphate species (Nishikawa et al., 2003a). *C. reinhardtii* is known to have small acidic vacuoles, filled by polyphosphate granules and calcium, with the same elemental composition of the electron-dense vacuoles in the present study. These organelles could serve as vehicle to secrete cell-wall proteins (Komine et al., 1996, 2000). Similar acidic vacuoles were described (Hong-Hermesdorf et al., 2014; Ruiz et al., 2001) and compared to acidocalcisome, due to their chemical composition (P and Ca) and the presence of specific proton pyrophosphatase ( $\text{H}^+$ -PPase) and vacuolar proton ATPase (V-  $\text{H}^+$ -ATPase). This organelle, conserved from bacteria to human cells, was involved in phosphate storage, pH and cations homeostasis (Docampo, 2006; Docampo and Moreno, 2011; Docampo et al., 2010; Huang et al., 2014). In *C. reinhardtii*, the co-location of the  $\text{H}^+$ -PPase, the V-  $\text{H}^+$ -ATPase and polyphosphate in acidocalcisome and contractile vacuole showed an interaction between these two organelles, indicating acidocalcisome played an important role in the osmoregulation of phosphate and cations (Ruiz et al., 2001). Indeed, acidocalcisomes were shown to play a role in the copper homeostasis during zinc depletion (Hong-Hermesdorf et al., 2014). Regarding the Cd, P and Ca co-location in the present study, Cd sequestration in acidocalcisomes could be hypothesized. Cd was also located in the nucleus and the pyrenoid. Essentially composed of ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase (Rubisco), the pyrenoid surrounded by a starch shell is the central place of CO<sub>2</sub> assimilation. Cd was known to decrease Rubisco activity impairing CO<sub>2</sub> assimilation in higher plants as *Lactuca sativa* (Dias et al., 2012) and *Nicotiana rustica* (Afef et al., 2011). However, in TAP medium, *C. reinhardtii* did not show any signs of toxicity.

### **Cadmium localization by $\mu$ XRF**

Results showed that for all the strains investigated, Cd level was highly heterogeneous between cells since no signal was detected in some algae although essential elements such as P and S were clearly measured in these cells (figure 4). Two Cd pools were observed for wt strain in the TAP medium: diffuse Cd in the whole cell and Cd hot spots in micrometer-sized spots in association with P and Ca. For the modified TAP medium, Ca was also present in micrometer sized 'grains' and S was found diffuse in the cells and present as a unique hot spot as for the TAP medium. The occurrence of P micrometer-sized spots was less clear than for the TAP medium. Cd was located in a unique hot spot as S, and diffuse in a structure resembling the chloroplast structure. Pcs1 strain showed a different pattern: although S was still present as a unique hot spot in the cell in addition to a diffuse background in the chloroplast, P and Ca high concentrations were encountered around this S spot. Concerning the cell-wall deficient strain, intracellular Cd concentration was not enough high to collect Cd map. However, in control conditions, micrometers-sized spots of P and Ca were collocated, inside and outside the cells.

A Sulfur hot spot was present in each *C. reinhardtii* cell, with a size which could correspond to the nucleus or the pyrenoid. Using elemental composition of these organelles obtain by TEM-EDX, possibility that S hot spot could correspond to the nucleus can be exclude. For the wt strain in TAP medium, as shown by TEM-EDX analysis, Cd could be sequestered in polyphosphate bodies, hypothetically associated to acidocalcisomes. On the left cell, the accumulation of small vacuoles rich in Cd (Cd, P and Ca collocated) on top of cell seemed to be a contractile vacuole during the systole state (Denning and Fulton, 1989), confirming the link between acidocalcisomes and contractile vacuole (Ruiz et al., 2001). The presence of diffuse Cd in the whole cell showed that cryogenic conditions during sample preparation and  $\mu$ XRF analysis

preserved metal distribution(Lombi et al., 2011b, 2011c; Sarret et al., 2013). In modified TAP medium, Cd was not sequestered in polyphosphate bodies but in the chloroplast, particularly on the pyrenoid. P and Ca were still collocated but spot size was bigger than in wt grown in TAP medium. Cd saturation of the pyrenoid and the size increasing of vacuoles could be the cause of signs of toxicity. In the pcs1 strain, Cd had a similar distribution than in wt in mTAP medium but P, S and Ca seemed to be present in the chloroplast and particularly in the pyrenoid. This strain is the more starch accumulative. Large amount of starch in the chloroplast could explain the different distribution in P, S and Ca. Finally, for cw15 strain, Cd seemed to not be present in large quantity into the cells. In control conditions, P and Ca collocated in small spots outside the cells could correspond to the excretion of polyphosphate granules, due to the lack of cell-wall, as it was already reported(Komine et al., 1996). Cd could be excreted and, then lost during sample preparation, explaining the low intracellular Cd concentration.

### ***In situ* cadmium speciation by $\mu$ -XANES**

$\mu$ -XRF used in tandem with  $\mu$ -XANES (figure 4) allowed to locate cadmium within the cells and to determine *in situ* cadmium speciation in cadmium-rich spots visualized on areas of interest. As previously shown(Isaure et al., 2006, 2015), Cd L<sub>III</sub> edge and Cd K edge XANES were powerful to distinguish sulfur and oxygen coordination. Cd L<sub>III</sub>-edge  $\mu$ -XANES spectra were treated by linear combination fits (LCFs) using reference spectra (figure 5, C). Spectra of Cd coordinated by sulfur atoms, namely Cd-phytochelatin<sub>2</sub> (Cd-PC<sub>2</sub>), Cd-glutathione complex (Cd-GSH) and Cd-cystein had similar features and thus it was not possible to determine the exact nature of the S donor ligands. With a typical peak at 3539 eV (dashed line in figure 5, C) , spectra of Cd-O species can be easily differentiate from spectra of Cd-S species. Moreover, the second oscillation for Cd complexed to organic acids as Cd-acetate and Cd-malate was shifted to higher energy values than Cd complexed to phosphate as Cd-phosphate and Cd-phytate (arrows in figure 5, C). Consequently, it was possible to differentiate the nature of the O donor ligands and to discriminate Cd-organic acids ligands from Cd-phosphate ligands. The results of the linear combination fits were expressed as proportions of Cd-S species, Cd-O-P species and Cd-O-C species.

Xanes spectra collected on the enriched Cd, P, Ca small grains of the wt strain in TAP medium (point 1 in figure 5E) clearly indicated that Cd was mainly coordinated to O-P

atoms. The spectrum features are in agreement with Cd-phytate spectrum structure and a good fit was obtained with 76% Cd-phytate + 31% Cd-cystein. In contrast, in the more diffuse Cd area, containing more S, the proportion of S ligands increased (66% Cd-S and 27% Cd-O-P). In the mTAP medium, speciation of Cd was different: the main part of Cd was associated to O ligands (86% Cd-O-P and 25% Cd-S) while Cd was found preferentially associated to S ligands in the unique Cd hot spot of the cell, which was also enriched with S. For pcs1 strain,  $\mu$ XANES collected on two points (Cd hot spot and less enriched area) could be fitted with thiol ligands only. For cw15, Cd signal by  $\mu$ -XRF was really low and cells were not enough concentrated in Cd to perform  $\mu$ -XANES analysis.

For wt strain in TAP medium, it could be hypothesized that Cd was trapped in small grains of phosphate containing Ca, hypothetically associated to acidocalcisomes. In the rest of the cell, Cd was mainly complexed by thiolated groups. *C. reinhardtii* is well-known to synthesize thiolated peptides like GSH and phytochelatins when exposed to Cd stress (Bräutigam et al., 2011; Gekeler et al., 1988; Hu et al., 2001). The interpretation of Cd first sphere of coordination was difficult for wt in mTAP medium and pcs1 because proportions in S/O ligands did not change with the location. However, it is interesting to note that, in modified TAP medium, Cd sequestered in the pyrenoid was bound to sulfur ligands. The pcs1 strain overexpressed PCS into the chloroplast and Cd should be complexed by phytochelatins.

### **Global cadmium speciation by Cd L<sub>III</sub>-edge and Cd K-edge XAS.**

Cadmium chemical environment was determined in bulk micro-algae for *C. reinhardtii* wt, pcs1 and cw15 strains grown in TAP or mTAP medium and exposed to 70  $\mu$ M [Cd] during 2 hours or 48 hours to evaluate the impact of time exposure. For Cd K-edge XANES and EXAFS, it was also possible to differentiate spectra of Cd-S ligands, Cd-O-C ligands and Cd-O-P ligands. For Cd K-edge XANES, O ligands induced a more intensive white line than S ligands (dashed line in figure 5, A), and the second oscillation for Cd-phosphate ligands was shifted to higher energy values than for Cd-organic acids ligands (arrow in figure 5, A). Concerning EXAFS spectra, the frequency of oscillations for Cd-thiol complexes was higher than for Cd-O ligands (figure 5, B), which is reflected by a clear shift of the first peak of the Fourier transformation to higher R+ $\Delta$ R values (figure 5, D). Moreover, Cd-phosphate ligands showed a typical shape of the second oscillation (figure 5, B).

Results in figure 6 showed that linear combination fits from Cd L<sub>III</sub>-edge XANES, Cd K-edge XANES and EXAFS gave similar results. The proportion of Cd-thiol containing complexes increased between 2 hours and 48 hours of Cd exposure, in any culture conditions. Thereby, wt strain in modified TAP medium had more cadmium bound to oxygen ligands (35% Cd-phosphate + 51% Cd-phytate + 25% Cd-GSH (NSS=0.12)) than in classic TAP medium (88% Cd-GSH + 13% Cd-phytate (NSS=0.14)) after 48h of cadmium exposition. In pcs1 strain, the proportion of Cd associated to S atoms increased slightly between 2 hours and 48 hours exposition time (35% Cd-cystein + 42% Cd-phytate + 24% Cd-phosphate after 2 hours (NSS=0.10) and 48% Cd-GSH + 26% Cd-phytate + 30% Cd-phosphate after 48 hours (NSS=0.20)). The cw15 strain XANES spectrum was collected for the 48h Cd exposure time only due to insufficient amount of Cd for the shorter time of exposure. All the Cd was bound to sulfur ligands after 48h of exposition.

Except for wt in TAP medium, Cd speciation from  $\mu$ -XANES did not correspond to Cd speciation in bulk samples. A dominance of S ligands was also found for the bulk sample, indicating that although some disperse phosphate grains could sequester Cd, the main part was coordinated by S atoms in most of the algae. These differences could be explain by the heterogeneity of intracellular Cd amounts observed on  $\mu$ -XRF maps. Moreover, at the micro-scale,  $\mu$ -XANES spectra was not easy to record due to the low amount of Cd in areas of interest. In any conditions, the increase of the proportions of Cd bound to thiolated compounds with the time exposure could be imputed to the induction of the thiolated peptides like phytochelatins synthesis during cadmium stress (Bräutigam et al., 2011; Gekeler et al., 1988; Hu et al., 2001). Nevertheless, it was reported that phytochelatins synthesis level and Cd accumulation was not necessarily correlated, but the maintenance of GSH level was more important for Cd accumulation (Nishikawa et al., 2006). For the wt strain, the apparition of signs of toxicity when cultivated in mTAP medium was follow by a switch of the nature of the Cd-ligands (from S-ligands to O-ligands). It could be due to the increasing of oxidative stress within the cell or to the modification of the phosphate metabolism. Therefore, at high free Cd concentration, phytocheltins and others thiolated peptides would not be the main sequestering mechanism against cadmium. For pcs1, since the phytochelatin synthase was surexpressed, thiolated peptides level should not be strongly increased over exposition time. However, in comparison with wt type, Cd was

highly bound to Cd-O ligands, suggesting that the PCs produced in the chloroplasts were not involved in Cd trapping. For cw15, the only Cd binding by thiolated compounds could be explain, once again, by the excretion of the polyphosphate granules during the sample preparation.

## CONCLUSIONS

Complementary results of the techniques used in the present work allowed to determine main tolerance strategies implemented by each *C. reinhardtii* strains to cope with cadmium stress. The wt strain, grown in TAP medium at 70  $\mu\text{M}$  Cd, did not have signs of toxicity. According to XAS analysis and subcellular fractionation, Cd was mainly sequestered by thiolated compounds, found in the HDP and HSP fraction. Imaging showed Cd sequestration by O-ligands in polyphosphate granules which could be related to acidocalcisomes. In modified TAP medium at 70  $\mu\text{M}$  Cd, growth and chlorophyll content decreased significantly. Cd was located in the chloroplast and particularly in the pyrenoid which could explain the growth decrease, impairing  $\text{CO}_2$  assimilation. XAS analysis revealed that Cd was mostly bound to O-ligands. This switch of ligands, in toxic conditions, went with the enrichment of the HSP fraction expected containing PCs, indicating that Cd was not necessarily bound to thiolated compounds in the HSP fraction. Pcs1 strain was able to synthesize PCS directly in the chloroplast and produced large amounts of starch. Surprisingly, only a half of the Cd pool was bound to thiolated compounds, in the chloroplast. Expected to be found in the HSP fraction, Cd seemed to be sequestered in polyphosphate granules in the organelles fraction and, in pyrenoid potentially present in debris fraction. Cw15 strain was the most Cd tolerant strain. Cd was concentrated in the organelles fraction, containing polyphosphate granules. Due to the lack of cell-wall, this strain was well-known to excrete polyphosphate granules as see in  $\mu\text{XRF}$  imaging. Thus, Cw15 seemed to maintain low intracellular Cd concentration by the excretion of Cd bound to polyphosphate granules.

## REFERENCES

- Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R.T., and Traina, S.J. (2002). Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 210, 1–11.
- Afef, N.-H., Leila, S., Donia, B., Houda, G., and Chiraz, C.-H. (2011). Relationship between physiological and biochemical effects of cadmium toxicity in *Nicotiana rustica*. *Am. J. Plant Physiol.* 6, 294–303.
- Arnon, D.I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15.
- Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.-C., and Matagne, R. (1990). Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66, 1–9.
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., and Arica, M.Y. (2006). Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *Int. J. Miner. Process.* 81, 35–43.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (W H Freeman).
- Boullemant, A., Le Faucheur, S., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2011). UPTAKE OF LIPOPHILIC CADMIUM COMPLEXES BY THREE GREEN ALGAE: INFLUENCE OF HUMIC ACID AND ITS pH DEPENDENCE<sup>1</sup>. *J. Phycol.* 47, 784–791.
- Bräutigam, A., Schaumlöffel, D., Krauss, G.-J., and Wesenberg, D. (2009). Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides—a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1737–1747.
- Bräutigam, A., Wesenberg, D., Preud'homme, H., and Schaumlöffel, D. (2010). Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 877–883.
- Bräutigam, A., Schaumlöffel, D., Preud'Homme, H., Thondorf, I., and Wesenberg, D. (2011). Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 34, 2071–2082.
- Burnap, R.L. (2004). D1 protein processing and Mn cluster assembly in light of the emerging Photosystem II structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 4803–4809.
- Burow, M.D., Chen, Z.-Y., Mouton, T.M., and Moroney, J.V. (1996). Isolation of cDNA clones of genes induced upon transfer of *Chlamydomonas reinhardtii* cells to low CO<sub>2</sub>. *Plant Mol. Biol.* 31, 443–448.
- Byrne, T.E., Wells, M.R., and Johnson, C.H. (1992). Circadian Rhythms of Chemotaxis to Ammonium and of Methylammonium Uptake in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 98, 879–886.

- Cai, X.-H., Brown, C., Adhiya, J., Traina, S.J., and Sayre, R.T. (1999). Growth and Heavy Metal Binding Properties of Transgenic *Chlamydomonas* Expressing a Foreign Metallothionein Gene. *Int. J. Phytoremediation* 1, 53–65.
- Cain, J.R., and Allen, R.K. (1980). Use of a cell wall-less mutant strain to assess the role of the cell wall in cadmium and mercury tolerance by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 792–801.
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y.E., Ozkan, A.D., Elibol, Z., and Tekinay, T. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1947–1957.
- Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between Trace Metals and Aquatic Organisms: A Critique of the Free-Ion Activity Model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier, and D.R. Turner, eds. pp. 45–102.
- Campbell, P.G.C. (2006). Cadmium-A priority pollutant. *Environ. Chem.* 3, 387–388.
- Castaing, R., and Slodzian, G. (1962). Microanalyse par émission ionique secondaire. *J. Microsc.* 395–410.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475–486.
- Clemens, S. (2006a). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.
- Clemens, S. (2006b). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* 163, 319–332.
- Clément, F., Lecoq, E., Duday, D., Belmonte, T., Audinot, J.-N., Lentzen, E., Penny, C., Cauchie, H.-M., and Choquet, P. (2011). NanoSIMS50 analyses of Ar/18O<sup>2</sup> plasma-treated *Escherichia coli* bacteria. *New J. Phys.* 13.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825–832.
- Croteau, M.-N., Hare, L., and Tessier, A. (1998). Refining and Testing a Trace Metal Biomonitor (*Chaoborus*) in Highly Acidic Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1348–1353.
- Denning, G.M., and Fulton, A.B. (1989). Electron Microscopy of a Contractile-Vacuole Mutant of *Chlamydomonas Moewusii* (chlorophyta) Defective in the Late Stages of Diastole<sup>1</sup>. *J. Phycol.* 25, 667–672.
- Dent, R.M., Han, M., and Niyogi, K.K. (2001). Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Plant Sci.* 6, 364–371.
- Devès, G., Isaure, M.-P., Lay, P.L., Bourguignon, J., and Ortega, R. (2005). Fully quantitative imaging of chemical elements in *Arabidopsis thaliana* tissues using STIM, PIXE and RBS. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 231, 117–122.

- Dias, M.C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., and Santos, C. (2012). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol. Plant.* *35*, 1281–1289.
- Diaz, J., Ingall, E., Vogt, S., de Jonge, M.D., Paterson, D., Rau, C., and Brandes, J.A. (2009). Characterization of phosphorus, calcium, iron, and other elements in organisms at sub-micron resolution using X-ray fluorescence spectromicroscopy. *Limnol. Oceanogr. Methods* *7*, 42–51.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., and Santore, R.C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* *20*, 2383–2396.
- Docampo, R. (2006). Acidocalcisomes and polyphosphate granules. In *Inclusions in Prokaryotes*, (Springer), pp. 53–70.
- Docampo, R., and Moreno, S.N.J. (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium* *50*, 113–119.
- Docampo, R., Ulrich, P., and Moreno, S.N.J. (2010). Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *365*, 775–784.
- Durrant, S.F., and Ward, N.I. (2005). Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* *20*, 821–829.
- Dutcher, S.K. (2000). *Chlamydomonas reinhardtii*: Biological Rationale for Genomics1. *J. Eukaryot. Microbiol.* *47*, 340–349.
- Ernst, W.H.O., Krauss, G.-J., Verkleij, J. a. C., and Wesenberg, D. (2008). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ.* *31*, 123–143.
- Errécalde, O., and Campbell, P.G.C. (2000). Cadmium and Zinc Bioavailability to *Selenastrum Capricornutum* (chlorophyceae): Accidental Metal Uptake and Toxicity in the Presence of Citrate. *J. Phycol.* *36*, 473–483.
- Faller, P., Kienzler, K., and Krieger-Liszky, A. (2005). Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1706*, 158–164.
- Feldmann, J., Salaün, P., and Lombi, E. (2009). Critical review perspective: Elemental speciation analysis methods in environmental chemistry-moving towards methodological integration. *Environ. Chem.* *6*, 275–289.
- Foster, R.A., Szejnreusz, S., and Kuypers, M.M.M. (2013). Measuring carbon and N<sub>2</sub> fixation in field populations of colonial and free-living unicellular cyanobacteria using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry<sup>1</sup>. *J. Phycol.* *49*, 502–516.

- François, L., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2007). pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* *84*, 123–132.
- Fujiwara, S., Kobayashi, I., Hoshino, S., Kaise, T., Shimogawara, K., Usuda, H., and Tsuzuki, M. (2000). Isolation and Characterization of Arsenate-Sensitive and Resistant Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* *41*, 77–83.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M.H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* *150*, 197–202.
- Gillet, S., Decottignies, P., Chardonnet, S., and Maréchal, P.L. (2006). Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. *Photosynth. Res.* *89*, 201–211.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998). Chloroplast Transformation and Reverse Genetics. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, eds. (Springer Netherlands), pp. 139–149.
- Goodenough, U.W., Shames, B., Small, L., Saito, T., Crain, R.C., Sanders, M.A., and Salisbury, J.L. (1993). The role of calcium in the *Chlamydomonas reinhardtii* mating reaction. *J. Cell Biol.* *121*, 365–374.
- Goto, K., and Johnson, C.H. (1995). Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* *129*, 1061–1069.
- Gray, A.L. (1985). Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst* *110*, 551–556.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1465*, 190–198.
- Hanikenne, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol.* *159*, 331–340.
- Hanikenne, M., Matagne, R.F., and Loppes, R. (2001). Pleiotropic mutants hypersensitive to heavy metals and to oxidative stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiol. Lett.* *196*, 107–111.
- Hanikenne, M., Krämer, U., Demoulin, V., and Baurain, D. (2005a). A Comparative Inventory of Metal Transporters in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol.* *137*, 428–446.
- Hanikenne, M., Motte, P., Wu, M.C.S., Wang, T., Loppes, R., and Matagne, R.F. (2005b). A mitochondrial half-size ABC transporter is involved in cadmium tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* *28*, 863–873.
- Harris, E.H. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use* (Academic Press).

- Hegemann, P. (1997). Vision in microalgae. *Planta* 203, 265–274.
- Hiriart-Baer, V.P., Fortin, C., Lee, D.-Y., and Campbell, P.G.C. (2006). Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquat. Toxicol.* 78, 136–148.
- Hong-Hermesdorf, A., Miethke, M., Gallaher, S.D., Kropat, J., Dodani, S.C., Chan, J., Barupala, D., Domaille, D.W., Shirasaki, D.I., Loo, J.A., et al. (2014). Subcellular metal imaging identifies dynamic sites of Cu accumulation in *Chlamydomonas*. *Nat. Chem. Biol.*
- Hu, S., Lau, K.W.K., and Wu, M. (2001). Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 161, 987–996.
- Huang, G., Ulrich, P.N., Storey, M., Johnson, D., Tischer, J., Tovar, J.A., Moreno, S.N.J., Orlando, R., and Docampo, R. (2014). Proteomic Analysis of the Acidocalcisome, an Organelle Conserved from Bacteria to Human Cells. *PLoS Pathog* 10, e1004555.
- Huguet, S., Bert, V., Laboudigue, A., Barthès, V., Isaure, M.-P., Llorens, I., Schat, H., and Sarret, G. (2012). Cd speciation and localization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Environ. Exp. Bot.* 82, 54–65.
- Hutchins, C.M., Simon, D.F., Zerges, W., and Wilkinson, K.J. (2010). Transcriptomic signatures in *Chlamydomonas reinhardtii* as Cd biomarkers in metal mixtures. *Aquat. Toxicol.* 100, 120–127.
- Im, C.S., and Grossman, A.R. (2002). Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 30, 301–313.
- Imam, S.H., Buchanan, M.J., Shin, H.C., and Snell, W.J. (1985). The *Chlamydomonas* cell wall: characterization of the wall framework. *J. Cell Biol.* 101, 1599–1607.
- Isaure, M.-P., Fayard, B., Sarret, G., Pairis, S., and Bourguignon, J. (2006). Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 61, 1242–1252.
- Isaure, M.-P., Huguet, S., Meyer, C.-L., Castillo-Michel, H., Testemale, D., Vantelon, D., Saumitou-Laprade, P., Verbruggen, N., and Sarret, G. (2015). Evidence of various mechanisms of Cd sequestration in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, the non-accumulator *Arabidopsis lyrata*, and their progenies by combined synchrotron-based techniques. *J. Exp. Bot.* erv131.
- Jackson, R.B., Carpenter, S.R., Dahm, C.N., McKnight, D.M., Naiman, R.J., Postel, S.L., and Running, S.W. (2001). Water in a changing world. *Ecol. Appl.* 11, 1027–1045.
- Jamers, A., Blust, R., Coen, W.D., Griffin, J.L., and Jones, O.A.H. (2013a). Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *BioMetals* 26, 731–740.

- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., and Jones, O.A.H. (2013b). An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* *126*, 355–364.
- Jiang, Y., Pan, F., Ji, H., Zhang, X., Zhu, Y., and Hu, X. (2012). Adsorption kinetics and equilibrium isotherms of cadmium removal from wastewater using *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in sodium alginate. In 2012 International Symposium on Geomatics for Integrated Water Resources Management, GIWRM 2012,.
- Johnson, X., and Alric, J. (2013). Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. *Eukaryot. Cell* *12*, 776–793.
- Johnson, X., Houille-Vernes, L., and Alric, J. (2011). Screening and studying photosynthetic mutants: Basics and beyond. *Bioenergetics* 239–244.
- Joux-Arab, L., Berthet, B., and Robert, J.M. (1998). Distribution of copper in the diatom *Haslea ostrearia simonsen*. *Mar. Environ. Res.* *46*, 555–558.
- Jr, A.R.P. (2003). Rubisco activase – Rubisco’s catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* *75*, 11–27.
- Keller, J., Smith, N., Boswell, R., Scipioni, L., Charles, C., and Sutherland, O. (2014). Magnetically enhanced, inductively coupled plasma source for a focused ion beam system.
- Kindle, K.L. (1998). Nuclear Transformation: Technology and Applications. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, eds. (Springer Netherlands), pp. 41–61.
- Klein, U., Chen, C., Gibbs, M., and Platt-Aloia, K.A. (1983). Cellular Fractionation of *Chlamydomonas reinhardtii* with Emphasis on the Isolation of the Chloroplast. *Plant Physiol.* *72*, 481–487.
- Knoll, M., and Ruska, E. (1932). Das Elektronenmikroskop. *Z. Für Phys.* *78*, 318–339.
- Kola, H., and Wilkinson, K.J. (2005). Cadmium Uptake by a Green Alga Can Be Predicted by Equilibrium Modelling. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 3040–3047.
- Kola, H., Laglera, L.M., Parthasarathy, N., and Wilkinson, K.J. (2004). Cadmium adsorption by *chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environ. Chem.* *1*, 172–179.
- Komine, Y., Park, H., Wolfe, G.R., and Hooper, J.K. (1996). Secretory granules in the cytoplasm of a wall-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* contain processed light-harvesting complex apoproteins and HSP70. *J. Photochem. Photobiol. B* *36*, 301–306.
- Komine, Y., Eggink, L.L., Park, H., and Hooper, J.K. (2000). Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* *210*, 897–905.

Konz, I., Fernández, B., Fernández, M.L., Pereiro, R., González-Iglesias, H., Coca-Prados, M., and Sanz-Medel, A. (2014). Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 2343–2348.

Kuramachi, K. (2005). PIXE analysis for bioaccumulation studies of trace elements. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* *264*, 295–301.

Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., and Morell, F.M.M. (2005). Biochemistry: A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* *435*, 42.

Lansman, J.B., Hess, P., and Tsien, R.W. (1986). Blockade of current through single calcium channels by Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup>. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J. Gen. Physiol.* *88*, 321–347.

Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2009a). Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.* *92*, 65–75.

Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., and Campbell, P.G. (2009b). Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods* *7*, 277–286.

Lavoie, M., Campbell, P.G.C., and Fortin, C. (2012). Extending the Biotic Ligand Model to Account for Positive and Negative Feedback Interactions between Cadmium and Zinc in a Freshwater Alga. *Environ. Sci. Technol.* *46*, 12129–12136.

Lavoie, M., Campbell, P.G.C., and Fortin, C. (2014). Predicting Cadmium Accumulation and Toxicity in a Green Alga in the Presence of Varying Essential Element Concentrations Using a Biotic Ligand Model. *Environ. Sci. Technol.* *48*, 1222–1229.

Lee, T.-M., Lai, H.-Y., and Chen, Z.-S. (2004). Effect of chemical amendments on the concentration of cadmium and lead in long-term contaminated soils. *Chemosphere* *57*, 1459–1471.

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

Leonardo, T., Farhi, E., Boisson, A.-M., Vial, J., Cloetens, P., Bohic, S., and Rivasseau, C. (2014). Determination of elemental distribution in green micro-algae using synchrotron radiation nano X-ray fluorescence (SR-nXRF) and electron microscopy techniques – subcellular localization and quantitative imaging of silver and cobalt uptake by *Coccomyxa actinabiotis*. *Metallomics* *6*, 316–329.

Li, M., Wan, C., Pan, X., Zou, Y., Chang, J., and Xie, P. (2012). ACUTE TOXIC EFFECTS OF ZINC, CADMIUM, AND MERCURY ON THE GROWTHS OF THREE UNICELLULAR GREEN MICROALGAE WITH RELATIVELY HIGH INITIAL DENSITIES. *IHB OpenIR* *21*.

- Lobinski, R., Moulin, C., and Ortega, R. (2006). Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* 88, 1591–1604.
- Lombi, E., and Susini, J. (2009). Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil* 320, 1–35.
- Lombi, E., Scheckel, K.G., and Kempson, I.M. (2011a). In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ. Exp. Bot.* 72, 3–17.
- Lombi, E., Hettiarachchi, G.M., and Scheckel, K.G. (2011b). Advanced in situ spectroscopic techniques and their applications in environmental biogeochemistry: Introduction to the special section. *J. Environ. Qual.* 40, 659–666.
- Lombi, E., Scheckel, K.G., and Kempson, I.M. (2011c). In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ. Exp. Bot.* 72, 3–17.
- Macfie, S.M., and Welbourn, P.M. (2000). The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 413–419.
- Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., and Welbourn, P.M. (1994). Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 454–458.
- Marchesini, N., Ruiz, F.A., Vieira, M., and Docampo, R. (2002). Acidocalcisomes Are Functionally Linked to the Contractile Vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 277, 8146–8153.
- Marín-Navarro, J., and Moreno, J. (2006). Cysteines 449 and 459 modulate the reduction–oxidation conformational changes of ribulose 1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the translocation of the enzyme to membranes during stress. *Plant Cell Environ.* 29, 898–908.
- Martell, A., E. (1971). Organic including macromolecules ligands. In *Stability Constants of Metal Ions Complexes, Supplement, Special Publication n°25*, (London: Burlington House), pp. 623–632.
- Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., dePamphilis, C.W., Miller, W., Harris, E.H., and Stern, D.B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome Islands of Genes in a Sea of Repeats. *Plant Cell* 14, 2659–2679.
- Mendoza-Cozatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., and Moreno-Sánchez, R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115, 276–283.
- 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., Maréchal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* 318, 245–250.
- Meyer, M., and Griffiths, H. (2013). Origins and diversity of eukaryotic CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms: lessons for the future. *J. Exp. Bot.* 64, 769–786.

- Miao, A.-J., and Wang, W.-X. (2006). Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions. *Aquat. Toxicol.* 78, 114–126.
- Minqin, R., Xiao, C., Yi, Z., Hao, S., Qingguang, R., Yong, L., and Frank, W. (2013). Sub-100-nm STIM imaging and PIXE quantification of rare earth elements in algae cells. *X-Ray Spectrom.* 42, 237–241.
- Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y., Taniguchi, F., Asamizu, E., Nakamura, Y., Tabata, S., Yamato, K.T., et al. (2004). Expression Profiling-Based Identification of CO<sub>2</sub>-Responsive Genes Regulated by CCM1 Controlling a Carbon-Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 135, 1595–1607.
- Mokgalaka, N.S., and Gardea-Torresdey, J.L. (2006). Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Principles and Applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* 41, 131–150.
- Moon, M., Kim, C.W., Park, W.-K., Yoo, G., Choi, Y.-E., and Yang, J.-W. (2013). Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 2, 352–357.
- Moore, K.L., Schröder, M., Lombi, E., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., Hawkesford, M.J., Shewry, P.R., and Grovenor, C.R.M. (2010). NanoSIMS analysis of arsenic and selenium in cereal grain. *New Phytol.* 185, 434–445.
- Moore, K.L., Zhao, F.-J., Gritsch, C.S., Tosi, P., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., Shewry, P.R., and Grovenor, C.R.M. (2012). Localisation of iron in wheat grain using high resolution secondary ion mass spectrometry. *J. Cereal Sci.* 55, 183–187.
- Moore, K.L., Chen, Y., van de Meene, A.M.L., Hughes, L., Liu, W., Geraki, T., Mosselmans, F., McGrath, S.P., Grovenor, C., and Zhao, F.-J. (2014). Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytol.* 201, 104–115.
- Moroney, J.V., and Ynalvez, R.A. (2007). Proposed Carbon Dioxide Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 6, 1251–1259.
- Moroney, J.V., Ma, Y., Frey, W.D., Fusilier, K.A., Pham, T.T., Simms, T.A., DiMario, R.J., Yang, J., and Mukherjee, B. (2011). The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynth. Res.* 109, 133–149.
- Mounicou, S., Vacchina, V., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., and Łobiński, R. (2001). Determination of phytochelatins by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* 126, 624–632.
- Nagel, K., and Voigt, J. (1995). Impaired photosynthesis in a cadmium-tolerant *Chlamydomonas* mutant strain. *Microbiol. Res.* 150, 105–110.
- Nagel, K., Adelmeier, U., and Voigt, J. (1996a). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 149, 86–90.

- Nagel, K., Adelmeier, U., and Voigt, J. (1996b). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* *149*, 86–90.
- Nikaido, S.S., and Johnson, C.H. (2000). Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem. Photobiol.* *71*, 758–765.
- Nishikawa, K., and Tominaga, N. (2001). Isolation, Growth, Ultrastructure, and Metal Tolerance of the Green Alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *65*, 2650–2656.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., and Tominaga, N. (2003a). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* *44*, 253–259.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., and Tominaga, N. (2003b). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* *44*, 253–259.
- Nishikawa, K., Onodera, A., and Tominaga, N. (2006). Phytochelatins do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp. *Chemosphere* *63*, 1553–1559.
- Novoselov, S.V. (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* *21*, 3681–3693.
- Nriagu, J.O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* *338*, 47–49.
- Ortega, R., Devès, G., and Carmona, A. (2009). Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J. R. Soc. Interface* *6*, S649–S658.
- O'Toole, E.T. (2010). *Chlamydomonas*. Cryopreparation methods for the 3-D analysis of cellular organelles.
- 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., et al. (2002). The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* *133*, 3–35.
- Park, H., Song, B., and Morel, F.M.M. (2007). Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ. Microbiol.* *9*, 403–413.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003). Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae<sup>1</sup>. *J. Phycol.* *39*, 1008–1018.
- Pollock, S.V., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Lemaire, S.D., and Moroney, J.V. (2004). The *Chlamydomonas reinhardtii* proteins Ccp1 and Ccp2 are required for long-term growth,

but are not necessary for efficient photosynthesis, in a low-CO<sub>2</sub> environment. *Plant Mol. Biol.* **56**, 125–132.

Prasad, M.N.V., Drej, K., Skawińska, A., and Strałka, K. (1998). Toxicity of Cadmium and Copper in *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-Type (WT 2137) and Cell Wall Deficient Mutant Strain (CW 15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**, 306–311.

Punshon, T., Jackson, B.P., Bertsch, P.M., and Burger, J. (2004). Mass loading of nickel and uranium on plant surfaces: Application of laser ablation-ICP-MS. *J. Environ. Monit.* **6**, 153–159.

Quarmby, L.M., and Hartzell, H.C. (1994). Two distinct, calcium-mediated, signal transduction pathways can trigger deflagellation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **124**, 807–815.

Raab, A., Feldmann, J., and Meharg, A.A. (2004). The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol.* **134**, 1113–1122.

Raab, A., Ferreira, K., Meharg, A.A., and Feldmann, J. (2007). Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*? *J. Exp. Bot.* **58**, 1333–1338.

Ramazanov, Z., Rawat, M., Henk, M.C., Mason, C.B., Matthews, S.W., and Moroney, J.V. (1994). The induction of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **195**, 210–216.

Ramos, I.B., Miranda, K., Ulrich, P., Ingram, P., LeFurgey, A., Machado, E.A., de Souza, W., and Docampo, R. (2010). Calcium- and polyphosphate-containing acidocalcisomes in chicken egg yolk. *Biol. Cell* **102**, 421–434.

Ravel, B., and Newville, M. (2005). *ATHENA*, *ARTEMIS*, *HEPHAESTUS*: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using *IFEFFIT*. *J. Synchrotron Radiat.* **12**, 537–541.

Raven, J.A. (2001). A role for mitochondrial carbonic anhydrase in limiting CO<sub>2</sub> leakage from low CO<sub>2</sub>-grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* **24**, 261–265.

Rosakis, A., and Köster, W. (2005). Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *Biometals* **18**, 107–120.

Rubinelli, P., Siripornadulsil, S., Gao-Rubinelli, F., and Sayre, R.T. (2002). Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation. *Planta* **215**, 1–13.

Ruiz, F.A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, and Docampo, R. (2001). The Polyphosphate Bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* Possess a Proton-pumping Pyrophosphatase and Are Similar to Acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 46196–46203.

- Ruiz, F.A., Lea, C.R., Oldfield, E., and Docampo, R. (2004). Human Platelet Dense Granules Contain Polyphosphate and Are Similar to Acidocalcisomes of Bacteria and Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 279, 44250–44257.
- Sakaguchi, T., Tsuji, T., Nakajima, A., and Horikoshi, T. (1979). Accumulation of cadmium by green microalgae. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8, 207–215.
- Sakai, T., Oikawa, M., Sato, T., Nagamine, T., Moon, H.D., Nakazato, K., and Suzuki, K. (2005). New in-air micro-PIXE system for biological applications. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 231, 112–116.
- Sarret, G., Willems, G., Isaure, M.-P., Marcus, M.A., Fakra, S.C., Frérot, H., Pairis, S., Geoffroy, N., Manceau, A., and Saumitou-Laprade, P. (2009). Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* × *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. *New Phytol.* 184, 581–595.
- Sarret, G., Smits, E.A.H.P., Michel, H.C., Isaure, M.P., Zhao, F.J., and Tappero, R. (2013). Chapter One - Use of Synchrotron-Based Techniques to Elucidate Metal Uptake and Metabolism in Plants. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 1–82.
- Schaumlöffel, D., Ouerdane, L., Bouyssiere, B., and Łobiński, R. (2003). Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 120–127.
- Scheidegger, C., Sigg, L., and Behra, R. (2011). Characterization of lead induced metal-phytochelatin complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2546–2552.
- Scopes, R.K. (1994). *Protein Purification* (New York, NY: Springer New York).
- Seebaugh, D.R., Goto, D., and Wallace, W.G. (2005). Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar. Environ. Res.* 59, 473–491.
- Semenova, G.A., Chekunova, E.M., and Ladygin, V.G. (2015). LIGHT-DEPENDENT SYNTHESIS OF CELL MEMBRANES IN THE Brc-1 MUTANT OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII. *Tsitologija* 57, 353–359.
- Seufferheld, M., Vieira, M.C.F., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Moreno, S.N.J., and Docampo, R. (2003). Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 278, 29971–29978.
- Sha, Y., Zhang, P., Wang, X., Liu, J., Huang, Y., and Li, G. (2002). Analysis of candidate micro-reference materials of lichen and algae by SRXRF and PIXE. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 189, 107–112.
- Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A. (2001). Assembly and Motility of Eukaryotic Cilia and Flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127, 1500–1507.

- Simon, D.F., Davis, T.A., Tercier-Waeber, M.-L., England, R., and Wilkinson, K.J. (2011). In situ evaluation of cadmium biomarkers in green algae. *Environ. Pollut.* *159*, 2630–2636.
- Singh, H., Shukla, M.R., Chary, K.V., and Rao, B.J. (2014). Acetate and bicarbonate assimilation and metabolite formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: a <sup>13</sup>C-NMR study. *PloS One* *9*, e106457.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., and Sayre, R.T. (2002). Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *Plant Cell Online* *14*, 2837–2847.
- Slaveykova, V.I., Guignard, C., Eybe, T., Migeon, H.-N., and Hoffmann, L. (2009). Dynamic NanoSIMS ion imaging of unicellular freshwater algae exposed to copper. *Anal. Bioanal. Chem.* *393*, 583–589.
- Slodzian, G., Daigne, B., Girard, F., Boust, F., and Hillion, F. (1992). Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biol. Cell* *74*, 43–50.
- Soares, H.M.V.M., and Conde, P.C.F.L. (2000). Electrochemical investigations of the effect of N-substituted aminosulfonic acids with a piperazinic ring pH buffers on heavy metal processes which may have implications on speciation studies. *Anal. Chim. Acta* *421*, 103–111.
- Solé, V.A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., and Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* *62*, 63–68.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2010). Differential effects of copper and cadmium exposure on toxicity endpoints and gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* *29*, 191–200.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2012). Relationships between surface-bound and internalized copper and cadmium and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* *31*, 324–335.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2013). Induction of reactive oxygen species in *chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environ. Toxicol.* *28*, 516–523.
- Storms, H.A., Brown, K.F., and Stein, J.D. (1977). Evaluation of a cesium positive ion source for secondary ion Mass spectrometry. *Analytical Chem.* *49*, 2023–2030.
- Tessier, A., Carigan, R., and Belzile, N. (1993). Réaction of trace elements near the sediment-water interface in lakes.
- Tüzün, İ., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., and Arıca, M.Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Environ. Manage.* *77*, 85–92.

Tylko, G., Mesjasz-Przybyłowicz, J., and Przybyłowicz, W.J. (2007). X-ray microanalysis of biological material in the frozen-hydrated state by PIXE. *Microsc. Res. Tech.* *70*, 55–68.

Vega, J.M., Garbayo, I., Domínguez, M.J., and Vígara, J. (2006). Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*: Induction of oxidative stress. *Enzyme Microb. Technol.* *40*, 163–167.

Vercesi, A.E., Moreno, S.N., and Docampo, R. (1994). Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* *304*, 227–233.

Visviki, I., and Rachlin, J.W. (1994). Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on growth. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *26*, 149–153.

Voigt, J., Nagel, K., and Wrann, D. (1998). A Cadmium-tolerant *Chlamydomonas* Mutant Strain Impaired in Photosystem II Activity. *J. Plant Physiol.* *153*, 566–573.

Watt, F., Grime, G.W., Brook, A.J., Gadd, G.M., Perry, C.C., Pearce, R.B., Turnau, K., and Watkinson, S.C. (1991). Nuclear microscopy of biological specimens. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* *54*, 123–143.

Wilson, R.G. (1995). SIMS quantification in Si, GaAs, and diamond - an update. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* *143*, 43–49.

Wong, M.-Y., Sauser, K.R., Chung, K.-T., Wong, T.-Y., and Liu, J.-K. (2001). Response of the Ascorbate-Peroxidase of *Selenastrum capricornutum* to Copper and Lead in Stormwaters. *Environ. Monit. Assess.* *67*, 361–378.

Xue, H., and Sigg, L. (1998). Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. *Anal. Chim. Acta* *363*, 249–259.

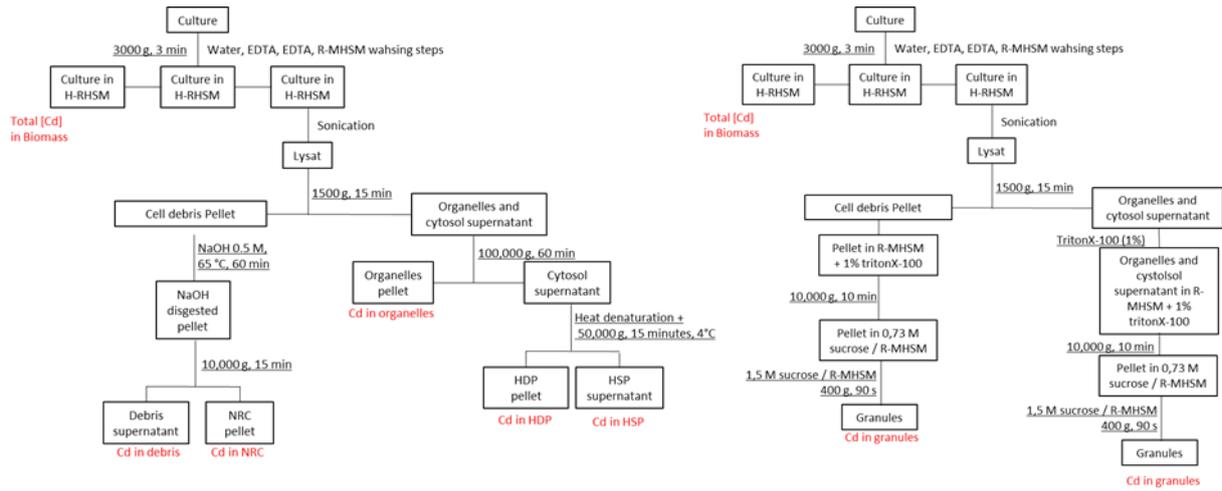
Yamano, T., Tsujikawa, T., Hatano, K., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., and Fukuzawa, H. (2010). Light and low-CO<sub>2</sub>-dependent LCIB-LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* *51*, 1453–1468.

Zhang, N., and Portis, A.R. (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 9438–9443.

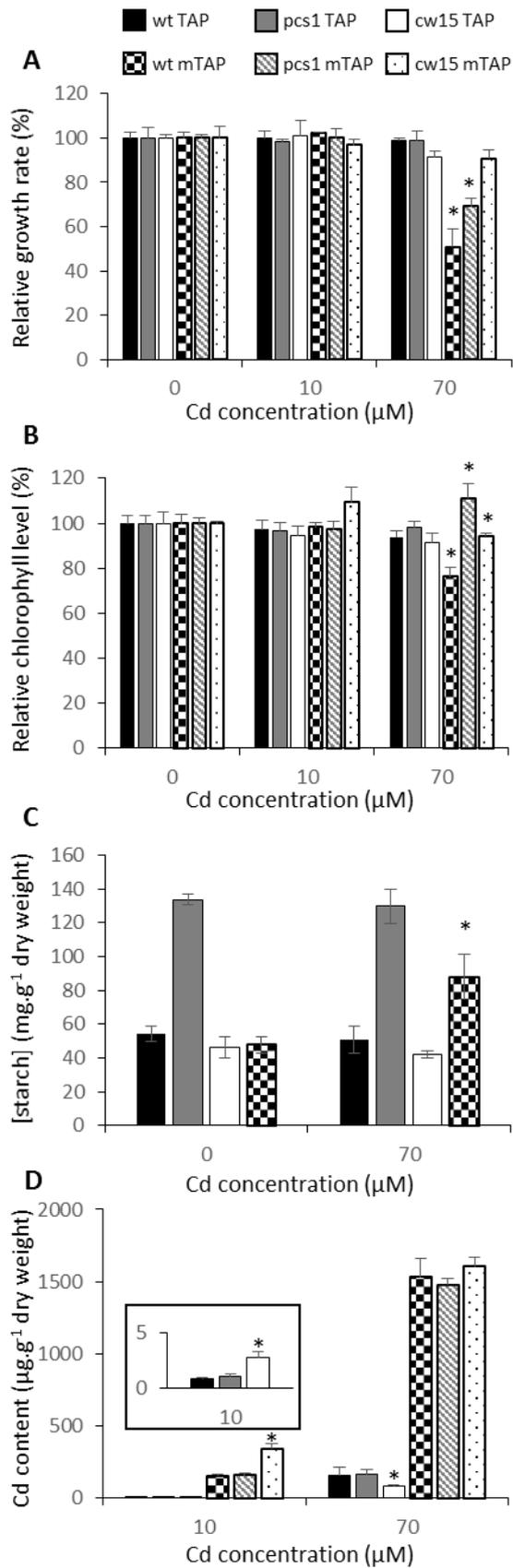
(1998). *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Dordrecht: Springer Netherlands).

Visual MINTEQ | Visual MINTEQ – a free equilibrium speciation model.

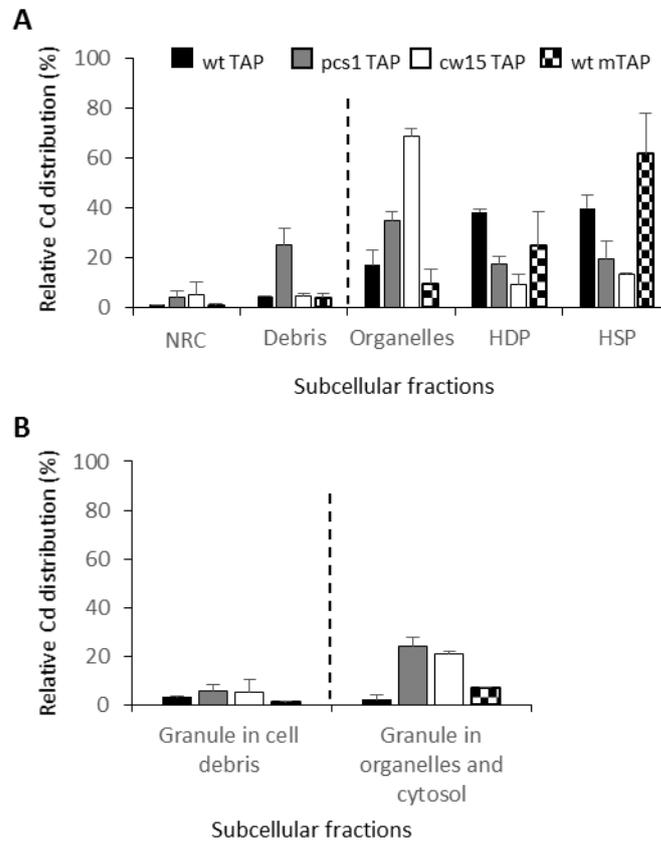




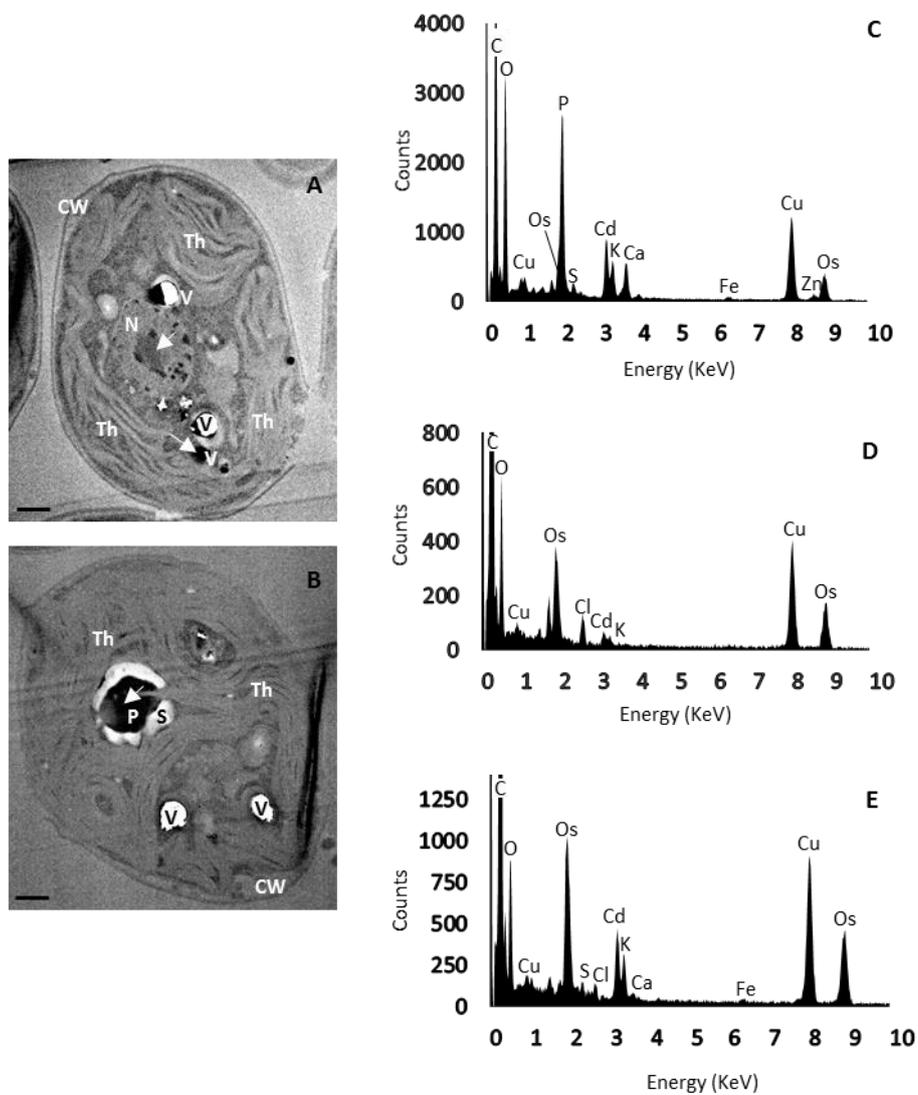
**Figure :** Methodes used to divide *C. reinhardtii* cells in different subcellular fractions. A) Differential centrifugation method: NRC, NaOH resistant compounds; HDP, heat denaturable protein; HSP, heat stable protein. B) polyphosphate granules purification.



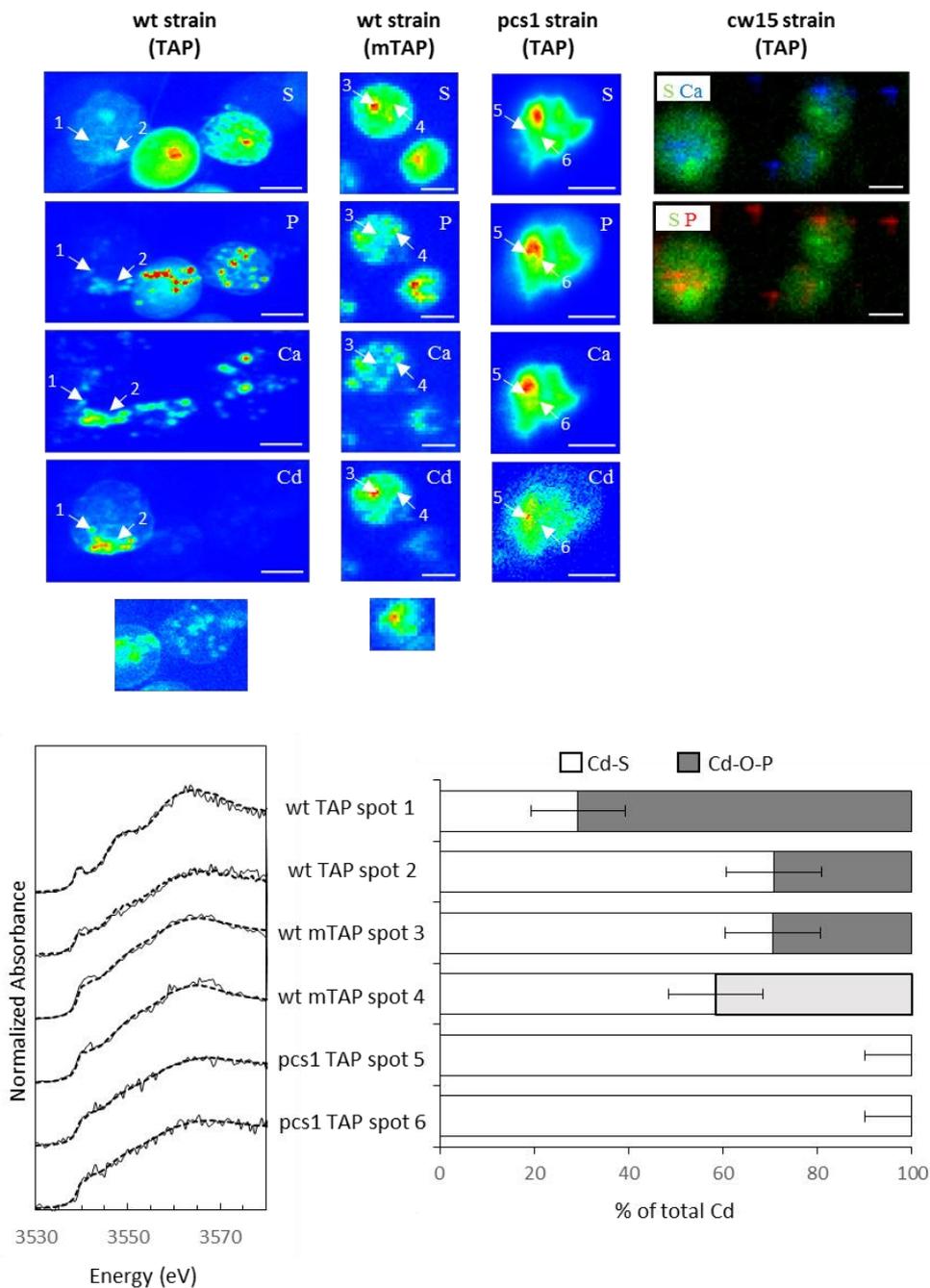
**Figure 1:** Cadmium sensitivity of *C. reinhardtii* wt, cw15 and pcs1 strains grown in TAP and modified TAP media. (A) Relative growth rate was determined during the growth exponential phase after addition of 0, 10 μM and 70 μM of CdCl<sub>2</sub> and expressed as percentage of growth in no contaminated medium. (B) Relative chlorophyll content was determined after 48h of 10 μM and 70 μM CdCl<sub>2</sub> exposition and expressed as a percentage of chlorophyll content in algae grown in no contaminated medium. (n=3 ± sd). Significant differences with respect to the control condition at a significance level of 0.05 (p < 0.05) are indicated by an \*. (C) Starch content (mg.g<sup>-1</sup> dry weight) in *C. reinhardtii* wt, cw15 and pcs1 strains grown in TAP and modified TAP media after 48 hours of 70 μM Cd exposure (n=3 ± sd). (D) Cadmium content (μg.g<sup>-1</sup> dry weight) in *C. reinhardtii* wt, cw15 and pcs1 strains grown in TAP and modified TAP media after 48 hours of 10 and 70 μM Cd exposition. (n=3 or 6 ± sd).



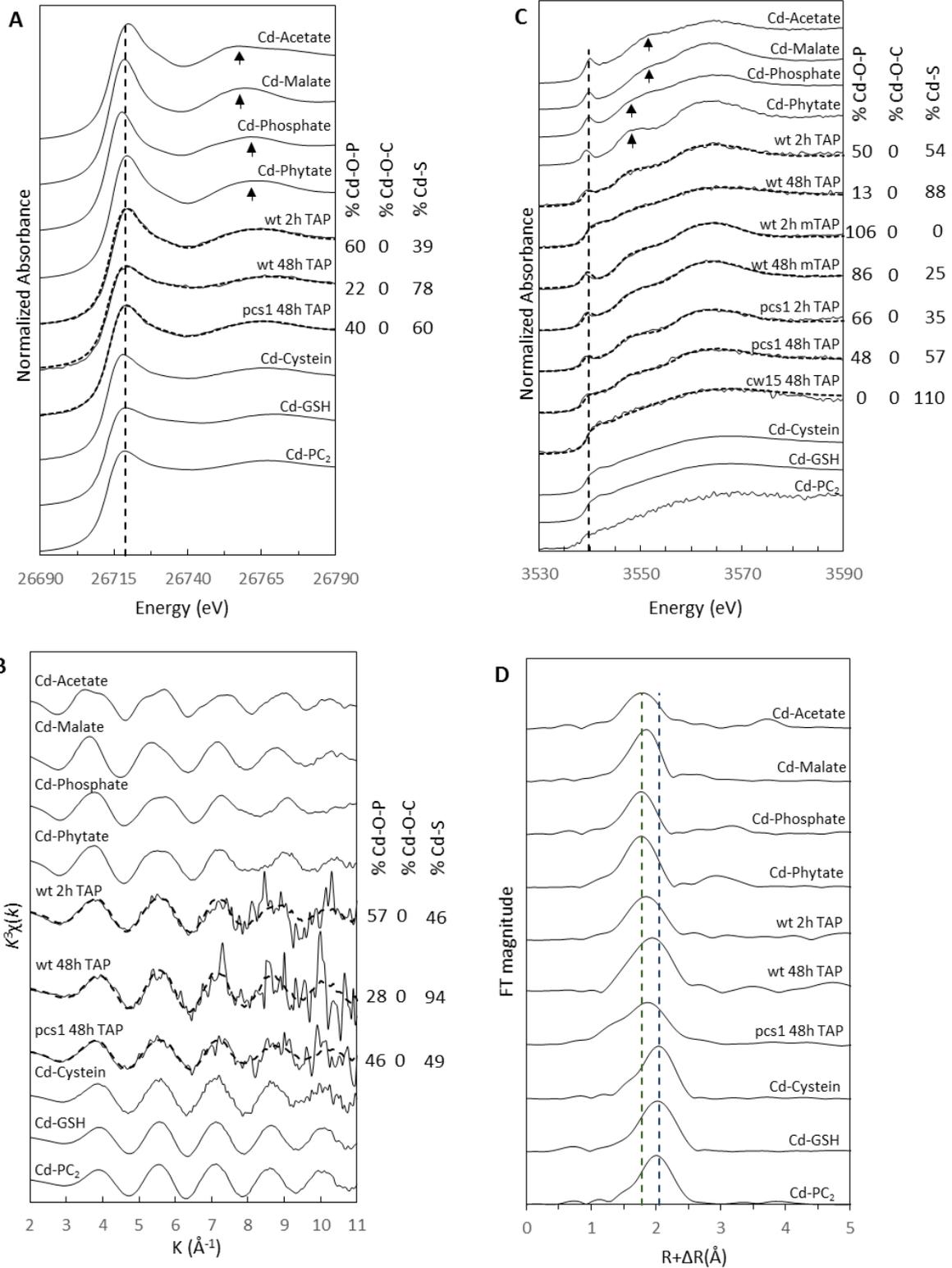
**Figure 2:** (A) Cadmium subcellular distribution in percentage in *C. reinhardtii* wt, cw15 and pcs1 strains after 48 hours of 70  $\mu$ M Cd in TAP and modified TAP media. (n=3 or 4  $\pm$  sd). (B) Proportions of cadmium bound to polyphosphate granules (n=3  $\pm$  sd). Fractionations (A) and (B) are independent.



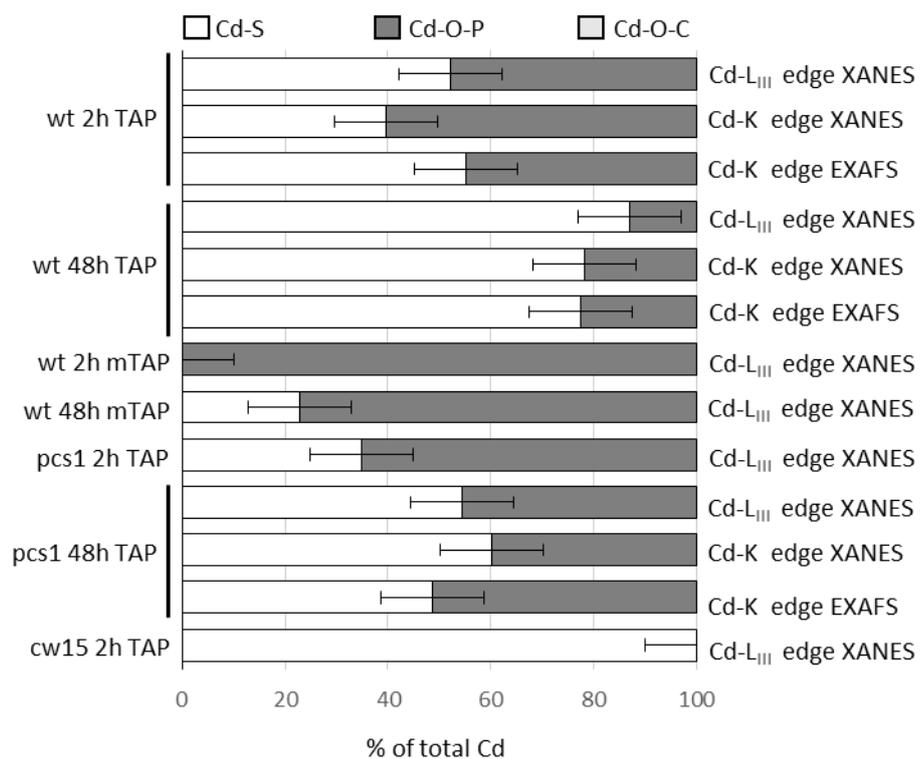
**Figure 3:** Elemental composition of nucleus, pyrenoid and electron dense bodies in *C. reinhardtii* wt cells grown in TAP medium after 48h of 70  $\mu$ M Cd exposure. (A) and (B) Electron micrographs of *C. reinhardtii* wt cells, circles indicated by an arrow show the area analyzed by EDX analysis, scale bar = 1  $\mu$ m. Abbreviations: N, nucleus; P, pyrenoid; S, starch; Th, thylakoid; V, vacuole; CW, cell-wall. (C), (D) and (E) EDX spectra of electron dense bodies in vacuoles, nucleus and pyrenoid, respectively. Copper signal is produced by the copper grid.



**Figure 4:** *In situ* cadmium localization and speciation in *C. reinhardtii*. (A) False color  $\mu$ -XRF elemental maps of wt grown in TAP medium and modified TAP medium and pcs1 grown in TAP medium after 48 hours of 70  $\mu$ M cadmium exposition. Bicolor elemental maps of cw15 strain in control TAP medium. Arrows show points of interest where  $\mu$ -XANES analysis were performed, boxed areas where contrast is stronger, scale bar = 5  $\mu$ m. Step size = 0.2  $\mu$ m, dwell-time = 300 ms/pixel at 3570 eV. (B) Two components fits (dotted line) of Cd L<sub>III</sub>-edge  $\mu$ -XANES spectra (solid line) of points of interest marked by arrows; (C) Distribution of Cd ligands after normalization of the percentages to 100%. The uncertainty is estimated to  $\pm 10\%$ .



**Figure 5:** Cadmium speciation in bulk samples by Cd L<sub>III</sub>-edge XANES, Cd-K edge XANES and Cd-K edge EXAFS of wt, pcs1 and cw15 strains grown in TAP or modified TAP medium after 2h or 48h of 70 μM Cd exposure. One-, two- or three-components fits (dotted line) of Cd K-edge XANES (A), Cd K-edge k<sup>3</sup>-weighted EXAFS (B), Cd L<sub>III</sub>-edge XANES (C) spectra their Fourier transformation (solid line) of seven *C. reinhardtii* samples and seven standards; arrows show energy shifting between Cd-organic acids complexes and Cd-phosphate complexes; dashed line shows differences between Cd-S ligands and Cd-O ligands; percentage of the best fit is estimated to ±10%.



**Figure 6:** Distribution of Cd ligands in bulk samples after normalization of the percentages to 100%. The uncertainty is estimated to  $\pm 10\%$ .