

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie - Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Thomas LEONARDO

Thèse dirigée par **Fabrice REBEILLE**
codirigée par **Corinne RIVASSEAU**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire
Végétale du CEA Grenoble et à l'Institut Laue Langevin de
Grenoble**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Mécanismes d'accumulation et impact biologique de l'argent et du cobalt chez la micro- algue *Coccomyxa actinabiotis*

Thèse soutenue publiquement le **12 décembre 2014**,
devant le jury composé de :

M. Eric ANSOBORLO

Expert international, CEA Marcoule, Rapporteur

M. Olivier THOMAS

Professeur, ICN (Nice), Rapporteur

M. David MACHEREL

Professeur, IRHS (Angers), Membre

M. Helmut SCHOBER

Directeur scientifique, ILL (Grenoble), Membre

M. Fabrice REBEILLE

Ingénieur-chercheur, CEA Grenoble, Directeur de thèse

Mme Corinne RIVASSEAU

Ingénieur-chercheur, CEA Grenoble, Codirectrice de thèse

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



Sommaire

Sommaire	5
Liste des abréviations	15
Introduction	21
Etat de l'art	29
I. Tolérance et détoxification des métaux par les micro-algues vertes	31
A. Toxicité des métaux	31
1. Métaux essentiels et non-essentiels	31
2. Importance de la concentration et de la spéciation dans la toxicité métallique	31
3. « Métaux lourds », « métaux toxiques »: remarques et conventions	32
4. Mécanismes de toxicité des métaux	33
a. Interaction avec les protéines et l'ADN	33
b. Accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène et stress oxydant	34
i. Propriétés des principaux ROS	34
ii. Effets délétères des ROS	36
iii. Impact des métaux sur la production de ROS	38
5. Nécessité d'une régulation, tolérance aux métaux et hyperaccumulation	38
B. Mécanismes de tolérance mis en œuvre à l'échelle cellulaire	40
1. Mécanismes limitant l'entrée des métaux dans la cellule	40
a. Complexation extracellulaire par sécrétion de ligands	40
b. Complexation des ions métalliques à la surface de la cellule	42
c. Exclusion des métaux par modification de la structure de la paroi cellulaire ou de la membrane plasmique	42
2. Mécanismes d'excrétion des métaux	43
3. Mécanismes de gestion des métaux incorporés : chélation et compartimentation subcellulaire	44
a. Glutathion, phytochélatines et séquestration vacuolaire	44
b. Métallothionéines	47
c. Chélation par des petites molécules : acides aminés libres et acides organiques	49
d. Autres sites de complexation intracellulaires des métaux : corps constitués de polyphosphates, chloroplaste, mitochondries et noyau	50
4. Enzymes et métabolites impliqués dans la réponse au stress oxydant	51
a. Mécanismes enzymatiques	52
b. Mécanismes non enzymatiques	53
II. Caractéristiques générales et toxicité de l'argent	56

A.	Propriétés physico-chimiques, production et usages de l'argent _____	56
1.	Isotopes stables _____	56
2.	L'essor des nanoparticules _____	57
3.	Isotopes radioactifs _____	57
B.	Toxicité de l'argent _____	58
1.	Toxicité pour l'homme et les organismes aquatiques _____	58
2.	Spéciation, accumulation et toxicité de l'argent pour les micro-algues _____	59
a.	Spéciation de l'argent en milieu aqueux _____	59
b.	Impact de la spéciation de l'argent sur son accumulation par les algues _____	60
c.	Impact de la spéciation de l'argent sur sa toxicité _____	61
3.	Effets physiologiques de l'argent sur les micro-algues _____	62
4.	Mécanismes de toxicité de l'argent et réponse adaptative _____	62
5.	Cas des nanoparticules _____	64
III.	Caractéristiques générales et toxicité du cobalt _____	66
A.	Propriétés physico-chimiques, production et usages du cobalt _____	66
1.	Isotopes stables _____	66
2.	Isotopes radioactifs _____	68
B.	Effets du cobalt sur les micro-algues _____	69
1.	Caractère essentiel et effets bénéfiques _____	69
2.	Accumulation du cobalt par les algues : un processus en deux temps _____	71
a.	Première phase : accumulation rapide par sorption _____	71
b.	Deuxième phase : internalisation plus lente _____	72
3.	Transporteurs du cobalt et spéciation dans les micro-algues _____	72
4.	Effets toxiques du cobalt _____	73
a.	Impact physiologique _____	73
b.	Mécanismes de toxicité et réponse biologique _____	76
	Matériels et méthodes _____	79
I.	Méthodes générales _____	81
A.	Culture cellulaire _____	81
1.	Cultures en lots dans des erlenmeyers _____	81
2.	Cultures en continu : utilisation de photobioréacteurs _____	82
3.	Avantages et inconvénients de ces modes de culture _____	84
B.	Mesure de la croissance des algues _____	84
C.	Mesure du rendement photochimique du photosystème II (rapport Fv/Fm) _____	86
D.	Exposition des algues aux métaux et récolte _____	86

1.	Choix des contenants _____	87
2.	Préparation des solutions d'argent et de cobalt pour l'exposition des algues aux métaux	87
	a. Argent _____	87
	b. Cobalt _____	88
3.	Exposition des algues aux métaux _____	88
4.	Récolte des algues _____	89
E.	Quantification des métaux par ICP-MS _____	90
II.	Caractérisation de l'accumulation des métaux par les algues _____	91
A.	Argent _____	91
	1. Cinétiques d'accumulation de l'argent _____	91
	2. Quantité d'argent accumulé par les algues après deux heures d'exposition _____	91
B.	Cobalt : cinétiques d'accumulation et quantités accumulées _____	92
III.	Imagerie et distribution subcellulaire des métaux incorporés par les micro-algues _____	92
A.	Nano-imagerie par fluorescence X et microscopie optique à fluorescence _____	93
B.	Microscopie électronique _____	93
IV.	Spéciation des métaux _____	95
A.	Etude de la spéciation de l'argent internalisé par les algues par spectroscopie d'absorption X et par diffraction de rayons X _____	95
B.	Etude de la spéciation du cobalt internalisé par les algues par spectroscopie d'absorption X	95
	1. Préparation des échantillons _____	95
	2. Réglages de la ligne de lumière et mesures _____	96
	3. Analyse des spectres _____	97
V.	Etude de l'impact physiologique et métabolique des métaux sur <i>C. actinabiotis</i> _____	98
A.	Etude de l'impact des métaux sur la croissance des algues et le photosystème _____	98
	1. Argent _____	98
	2. Cobalt _____	99
B.	Analyses du métabolome par RMN et par HPLC _____	99
	1. RMN : extraction des métabolites et analyse _____	100
	2. HPLC : extraction des métabolites et analyse _____	100

Chapitre 1 : Caractérisation de l'accumulation de l'argent et du cobalt par *C. actinabiotis* _____ 103

I. Argent _____ 105

A.	Cinétiques d'accumulation de l'argent _____	105
B.	Quantités d'argent accumulées _____	108
II.	Cobalt _____	111
A.	Cinétiques d'accumulation du cobalt _____	111
B.	Quantités de cobalt accumulées _____	114
III.	Conclusion _____	116
Chapitre 2 : Distribution subcellulaire de l'argent et du cobalt accumulés par <i>C. actinabiotis</i> _____ 119		
I.	Nano-imagerie par fluorescence de rayons X : une technique de choix pour l'analyse de la distribution subcellulaire des métaux chez <i>C. actinabiotis</i> _____	121
II.	Article _____	123
III.	Synthèse des principaux résultats _____	142
A.	Distribution subcellulaire des éléments endogènes de l'algue _____	142
B.	Distribution subcellulaire de l'argent et du cobalt _____	142
IV.	Conclusion _____	144
Chapitre 3 : Spéciation de l'argent et du cobalt accumulés par <i>C. actinabiotis</i> ____ 145		
I.	Spéciation de l'argent internalisé par <i>C. actinabiotis</i> _____	147
A.	La spectroscopie d'absorption X : une technique de choix pour l'étude de la spéciation des métaux en biologie _____	147
B.	Etude de la spéciation de l'argent chez <i>C. actinabiotis</i> _____	148
C.	Article _____	150
D.	Conclusion sur la spéciation de l'argent internalisé dans les algues _____	181
II.	Spéciation du cobalt internalisé par <i>C. actinabiotis</i> _____	183
A.	Teneur en cobalt des échantillons _____	183
B.	Effet de la concentration et du temps d'exposition sur la spéciation du cobalt _____	184
C.	Spéciation du cobalt dans l'échantillon d'algues exposées 3 jours à 10^{-2} M Co^{2+} _____	186
1.	Détermination du degré d'oxydation du cobalt _____	186
2.	Comparaison avec des spectres de références de $\text{Co}(+II)$ _____	187
3.	Modélisation de l'environnement chimique du cobalt _____	190
4.	Comparaison de la spéciation du cobalt chez <i>C. actinabiotis</i> et chez des plantes supérieures 191	
D.	Conclusion sur la spéciation du cobalt incorporé par <i>C. actinabiotis</i> _____	193

Chapitre 4 : Impact biologique de l'argent et du cobalt sur <i>C. actinabiotis</i>	195
I. Croissance et activité photosynthétique des algues exposées aux métaux	197
A. Argent	198
B. Cobalt	202
II. Analyses métaboliques	206
A. Métabolome hydrophile analysé par RMN	207
1. Effet de l'argent	210
2. Effet du cobalt	212
B. Analyse des pigments et des tocophérols par HPLC	214
1. Effet de l'argent	215
2. Effet du cobalt	217
III. Discussion	219
Discussion générale et perspectives	221
Annexes	233
Annexe 1 Classification périodique des éléments et répartition par séries chimiques	235
Annexe 2 Occurrence des phytochélatines et des métallothionéines chez les algues	237
Annexe 3 Mécanismes de toxicité des ions Ag⁺ et réponse adaptative chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	239
Annexe 4 Ligands azotés impliqués dans la chélation du cobalt chez les plantes et les algues	241
Annexe 5 Description de la chaîne réactionnelle du photosystème II	243
Annexe 6 Composition du milieu de culture des algues	245
Annexe 7 Méthode de comptage automatisée	247
I. Principe	247
II. Code de la macro ImageJ	249
III. Validation de la méthode de comptage automatisée	251
A. Comparaison des résultats obtenus par comptage manuel et par comptage automatisé	252
B. Qualité de l'estimation du nombre de cellules sur les photographies	253
C. Comparaison du nombre de cellules visibles au microscope et sur les photographies	253
D. Les différences de dénombrement entre les deux méthodes de comptage ne sont pas	

statistiquement significatives _____	254
IV. Critères de prise de vue et limitations _____	256
Annexe 8 Spéciation de l'argent et du cobalt dans le milieu de culture BBM _____	259
Annexe 9 Principe de la quantification par ICP-MS et précautions d'emploi _____	263
Annexe 10 Protocole d'extraction à l'acide perchlorique pour analyse par RMN ¹H_ _____	265
I. Première étape _____	265
II. Deuxième étape : après la première lyophilisation _____	266
III. Troisième étape : après la deuxième lyophilisation _____	266
Annexe 11 Protocole d'extraction méthanol/chloroforme pour analyse par HPLC __	267
Annexe 12 Fluorescence X et cartographie élémentaire : principe de fonctionnement	269
A. Fluorescence X _____	269
B. Cartographie élémentaire par fluorescence X _____	271
Annexe 13 Méthodologie pour l'analyse des spectres XRF et l'exploitation des résultats	273
I. Paramètres d'ajustement des spectres _____	273
II. XRF : Conversion des résultats retournés par PyMCA et tracé des cartographies	279
A. Intérêt d'une conversion des résultats _____	279
B. Mise en œuvre _____	280
III. XRF : Analyse des résultats par analyse en composantes principales (ACP) et	
classification ascendante hiérarchique (CAH) _____	282
A. Prétraitements appliqués avant l'analyse par composante principales _____	282
B. Mise en œuvre des ACP et CAH _____	285
Annexe 14 Spectroscopie d'absorption X _____	287
Annexe 15 Calcul du nombre de coordination moyen d'une nanoparticule _____	295
I. Petites particules : calcul exact de la coordination des atomes d'un polyèdre __	295
II. Particules de taille plus importante : calcul par approximation sphérique _____	297
<i>Bibliographie</i> _____	300

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ANOVA	Analyse de la variance
BBM	Milieu nutritif utilisée pour la culture de <i>C. actinabiotis</i> (<i>Bold modified basal medium</i>)
BM20, BM30b	Lignes de lumière de l'ESRF, de type <i>bending magnet</i>
CAH	Classification ascendante hiérarchique
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> (transporteur membranaire)
CE ₅₀	Concentration efficace médiane
CEA	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
CFC	Cubique faces centrées
CT μ	Centre technologique des microstructures (Université Lyon I)
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée ; inhibiteur de la photosynthèse
DMF	Diméthylformamide
EDS, EDX	Analyse dispersive en énergie (<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EELS	Spectroscopie par perte d'énergie d'électron (<i>electron energy loss spectroscopy</i>)
ESRF	Installation européenne de rayonnement synchrotron (<i>European synchrotron radiation facility</i>)
EXAFS	<i>Extended X-ray absorption spectroscopy</i>
FAME	<i>The French absorption spectroscopy beamline in material and environmental sciences</i> (BM30b, ESRF)
F _v /F _m	Rendement photochimique maximal du photosystème II
g _{MF}	Masse fraîche (hydratée), en grammes
g _{MS}	Masse sèche (lyophilisée), en grammes

Gy	Gray
HMA	<i>Heavy Metal P-type ATPase</i> (transporteur membranaire)
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
ICP-MS	Spectroscopie par torche plasma couplée à la spectrométrie de masse (<i>inductively coupled plasma mass spectroscopy</i>)
ID22	Ligne de lumière de l'ESRF, de type <i>insertion device</i>
ILL	Institut Laue Langevin, Grenoble
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
NRAMP	Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (transporteur membranaire)
PAM	Modulation par amplitude de pulse (pulse-amplitude modulation)
PBR	Photobioréacteur
PCA (extraction)	Extraction à l'acide perchlorique
PET	Polyéthylène téréphtalate
PETG	Polyéthylène téréphtalate glycolisé
PIXE	Emission de photons X induite par particules (<i>particle-induced X-ray emission</i> ou <i>proton-induced X-ray emission</i>)
PP	Polypropylène
PSII	Photosystème II
RMN ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
ROBL	<i>The Rossendorf beamline</i> (BM20, ESRF)
SAX	Spectroscopie d'absorption X
SIMS	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire (<i>secondary ion mass spectroscopy</i>)
TMSP	Acide triméthylsilylpropanoïque

XANES *X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy*

XRF Spectrométrie de fluorescence X (*X-ray fluorescence*)

Introduction

Qu'est-ce qu'une micro-algue ?

Il n'existe pas de définition formelle des algues, mais l'on considère généralement que c'est un groupe constitué d'organismes eucaryotes photosynthétiques simples. On distingue les micro-algues, qui sont unicellulaires, des macro-algues pluricellulaires. Les algues ne possèdent pas de racines, de tiges, de feuilles, de vaisseaux ou d'organes reproducteurs complexes, ce qui distingue notamment les macro-algues des plantes supérieures (Croft et al., 2006). Les cyanobactéries, organismes unicellulaires photosynthétiques parfois appelés « algues bleu-vert » ou « algues bleues », possèdent un appareil photosynthétique éminemment similaire à celui contenu dans le chloroplaste des organismes eucaryotes. De nombreux auteurs les excluent toutefois du groupe des algues car ce sont des procaryotes (Stanier and Bazine, 1977).

Toutes les algues n'ont pas un même ancêtre commun, on dit qu'elles constituent un groupe polyphylétique. Ce groupe est également paraphylétique : certains de ses taxons (un taxon est une entité regroupant des organismes vivants possédant en commun certains caractères bien définis) comportent des organismes qui ne sont pas des algues car ils ont perdu la capacité à réaliser la photosynthèse (Blaby-Haas and Merchant, 2012). La compréhension de l'évolution des algues et leur classification évoluent à mesure que de nouvelles observations sont réalisées. Nous présentons ici les idées générales qui semblent actuellement faire consensus.

Trois groupes d'algues ont un chloroplaste primaire, entouré de deux membranes : les Chlorophytes ou algues vertes, les Rhodophytes ou algues rouges et les Glaucophytes. On pense que ces groupes ont un ancêtre commun, c'est-à-dire que l'existence des chloroplastes dans ces cellules serait le fait d'un unique évènement d'endosymbiose durant lequel une cyanobactérie a été incorporée par un organisme eucaryote hétérotrophe (Blaby-Haas and Merchant, 2012; Croft et al., 2006).

Les Chlorophytes et les Rhodophytes sont à l'origine d'autres groupes d'algues dont les chloroplastes sont entourés de trois ou quatre membranes, apparus suite à des évènements d'endosymbiose secondaire ou tertiaire avec différents organismes non photosynthétiques (Blaby-Haas and Merchant, 2012; Croft et al., 2006). Les algues brunes et les diatomées appartiennent par exemple au groupe des straménopiles qui est issu de l'endosymbiose d'une algue rouge (Reyes-Prieto et al., 2007). Certains des groupes issus des endosymbioses

secondaires ou tertiaires ont perdu leurs propriétés photosynthétiques et ne sont donc pas des algues, c'est par exemple le cas des apicomplexes (Croft et al., 2006). Les algues vertes sont également à l'origine des plantes supérieures, ces deux groupes constituent la « lignée verte » (Bhattacharya and Medlin, 1998; Graham, 1996). Ces informations sont schématisées sur la Figure 1.

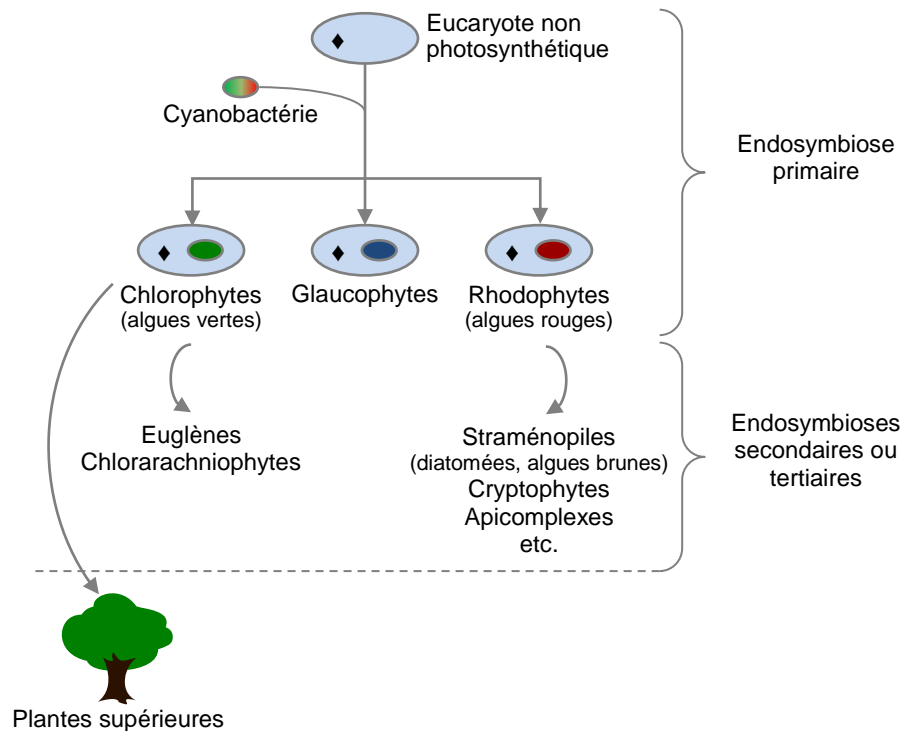


Figure 1 : Schéma simplifié de l'évolution des algues. Un unique évènement d'endosymbiose est à l'origine des Chlorophytes (algues vertes), des Glaucophytes et des Rhodophytes (algues rouges), respectivement représentées avec un chloroplaste vert, bleu et rouge. Les chloroplastes des algues vertes et rouges ont ensuite été transférés à d'autres groupes par plusieurs évènements d'endosymbiose secondaire ou tertiaire indépendants. Les plantes supérieures sont également issues des Chlorophytes, sans endosymbiose secondaire. D'après (Croft et al., 2006; Reyes-Prieto et al., 2007)

Découverte d'une nouvelle espèce de micro-algue aux propriétés originales

Des piscines de stockage du combustible sont présentes dans les installations nucléaires. Ces piscines sont utilisées pour entreposer provisoirement le combustible nucléaire destiné au rechargement des réacteurs ou le combustible usagé. Le combustible usagé dégage une chaleur importante et est très radioactif lorsqu'il est déchargé du cœur du réacteur. Le stockage en piscine permet d'absorber la majeure partie des radiations émises par le

combustible, de le refroidir et de le désactiver partiellement avant son envoi vers une usine de retraitement.

Une nouvelle espèce de micro-algue verte a été découverte dans l'une de ces piscines de stockage du combustible. Elle est de forme ovoïde, ne possède pas de flagelle et mesure 6 à 7 μm de longueur sur 2 à 3 μm de largeur. Elle possède un noyau, un unique chloroplaste et une ou plusieurs vacuoles (organites de stockage de la cellule) (cf. Figure 2). Sa paroi est recouverte de mucilage, un complexe polysaccharidique qui protège la cellule et lui permet de capter certains oligoéléments.

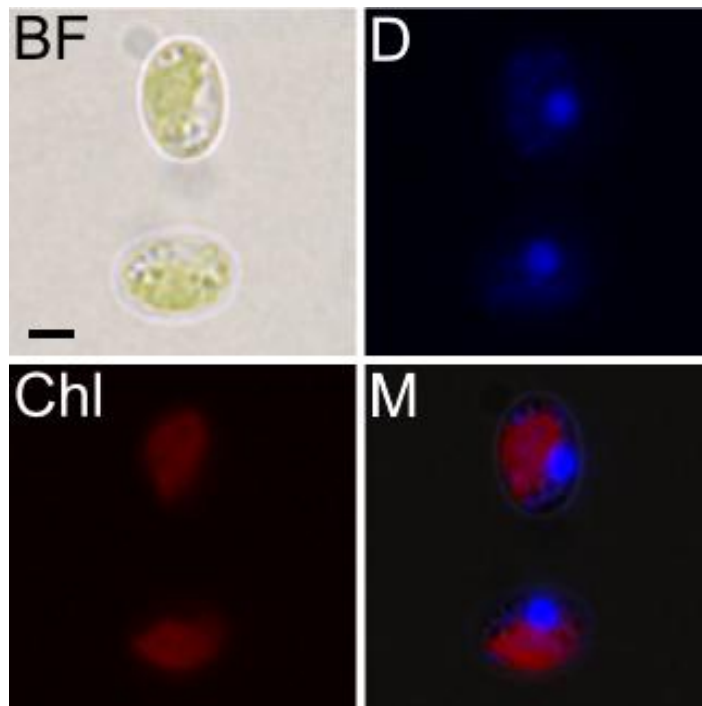


Figure 2 : Micro-algue *Coccomyxa actinabiotis* observée au microscope optique à fluorescence. Observation en champ clair (BF), fluorescence du noyau marqué au DAPI (D), auto-fluorescence du chloroplaste (Chl) et superposition de ces trois images (M)

Les analyses morphologiques, biochimiques et génétiques ont permis d'identifier l'algue : elle appartient à la division des Chlorophytes (algues vertes), à la classe des Chlorophycées et au genre des Coccomyxées. Elle constitue en revanche une nouvelle espèce baptisée *actinabiotis* (« qui vit dans le rayonnement ») (Rivasseau et al., 2011).

La micro-algue *Coccomyxa actinabiotis* présente plusieurs propriétés singulières de résistance au stress. Elle résiste au stress nutritif et a pu se développer dans une piscine de

stockage du combustible malgré la faible teneur en nutriments de ce biotope. L'algue résiste également à des doses élevées de rayonnement ionisant : c'est le seul organisme eucaryote connu pouvant supporter une irradiation de 20 000 Gy. Les seuls organismes connus pouvant supporter des doses de radiations ionisantes similaires sont des procaryotes, comme la bactérie *Deinococcus radiodurans*. Rappelons pour comparaison que la dose létale pour l'homme se situe aux alentours de 10 Gy. *C. actinabiotis* présente enfin la particularité de résister au stress métallique et d'accumuler les ions métalliques, comme par exemple l'argent, le cobalt, le zinc ou le manganèse lorsqu'elle se développe dans les piscines de stockage où ces métaux sont dissous (Rivasseau et al., 2011, 2013).

Applications envisagées

Du fait de ces différentes propriétés, la micro-algue *C. actinabiotis* pourrait être utilisée pour développer des applications de purification de matrices contaminées par des métaux ou des radionucléides.

Au sein des installations nucléaires, par exemple, la teneur en radionucléides des fluides doit être régulée afin de limiter la contamination des circuits. Les traitements de purification appliqués reposent généralement sur l'utilisation de résines échangeuses d'ions, bien que d'autres procédés conventionnels soient également utilisés (évaporation, précipitation, floculation, séparation liquide/solide, osmose inverse, etc.) (AIEA, 2002, 2003; Efremkov, 1989). Ces procédés présentent toutefois des inconvénients, notamment liés à leur coût élevé, à leur faible efficacité de décontamination pour certains ions ou au traitement des déchets générés (AIEA, 2002; Gadd, 2009).

Des procédés de bio-décontamination peuvent constituer une alternative ou un complément aux procédés de décontamination traditionnels. Les procédés de bio-décontamination reposent sur l'utilisation d'un organisme ou d'extraits biologiques pour purifier une matrice. Leur application dans divers domaines se révèle être compétitive, du fait de faibles coûts économiques, énergétiques et chimiques et d'un impact réduit sur l'environnement (Gadd, 2009, 2010; Rascio and Navari-Izzo, 2011). Jauberty *et al.* (2011) ont par exemple montré qu'un procédé basé sur la biosorption de l'uranium (UO_2^{2+}) par de l'écorce de sapin peut efficacement remplacer l'utilisation de résines échangeuses d'ions pour décontaminer d'anciens sites miniers. Les micro-algues sont des organismes particulièrement intéressants dans le cadre de la bio-décontamination car elles ne nécessitent qu'un faible

apport en nutriments pour produire rapidement une quantité importante de biomasse (Nilanjana et al., 2008; Perales-Vela et al., 2006).

La micro-algue *C. actinabiotis* est un organisme de choix pour purifier les matrices contenant des radionucléides : elle présente l'avantage d'accumuler non seulement les métaux mais également le carbone 14, les voies métaboliques de fixation du carbone restant fonctionnelles du fait de la résistance de l'algue aux radiations ionisantes. Le développement d'une biotechnologie de décontamination des effluents liquides des réacteurs nucléaires basée sur *C. actinabiotis* est actuellement étudié du fait de ces propriétés (de Gouvion Saint Cyr, 2014; Rivasseau et al., 2013).

Outre son potentiel pour la décontamination de radionucléides, la microalgue *C. actinabiotis* pourrait également être employée pour épurer les effluents industriels et des sites contaminés par des métaux non radioactifs. Elle accumule en effet des quantités importantes d'argent et de cobalt, supérieures ou de l'ordre des valeurs maximales de bioaccumulation rapportées pour différents organismes (Rivasseau et al., 2013). Elle peut par exemple capter jusqu'à 30 mg d'argent par gramme de masse fraîche d'algues, soit environ 300 mg par gramme de masse sèche. Or l'argent est l'un des métaux les plus toxiques (Ratte, 1999). Il est notamment présent dans les effluents miniers et dans ceux de l'industrie photographique. Mais il est de plus en plus fréquemment utilisé, notamment sous la forme de nanoparticules, dans des objets de la vie courante comme les pansements, les textiles ou encore le matériel électroménager, du fait de ses propriétés antibactériennes, ce qui conduit à une augmentation de sa présence dans les effluents environnementaux.

Objet de la thèse

Mon travail de thèse vise à comprendre les mécanismes d'accumulation et l'impact biologique de certains métaux sur la micro-algue *C. actinabiotis*. Mon étude a porté sur l'argent et le cobalt, qui sont les principaux radionucléides émetteurs gamma présents dans les effluents liquides des réacteurs du parc électronucléaire français.

La première partie du manuscrit présente l'état de l'art sur la tolérance et la détoxification des métaux par les micro-algues vertes. Nous décrivons les caractéristiques de la toxicité des métaux, en particulier l'effet de leur spéciation, c'est-à-dire leur forme chimique, les mécanismes de cette toxicité et les mécanismes de tolérance mis en œuvre à l'échelle cellulaire, de manière générale. Les effets et la toxicité de l'argent et du cobalt sur les micro-

algues sont ensuite développés.

Les matériels et les méthodes utilisés pour ce travail, dans l'ordre correspondant au déroulement du manuscrit, sont ensuite décrits.

Dans le premier chapitre de résultats, nous caractérisons l'accumulation de l'argent et du cobalt par la micro-algue *C. actinabiotis*. Nous y présentons les cinétiques de fixation et la quantification de l'accumulation des métaux par l'algue.

Le second chapitre décrit la distribution subcellulaire des métaux accumulés par l'algue. Différentes techniques d'imagerie sont employées, en particulier l'imagerie par nano-fluorescence de rayons X.

La spéciation de l'argent et du cobalt internalisés par l'algue est ensuite étudiée. Cette étude repose notamment sur l'analyse des algues par spectroscopie d'absorption X.

Enfin, l'impact biologique de ces deux métaux est évalué dans le quatrième chapitre. Les réponses physiologique et métabolique de la micro-algue sont notamment analysées par des techniques chromatographiques et de résonance magnétique nucléaire.

La discussion générale, en fin de manuscrit, fait le lien entre les résultats présentés dans les différents chapitres pour apporter des explications possibles et propose des pistes d'exploration ultérieures.

Etat de l'art

I. Tolérance et détoxification des métaux par les micro-algues vertes

A. Toxicité des métaux

1. Métaux essentiels et non-essentiels

De nombreux métaux jouent un rôle central et spécifique dans le métabolisme des cellules biologiques. A ce titre, ils sont qualifiés de *métaux* ou *micronutriments essentiels*. Le cuivre, le fer, le manganèse, le molybdène, le nickel et le zinc sont par exemple indispensables aux processus physiologiques mis en œuvre par les plantes supérieures (Hänsch and Mendel, 2009). Ces micronutriments peuvent être impliqués dans les transformations biochimiques du fait de leurs propriétés redox, jouer le rôle d'activateur d'enzyme ou encore intervenir dans la stabilisation des structures protéiques. Ils sont indispensables aux processus physiologiques majeurs tels que la photosynthèse, la respiration mitochondriale ou l'assimilation et le métabolisme des macronutriments (azote, soufre), ils participent au contrôle et à l'expression des gènes, à la biosynthèse des acides nucléiques, des protéines, des glucides, des lipides, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires, et ils sont impliqués dans les mécanismes de résistance au stress et l'intégrité des membranes (Appenroth, 2010; Hänsch and Mendel, 2009; Yruela, 2013). D'autres métaux, au contraire, sont assimilés par les plantes mais n'ont pas de fonction connue dans leur métabolisme, ils sont qualifiés de *non-essentiels*. C'est par exemple le cas du cadmium, du mercure, de l'argent, du plomb ou de l'étain (Kabata-Pendias, 2011).

2. Importance de la concentration et de la spéciation dans la toxicité métallique

Essentiels ou non, tous les métaux présentent un caractère toxique pour les plantes sous certaines conditions. Deux facteurs sont à prendre en compte pour qualifier cette toxicité : la spéciation et la concentration des métaux.

La spéciation d'un élément est définie par ses caractéristiques chimiques et physiques (état d'oxydation, charge, nature des formes complexées, nature des interactions en jeu, solubilité, répartition entre les différentes formes). C'est une propriété essentielle qui détermine la mobilité des éléments, leur biodisponibilité, leur réactivité chimique, et par là même leur toxicité. Dans le cadre des systèmes biologiques, la spéciation des éléments est principalement déterminée par deux facteurs : le pH et la composition du milieu (présence de

ligands, de composés redox, *etc.*). La compréhension des effets toxiques des métaux en biologie suppose de contrôler leur spéciation dans deux « compartiments » : à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule. Les formes physico-chimiques sous lesquelles se trouve le métal à l'extérieur de la cellule déterminent sa biodisponibilité, et donc sa capacité à pénétrer l'organisme ; tandis que la spéciation des formes internalisées détermine leurs propriétés réactionnelles, et donc leur toxicité. A l'intérieur des cellules, ce sont généralement les ions libres qui constituent les formes métalliques les plus toxiques (Allen et al., 1980; Jonnalagadda and Rao, 1993; Ménager et al., 2009; Reeder et al., 2006)

Le lien entre la concentration des métaux et leur toxicité semble régi par une relation dose-réponse classique en toxicologie. Pour les métaux essentiels, cette courbe se décompose en trois parties : les cellules sont carencées lorsque la concentration de métal est trop faible ; les métaux sont tolérés, régulés et utiles au développement de la cellule dans une gamme de concentration intermédiaire qualifiée d'*optimale* ; enfin ils deviennent toxique pour la cellule aux fortes concentrations. La première partie de la courbe (carence) n'est pas observée pour les métaux non-essentiels : ils sont régulés ou tolérés aux faibles concentrations et ont des effets toxiques aux plus fortes concentrations. Dans les deux cas, la toxicité apparaît au-delà d'une concentration seuil. (Berry and Wallace, 1981; Reeder et al., 2006)

3. « Métaux lourds », « métaux toxiques »: remarques et conventions

Certains métaux non-essentiels présentent un seuil de toxicité pour les cellules végétales très bas, notamment les ions Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} et Sn^{2+} (Appenroth, 2010; Kabata-Pendias, 2011). Ils sont de ce fait usuellement qualifiés de *métaux toxiques*, mais ce terme est impropre. Il occulte l'effet de la spéciation et de la concentration des métaux : aucun métal n'est intrinsèquement toxique ; tous sont tolérés par les systèmes biologiques en-deçà d'un certain seuil de biodisponibilité et deviennent toxiques au-delà. Des effets bénéfiques ont d'ailleurs été observés pour certains métaux non-essentiels (cadmium, plomb, titane, *etc.*) lorsque les plantes y sont exposées à de très faibles doses : croissance accélérée, stimulation de l'activité photosynthétique, retard de sénescence, *etc.* (Appenroth, 2010; Mayer et al., 2005).

Le terme *métal lourd* est également largement employé pour désigner des métaux ou des métalloïdes associés à des phénomènes de toxicité biologique ou environnementale. C'est cependant un concept vague, sans fondement scientifique formel. De nombreux auteurs ont

proposé des critères de définition, reposant en particulier sur : la densité, la masse atomique, le numéro atomique, les propriétés chimiques ou la toxicité des éléments chimiques ou de leurs composés. Ces différentes classifications ne se recoupent pas, et aucune ne fait consensus (Duffus, 2002). D'autre part, parler de *métal lourd* dans un cadre toxicologique suggère de façon trompeuse un lien entre les propriétés toxicologiques des éléments et leur masse ou leur densité.

Nous éviterons donc d'utiliser les termes *métal toxique* et *métal lourd* dans la suite de ce manuscrit, et nous utiliserons préférentiellement les termes *métal*, *métal essentiel* et *métal non-essentiel*. Par commodité, nous désignerons par le terme *métal* les métaux de transition (bloc d du tableau périodique, lanthane et actinium exclus), les métaux pauvres (notamment l'aluminium, l'étain ou le plomb), les métalloïdes (en particulier l'arsenic), voire des non-métaux (comme le sélénium). La composition de ces séries chimiques est rappelée en Annexe 1.

4. Mécanismes de toxicité des métaux

Les mécanismes de toxicité des métaux peuvent être répartis en deux catégories : la toxicité peut être engendrée par l'interaction directe entre les ions métalliques et les protéines, l'ADN ou d'autres molécules dont le comportement sera modifié, ou elle peut être le fruit du stress oxydant causé par les métaux.

a. Interaction avec les protéines et l'ADN

Des interactions entre les cations Cd^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} et les protéines sont rapportées dans la littérature. Les protéines peuvent être affectées de deux façons : les cations peuvent modifier la structure tridimensionnelle des protéines, par exemple en se liant aux groupements thiols des acides aminés qui la composent, ou ils peuvent se substituer aux cofacteurs métalliques des métalloprotéines. Dans les deux cas, les protéines sont dénaturées et leur fonction n'est plus assurée (Moullis, 2010; Sharma et al., 2008).

Les ions métalliques peuvent également interagir avec l'ADN, c'est notamment le cas du nickel, du chrome et du platine (Sharma et al., 2008). Le nickel peut par exemple, par compétition avec le magnésium, modifier la condensation de la chromatine et réprimer ainsi l'expression de gènes (Briat and Lebrun, 1999).

b. Accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène et stress oxydant

Les métaux peuvent engendrer l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, pour *reactive oxygen species*), provoquant un état de stress oxydant qui semble être l'une des principales causes de la toxicité des métaux.

Les ROS sont produits par tous les organismes aérobies, c'est-à-dire les organismes dont les voies métaboliques utilisent le dioxygène comme accepteur d'électrons, tels que les plantes. Ils interviennent dans différents processus cellulaires, par exemple des processus de signalisation ou de défense. En conditions de fonctionnement normales, leur production et leur suppression sont régulées par des mécanismes antioxydants afin de maintenir la balance de potentiel oxydo-réducteur à l'équilibre.

La cellule est en état de stress oxydant lorsque cet équilibre est rompu et que le système antioxydant de la cellule est submergé par une quantité trop importante de ROS. De nombreuses conditions de culture peuvent engendrer un stress oxydant chez les plantes : carences nutritives, sécheresse, chocs thermiques, radiations ionisantes, contraintes mécaniques, polluants, etc. L'exposition aux métaux est également l'une des causes du stress oxydant (Ercal et al., 2001; Hall, 2002; Mittler, 2002).

Dans les paragraphes suivants, nous décrivons les propriétés des principaux ROS et les compartiments où ils sont produits au sein des cellules végétales, les mécanismes par lesquels ils endommagent différents composants cellulaires, et l'impact des métaux sur la production de ROS.

i. Propriétés des principaux ROS

La plupart des ROS sont des radicaux, c'est-à-dire des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe et présentant de ce fait une grande instabilité chimique. Les radicaux ont une réactivité chimique importante et généralement non spécifique, qui va de pair avec une durée de vie en solution très courte.

Dans son état de plus basse énergie, c'est-à-dire à l'état triplet noté $^3\text{O}_2$ ou $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$, le dioxygène est lui-même un biradical : il possède deux électrons non appariés de spins parallèles. Du fait de cette configuration électronique, il réagit très rapidement avec d'autres radicaux, mais difficilement avec les molécules organiques dont les électrons ont des spins appariés (Halliwell, 2006). Pour réagir avec ces molécules, il doit être activé.

L'état singulet $^1\text{O}_2$ est obtenu lorsque le dioxygène à l'état triplet absorbe suffisamment d'énergie pour que le spin de l'un de ses électrons célibataires soit inversé ; cela se produit par exemple durant la photosynthèse lorsque le photosystème ne peut pas dissiper rapidement l'énergie lumineuse absorbée en excès (Foyer et al., 1994). La contrainte sur les spins est alors levée, ce qui augmente considérablement les capacités oxydantes de l'oxygène singulet : il peut oxyder des molécules organiques telles que les protéines, l'ADN et les lipides (Halliwell, 2006), en interagissant avec les doubles liaisons.

Le dioxygène peut également être activé par réduction partielle, en acceptant un, deux ou trois électrons. Sont alors respectivement formés le radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$ (Mittler, 2002). L'apport d'un quatrième électron entraîne la formation d'eau, qui est la forme réduite normale de l'oxygène dans la chaîne respiratoire. Ces réductions en chaîne sont présentées dans la Figure 3. L'activation par réduction partielle peut être causée par toutes les voies métaboliques impliquant une chaîne de transport d'électron et peut donc avoir lieu dans différents compartiments subcellulaires, comme par exemple les mitochondries, les chloroplastes, les peroxysomes ou le cytosol (Alscher et al., 2002).

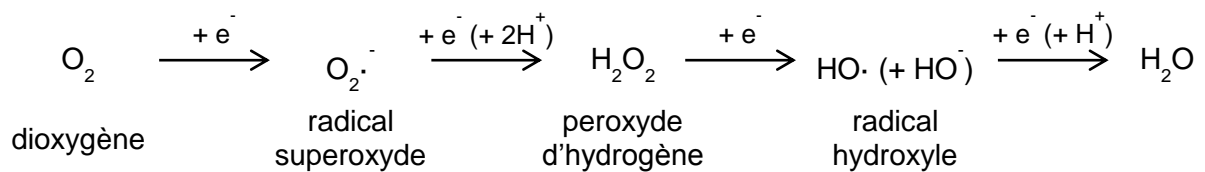


Figure 3 : Intermédiaires réduits de l'oxygène

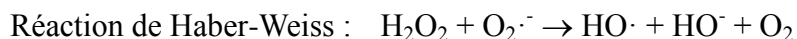
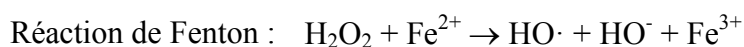
L'oxygène singulet est principalement produit dans le photosystème II du chloroplaste où l'activation de l'oxygène triplet est couplée avec la désexcitation de la chlorophylle ($^3\text{O}_2 + ^3\text{P680}^* \rightarrow ^1\text{O}_2 + ^1\text{P680}$) (Asada, 2006). C'est une espèce fortement réactive, qui cible particulièrement les doubles liaisons conjuguées des acides gras polyinsaturés. Son temps de demi-vie en solution est compris entre 10^{-6} et 10^{-5} s (Mourato et al., 2012; Sies, 1993).

Le radical superoxyde est majoritairement produit dans le chloroplaste (par les photosystèmes I et II) et dans les mitochondries du fait des chaînes de transfert d'électrons impliquées dans la photosynthèse et la respiration. Il est également produit dans les péroxysomes, la membrane plasmique et la paroi cellulaire. Son temps de demi-vie en solution est compris entre 10^{-6} et 10^{-5} s et il ne peut pas traverser les membranes

phospholipidiques, il doit donc être pris en charge *in situ* (Mittler, 2002; Mourato et al., 2012).

Le peroxyde d'hydrogène est produit dans les peroxysomes, les mitochondries et la paroi cellulaire. Ce n'est pas un radical, son temps de demi-vie en solution est de l'ordre de la milliseconde, et il peut traverser les différentes membranes et diffuser à travers la cellule (Mittler, 2002; Mourato et al., 2012).

Le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont moins réactifs que les autres ROS, mais ils peuvent être produits en quantités importantes dans les cellules et initialiser la synthèse d'autres radicaux, notamment du radical hydroxyle par des réactions de type Fenton ou Haber-Weiss (Kehrer, 2000; Noctor and Foyer, 1998) :



Le fer ou d'autres métaux ayant des propriétés redox en milieu biologique (cuivre, chrome, manganèse, *etc*) jouent le rôle de réducteur dans les réactions de type Fenton, et ils catalysent la réaction de Haber-Weiss. Le radical hydroxyle est un puissant agent oxydant, c'est l'espèce de ROS la plus réactive (Møller et al., 2007; Mourato et al., 2012). Les caractéristiques de ces différentes espèces sont rappelées dans le Tableau 1.

Nom	Notation, Structure	Type	Réactivité relative	Temps de demi-vie en solution
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$ O-O:	Radical	Forte	$10^{-6} - 10^{-5}$ s
Radical superoxyde	$\text{O}_2^{\cdot-}$ $\cdot\text{O}-\text{O}:$	Radical	Moyenne	$10^{-6} - 10^{-5}$ s
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2 H:O-O:H	Non radicalaire	Faible	10^{-3} s
Radical hydroxyle	HO· H:O·	Radical	Très forte	10^{-9} s

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux ROS, d'après (Møller et al., 2007; Mourato et al., 2012; Sies, 1993)

ii. Effets délétères des ROS

Les ROS sont à l'origine de nombreuses réactions d'oxydation au sein des cellules. Ces réactions sont généralement des réactions radicalaires en chaîne. Elles peuvent entraîner la formation de radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$ et de dérivés réactifs de l'azote (RNS, *pour*

reactive nitrogen species), qui peuvent à leur tour propager les réactions à d'autres fonctions chimiques (Møller et al., 2007; Sies, 1993). Ces réactions d'oxydation affectent notamment les lipides, les protéines, les glucides et l'ADN.

Les acides gras poly-insaturés (PUFAs, pour *polyunsaturated fatty acids*), tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique qui constituent les membranes lipidiques des cellules, sont facilement peroxydés lors de réactions en chaînes initiées par les ROS. L'oxydation des PUFAs diminue la fluidité des membranes, augmente leur perméabilité et cause des dommages secondaires aux protéines membranaires (Møller et al., 2007).

De nombreux acides aminés sont facilement oxydés, et l'oxydation des protéines est de ce fait souvent utilisée comme marqueur pour diagnostiquer le stress oxydant. Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) sont particulièrement sensibles aux ROS et les fonctions chimiques pouvant résulter de leur oxydation sont très diverses : la fonction thiol (-SH) de la cystéine s'oxyde en acide sulfénique (-SOH), en acide sulfinique (-SOOH), en acide sulfonique (-SO₂OH) ou en disulfure (-S-S-); la fonction thioéther (-S-) de la méthionine s'oxyde en sulfoxyde (-SO-) ou en sulfone (-SO₂-). Les ROS peuvent également oxyder la chaîne carbonée des autres acides aminés (en particulier de l'arginine, de l'histidine, de la lysine, de la proline, de la thréonine et du tryptophane) en formant des alcools (-OH), des aldéhydes (-COH) ou des cétones (-CO-). Les protéines oxydées sont dénaturées et perdent leur conformation fonctionnelle, elles sont alors généralement rapidement lysées par les enzymes protéolytiques. Toutefois, l'oxydation d'un nombre important de protéines peut entraîner la formation d'agrégats protéiques difficiles à dégrader sinon par autophagie (Xiong et al., 2007).

Les glucides peuvent être oxydés par le radical hydroxyle. Sont concernés les glucides libres tels que les sucres ou les polyols, ainsi que les glucides constituant la paroi cellulaire.

Les ROS peuvent également endommager l'ADN en modifiant les bases nucléotidiques, en causant des mutations et des défauts génétiques, ou en modifiant la régulation de l'expression des gènes (par altération de la méthylation des cytosines). Plusieurs mécanismes de réparation sont mis en œuvre par les cellules pour réparer l'ADN ainsi endommagé, comme par exemple la réparation directe de la modification par voie enzymatique, la réparation par excision de base, ou encore la réparation par excision de nucléotide (Møller et al., 2007; Tuteja et al., 2001).

Une partie de ces mécanismes d'oxydation est nécessaire au fonctionnement et au développement des cellules. Les ROS interviennent par exemple dans la signalisation des conditions de stress et l'activation des mécanismes d'adaptation et de défense des plantes (Foyer and Noctor, 2003; Halliwell, 2006; Mittler, 2002). L'élongation des cellules lors de la croissance des plantes est également facilitée par les ROS : l'auxine (phytohormone de croissance) promeut la production de radical hydroxyle aux abords de la paroi cellulaire pour augmenter son élasticité en oxydant les polysaccharides qui la constituent (Schopfer et al., 2002).

Toutefois, lorsque la cellule est en état de stress oxydant, les réactions d'oxydation ne sont plus régulées et elles endommagent les différents composants cellulaires. Ces dégradations entraînent l'apoptose lorsqu'elles sont trop importantes pour être réparées par les mécanismes cellulaires dédiés (Mittler, 2002; Møller et al., 2007; Mourato et al., 2012).

iii. Impact des métaux sur la production de ROS

La présence de métaux au sein des cellules peut entraîner l'accumulation de ROS de façon directe ou indirecte. Les métaux présentant des propriétés redox en milieu biologique (fer, cuivre, chrome, manganèse, *etc.*) génèrent directement des ROS par les réactions de type Fenton et Haber-Weiss. Les métaux qui ne participent pas aux réactions redox en milieu biologique (cadmium, plomb, mercure, *etc.*) participent pour leur part à l'accumulation de ROS en se liant aux molécules antioxydantes et aux enzymes responsables de l'élimination des ROS, ce qui diminue le pouvoir antioxydant des cellules (Ercal et al., 2001; Stohs and Bagchi, 1995; Yadav, 2010).

5. Nécessité d'une régulation, tolérance aux métaux et hyperaccumulation

Afin de prévenir la toxicité des métaux, les cellules végétales doivent donc réguler leur spéciation et leur concentration intracellulaire. Elles doivent notamment réguler la concentration cytosolique des ions métalliques libres. On parle généralement d'*homéostasie* pour les métaux essentiels, et de *mécanismes de détoxification* pour les métaux non-essentiels. Il s'agit dans le premier cas de maintenir une concentration optimale, dans le second de rester en-deçà du seuil de toxicité.

Ces mécanismes de régulation sont à l'œuvre chez toutes les algues et les plantes.

Certaines espèces ou souches se distinguent toutefois par leur capacité à se développer dans des environnements particulièrement riches en métaux, elles sont dites *tolérantes aux métaux*. La tolérance est généralement spécifique à un métal particulier : par exemple une micro-algue tolérante au cuivre ne sera pas nécessairement tolérante au cadmium (Clemens, 2001; Gaur and Rai, 2001).

Les observations ont montré que différents mécanismes peuvent participer à la tolérance métallique. Elle repose par exemple sur des mécanismes d'exclusion du métal qui limitent sa concentration intracellulaire chez certaines espèces ou souches. Il a ainsi été montré qu'une souche tolérante au cuivre de la micro-algue verte *Chlorella vulgaris* incorpore moins de cuivre qu'une souche classique lorsqu'elles sont cultivées dans le même milieu (Foster, 1977). Des résultats similaires ont été obtenus avec une souche tolérante au cuivre de la macro-algue brune *Ectocarpus siliculosus* (Hall et al., 1979).

D'autres espèces ou souches tolérantes aux métaux sont au contraire *hyperaccumulatrices* : en plus de les tolérer, elles incorporent des quantités de métal importantes. Des souches de micro-algues vertes des genres *Chlorella* et *Scenedesmus*, isolées depuis des lacs riches en métaux, accumulent par exemple davantage de cuivre que des souches des mêmes genres cultivées en laboratoire (Stokes et al., 1973). Chez les plantes supérieures, plus de 450 espèces d'hyperaccumulateurs sont rapportés dans la littérature. La limite pour parler d'hyperaccumulation chez les plantes supérieures varie selon les métaux : les plantes doivent par exemple pouvoir accumuler une masse de métal rapportée à leur masse sèche supérieure à 0,01% dans le cas du cadmium, supérieure à 0,1% dans le cas nickel, du chrome ou du plomb, et supérieure à 1% dans le cas du zinc (Clemens, 2001; Verbruggen et al., 2009).

Ces capacités d'exclusion ou d'hyperaccumulation de métaux indiquent l'existence de mécanismes permettant de réguler l'incorporation des métaux et de neutraliser leur toxicité. Ces mécanismes sont décrits dans la partie qui suit.

B. Mécanismes de tolérance mis en œuvre à l'échelle cellulaire

Différents mécanismes de tolérance peuvent être mis en œuvre par les micro-algues. Ces mécanismes peuvent être regroupés en trois catégories, selon qu'ils ont pour fonction de limiter l'entrée des métaux dans les cellules, de favoriser leur excrétion, ou de les gérer à l'échelle intracellulaire (Gadd, 2010; Gaur and Rai, 2001; Perales-Vela et al., 2006). Ils sont schématisés sur la Figure 4 et décrits plus en détail ci-après. Notons que, les organismes étudiés étant unicellulaires, leur tolérance à la toxicité métallique ne repose pas sur les mécanismes de translocation classiquement à l'œuvre chez les plantes supérieures.

1. Mécanismes limitant l'entrée des métaux dans la cellule

La première catégorie de mécanismes repose sur une stratégie d'évitement : les cellules limitent la concentration intracellulaire des métaux en réduisant leur assimilation. Trois types de mécanismes peuvent être mis en œuvre dans ce but : des ligands peuvent être sécrétés afin de former des complexes non bio-disponibles avec les métaux, les ions métalliques peuvent être complexés à la surface de la cellule, ou bien la paroi cellulaire et la membrane plasmique peuvent limiter l'entrée des ions métalliques dans la cellule.

a. Complexation extracellulaire par sécrétion de ligands

La sécrétion par la cellule de ligands qui chélatent les ions métalliques en solution dans le milieu extérieur et forment des complexes qui ne peuvent pas pénétrer la cellule a été mise en évidence chez plusieurs espèces de micro-algues et de cyanobactéries (McKnight and Morel, 1979; Whitton, 1965; Xue and Sigg, 1990). McKnight et Morel (1979) rapportent par exemple que des micro-algues vertes appartenant à différents genres (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, etc.) sécrètent, lorsqu'elles sont exposées à l'ion Cu^{2+} , des ligands qui complexent le cuivre en solution et qui sont probablement des acides organiques. On pense que ces ligands participent à la protection des algues contre la toxicité métallique, mais leur rôle est encore mal compris (Gaur and Rai, 2001).

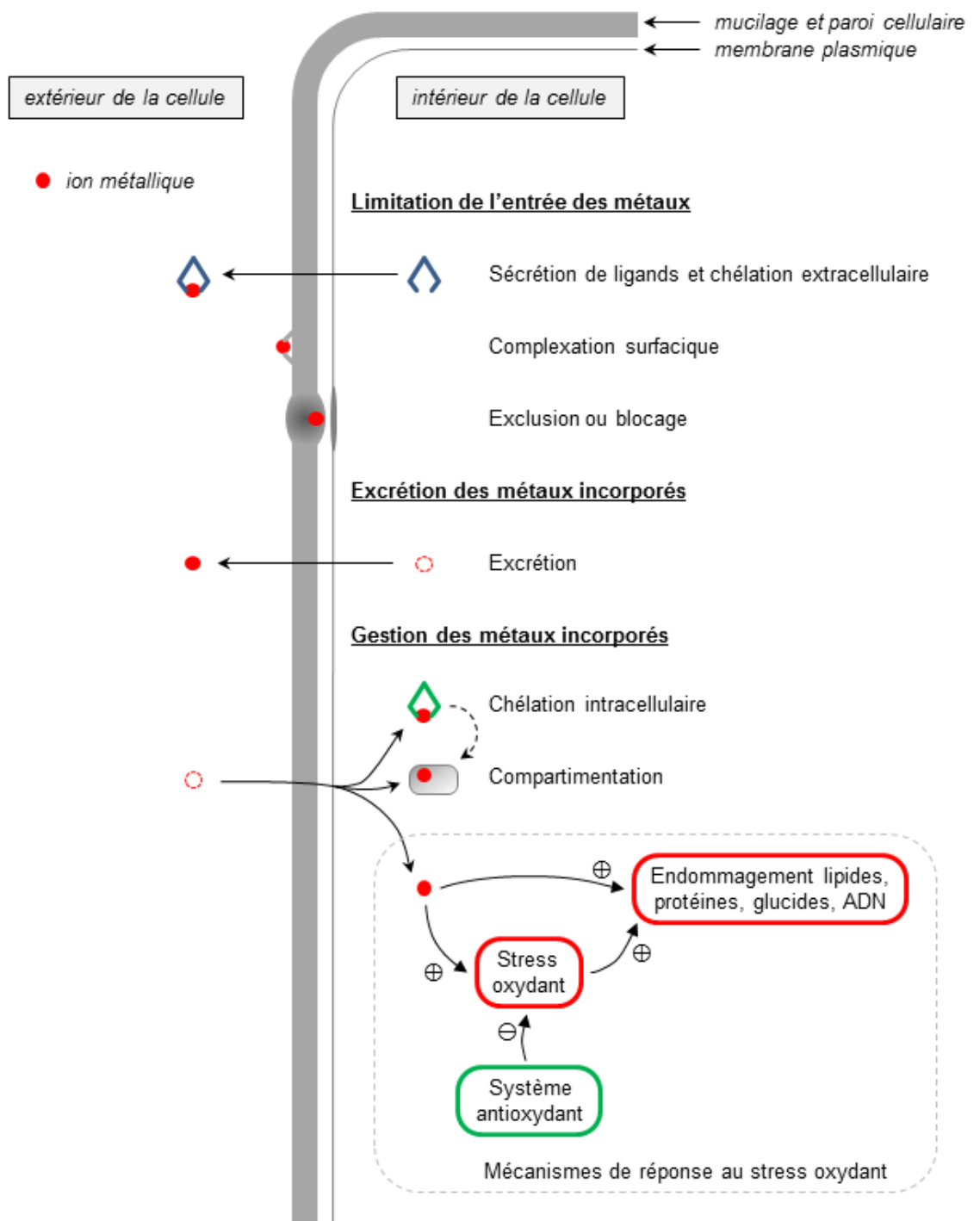


Figure 4 : Mécanismes généraux de tolérance aux métaux mis en oeuvre à l'échelle cellulaire

b. Complexation des ions métalliques à la surface de la cellule

De nombreuses algues et cyanobactéries sécrètent des quantités importantes de mucilage, substance visqueuse enrobant les cellules (Metaxatos et al., 2003; De Philippis and Vincenzini, 1998). Le mucilage est principalement composé de polysaccharides et est capable de fixer des quantités importantes d'ions métalliques (Parker et al., 1996). Tease et Walker (1987) rapportent par exemple la fixation d'ions cadmium Cd^{2+} sur le mucilage de la cyanobactérie *Gloeotheca ATCC 27152*. Le mucilage peut ainsi jouer le rôle de barrière protectrice pour les micro-organismes, en empêchant certains métaux de pénétrer la cellule (Gaur and Rai, 2001; De Philippis and Vincenzini, 1998).

La paroi cellulaire pourrait avoir une fonction similaire. Elle est notamment porteuse de groupements carboxyles et phosphates qui, du fait de leur charge négative, peuvent lier des métaux sous forme cationique (Crist et al., 1988; Xue and Sigg, 1990). Une plus forte sensibilité à la toxicité métallique (cadmium, cobalt, cuivre, nickel) a été rapportée pour des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvus de paroi cellulaire (Macfie et al., 1994).

Ces mécanismes de complexation (par le mucilage ou la paroi cellulaire) semblent jouer un rôle ambivalent : ils peuvent participer à la protection de la cellule si les métaux adsorbés en surface ne pénètrent pas la cellule, mais l'adsorption des ions métalliques à la surface peut aussi être temporaire et constituer la première étape de leur entrée dans la cellule (Knauer et al., 1997). Le devenir des métaux adsorbés à la surface de la cellule dépend probablement des interactions en jeu : certains sites d'adsorption lient fortement les métaux et diminueraient leur bio-disponibilité et leur capacité à pénétrer la cellule ; tandis que d'autres sites pourraient faire partie intégrante des processus d'influx (Gaur and Rai, 2001).

c. Exclusion des métaux par modification de la structure de la paroi cellulaire ou de la membrane plasmique

Les algues tolérant des concentrations métalliques extracellulaires importantes pourraient bénéficier de mécanismes d'exclusion des métaux mis en œuvre au niveau de la paroi cellulaire ou de la membrane plasmique. Ces mécanismes d'exclusion reposent sur les propriétés physiques des structures externes de la cellule (épaisseur, perméabilité aux ions métalliques). Ils constituent une barrière physique à l'entrée des ions métalliques et ne supposent pas nécessairement la complexation des métaux par les structures cellulaires (Gaur and Rai, 2001).

La structure de la paroi cellulaire, et en particulier son épaisseur, semble influencer sur la tolérance des algues aux métaux : plusieurs observations indiquent que les algues aux parois cellulaires plus épaisses sont moins sensibles à la toxicité métallique (Rijstenbil et al., 1998). Certaines conditions de stress peuvent engendrer une modification de la paroi, son épaissement a par exemple été observé chez la micro-algue verte *Scenedesmus obtusiusculus* en réponse à une carence en phosphate (Tillberg and Rowley, 1989), mais de telles observations n'ont pas été rapportées dans le cas d'un stress métallique. L'épaississement de la paroi cellulaire lors d'un stress métallique est en revanche documentée dans le cas des plantes supérieures (Krzeslowska, 2010).

Un second mécanisme d'exclusion pourrait reposer sur des modifications de la membrane plasmique. Chez les cyanobactéries, l'amélioration de l'intégrité de la membrane par enrichissement lipidique et l'altération des fonctions qui la rendent perméable aux ions métalliques ont été observées sur des souches tolérantes aux métaux (Asthana et al., 1993; Rai et al., 1991). Des mécanismes similaires pourraient exister chez les algues, bien qu'ils ne soient pas rapportés dans la littérature.

2. Mécanismes d'excrétion des métaux

Si malgré les mécanismes décrits précédemment des quantités trop importantes de métaux pénètrent dans la cellule, des processus d'excrétion peuvent être mis en œuvre pour les rejeter et diminuer la concentration intracellulaire. L'excrétion des ions métalliques est particulièrement courante chez les bactéries tolérantes aux métaux (Gadd, 2010; Silver and Phung, 1996). Différentes observations indiquent que des mécanismes d'excrétion sont également mis en œuvre par des micro-algues. Yoshimura *et al.* (1999) suggèrent par exemple un mécanisme actif d'efflux de l'ion Al^{3+} chez la micro-algue rouge *Cyanidium caldarium* pour expliquer sa tolérance à l'aluminium. Pillai *et al.* (2014) ont observé une excrétion d'argent par la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* lors d'expositions à Ag^+ ; cette excrétion est corrélée avec une augmentation des ARN codant pour l'efflux actif des ions Cu^+ , l'efflux d' Ag^+ ayant probablement lieu via les mêmes transporteurs.

Les micro-algues de l'espèce des chlorelles mettent en œuvre un mécanisme d'excrétion de l'ion mercurique Hg^{2+} particulier : il est d'abord réduit par voie enzymatique en mercure métallique Hg^0 , puis excrété par la cellule par volatilisation (de Filippis, 1978).

3. Mécanismes de gestion des métaux incorporés : chélation et compartimentation subcellulaire

La détoxification des métaux incorporés par les cellules repose sur la modification de leur spéciation par chélation intracellulaire ou oxydo-réduction et sur leur compartimentation subcellulaire dans différents organites. De nombreux ligands peuvent être impliqués dans la chélation des métaux, notamment le glutathion, les phytochélatines, les métallothionéines, des acides aminés libres ou des acides organiques. La séquestration des métaux par compartimentation subcellulaire diminue la concentration de métal libre dans le cytosol ; elle fait intervenir différents organites (vacuole, chloroplaste, mitochondries, noyau) et des corps constitués de polyphosphates.

a. Glutathion, phytochélatines et séquestration vacuolaire

Les phytochélatines sont un groupe de ligands intracellulaires très abondants chez les cellules végétales. Ce sont des molécules de nature peptidique, leur structure riche en cystéine est de la forme $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ (n pouvant varier de 2 à 11). Elles ont été isolées et caractérisées chez des micro-algues appartenant à de nombreux embranchements, notamment chez de nombreuses chlorophytes (embranchement auquel appartient l'espèce *C. actinabiotis* ; voir Annexe 2) (Gaur and Rai, 2001; Gekeler et al., 1988; Rauser, 1999). Quatre types d'isophytochélatines ont également été identifiés : ces molécules ont toutes une structure de la forme $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-X}$, l'acide aminé terminal X pouvant être une β -alanine, une cystéine, une sérine ou un glutamate (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Rauser, 1999). Bien que le préfixe *phyto* soit utilisé pour les nommer du fait de leur présence importante chez les plantes (Grill et al., 1985), les phytochélatines ne sont pas spécifiques au règne végétal : elles furent initialement découvertes chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, et des gènes impliqués dans leur synthèse ont été depuis identifiés chez des animaux (Cobbett and Goldsbrough, 2002). C'est en partie du fait de cette ubiquité que plusieurs noms leur ont été attribués : cadystines, peptides γ -glutamyles chélateurs de métaux, phytométallothionéines, poly(γ -glutamyle-cystéinyle)glycines ou encore métallothionéines de classe III (Robinson, 1989).

Les phytochélatines (PC) sont d'origine biosynthétiques. Elles sont synthétisées à partir de glutathion (GSH ; $\gamma\text{-GluCysGly}$) par les enzymes PC synthase. Plusieurs observations montrent que leur synthèse est induite *in vivo* par la présence de nombreux ions

métalliques (Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , *etc.*), en particulier chez les micro-algues (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Gaur and Rai, 2001). Deux mécanismes d'activation de l'enzyme PC synthase sont envisagés. Le premier repose sur une activation de l'enzyme PC synthase par liaison directe avec des métaux libres ; des études menées *in vitro* ont montré que la PC synthase de l'espèce *Arabidopsis thaliana* AtPCS1 est activée par la chélation d'un ion Cd^{2+} (Ogawa et al., 2011). Le second mécanisme passe par une interaction indirecte avec les métaux : le métal se lie au glutathion, et c'est la molécule de glutathion « bloquée » qui active la synthèse de phytochélatines. Ce mécanisme a été observé *in vitro* sur la même PC synthase AtPCS1 en présence de cadmium ou de zinc complexés par du glutathion (CdGS_2 ou ZnGS_2) (Vatamaniuk et al., 2000). Il pourrait expliquer le fait que la synthèse de phytochélatines est une réponse générique à la présence d'un grand nombre de métaux : il suffit que des ions métalliques puissent être chélaté par le glutathion pour qu'ils activent les enzymes PC synthase (sous réserve de contraintes stériques au niveau du site d'activation de l'enzyme) (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Le cadmium est le métal qui active le plus efficacement la synthèse de phytochélatines, et celui dont l'interaction avec ces ligands est la mieux renseignée dans la littérature. Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* comme chez la plante, les complexes phytochélatine-cadmium (PC-Cd) sont séquestrés dans des vacuoles après leur formation (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Gaur and Rai, 2001). Les vacuoles sont des compartiments subcellulaires entourés d'une membrane simple. Les cellules des plantes supérieures peuvent posséder plusieurs types de vacuoles, qui remplissent des fonctions diverses : stockage permanent ou transitoire (ions inorganiques, sucres, acides organiques et aminés, protéines, métabolites secondaires, pigments), dégradation des protéines, fonctions structurales (Wink, 1993). Chez les algues vertes, on distingue deux types de vacuoles : les vacuoles contractiles, impliquées dans la régulation de la pression osmotique, et les vacuoles acides, également appelées granules vacuolaires, qui contiennent des polyphosphates et jouent le rôle d'organe de stockage et de dégradation (Becker, 2007; Komine et al., 2000). C'est à ce second type de vacuole que les complexes PC-Cd pourraient être transférés chez les algues vertes.

Le transfert des complexes PC-Cd du cytosol à la vacuole est réalisé par des transporteurs ATP-dépendants, les observations de Park *et al.* (2012) montrent que les deux transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) AtABCC1 et AtABCC2 sont impliqués dans ce transport chez *A. thaliana*. Les complexes PC-Cd peuvent également interagir avec

des ions sulfure S^{2-} : ils permettent d'augmenter le nombre d'atomes de cadmium fixés par le complexe et de le stabiliser. Ces complexes sulfurés PC-CdS ont été observés chez la levure et chez certaines plantes. Ceux présentant les ratios S: Cd les plus élevés forment des agrégats de 20 Å de diamètre composés d'un cœur cristallin de sulfure de cadmium CdS entouré de phytochélatines (Dameron et al., 1989; Reese et al., 1992). Des complexes vacuolaire contenant du cadmium et du soufre ont également été observés chez la micro-algue verte *Dunaliella bioculata* (Heuillet et al., 1986). Le rôle du glutathion et des phytochélatines dans la séquestration vacuolaire des métaux est schématisé sur la Figure 5.

Le rôle des phytochélatines dans la détoxification des métaux autres que le cadmium est moins renseigné. Des observations montrent que les phytochélatines ne complexent pas tous les métaux qui induisent leur synthèse. *In vitro*, elles forment des complexes avec Ag, Pb et Hg (Mehra et al., 1996; Rauser, 1999). Chez la plante *Rubia tinctorum*, la synthèse de phytochélatines est notamment induite par Ag^+ , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} , mais seuls Cd, Ag et Cu sont identifiés dans des complexes *in vivo* (Maitani et al., 1996). D'autre part, des mutants d'*Arabidopsis* et de *S. pombe* déficients en PC-synthase sont très sensibles au cadmium et à l'arséniate, mais pas spécialement à d'autres métaux (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ni^{2+} , SeO_3^{2-}) (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Les observations de Park *et al.* (2012) et Song *et al.* (2010) indiquent que la tolérance à Hg^{2+} et la tolérance et l'accumulation de As^{3+} et As^{5+} sont, chez *A. thaliana*, positivement corrélées avec l'expression des gènes AtABCC1 et AtABCC2, impliqués dans le transport vacuolaire des complexes PC-Cd. Ces résultats suggèrent la formation de complexes PC-Hg et PC-As et leur transport vers la vacuole. Le transport des complexes formées par les phytochélatines avec d'autres métaux que le cadmium, le mercure et l'arsenic dans la vacuole ou l'implication du sulfure dans ces complexes ne sont, à notre connaissance, pas rapportés dans la littérature.

Les phytochélatines sont donc manifestement impliquées dans la détoxification du cadmium et d'autres métaux (mercure, arsenic, etc.). Elles ne semblent par ailleurs pas être impliquées dans d'autres mécanismes cellulaires que la détoxification des métaux.

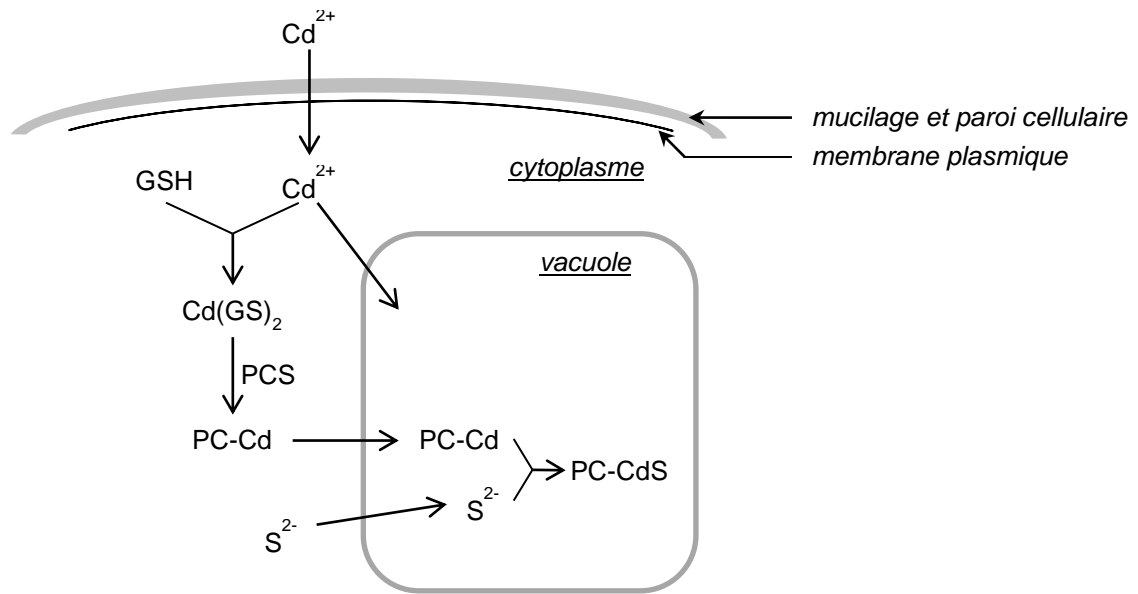


Figure 5 : Schéma simplifié du rôle du glutathion et des phytochélatines dans la chélation des métaux et le transport dans la vacuole (observé dans le cas du cadmium). GSH : glutathion, $Cd(GS)_2$: complexe glutathion cadmium, PC : phytochélatine, PCS : phytochélatine synthase, PC-Cd : complexe phytochélatine-cadmium

En plus d'être le précurseur de la synthèse des phytochélatines, le glutathion est probablement directement impliqué dans la chélation des métaux et leur transport vers la vacuole (Yadav, 2010). Il a par exemple été observé chez la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée à des concentrations sub-létales de Hg^{2+} et de Cd^{2+} que le mercure induit une synthèse accrue de glutathion, contrairement au cadmium qui induit la synthèse de phytochélatines (Howe and Merchant, 1992). L'augmentation de la synthèse de glutathion est également positivement corrélée à la tolérance au cadmium et au nickel chez plusieurs plantes supérieures (Freeman et al., 2004; Zhu et al., 1999). On notera toutefois que les études disponibles ne démontrent pas, à notre connaissance, ni la chélation *in vivo* des métaux par le glutathion, ni le transport du complexe vers la vacuole.

b. Métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines chélatrices de métaux largement répandues dans le monde vivant. Ce sont des polypeptides de faible masse moléculaire, riches en cystéine, qui chélatent les métaux via des liaisons soufrées. Les résidus cystéine forment des motifs CysXCys ou CysXXCys (X pour un autre acide aminé) répétés de nombreuses fois dans la chaîne peptidique.

Les métallothionéines furent initialement découvertes chez le cheval, en tant que

ligands du cadmium dans le système rénal (Margoshes and Vallee, 1957), et ont depuis été décrites chez de nombreux animaux, plantes et micro-organismes eucaryotes et procaryotes (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Rauser, 1999). Elles constituent une famille très variée de protéines et sont classifiées en fonction de leur séquence peptidique, plus particulièrement de l'agencement de leurs résidus cystéine. On distingue ainsi deux ou trois classes de métallothionéines : les métallothionéines de classe I possèdent 20 résidus Cys dont les positions sont hautement conservées (très proches des métallothionéines du cheval) et sont présentes chez la plupart des vertébrés ; les métallothionéines dont la disposition des résidus Cys est moins stricte appartiennent à la classe II, on les retrouve chez certaines plantes, algues, cyanobactéries, mycètes et invertébrés (drosophile, oursins). (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Fowler et al., 1987; Rauser, 1999). Des métallothionéines de classe II ont par exemple été décrites chez des cyanobactéries du genre *Synechococcus* (Olafson et al., 1988) et chez la macro-algue brune *Fucus vesiculosus* (Morris et al., 1999). Leur présence chez des micro-algues vertes n'est pas rapportée dans la littérature.

Du fait de leurs similarités structurelles (peptides riches en cystéine), certains auteurs considèrent que les phytochélatines constituent une troisième classe, qualifiée « d'atypique », de métallothionéines (Fowler et al., 1987; Rauser, 1999). Il existe toutefois des différences notables entre les métallothionéines de classe I et II et les phytochélatines : elles n'ont pas la même origine synthétique (les métallothionéines de classe I et II sont produites par traduction d'ARNm tandis que les phytochélatines sont le produit d'une synthèse enzymatique) et leurs fonctions (encore mal comprises chez les plantes pour les métallothionéines) sont potentiellement distinctes (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Grennan, 2011). Du fait de ces différences, et afin d'éviter toute confusion, nous distinguerons les phytochélatines des métallothionéines, ce dernier terme désignant dans la suite du manuscrit uniquement les classes I et II.

Le rôle joué par les métallothionéines chez les plantes est encore mal compris. Chez les animaux, elles servent notamment à protéger les cellules de la toxicité du cadmium (Klaassen et al., 1999). Leur rôle dans l'homéostasie du cuivre et du zinc, la réparation de l'ADN, la protection contre les dérivés réactifs de l'oxygène et la régénération des cellules a été mis en évidence sur des cellules hépatiques de souris (Cherian and Kang, 2006). La diversité des séquences peptidique chélatrices de métaux rencontrées chez les métallothionéines végétales suggère qu'elles peuvent lier davantage de métaux que les

métallothionéines animales, et que leurs fonctions sont plus variées, mais très peu ont été déterminées (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Grennan, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, elles semblent être impliquées dans l'homéostasie du cuivre et du zinc (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Grennan, 2011) et pourraient jouer le rôle de protéine chaperonne pour le transport du cuivre dans la cellule (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

c. Chélation par des petites molécules : acides aminés libres et acides organiques

Un nombre important de composés de faible masse moléculaire sont également impliqués dans la chélation des métaux chez les plantes, notamment des acides aminés et des acides organiques.

De nombreux acides aminés peuvent lier les métaux. La concentration d'acides aminés libres peut augmenter au sein des cellules végétales lors d'un stress métallique, suggérant qu'ils participent à la tolérance à la toxicité métallique (Briat and Lebrun, 1999). L'augmentation de la concentration en histidine est ainsi probablement responsable de la tolérance au nickel de plantes terrestres du genre *Alyssum* (Krämer et al., 1996), tandis que l'augmentation de la concentration en proline est positivement corrélée avec les capacités de tolérance au cuivre de la micro-algue verte *Trebouxia erici* (Bačkor et al., 2004). Des simulations informatiques de spéciation tenant compte des métaux et des acides aminés présents dans la sève de *Yucca flacida* indiquent par ailleurs que les ions Cu^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} seraient majoritairement présent sous forme complexée, respectivement avec de la glutamine, de l'asparagine et de l'alanine (Mullins et al., 1986). Chez les plantes, l'aspartate et le glutamate pourraient également participer à la détoxification des métaux par chélation directe (Sharma and Dietz, 2006).

Les acides organiques constituent un autre groupe de chélateurs de métaux, en particulier les acides dicarboxyliques (acides oxalique, fumarique, malique) et tricarboxyliques (acide citrique). On observe chez certaines plantes une stimulation de leur synthèse en présence de métaux, ce qui suggère qu'ils sont impliqués dans leur détoxification (Rauser, 1999). Des écotypes tolérants au zinc de *Silene vulgaris* présentent par exemple des concentrations foliaires d'acide malique quatre à sept fois plus importante que les écotypes non tolérants ; l'acide malique pourrait chélater Zn^{2+} dans le cytosol et permettre son transport dans la vacuole où l'acide oxalique le lierait (Mathys, 1977). Il a été montré sur différents

écotypes de *Deschampsia caespitosa* que la concentration d'acide citrique dans la sève racinaire est plus importante chez les écotypes tolérants au zinc que chez ceux qui y sont sensibles, qu'elle est proportionnelle à la quantité de zinc accumulé, et que le zinc est essentiellement présent sous forme de complexes zinc-citrate dans la sève racinaire (Godbold et al., 1984). Un écotpe de *Festuca rubra* tolérant au zinc et au cadmium présente des concentrations foliaires d'acide malique plus importantes qu'un écotpe non résistant, et positivement corrélées à la concentration d'exposition de zinc (Harrington et al., 1996). Le sarrasin *Fagopyrum esculentum*, qui peut pousser sur des terres à forte teneur en aluminium, sécrète rapidement et de façon spécifique de l'acide oxalique au niveau des racines en réponse au stress aluminium, et stocke ce métal sous forme de complexes aluminium-oxalate non toxiques dans ses feuilles (Ma et al., 1997). Les mécanismes de détoxication des métaux par complexation avec des acides organiques demeurent cependant peu documentés, et ils n'ont pour l'heure été décrits que chez les plantes supérieures (Gaur and Rai, 2001; Rauser, 1999).

d. Autres sites de complexation intracellulaires des métaux : corps constitués de polyphosphates, chloroplaste, mitochondries et noyau

La vacuole est considérée comme étant le principal organe de séquestration des métaux chez les algues vertes comme chez les plantes supérieures. D'autres sites de complexation ont néanmoins été observés. Dans tous les cas, la compartimentation des métaux ainsi stockés permet de réduire leur concentration cytosolique.

De nombreuses micro-algues accumulent des quantités de phosphates excédant leurs besoins métaboliques lorsqu'elles poussent dans des milieux riches. Le phosphate excédentaire est stocké sous forme de polyphosphates qui ont la capacité de complexer des cations, en particulier les cations métalliques (Co^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , etc.) (Gaur and Rai, 2001; Twiss and Nalewajko, 1992). Ce mécanisme a par exemple été décrit chez la micro-algue *Tetraselmis suecica* qui, lorsqu'elle est exposée à de l'argent ou du cuivre, accumule ces métaux dans des corps osmiophiles identifiés comme étant des polyphosphates (Ballan-Dufrançais et al., 1991). Si la séquestration par les polyphosphates permet d'atténuer la concentration cytosolique d'ions métalliques libres, elle peut cependant n'être qu'une solution temporaire puisque les phosphates accumulés peuvent être mobilisés pour des besoins métaboliques et de ce fait relarguer les métaux complexés.

Le chloroplaste peut également être impliqué dans la complexation des métaux chez

les micro-algues. L'analyse par fractionnement subcellulaire de la distribution du cadmium accumulé chez un mutant sans paroi cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* a montré que le métal est majoritairement contenu dans le chloroplaste et qu'il y est partiellement lié à des phytochélatines et des oligopeptides. Les analyses suggèrent par ailleurs que les phytochélatines sont principalement localisées dans le chloroplaste chez cette espèce (Nagel et al., 1996). L'observation au microscope électronique de souches tolérantes au cuivre de la micro-algue verte *Oocystis nephrocystioides* montre qu'elles accumulent le cuivre dans leur chloroplaste (Soldo et al., 2005). Le protiste *Euglena gracilis* ne possède pas de vacuoles de stockage comme les plantes, il accumule préférentiellement le cadmium dans ses chloroplastes lorsqu'il y est exposé lors de cycles lumière/obscurité de 12h/12h, et cette accumulation s'accompagne d'une augmentation des ligands possédant un groupement thiol (cystéine, γ -glutamylcystéine, glutathion, phytochélatines) au sein du chloroplaste (Mendoza-Cózatl and Moreno-Sánchez, 2005). Des souches d'*Euglena gracilis* conservées à l'obscurité durant une longue période perdent leurs chloroplastes et doivent être cultivées en conditions hétérotrophes. Un prétraitement au mercure confère à ces souches une tolérance et une capacité d'accumulation du cadmium plus importantes, le cadmium étant alors séquestré dans les mitochondries où les concentrations de citrate, de cystéine et de glutathion sont augmentées (Avilés et al., 2003).

Des micro-algues tolérantes au cuivre du genre *Scenedesmus* accumulent ce métal sous forme d'agrégats dans le noyau des cellules. Ces inclusions intranucléaires pourraient participer à la tolérance des algues en diminuant la concentration cytoplasmique d'ion cuivrique Cu^{2+} (Silverberg et al., 1976).

4. Enzymes et métabolites impliqués dans la réponse au stress oxydant

Lors de l'exposition des algues aux métaux, si la formation de ROS ne peut être évitée par les mécanismes de prise en charge des métaux précédemment décrits, les cellules mettent en œuvre une réponse antioxydante pour limiter les effets du stress oxydant. Ces mécanismes consistent à intercepter les ROS ou les radicaux secondaires qu'ils forment afin d'interrompre la propagation des réactions radicalaires en chaîne. Ils reposent sur l'action conjointe d'enzymes catalysant la réduction des ROS ou de molécules oxydées et de molécules antioxydantes sans caractère enzymatique. Nous décrivons ici les principales molécules constituant ces deux groupes.

a. Mécanismes enzymatiques

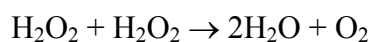
Les mécanismes enzymatiques de réponse au stress oxydant reposent principalement sur trois types d'enzymes : les superoxyde dismutases, la catalase et les peroxydases.

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène suivant la réaction suivante :

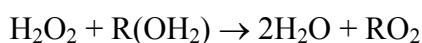


Les SOD sont caractérisées par le cofacteur métallique utilisé par l'enzyme et sont classées en trois catégories : la SOD à fer (Fe-SOD), la SOD à manganèse (Mn-SOD), et les SOD à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD). Les différentes catégories de SOD sont localisées dans des compartiments subcellulaires propres. Chez les plantes, les Fe-SOD sont localisées dans les chloroplastes, les Mn-SOD dans les mitochondries et les peroxysomes, et les Cu/Zn-SOD dans les chloroplastes, le cytosol et peut-être la paroi cellulaire (Alscher et al., 2002).

La catalase (CAT) est principalement présente dans les peroxysomes, dont le nombre augmente lorsque les cellules subissent un stress. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène pour former de l'eau et du dioxygène (Mittler, 2002) :



Les peroxydases sont une famille d'enzymes qui permettent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau selon la réaction :



Plusieurs types de donneurs électroniques peuvent jouer le rôle de réducteur $\text{R}(\text{OH}_2)$: par exemple l'acide ascorbique pour l'ascorbate peroxydase (APX) ou le glutathion pour la glutathion peroxydase (GPX) (Mourato et al., 2012).

Bien qu'elles ciblent le même substrat, la catalase et les peroxydases ont des caractéristiques distinctes : les peroxydases sont ubiquitaires dans la cellule tandis que la CAT est localisée dans les peroxysomes, et l'APX a une affinité pour H_2O_2 bien plus forte que la CAT. Ces enzymes semblent donc avoir des rôles distincts : la CAT dégraderait le peroxyde d'hydrogène produit en excès lors d'épisodes de stress, tandis que l'APX modulerait finement sa concentration à des fins de signalisation (Mittler, 2002).

Ces enzymes agissent conjointement dans différents cycles pour détoxifier les ROS, par exemple le cycle eau-eau au sein des chloroplastes ou le cycle acide ascorbique-glutathion dans les chloroplastes, le cytosol, les mitochondries, l'apoplasme et les peroxysomes (Figure 6). D'autres enzymes interviennent dans ces cycles pour régénérer les antioxydants impliqués dans la chaîne d'oxydation, comme par exemple la glutathion réductase (GR), la monodéhydroascorbate réductase (MDAR) ou la déhydroascorbate réductase (DHAR) (Gill and Tuteja, 2010; Mittler, 2002; Møller et al., 2007; Mourato et al., 2012; Sies, 1993).

b. Mécanismes non enzymatiques

Des molécules antioxydantes complètent les mécanismes enzymatiques décrits pour gérer les ROS. Les antioxydants sont des molécules qui retardent ou empêchent l'oxydation d'un substrat oxydable, même lorsqu'elles sont présentes à des concentrations plus faibles que le substrat en question (Halliwell, 1990). Elles jouent deux rôles importants au sein des cellules : elles désactivent les ROS ou les radicaux secondaires pour interrompre les réactions radicalaires en chaîne, et elles transfèrent les fonctions radicalaires vers les compartiments moins sensibles de la cellule, c'est-à-dire généralement des phases hydrophobes vers les phases hydrophiles. Cette étape de transfert permet la régénération du pouvoir antioxydant des molécules qui sont réduites par des molécules hydrophiles. Dans les membranes cellulaires, où cette étape de transfert/régénération est rapide, une molécule antioxydante suffit ainsi à protéger entre 300 et 1000 molécules oxydables (Sies, 1993).

L' α -tocophérol (l'une des formes de la vitamine E) est par exemple l'un des antioxydants les plus efficaces des membranes des thylakoïdes. Il est ancré dans la phase lipidique grâce à sa longue chaîne carbonée, et son groupe phénol lui permet d'intercepter les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) formés par les ROS. Le tocophérol radicalaire est ensuite réduit par des réducteurs de la phase hydrophile, tels que l'acide ascorbique ou les thiols (Sies, 1993). Les tocophérols présentent d'autres propriétés antioxydantes, ils peuvent notamment désactiver l'oxygène singulet (Gill and Tuteja, 2010).

L'acide ascorbique et le glutathion sont les antioxydants hydrosolubles les plus abondants chez les plantes. Ils sont présents dans tous les compartiments cellulaires. L'acide ascorbique peut désactiver l'oxygène singulet et il est impliqué dans la régénération de l' α -tocophérol et de certains caroténoïdes. Le glutathion peut également désactiver certains ROS (oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle), il est impliqué dans la

régénération d'autres antioxydants, et l'équilibre entre ses formes réduites (GSH) et oxydés (GSSG) joue un rôle essentiel dans la balance redox de la cellule. Les deux antioxydants sont aussi des substrats enzymatiques dans le cycle acide ascorbique-glutathion qui permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène (Gill and Tuteja, 2010; Mourato et al., 2012; Noctor and Foyer, 1998).

Certains terpénoïdes, composés organiques dérivés de l'isoprène, ont des propriétés antioxydantes importantes. Le β -carotène et la zéaxanthine par exemple, qui sont des caroténoïdes, limitent la production de ROS dans le chloroplaste en désexcitant la chlorophylle et désactivent les ROS et les lipides peroxydés (Gill and Tuteja, 2010; Mourato et al., 2012). Les flavonoïdes, composés organiques dont la structure est dérivée de la flavone, peuvent également présenter des propriétés antioxydantes, comme par exemple les anthocyanines (Gill and Tuteja, 2010; Kähkönen and Heinonen, 2003).

Beaucoup d'autres composés sont impliqués dans la défense antioxydante des plantes, notamment des métabolites azotés tels que les acides aminés non protéiques (en particulier la proline et l'histidine), les polyamines, les thiols ou encore les protéines de choc thermique (Gill and Tuteja, 2010; Mourato et al., 2012; Sharma and Dietz, 2006).

Fig. 1. Pathways for reactive oxygen intermediate (ROI) scavenging in plants. (a) The water–water cycle. (b) The ascorbate–glutathione cycle. (c) The glutathione peroxidase (GPX) cycle. (d) Catalase (CAT). Superoxide dismutase (SOD) acts as the first line of defense converting O_2^- into H_2O_2 . Ascorbate peroxidases (APX), GPX and CAT then detoxify H_2O_2 . In contrast to CAT (d), APX and GPX require an ascorbate (AsA) and/or a glutathione (GSH) regenerating cycle (a–c). This cycle uses electrons directly from the photosynthetic apparatus (a) or NAD(P)H (b, c) as reducing power. ROIs are indicated in red, antioxidants in blue and ROI-scavenging enzymes in green. Abbreviations: DHA, dehydroascorbate; DHAR, DHA reductase; Fd, ferredoxin; GR, glutathione reductase; GSSG, oxidized glutathione; MDA, monodehydroascorbate; MDAR, MDA reductase; PSI, photosystem I; tAPX, thylakoid-bound APX.

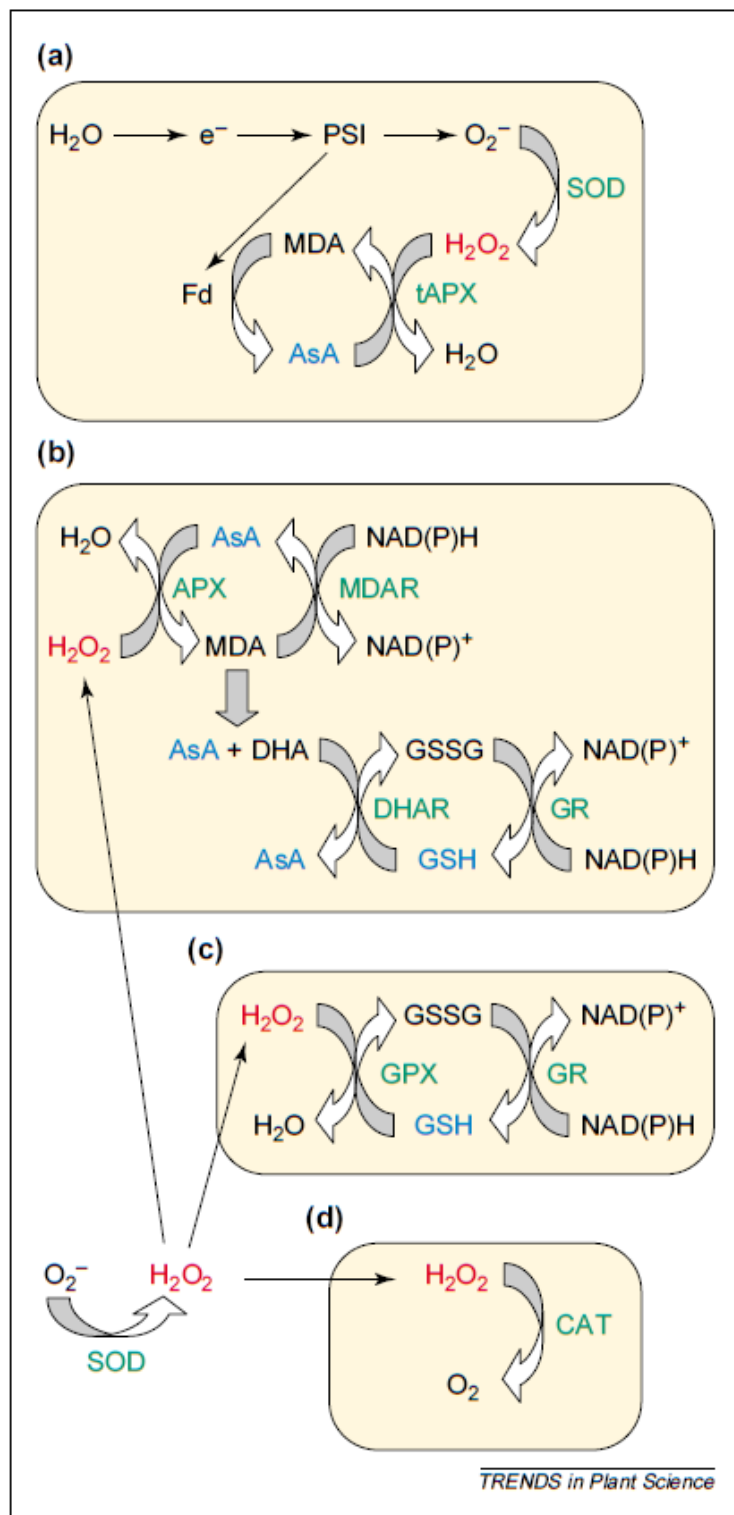


Figure 6 : Cycles de détoxication des ROS, d'après (Mittler, 2002)

II. Caractéristiques générales et toxicité de l'argent

A. Propriétés physico-chimiques, production et usages de l'argent

1. Isotopes stables

L'argent est un métal de transition de numéro atomique $Z = 47$ et de masse atomique relative 107,868 u. C'est un métal blanc argenté aux reflets brillants, malléable et ductile. A l'état naturel, il existe sous forme de deux isotopes stables : ^{107}Ag (51,8 %) et ^{109}Ag (48,2 %). Ses principales propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 2.

Propriétés	Ag
Numéro atomique	47
Isotopes naturels	^{107}Ag (51,8 %), ^{109}Ag (48,2 %)
Masse atomique (u)	107,868
Configuration électronique	[Kr] 5s ¹ 4d ¹⁰
Electronégativité (Pauling)	1,93
Point de fusion (°C)	961,78
Point d'ébullition (°C)	2162
Densité (20°C, g.cm ⁻³)	10,5
Degrés d'oxydation courants	+1
Potentiel redox standard	$E^0 (\text{Ag}^+/\text{Ag}) = 0,80 \text{ V}$
Classement HSAB	Acide mou

Tableau 2 : Principales propriétés physico-chimiques de l'argent

La production d'argent était de 32,6 kt en 2012, 21 % provenant de l'exploitation des mines d'argent, 54 % des sous-produits d'autres exploitations minières (en particulier des mines de zinc et de plomb), et 25 % du recyclage. L'essentiel de la demande provient de l'industrie, en particulier des industries électriques et électroniques du fait de ses propriétés physiques (c'est le métal dont les conductivités thermiques et électriques sont les meilleures). Il est également utilisé en bijouterie, dans la fabrication de l'argenterie et pour frapper des médailles et des devises du fait de ses propriétés optiques et de sa rareté, ainsi que dans l'industrie des films photographiques argentiques qui tire bénéfice de la photosensibilité des halogénures d'argent (Purcell and Peters, 1998; Ratte, 1999; Thomson Reuters GFMS, 2013). La répartition de la demande entre ces secteurs est présentée Figure 7.

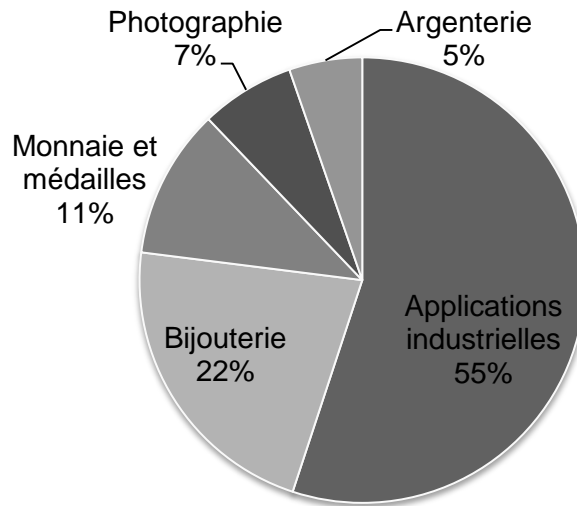


Figure 7 : Demande mondiale en argent par secteurs en 2012 (Thomson Reuters GFMS, 2013)

2. *L'essor des nanoparticules*

L'argent est également utilisé depuis des siècles pour ses propriétés antimicrobiennes : il a par exemple été utilisé pour rendre l'eau potable, pour soigner blessures et brûlures, et pour traiter des infections (Lansdown, 2006; Nowack et al., 2011; Rai et al., 2009). Récemment, les applications des propriétés biocides de l'argent se sont fortement développées, celui-ci étant désormais incorporé dans des objets de la vie courante sous forme de nanoparticules ou de colloïdes. On en trouve par exemple dans des pansements, des chaussettes et autres textiles, des récipients alimentaires, du dentifrice, des filtres à air, des aspirateurs et des réfrigérateurs (Klaine et al., 2008). Plusieurs études ont montré qu'une utilisation normale de ces produits entraîne la libération dans l'environnement d'une fraction importante de l'argent qu'ils contiennent, sous forme de nanoparticules, de colloïdes ou de composés ioniques (Benn and Westerhoff, 2008; Kaegi et al., 2010).

3. *Isotopes radioactifs*

38 isotopes radioactifs de l'argent ont été caractérisés (Audi et al., 1997). Parmi eux, seul ^{110m}Ag a été détecté dans l'environnement, en particulier suite à des accidents nucléaires de grande ampleur tels que ceux de Tchernobyl (Calmet et al., 1991; Jones et al., 1986; Vuković, 2002) ou de Fukushima (Fukuda et al., 2013). ^{110m}Ag est un émetteur gamma, son activité massique est de $1,76 \cdot 10^{14} \text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ et son temps de demi-vie de 249 jours. Ce n'est pas un produit de fission du combustible nucléaire mais un élément d'activation de ^{109}Ag

(Vuković, 2002), qui est présent dans les barres de contrôle des réacteurs. Ces barres de contrôle, constituées d'un alliage d'argent, d'indium et de cadmium permettent la régulation du flux de neutrons émis par le cœur du réacteur (EDF, 2014).

^{110m}Ag est présent dans les effluents liquides des réacteurs à eau pressurisée en fonctionnement normal. En 2000, pour le parc électronucléaire français, le ^{110m}Ag représentait respectivement 26, 8 et 48 % de l'activité gamma totale des effluents liquides des réacteurs à eau pressurisée de 900, 1300 et 1450 MWe (Figure 8); soit une quantité totale d'environ 7,7 GBq pour l'année (Florence and Hartmann, 2003).

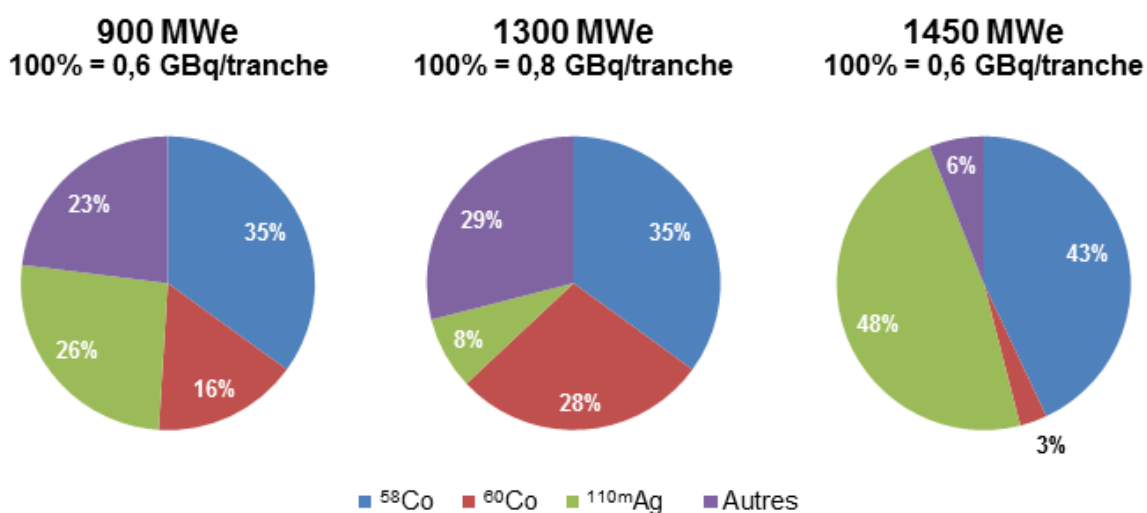


Figure 8 : Répartition des radionucléides émetteurs gamma rejetés par les réacteurs nucléaires d'EDF en 2000, d'après (Florence et Hartmann 2003)

B. Toxicité de l'argent

1. Toxicité pour l'homme et les organismes aquatiques

L'argent est un métal non-essentiel pour les organismes vivants. Il présente une toxicité faible pour l'homme (Drake, 2005; Lansdown, 2006). Une exposition chronique, notamment aux formes solubles de l'argent, peut entraîner une coloration permanente bleu-grise de la peau (argyrisme) ou des yeux (argyrose) (Drake, 2005; Lansdown, 2006). Cette affection est classifiée par l'Agence américaine de protection de l'environnement (US Environmental Protection Agency) comme bénigne et d'ordre cosmétique (US EPA, 1996). Elle serait provoquée par l'ingestion de 5 à 14 $\text{ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'argent (RAIS, 2014; US EPA, 1996). Les doses provoquant une toxicité aiguë chez l'homme ne sont pas déterminées de

façon fiable, mais elles sont importantes (la dose létale par ingestion serait d'au moins 10 g pour le nitrate d'argent (RAIS, 2014)). L'argent et ses composés n'ont pas d'effet mutagène, tératogène ou cancérigène connu chez l'homme (Eisler, 1996; RAIS, 2014; US EPA, 1996).

L'argent est en revanche l'un des métaux les plus toxiques en milieu aquatique, après le mercure, et au même rang que le cadmium et le chrome. Il est notamment toxique pour les bactéries, les algues, les invertébrés, les poissons et les amphibiens (Eisler, 1996; Rai et al., 1981; Ratte, 1999). Il est rapidement et fortement accumulé par les bactéries, les algues et les invertébrés (Eisler, 1996; Ratte, 1999) et sa distribution dans les océans est similaire à celle des nutriments essentiels : sa concentration est faible en surface (où le phytoplancton consomme les nutriments) et augmente avec la profondeur (Zhang et al., 2004). Malgré cette toxicité importante, l'étude de l'impact de l'argent sur les organismes et les écosystèmes est récente : elle a débuté dans les 1970-80, du fait des rejets substantiels de l'industrie de la photographie argentique (Ratte, 1999).

2. Spéciation, accumulation et toxicité de l'argent pour les micro-algues

La spéciation de l'argent dans le milieu influe sur son accumulation par les organismes marins et sur sa toxicité (Hogstrand and Wood, 1998).

a. Spéciation de l'argent en milieu aqueux

L'ion libre Ag^+ est considéré comme l'espèce chimique de l'argent dont l'accumulation et la toxicité sont les plus importantes (Hogstrand and Wood, 1998; Reinfelder and Chang, 1999). En milieu aqueux, dans les conditions de pH et d'oxydo-réduction classiques, l'argent ionique réagit toutefois avec une grande variété de composés qui modifient sa spéciation, comme par exemple le chlore, le thiosulfate, les sulfures ou des acides organiques. En présence de chlore, comme par exemple en milieu marin ou estuariens, l'argent et le chlore forment des complexes stables contenant jusqu'à quatre atomes de chlore pour un atome d'argent (Barriada et al., 2007; Reinfelder and Chang, 1999). Dans les eaux usées et les effluents des industries photographiques riches en thiosulfate $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, l'argent peut former des complexes de mono-, di- et tri-sulfate (Fortin and Campbell, 2001). L'argent peut également former des complexes stables avec l'ion hydrogénosulfure HS^- (Dyrssen, 1988) ainsi qu'avec des complexes organiques (Cowan et al., 1985; Hogstrand and Wood, 1998).

b. Impact de la spéciation de l'argent sur son accumulation par les algues

La spéciation de l'argent influe sur sa biodisponibilité pour les micro-algues : certaines espèces d'argent sont disponibles, tandis que d'autres ne sont pas accumulées par les algues.

L'effet des ions chlorure sur l'accumulation de l'argent par les micro-algues diffère selon les études publiées. Pour une concentration d'exposition en argent fixée (50 pM) et différentes concentrations de chlore (de 0,5 mM à 50 mM), la quantité d'argent accumulé par la diatomée *Thalassiosira weissflogii* sur des temps courts (4h) dépend principalement de la proportion d'argent sous forme de $\text{AgCl}_{(\text{aq})}$ dans le milieu, cette espèce serait donc celle qui pénètre le plus facilement la cellule, devant Ag^+ et les complexes de la forme AgCl_n^{1-n} ($n = 2$ à 4) (Reinfelder and Chang, 1999). Dans des conditions similaires ($[\text{Ag}]$ fixée à 10 ou 115 nM, $[\text{Cl}]$ variant de 5 μM à 50 mM, exposition durant 1h), l'accumulation d'argent par les micro-algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella pyrenoidosa* est positivement corrélée à la concentration de Ag^+ en solution, et l'internalisation de AgCl_n^{1-n} ($n = 1$ à 4) n'est pas observée (Lee et al., 2004). Lorsque la concentration en Ag^+ en solution est fixée tandis que les concentrations totales en argent et en chlore varient, les deux espèces précédentes accumulent une quantité fixe d'argent, contrairement à la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* qui accumule une quantité d'argent croissante en fonction des ions chlorure ($[\text{Ag}^+] = 8$ nM, $[\text{Cl}^-] = 5$ μM – 4 mM, 1h d'exposition) (Fortin and Campbell, 2000; Lee et al., 2004). Dans ces mêmes conditions, l'internalisation des espèces de l'argent de la forme AgCl_n^{1-n} ($n = 1$ à 4) n'a pas été observée (Fortin and Campbell, 2000). Si la spéciation de l'argent modifie sans conteste son accumulation par les micro-algues, la prévision de son impact sur différentes espèces de micro-algues apparaît donc complexe.

A concentration en Ag^+ fixée, *Chlamydomonas reinhardtii* accumule davantage d'argent lorsque du thiosulfate d'argent AgS_2O_3^- est ajouté à la solution, tandis que l'ajout de sulfate SO_4^{2-} à la solution contenant déjà Ag^+ et AgS_2O_3^- diminue la quantité d'argent accumulé ($[\text{Ag}^+] = 10$ nM, $[\text{AgS}_2\text{O}_3^-] = 0$ ou 110 nM, $[\text{SO}_4^{2-}] = 0$ ou 81 μM , exposition durant 1h). Le thiosulfate d'argent pourrait traverser la membrane plasmique via des transporteurs communs au sulfate et au thiosulfate, cette hypothèse rendant compte de l'augmentation de l'argent accumulé observée en présence de thiosulfate d'argent et de la compétition entre le thiosulfate d'argent et le sulfate (Fortin and Campbell, 2001). Des effets semblables sont observées chez *Pseudokirchneriella subcapitata* en présence d'ions Ag^+ et de thiosulfate

d'argent (Hiriart-Baer et al., 2006).

La présence d'acide humique dans le milieu d'exposition augmente également la quantité d'argent accumulée par *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata* à $[Ag^+]$ fixée ($[Ag^+] = 35 - 50 \text{ nM}$, $[\text{acide humique}] = 5 - 10 \text{ mg C.L}^{-1}$, temps d'exposition inférieur à 1 h). L'analyse de la répartition de l'argent dans les micro-algues par fractionnement subcellulaire révèle une présence d'argent plus importante dans la fraction contenant la paroi cellulaire et la membrane plasmique dans le cas des expositions en présence d'acide humique, ce qui suggère que des complexes constitués d'argent et d'acide humique se lient à la paroi cellulaire sans être internalisés (Chen et al., 2013).

Les cinétiques d'accumulation de l'argent, notamment de l'ion Ag^+ , sont rapides dans toutes les observations rapportées (c'est pourquoi les suivis d'accumulation sont généralement réalisés sur une à quelques heures). L'internalisation des différentes espèces de l'argent met en œuvre différents mécanismes : les ions Ag^+ sont probablement internalisés par des transporteurs du cuivre Cu^+ (Leclerc and Wilkinson, 2014; Pillai et al., 2014), les complexes de thiosulfate d'argent par des transporteurs communs au sulfate et au thiosulfate (Fortin and Campbell, 2001), tandis que les espèces telles que $AgCl$ ou $AgHS$ pourraient traverser la membrane du fait de leur neutralité électronique (Reinfelder and Chang, 1999).

c. Impact de la spéciation de l'argent sur sa toxicité

Au-delà de son impact sur la biodisponibilité et l'accumulation par les algues, la spéciation de l'argent dans le milieu influe sur la toxicité de l'argent accumulé. Dans le cas des chlorures, des effets différents sont décrits pour les micro-algues *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii* : la toxicité ne dépend que de la concentration en Ag^+ dans le milieu pour la première, tandis qu'elle est fonction de la concentration dans le milieu de toutes les espèces solubles d'argent (Ag^+ et $AgCl_n^{1-n}$ ($n = 1 \text{ à } 4$)) pour la seconde (Lee et al., 2005). Le thiosulfate d'argent est accumulé et toxique pour ces deux mêmes espèces de micro-algues, mais l'argent internalisé sous forme de thiosulfate semble être moins toxique que l'argent internalisé sous forme ionique (Hiriart-Baer et al., 2006). La présence d'acides humiques dans le milieu, à concentration en Ag^+ fixée, ne modifie pas la toxicité de l'argent sur ces micro-algues : les complexes constitués d'argent et d'acides humiques qui se lient probablement à la paroi cellulaire n'influent pas sur la toxicité globale qui semble essentiellement dépendre de l'argent sous forme Ag^+ (Chen et al., 2013).

3. Effets physiologiques de l'argent sur les micro-algues

De nombreux effets physiologiques induits par sa toxicité sont observés lors de l'accumulation d'argent par les micro-algues : diminution du taux de croissance voire mortalité des cultures, impact sur le rendement du photosystème, perturbation de la fixation du carbone et de l'azote (Chen et al., 2013; Hiriart-Baer et al., 2006; Lee et al., 2005; Navarro et al., 2008; Rai and Raizada, 1985). Le suivi de ces paramètres permet de déterminer les concentrations auxquelles les effets toxiques de l'argent apparaissent. Nous présentons dans le Tableau 3 un bilan des concentrations efficaces médianes (CE₅₀) rapportées dans la littérature pour l'ion Ag⁺ sur deux espèces de micro-algues vertes, mesurées dans différentes conditions. La CE₅₀ est la concentration en Ag⁺ à laquelle les fonctions suivies ont une valeur médiane entre leur valeur en l'absence d'argent et leur valeur lorsque la toxicité est maximale.

Espèce	CE ₅₀ (nM)	Paramètre mesuré	Conditions	Réf.
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	188 ± 61 (ES)	Fv/Fm	1 h, batch	a
	~ 190	Fv/Fm	1 h, batch	b
	12 ± 1 (IC ₉₅)	TC	6 h, batch	c
	21,2 ± 1,8 (ET)	TC	1 j, batch	d
	15 ± 7 (ES)	TC	1 j, turbidostat	e
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	26 ± 5 (IC ₉₅)	TC	6 h, batch	c
	22 ± 13 (ES)	TC	1 j, turbidostat	e

CE₅₀ : Concentration efficace médiane
 La méthode de calcul de l'incertitude sur la CE₅₀ est indiquée entre parenthèses : ES : Erreur standard ; IC₉₅ : Intervalle de confiance à 95% ; ET : Ecart type
 Fv/Fm : Rendement quantique maximum du photosystème II ; TC : taux de croissance
 Références : a : (Navarro et al., 2008) ; b : (Pillai et al., 2014) ; c : (Lee et al., 2005) ; d : (Chen et al., 2013) ; e : (Hiriart-Baer et al., 2006)
 Toutes ces mesures ont été effectuées dans des conditions de spéciation telles que [Ag_{total}] = [Ag⁺] dans le milieu

Tableau 3 : Paramètres de toxicité de l'ion Ag⁺ pour les micro-algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*

4. Mécanismes de toxicité de l'argent et réponse adaptative

L'argent a une forte affinité chimique pour le soufre. Dans les systèmes biologiques, il forme généralement des complexes avec des protéines et des acides aminés via leurs bases sulfurées (par exemple avec la cystéine ou la méthionine) ou avec des molécules présentant des fonctions thiols (telles que le glutathion ou les phytochélatines) (Adam and Garnier-

Laplace, 2003; Szpunar et al., 2003). L'argent présente également une réactivité chimique proche du cuivre, les deux éléments appartenant au même groupe du tableau périodique ; il peut donc s'y substituer et perturber les systèmes qui reposent sur le cuivre (Leclerc and Wilkinson, 2014; Pillai et al., 2014). Ces deux propriétés expliquent les principaux mécanismes de toxicité observés chez les micro-algues.

Les effets biologiques de l'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à Ag^+ sont nombreux :

- L'appareil photosynthétique des algues est affecté, leur rendement de photosynthèse diminue (Kabata-Pendias, 2011; Navarro et al., 2008; Pillai et al., 2014). La liaison de l'argent aux fonctions thiols ou la substitution du cuivre dans des métalloprotéines clés de la photosynthèse peuvent rendre les protéines non fonctionnelles et perturber le photosystème (Pillai et al., 2014)
- Le système de transport du cuivre est perturbé par les ions Ag^+ (Pillai et al., 2014)
- La quantité d'ATP dans la cellule diminue, probablement du fait de l'inhibition de protéines clés dans le chloroplaste et la mitochondrie, principaux lieux de production de l'ATP dans la cellule. L'utilisation d'ATP pour excréter les ions Ag^+ pourrait également participer à cette diminution (Pillai et al., 2014)
- La perturbation des chaînes de transfert d'électrons des chloroplastes et des mitochondries entraîne également la formation de ROS et l'apparition d'un stress oxydant, dont les nombreux effets secondaires ont été décrits au paragraphe I.A.4.b (p.34) (Pillai et al., 2014; Szivák et al., 2009)
- Le métabolisme lipidique est modifié, une augmentation de la quantité de corps lipidiques est observées, probablement du fait du stress oxydant (Kabata-Pendias, 2011; Pillai et al., 2014)

Différents mécanismes ont été observés chez les micro-algues en réponse à ces perturbations :

- L'activation des mécanismes de réponse de détoxification des ROS et de réparation des dommages du stress oxydant a été observée chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Pillai et al., 2014)

- L'élimination des ions Ag^+ présents dans le cytosol par efflux via des transporteurs de type ATPase pourrait se mettre en place quelques heures (entre 5 et 24 h) après le début de l'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à l'argent (Pillai et al., 2014)
- Une induction de la synthèse de phytochélatines a été observée chez les micro-algues vertes *Scenedesmus acutiformis* et *Chlorella fusca* lorsqu'elles sont exposées à Ag^+ (Gekeler et al., 1988)
- L'analyse de la micro-algue marine *Tetraselmis suecica* après 5 jours d'exposition à l'argent (à 185 nM) a révélé le stockage de l'argent dans des vésicules osmiophiles contenant des lipides et la co-précipitation d'argent, de cuivre, de plomb, de calcium, de soufre et de phosphore dans des granules potentiellement constitués de polyphosphates (Ballan-Dufrançais et al., 1991).

Pillai et al. (2014) ont proposé une représentation schématique des mécanismes de toxicité et de la réponse adaptative de *Chlamydomonas reinhardtii* en analysant les perturbations physiologiques, transcriptomiques et protéomiques induites par une exposition à l'argent. Ces schémas sont présentés en Annexe 3.

5. Cas des nanoparticules

La toxicité des nanoparticules d'argent sur les micro-algues a fait l'objet d'un certain nombre d'études, mais la nature des mécanismes de toxicité à l'œuvre ne fait pas consensus.

Certaines études suggèrent une toxicité indirecte des nanoparticules : leur toxicité serait uniquement due aux ions Ag^+ que les nanoparticules libèrent lentement par dissolution ; à une concentration en Ag^+ donnée, la toxicité serait la même que ces ions proviennent de nanoparticules (par ailleurs encore présentes dans le milieu) ou de la dissociation de nitrate d'argent par exemple (Piccapietra et al., 2012; Turner et al., 2012).

D'autres études indiquent au contraire que des mécanismes de toxicité spécifiques aux nanoparticules pourraient être à l'œuvre : fixation sur les parois des cellules, agrégation des cellules autour des nanoparticules, internalisation des nanoparticules qui pourrait ensuite se dissoudre à l'intérieur des cellules (Miao et al., 2010; Oukarroum et al., 2012; Stevenson et al., 2013). Mais cette internalisation n'est pas toujours observée (Piccapietra et al., 2012).

Enfin, des études laissent penser qu'un mécanisme « intermédiaire » pourrait être à

l'œuvre : leurs auteurs font le constat d'une toxicité plus importante, à $[Ag^+]$ fixée, en présence de nanoparticules ; ils suggèrent que la toxicité est attribuable à l'action des ions Ag^+ mais que les nanoparticules influent (par un mécanisme non précisé) sur leur action (Leclerc and Wilkinson, 2014; Navarro et al., 2008).

Précisons enfin que, plus encore que pour les espèces ioniques ou moléculaires de l'argent, la question de la spéciation des nanoparticules est complexe : cette catégorie regroupe des agrégats chimiques aux propriétés physiques variées (taille, forme, caractère amorphe ou cristallin, potentiel zêta, etc.), pouvant être revêtus ou non de divers composés (polymères, molécules organiques) et dont les molécules excrétées par les micro-algues peuvent modifier les propriétés (Arnaout, 2012; Perreault et al., 2012; Stevenson et al., 2013).

III. Caractéristiques générales et toxicité du cobalt

A. Propriétés physico-chimiques, production et usages du cobalt

1. Isotopes stables

Découvert en 1735 par Brandt, le cobalt est un métal de transition de numéro atomique $Z = 27$. C'est un métal blanc-bleu, malléable, ductile et ferromagnétique. Il existe sous la forme d'un seul isotope à l'état naturel, le ^{59}Co stable. Le cobalt est pratiquement inoxydable à température ordinaire, il s'oxyde pour des températures supérieures à 300°C (Barceloux, 1999; Bresson et al., 2009a). Ses principales propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 4.

Propriétés	Co	
Numéro atomique	27	
Isotope naturel	^{59}Co (100 %)	
Masse atomique (u)	58,933	
Configuration électronique	[Ar] $3d^7 4s^2$	
Electronégativité (Pauling)	1,8	
Point de fusion ($^\circ\text{C}$)	1495	
Point d'ébullition ($^\circ\text{C}$)	3100	
Densité (20°C , $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	8,9	
Degrés d'oxydation courants	+II	+III
Potentiel redox standard (25°C)	$E^0 (\text{Co}^{2+}/\text{Co}) = -0,28 \text{ V}$	$E^0 (\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}) = 1,81 \text{ V}$
Classement HSAB	Intermédiaire acide dur/mou	Acide dur

Tableau 4 : Principales propriétés physico-chimiques du cobalt (Bresson et al., 2009a)

Ses degrés d'oxydation les plus courants sont (+II) et (+III). En solution aqueuse, le degré (+II) est plus stable. Il est lié par six molécules d'eau lorsqu'il est sous forme de cation divalent « libre » : il forme le complexe $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, noté Co^{2+} . Il peut se trouver sous différentes formes solubles ($\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ou insolubles (hydroxydes, oxydes et sulfures). Les différences de solubilité de ces composés et leur spéciation sont importantes pour les aspects toxicologiques. Co^{3+} est facilement réduit en Co^{2+} en milieu aqueux non complexant, mais il est stabilisé en milieu basique et en présence de

ligands à champ fort¹. En milieu biologique, on trouve notamment Co(+III) dans la cobalamine (ou vitamine B₁₂), où il est complexé par un anneau corrine (cf. Annexe 4). Il peut toutefois être réduit au sein de la protéine en Co(+II) et Co(+I), formant alors respectivement de la vitamine B_{12r} et B_{12s} (Bresson et al., 2009a; Collins and Kinsela, 2010; Le Guen and Ansoborlo, 2004).

La production de cobalt était d'environ 77 kt en 2012 (hors recyclage), 57 % provenant des sous-produits de l'industrie minière du nickel, 37 % des sous-produits de l'exploitation des mines de cuivre et d'autres métaux, et 6 % de l'exploitation de mines de cobalt (CDI, 2013). Le cobalt a de nombreuses applications industrielles, il entre notamment dans la composition de superalliages, d'aciers spéciaux, de batteries, de catalyseurs, d'aimants, de pigments et de pneumatiques (Barceloux, 1999; CDI, 2013). L'industrie des superalliages a longtemps été la principale consommatrice de cobalt, mais elle est aujourd'hui supplantée par les applications chimiques, en particulier les batteries et les catalyseurs dont la demande ne cesse d'augmenter depuis 10 ans environ (CDI, 2013). La répartition de la demande mondiale entre ces secteurs en 2012 est présentée Figure 9.

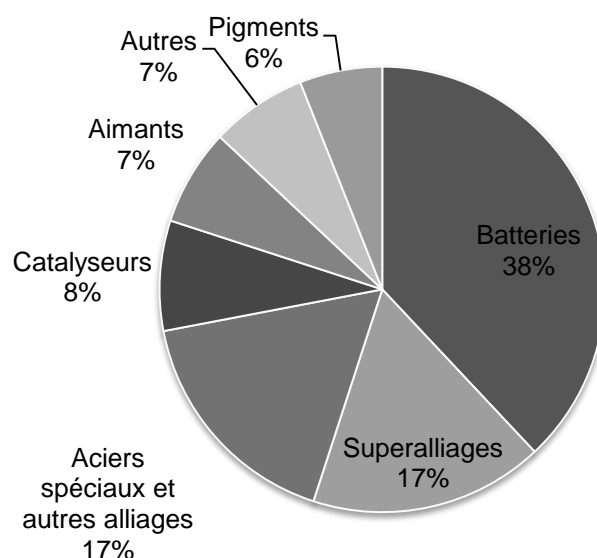


Figure 9 : Demande mondiale en cobalt par secteurs en 2012 (CDI, 2013)

¹ Un ligand à champ fort est un ligand pour lequel l'éclatement Δ_o du champ cristallin (différence d'énergie entre les orbitales moléculaires e_g et t_{2g}) est supérieur à l'énergie d'appariement des spins. C'est par exemple le cas des ligands NH_3 , CN^- et CO .

2. Isotopes radioactifs

28 isotopes radioactifs du cobalt ont été caractérisés (Audi et al., 1997). Les principaux sont le ^{57}Co , le ^{58}Co et le ^{60}Co , dont quelques propriétés nucléaires sont présentées dans le Tableau 5.

Isotope	Demi-vie	Activité massique (Bq.g^{-1})	Emission γ	Emission β
^{57}Co	272 j	$3,11.10^{14}$	122 keV	-
^{58}Co	71 j	$1,17.10^{15}$	810 keV	475 keV
^{60}Co	5,3 a	$4,18.10^{13}$	1,17 et 1,33 MeV	318 keV

Tableau 5 : Propriétés nucléaires des principaux isotopes radioactifs du cobalt (Bresson et al., 2009a)

Le ^{58}Co et ^{60}Co sont présents dans les effluents liquides des réacteurs nucléaires à eau pressurisés. Le ^{58}Co est un produit d'activation du ^{58}Ni qui entre dans la composition de superalliages tels que l'Inconel® des tubes générateurs de vapeurs, tandis que le ^{60}Co est un produit d'activation du ^{59}Co qui entre dans la composition de certains matériaux inoxydables comme par exemple les portées d'étanchéité de robinets utilisés sur le circuit primaire (EDF, 2014). En 2000, pour le parc électronucléaire français, ces deux isotopes représentaient respectivement 51, 63 et 46 % de l'activité gamma totale des effluents liquides des réacteurs à eau pressurisée de 900, 1300 et 1450 MWe (Figure 8, p.58) ; soit une activité totale de 13,8 GBq pour l'année pour le ^{58}Co et de 7,8 GBq pour le ^{60}Co (Florence and Hartmann). Ces quantités ont depuis fortement diminué : en 2007, l'activité gamma rejetée avec les effluents liquides du parc électronucléaire français était de 2,7 GBq pour le ^{58}Co et de 3,5 GBq pour le ^{60}Co (Bresson et al., 2009a).

Les isotopes radioactifs du cobalt sont utilisés dans les domaines médicaux et industriels. Le ^{60}Co est utilisé en médecine nucléaire comme agent de thérapie (gammagraphie), dans le domaine industriel pour la stérilisation de matériel ou de denrées alimentaires et en recherche. Il est utilisé sous forme de sources scellées dont l'activité peut être importante (10^{-3} à 10^3 TBq). Les sources non scellées de ^{57}Co et ^{58}Co ont une activité de l'ordre du kBq et sont utilisées comme sources d'étalonnage, comme traceurs et pour le diagnostic (Le Guen and Ansoborlo, 2004).

B. Effets du cobalt sur les micro-algues

1. Caractère essentiel et effets bénéfiques

Le cobalt est un composant essentiel de plusieurs enzymes et coenzymes, notamment des cobalamines et en particulier de la vitamine B₁₂ (Kobayashi and Shimizu, 1999; Martens et al., 2002). La vitamine B₁₂ est présente chez de nombreux êtres vivants, elle est indispensable au développement de certaines bactéries et des animaux. Chez l'homme, par exemple, l'apport journalier d'environ 1 µg de vitamine B₁₂ est nécessaire (Martens et al., 2002). Le caractère essentiel du cobalt et de la vitamine B₁₂ chez les plantes et les algues est en revanche discuté, leurs éventuels rôles physiologiques étant peu connus (Palit et al., 1994). Il pourrait dépendre des espèces considérées.

De nombreux genres de bactéries synthétisent la vitamine B₁₂ (Martens et al., 2002). La biosynthèse de cette vitamine ou de ses analogues à partir de Co²⁺ présent dans le milieu de culture a également été observée chez la cyanobactérie *Synechococcus vulcanus* (Ambe, 1990). La présence de cobalt comme nutriment dans le milieu de culture est par ailleurs indispensable à la croissance des quatre espèces de cyanobactéries étudiées par Holm-Hansen *et al.* (1954).

Les données de la littérature ayant trait au caractère essentiel du Co²⁺ et de la vitamine B₁₂ chez les micro-algues et à leur capacité à synthétiser cette vitamine sont très variées. Chen *et al.* (2011) rapportent que la présence de Co²⁺ dans le milieu de culture est indispensable à la croissance optimale de la micro-algue verte *Dunaliella tertiolecta*, les cultures non exposées au cobalt présentant un taux de croissance sur 7 jours 50 % plus faible. Si la présence de cobalt ne semble pas indispensable à la croissance de la micro-algue verte *Monoraphidium minutum* et de la diatomée *Nitzschia perminuta*, El-Sheek *et al.* (2003) ont toutefois observé un effet positif sur la croissance de ces espèces lors de l'ajout de faibles concentrations de Co²⁺ (de l'ordre de 10⁻⁵ M) au milieu de culture (croissance sur 7 à 10 jours supérieure de 5 à 10 % par rapport aux témoins non exposés au cobalt). Croft *et al.* (2006) ont réalisé une revue de la littérature sur les besoins des algues en vitamines pour leur croissance : 155 des 306 espèces étudiées nécessitent un apport externe en vitamine B₁₂ pour leur croissance, et en particulier 44 des 148 espèces de Chlorophytes (embranchement qui contient de nombreuses algues vertes). Ces algues ne semblent donc pas capables de synthétiser la vitamine B₁₂ à partir de cobalt ; en milieu naturel elles consommeraient les vitamines B₁₂ produites par des

bactéries (Croft et al., 2006). Scott et Ericson (1955) font la même hypothèse à propos de la macro-algue rouge *Rhodomenia palmata* : l'algue contient de la vitamine B₁₂ mais elle ne la synthétise pas à partir du cobalt qu'elle accumule depuis son milieu de culture, une consommation de vitamine B₁₂ synthétisée par des bactéries est donc probable. Les données disponibles concernant la micro-algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, généralement cultivée dans des milieux contenant des traces de Co²⁺, sont partiellement contradictoires : Croft *et al.* (2006) indiquent qu'elle n'a pas besoin d'un apport exogène de vitamine B₁₂ pour se développer ; les résultats de Watanabe *et al.* (1991) suggèrent qu'elle peut utiliser de la vitamine B₁₂ exogène ou la synthétiser ; tandis que Kropat *et al.* (2011) suggèrent qu'elle n'est pas capable de synthétiser la vitamine B₁₂ car la présence de cobalt dans son milieu de culture n'améliore pas son développement.

Le cobalt pourrait être un élément essentiel pour les micro-algues de par son implication dans d'autres métalloprotéines que la vitamine B₁₂ et ses dérivés. L'aldéhyde décarbonylase est par exemple une enzyme à cobalt ubiquitaire chez les êtres vivants qui joue un rôle clé dans la biosynthèse des composés hydrocarbonés. Elle a par exemple été identifiée et caractérisée chez la micro-algue verte *Botryococcus braunii* (Kobayashi and Shimizu, 1999).

Chez les plantes supérieures, les enzymes dépendant de la vitamine B₁₂ ont été perdues et remplacées par d'autres enzymes indépendantes vis-à-vis de cette vitamine (Blaby-Haas and Merchant, 2012). De nombreux effets bénéfiques ont été observés lors de l'exposition des plantes supérieures à de faibles concentrations de cobalt, sans que le rôle joué par celui-ci soit clairement précisé : croissance stimulée, senescence retardée, meilleure résistance à la sécheresse et aux attaques microbiennes, régulation de la synthèse des alcaloïdes et de l'éthylène, synthèse de chlorophylle stimulée, etc. (Kabata-Pendias, 2011; Palit et al., 1994).

Les plantes peuvent également bénéficier de l'apport de cobalt lorsqu'elles sont en carence de nitrates (Palit et al., 1994). Ce phénomène a été observé avec des plantes légumineuses (Ahmed and Evans, 1959) et non-légumineuses (Hewitt and Bond, 1966). Il semble être le fait d'une symbiose entre la plante et les bactéries de sa rhizosphère (Hewitt and Bond, 1966; Palit et al., 1994). Des observations similaires ont été faites sur la fougère aquatique *Azolla filiculoides*, qui vit en symbiose avec la cyanobactérie *Anabaena azollae* (Johnson et al., 1966).

2. *Accumulation du cobalt par les algues : un processus en deux temps*

Garnham *et al.* (1991, 1992) ont montré que l'accumulation du cobalt par la micro-algue *Chlorella salina* se décompose en deux phases. La première phase est rapide (de l'ordre de la dizaine de minutes) et indépendante du métabolisme de la cellule ou de l'illumination des cultures : elle correspond à la sorption du cobalt à la surface des cellules. La deuxième phase est plus lente (elle s'étend sur plusieurs heures) et dépend du métabolisme de la cellule (elle est bloquée à l'obscurité ou en présence d'inhibiteurs de la respiration et de la photosynthèse) : elle correspond à l'internalisation active du cobalt dans les cellules.

a. Première phase : accumulation rapide par sorption

La phase de sorption rapide du cobalt a également été mise en évidence chez la macro-algue verte *Chara corallina* et les macro-algues brunes *Ascophyllum nodosum* et *Cystoseira barbata* (Kuyucak and Volesky, 1989; Liu *et al.*, 1998; Palit *et al.*, 1994). L'analyse de la distribution du cobalt dans les algues par fractionnement cellulaire montre qu'on retrouve dans la paroi cellulaire 38 % du cobalt accumulé par la micro-algue *Chlorella salina* et environ 90 % du cobalt accumulé par la macro-algue verte *Chara corallina* (Garnham *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998).

L'efficacité de la sorption du cobalt est sujette à la compétition avec d'autres cations : elle diminue par exemple en présence de Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Rb^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Sr^{2+} pour *Chlorella salina*, en présence de Cd^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} pour *Chara corallina*, et à pH acide (compétition avec H^+) pour les deux algues précédentes et *Chlamydomonas reinhardtii* (Garnham *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998; Macfie *et al.*, 1994). La sorption du cobalt se fait donc par un mécanisme d'échange d'ions (Palit *et al.*, 1994). Liu *et al.* (1998) indiquent que le cobalt est accumulé sous forme d'ion libre Co^{2+} plutôt que sous ses formes complexées par l'ion hydroxyde $\text{Co}(\text{OH})^+$ et $\text{Co}(\text{OH})_2$, du fait de leur charge moins importante ou nulle. Nieboer et Richardson (1980) ont établi une classification des métaux qui indique notamment leur affinité pour les ligands contenant du soufre ou de l'oxygène : le cobalt se trouve dans la classe intermédiaire des métaux ayant une affinité pour les deux types de ligands. Les observations suggèrent que la sorption du cobalt sur le mucilage et la paroi des algues implique à la fois les groupements thiols (-SH) des transporteurs de la membrane et les groupements carboxyles (-COOH) des molécules de la paroi et du mucilage (Liu *et al.*, 1998; Palit *et al.*, 1994), ce qui est en accord avec cette classification.

b. Deuxième phase : internalisation plus lente

La deuxième phase de l'accumulation, l'internalisation du cobalt, est une phase d'accumulation active ; elle dépend du métabolisme des algues chez *Chlorella salina* (Garnham et al., 1991, 1992). On retrouve ce phénomène d'accumulation active chez la macro-algue rouge *Rhodymenia palmata* : Scott et Ericson (1955) ont exposé cette algue à une solution contenant du cobalt durant huit jours, en la soumettant à des cycles de lumière/obscurité de 8/16 h. Le suivi de la concentration de cobalt dans le milieu de culture montre que le cobalt est globalement accumulé au cours des huit jours et que sa concentration varie en phase avec les conditions d'éclairage : il est accumulé lorsque les algues sont éclairées et partiellement relargué lors des phases d'obscurité. Cette observation corrobore l'hypothèse d'un phénomène actif d'accumulation.

Des phénomènes passifs peuvent toutefois également être à l'œuvre durant cette deuxième phase d'accumulation : Kuyucak et Volesky (1989) ont étudié l'accumulation de cobalt par de la biomasse morte de la macro-algue brune *Ascophyllum nodosum* ; ils obtiennent un profil d'accumulation similaire à celui précédemment décrit (deux phases, la première rapide et la seconde plus lente) alors qu'aucun mécanisme d'accumulation actif ne peut avoir lieu.

3. **Transporteurs du cobalt et spéciation dans les micro-algues**

Les protéines de transport membranaire jouent un rôle important dans l'homéostasie des métaux (Clemens, 2001). La recherche de séquences similaires aux séquences des transporteurs métalliques connus chez l'homme, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez la plante *Arabidopsis thaliana* dans le génome de *Chlamydomonas reinhardtii* a permis d'identifier 41 protéines chez la micro-algue dont la fonction putative est le transport de métaux (Hanikenne et al., 2005). Parmi ces protéines, 11 appartiennent à trois familles de transporteurs connus pour transporter l'ion Co^{2+} ou supposés pouvoir le faire (Hanikenne et al., 2005) :

- Les *Cation Diffusion Facilitator* (CDF, 5 protéines putatives), qui favorisent l'efflux des cations métalliques divalents du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou vers des compartiments subcellulaires

- Les *Heavy Metal P-type ATPases* (HMA, 3 protéines putatives), qui jouent un rôle dans le transport des métaux monovalents ou divalents (en fonction de la nature du transporteur)
- Les *Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins* (NRAMP, 3 protéines putatives), qui appartiennent au groupe des transporteurs du fer et qui transportent les cations divalents et le fer en particulier

L'évaluation *in vivo* de la fonction de ces protéines chez les micro-algues et de leur rôle dans le transport du cobalt n'a toutefois pas encore été réalisée.

Par analogie avec le nickel, on suppose que les histidines jouent un rôle important dans la spéciation et le transport du cobalt chez les plantes (Le Guen and Ansoborlo, 2004). Cette hypothèse est corroborée par des expérimentations menées par Morgan et Parker (1952) qui ont mesuré l'effet individuel de 29 acides aminées et de composés proches sur la toxicité du cobalt lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de culture de fibroblastes² : l'histidine et ses dérivés offrent la meilleure protection contre la toxicité, tandis que la cystéine offre une protection moindre. D'autre part, l'analyse des séquences peptidiques des protéines mitochondriales d'*Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* qui lient fortement le cobalt indique qu'elles sont particulièrement riches en histidine, ainsi qu'en cystéine et en méthionine (Tan et al., 2010).

La spéciation du cobalt accumulé par les micro-algues semble donc déterminée par l'affinité de l'ion Co^{2+} avec les fonctions imidazoles (histidine), tétrapyrroles (corrinoïdes dont la vitamine B₁₂, porphyrines), les thiols (cystéine) et les fonctions carboxyles (méthionine)³ (Le Guen and Ansoborlo, 2004; Morgan and Parker, 1952; Palit et al., 1994; Szpunar et al., 2003). La structure de ces molécules est représentée en Annexe 4.

4. Effets toxiques du cobalt

a. Impact physiologique

Le cobalt, à forte concentration, engendre des effets toxiques chez tous les organismes vivants (Barceloux, 1999; Bresson et al., 2009a; Palit et al., 1994).

² Les fibroblastes sont des cellules animales, elles sont présentes dans le tissu conjonctif des organismes.

³ Les ligands notés entre parenthèses sont donnés à titre d'exemple, ils ne constituent pas une liste exhaustive des ligands avec lesquels le cobalt interagit. Comme on l'a vu précédemment, le cobalt entre par exemple dans la composition d'autres métalloprotéines que la vitamine B₁₂.

Chez les plantes supérieures, l'exposition à des doses toxiques de cobalt entraîne la chlorose et la nécrose des feuilles, diminue la biomasse et modifie la morphologie des plantes (Ahmed and Twyman, 1953; Gopal et al., 2003; Hewitt and Bond, 1966; Kabata-Pendias, 2011; Liu et al., 2000; Palit et al., 1994; Yadav, 2010). Aux fortes concentrations, le cobalt inhibe la synthèse des chlorophylles a et b, le rendement du photosystème et la respiration mitochondriale (Gopal et al., 2003; Palit et al., 1994; Tan et al., 2010). Il déstabilise également l'homéostasie d'autres nutriments (P, S, Fe, Mn, Zn, Cu), notamment en perturbant leur assimilation et leur translocation des racines vers les feuilles (Gopal et al., 2003; Palit et al., 1994; Yadav, 2010).

L'observation de la toxicité du cobalt chez les micro-algues montre des effets similaires : ralentissement voire arrêt de la division cellulaire, perturbation du photosystème, diminution de la quantité de pigments (chlorophylle a, chlorophylle b et carotènes). Une revue de ces effets chez les micro-algues vertes et d'autres organismes « apparentés » (diatomées, cyanobactéries et macro-algues) et les références associées sont présentées dans le Tableau 6. Nous n'avons pas pu, faute d'informations dans certaines publications, exprimer toutes les concentrations en cobalt dans la même unité ; elles sont donc exprimées dans l'unité de leur publication d'origine⁴. La spéciation du cobalt, notamment le pourcentage de Co^{2+} libre en solution qui dépend du milieu de culture utilisé, n'est pas non plus systématiquement précisé.

Globalement, et aux approximations de conversion près, les effets de la toxicité du cobalt sont rapportés pour des concentrations variant de 10 μM à 1 mM de cobalt environ. Nous avons vu que la CE_{50} de l'ion Ag^+ relative à la croissance et au fonctionnement du photosystème des algues rapportée par la littérature est de l'ordre de 10 - 100 nM (Tableau 3, p. 62). La toxicité du cobalt pour les micro-algues est donc plus faible que celle de l'argent.

⁴ Il n'est pas possible, pour certaines publications dont les résultats sont exprimés en concentrations massiques ou en ppm, de déterminer si la masse considérée est celle de cobalt ou du sel de cobalt utilisé pour l'expérience. Les masses molaires respectives de Co, de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (les deux sels de cobalt couramment utilisés) sont de 58,9, 237,9 et 290,9 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$; soit un facteur 4 environ entre la masse molaire du cobalt et celle du chlorure de cobalt hexahydrate, et un facteur 5 entre celles du cobalt et du nitrate de cobalt hexahydrate. Ces facteurs correspondent à l'erreur que nous aurions consacrée en interprétant mal les unités choisies par les auteurs lors d'une conversion, aussi nous préférons présenter les résultats avec leur unité d'origine. Pour mémoire, on convertit les ppm en concentration molaire grâce à l'égalité suivante :

$$C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{ppm}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) \times 10^{-3}(\text{g} \cdot \text{mg}^{-1})}{M(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})}$$

Espèce	Concentration cobalt	Observations	Réf.
Micro-algues vertes			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10 – 20 ppm ⁽¹⁾	Croissance inhibée	a
	30 ppm ⁽¹⁾	Arrêt division cellulaire	a
<i>Chlorella vulgaris</i>	51,7 µM Co ²⁺	-30 % croissance à 5 j (pH = 5,0)	b
	19,0 µM Co ²⁺	-30 % croissance à 5 j (pH = 6,8)	b
	9,0 ± 6,6 µM Co ²⁺	CE ₅₀ croissance à 4 j	c
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,1 mM Co	30 min : Fv/Fm 0,8 → 0,45
<i>Monoraphidium minutum</i>	1 mM Co	30 min : Fv/Fm 0,8 → 0,25	d
	10 mM Co	6 h : -40 % oxygène photo-induit	d
	30 min : Fv/Fm 0,8 → 0,15	2 h : -75 % oxygène photo-induit	d
	6 h : -95 % oxygène photo-induit	6 h : -95 % oxygène photo-induit	d
<i>Monoraphidium minutum</i>	1 ppm Co ²⁺	-5 % croissance à 10 j	e
	2 ppm Co ²⁺	Diminution quantité pigments	e
	3 ppm Co ²⁺	-17 % croissance à 10 j	e
Diatomées			
<i>Nitzschia closterium</i>	10,2 ± 0,02 ppm Co	CE ₅₀ croissance à 4 j	f
<i>Nitzschia perminuta</i>	2,5 ppm Co ²⁺	-14 % croissance à 7 j	e
	3,5 ppm Co ²⁺	Diminution quantité pigments	e
	5 ppm Co ²⁺	-18 % croissance à 7 j	e
		Diminution quantité pigments	e
Cyanobactéries			
<i>Spirulina platensis</i>	23,8 ± 6,4 mg.L ⁻¹ ⁽²⁾	CE ₅₀ 4 j	g
	14,4 ± 2,1 mg.L ⁻¹ ⁽²⁾	CE ₅₀ 5 j	g
	10,9 ± 1,5 mg.L ⁻¹ ⁽²⁾	CE ₅₀ 6 j	g
	8,13 ± 0,93 mg.L ⁻¹ ⁽²⁾	CE ₅₀ 7 j	g
<i>Anacystis nidulans</i>	0,32 mg.L ⁻¹ ⁽³⁾	Effet fortement inhibiteur	h
	1 µM	Synthèse ARN et protéines inhibée	i
	10 µM	Pas d'effet sur la croissance	i
	100 µM	Croissance inhibée	i
Macro-algue rouge			
<i>Gracilaria domingensis</i>	1,60 ± 0,06 mM Co ²⁺	CE ₅₀ croissance, 48 h	j
⁽¹⁾ Les auteurs ne précisent pas si ce sont des ppm de Co ou du sel de cobalt utilisé (rapporté comme étant du Co(NO ₃) ₂ .H ₂ O, mais il est probable que ce soit une coquille et que le sel utilisé soit du Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O) ⁽²⁾ Les auteurs ne précisent pas s'il s'agit de mg.L ⁻¹ de CoCl ₂ .6H ₂ O ou de cobalt ⁽³⁾ Les auteurs ne précisent pas s'il s'agit de mg.L ⁻¹ de cobalt ou du sel de cobalt utilisé (dont la nature n'est pas indiquée)			
CE ₅₀ : Concentration efficace médiane			
Références : a : (Lustigman et al., 1995) ; b : (Macfie et al., 1994) ; c : (Rachlin and Grosso, 1993) ; d : (Plekhanov and Chemeris, 2003) ; e : (El-Sheekh et al., 2003) ; f : (Rosko and Rachlin, 1975) ; g : (Sharma et al., 1987) ; h : (Whitton and Shehata, 1982) ; i : (Rai et al., 1981) ; j : (Mendes et al., 2013)			

Tableau 6 : Effets physiologiques du cobalt chez les micro-algues vertes et d'autres organismes aquatiques

b. Mécanismes de toxicité et réponse biologique

La diminution de la quantité de chlorophylles observée chez les micro-algues, les diatomées et les plantes supérieures exposées à des concentrations toxiques de cobalt pourrait être due au remplacement de l'ion Mn^{2+} par un ion Co^{2+} dans la protoporphyrine, précurseur des chlorophylles, qui inhiberait la synthèse de ces pigments (El-Sheekh et al., 2003).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'endommagement du PSII par le cobalt. Tripathy et Mohanty (1981) ont montré que la stabilisation par du glutaraldéhyde des membranes de chloroplastes isolés à partir de feuilles d'orge protège le fonctionnement de leur PSII des dommages causés par le Co^{2+} . Ils en déduisent que la perte de fonctionnalité des chloroplastes en présence de Co^{2+} pourrait être liée à une dégradation de la structure et de l'intégrité de leur membrane, et peut-être à l'endommagement du centre réactionnel du PSII. Des observations menées sur la micro-algue *Monoraphidium minutum*, sur la diatomée *Nitzschia perminuta* et sur les feuilles du pois *Pisum sativum L.* indiquent que la perturbation du PSII par l'ion Co^{2+} a lieu au niveau de la quinone B (Q_B , accepteur secondaire d'électrons du PSII), dont la fonction est dégradée en présence de cobalt (El-Sheekh et al., 2003; Mohanty et al., 1989). Cette dégradation peut avoir trois origines : le flux d'électrons entre la quinone A (Q_A , accepteur primaire d'électrons du PSII) et Q_B peut être interrompu, Q_B peut être modifiée, ou les composants de la chaîne de transfert d'électrons situés en aval de Q_B peuvent être altérés (cf. Annexe 5). Les mesures effectuées sur le système photosynthétique du pois suggèrent la deuxième option : Q_B serait directement modifiée par les ions Co^{2+} , ce qui endommage l'activité du PSII (Mohanty et al., 1989). Quelle qu'en soit l'origine, l'endommagement du PSII, et donc de l'activité photosynthétique de l'algue, est l'une des causes limitant la croissance des cultures exposées au cobalt (Plekhanov and Chemeris, 2003).

L'exposition des micro-algues au cobalt peut également générer un stress oxydant. Li *et al.* (2007) ont mesuré la réponse biologique de la micro-algue marine *Pavlova viridis* lors de son exposition à des concentrations de cobalt variant de 10 à 200 μM . Dès 10 μM , la quantité de lipides peroxydés augmente significativement, ce qui indique l'apparition d'un stress oxydant. La quantité de glutathion, l'activité de la catalase et celle de la glutathion peroxydase sont quant à elles positivement corrélées à la concentration de Co^{2+} dans le milieu de culture, ce qui suggère la mise en place d'une réponse antioxydante pour contrer les dommages du stress oxydant engendré par le cobalt.

Des effets génotoxiques du cobalt ont été observés chez les mammifères et les levures (cassure de l'ADN simple ou double brin, mutations, inhibition de la réparation de l'ADN) (Bresson et al., 2009a; Palit et al., 1994). Chez les plantes supérieures et les algues, des modifications de la structure des chromosomes ont été observées en présence de cobalt, ainsi qu'une diminution de la quantité d'ARN et d'ADN dans les cellules (Gopal et al., 2003; Palit et al., 1994). Deux mécanismes moléculaires semblent impliqués dans les effets génotoxiques du cobalt : la toxicité serait causée d'une part par la production de ROS, qui entraînerait l'accumulation de lésions oxydatives dans le génome ; et d'autre part par l'inhibition de la réparation de l'ADN, qui est vraisemblablement due au remplacement du zinc par du cobalt dans des métalloprotéines jouant un rôle clé dans la réparation de l'ADN (Bresson et al., 2009b).

Matériels et méthodes

I. Méthodes générales

A. Culture cellulaire

Les algues *C. actinabiotis* utilisées dans nos expérimentations sont produites via deux modes de culture : dans le premier cas, le milieu de culture est renouvelé de façon ponctuelle, on parle de *cultures en lots*, (ou *batch*) ; dans le second cas le milieu de culture est renouvelé de façon continue, on parle de *cultures en continu*.

1. Cultures en lots dans des erlenmeyers

Pour les cultures en batch, les solutions d'algues sont placées dans des erlenmeyers ou des ballons stériles de 200 mL à 2 L. Ces récipients sont placés dans des incubateurs INFORS qui contrôlent l'agitation des solutions (100-120 tours par minute), la température de l'air (21 ± 1 °C) et l'intensité lumineuse délivrée (80 ± 10 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

L'algue *C. actinabiotis* est cultivée dans un milieu de culture BBM (Bold modified basal freshwater nutrient solution) fourni par Sigma-Aldrich. Ce milieu nutritif, développé pour la culture des algues vertes, ne contient pas de vitamines ni de carbone organique, ce qui permet notamment de limiter les contaminations bactériennes. Sa composition est donnée en Annexe 6. Pour les cultures en batch, le milieu BBM est dilué deux fois avec de l'eau ultra pure stérile.

Dans ces conditions, les algues se multiplient pendant environ une semaine avant d'arriver à une phase plateau notamment due au manque de nutriments. Elles doivent donc être régulièrement « repiquées », c'est-à-dire remises en culture dans un milieu nutritif neuf. Pour ce faire, on centrifuge les algues durant 5 minutes à 2000 g : les algues forment alors un culot pâteux au fond du récipient, surmonté du milieu liquide. Le culot d'algues est remis en solution, dans un volume choisi de façon à obtenir une densité cellulaire initiale d'environ 5 à 10 millions de cellule par mL.

Afin d'éviter les contaminations microbiennes, l'ensemble de la verrerie, des solutions et des consommables utilisés est stérilisé par la vapeur en autoclave ou avec un mélange éthanol-eau s'ils ne peuvent pas passer à l'autoclave. On utilise du papier aluminium pour fermer les récipients de culture tout en permettant les échanges gazeux avec l'atmosphère. Toute manipulation exigeant l'ouverture des récipients est réalisée sous hotte à flux laminaire et dans la zone de stérilité d'une flamme.

2. Cultures en continu : utilisation de photobioréacteurs

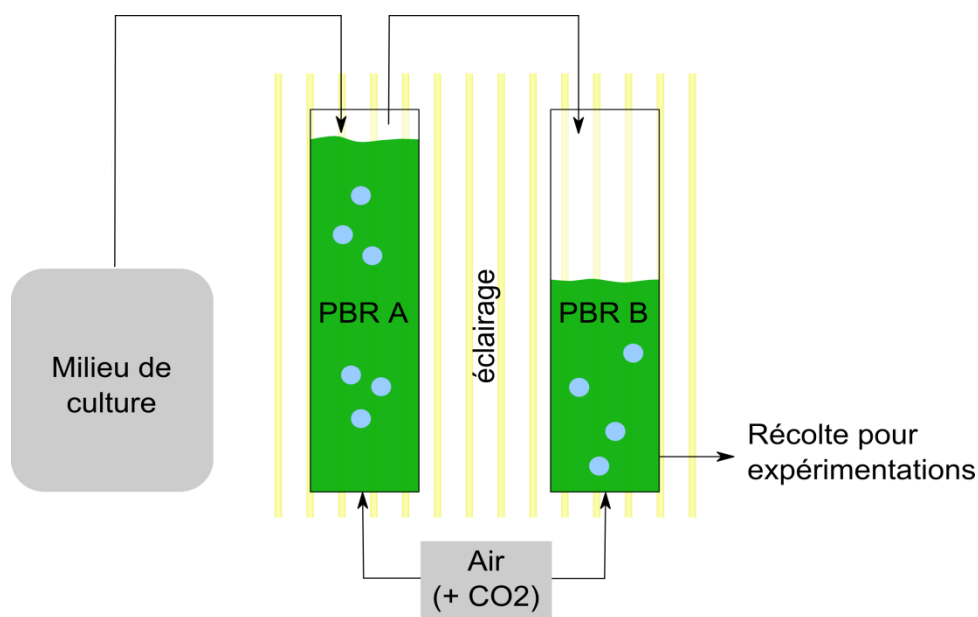


Figure 10 : Utilisation de photobioréacteurs pour la culture d'algues alimentées de façon continue

Les cultures d'algues dont le milieu de culture est renouvelé de façon continue sont réalisées dans des photobioréacteurs (PBR). Pour produire les algues, nous avons utilisé des montages constitués de deux photobioréacteurs en série (Figure 10).

Le premier photobioréacteur (PBR A) est alimenté de façon continue en milieu de culture. Lorsqu'il est plein, le liquide excédentaire est évacué vers le second photobioréacteur (PBR B). Les deux photobioréacteurs sont éclairés par des tubes fluorescents. Les cultures sont homogénéisées et les algues sont mises en suspension par bullage d'air. Le bullage d'air permet également les échanges gazeux nécessaires à la croissance des algues. Du dioxyde de carbone est parfois additionné au gaz bullé (voir ci-dessous) afin de réguler le pH des cultures.

Les cultures en continu se décomposent en deux phases :

- Une phase de stabilisation, durant laquelle les propriétés de la culture évoluent avec le temps (en particulier la densité cellulaire des cultures augmente). La durée de cette phase est de l'ordre de la dizaine de jours.
- Suite à cette période initiale, la culture est stabilisée : le PBR permet de produire de façon continue des algues dont les paramètres physiologiques sont stables dans le temps.

L'utilisation de deux PBR en série a pour but de ne pas perturber la culture une fois qu'elle est stabilisée. Le PBR A est utilisé pour maintenir la culture stabilisée, la biomasse d'algues nécessaire aux expérimentations n'y est pas prélevée afin de ne pas le déséquilibrer. De cette façon les algues ont des paramètres physiologiques constants lorsqu'elles arrivent dans le PBR B. C'est dans ce second PBR qu'est récoltée la biomasse d'algue nécessaire aux expérimentations. On prend soin de vider le PBR B quelques heures avant la récolte afin que les algues utilisées pour les expérimentations soient fraîchement produites.

Nous avons utilisé deux montages de ce type pour produire la biomasse d'algues nécessaire à nos expérimentations :

- Le premier constitué de deux PBR de 2 L chacun, alimenté pour le premier en BBM dilué deux fois avec un débit d'environ 700 mL par jour, éclairés par des tubes fluorescents délivrant une intensité lumineuse de $100 \pm 10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La température des cultures est de $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (température de la pièce où sont placés les PBR, régulée par une climatisation). L'air bullé dans ces PBR n'est pas additionné de CO_2 .
- Le second montage est constitué d'un PBR de 10 L (PBR A) en série avec un PBR de 5 L (PBR B), le PBR A alimenté en BBM non dilué (des mesures ayant montré que l'utilisation de BBM dilué deux fois entraînait une carence en nitrate (de Gouvion Saint Cyr, (2014)) avec un débit de 3,4 L par jour. Des sondes permettent de contrôler la température et le pH de la culture dans le PBR A, le pH est régulé et maintenu à une valeur de 6,1 par ajout contrôlé de CO_2 dans l'air de bullage. Les PBR sont éclairés par des tubes fluorescents délivrant une intensité lumineuse de $200 \pm 10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La température de la culture dans le PBR A, mesurée par une sonde, est de $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (la température de la pièce où sont placés les PBR est régulée par une climatisation et un ventilateur est placé au niveau des PBR pour évacuer la chaleur délivrée par les tubes fluorescents).

Dans la suite du manuscrit, nous désignons ces deux montages par le volume de leur premier PBR, soit « PBR 2L » et « PBR 10 L » respectivement.

La culture en PBR de *C. actinabiotis* a été développée en partenariat avec Diane de Gouvion Saint Cyr. Dans le cadre de sa thèse de doctorat, Diane a notamment conçu, mis en œuvre et optimisé les conditions de production d'algues du PBR 10 L (de Gouvion Saint Cyr,

2014). La production des algues du PBR 10 L utilisées dans nos expérimentations a principalement été supervisée par Diane.

3. Avantages et inconvénients de ces modes de culture

Ces deux modes de culture (en lots et en continu) présentent chacun des avantages et des inconvénients propres.

La culture en lots nécessite peu de matériel et permet de limiter efficacement les contaminations bactériennes. C'est ce mode de culture qui a d'abord été mis en œuvre pour cultiver *C. actinabiotis* au laboratoire. L'obtention d'une quantité importante de biomasse par ce mode de culture est néanmoins délicate car elle requiert l'utilisation d'un nombre important de contenants. En plus d'alourdir significativement les opérations de suivi des cultures (suivi de la croissance, renouvellement du milieu de culture), la multiplication des contenants entraîne une désynchronisation des cycles de croissance des cultures dont la gestion est délicate étant donné que nos expérimentations doivent être menées sur des algues en phase de croissance.

La culture en continu en photobioréacteurs pallie ces limitations : elle permet d'obtenir des quantités d'algues importantes et dans un état physiologique contrôlé et reproductible. Sa mise en œuvre initiale est néanmoins plus complexe que celle de la culture en lots car elle suppose l'utilisation de matériel spécifique et l'ajustement des paramètres de culture (par exemple du débit de renouvellement du milieu de culture). Le contrôle de la contamination bactérienne est également plus difficile avec ce mode de culture du fait des échanges permanents de liquide et du volume important des PBR qui ne permet pas de travailler sous hotte à flux laminaire ou en environnement stérile.

B. Mesure de la croissance des algues

Le suivi de la croissance des algues s'effectue par comptage sur cellule de Malassez (Figure 11). Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage est gravé dans un « canal » de profondeur 200 μm . On dépose 15-20 μL de la culture dont on souhaite évaluer la densité cellulaire dans ce canal, on recouvre d'une lamelle de verre et on laisse les algues sédimenter durant 5 minutes environ. La densité cellulaire de la solution est déterminée en comptant le nombre de cellules contenues dans des rectangles de dimensions 200 μm x 250 μm (le rectangle constitué de 20 carreaux visible sur la vignette de droite de la Figure 11),

qui correspondent à un volume de solution de 0,01 μL . Le résultat obtenu est multiplié par 10^5 pour obtenir un nombre de cellules par mL de solution. Les cultures peuvent être diluées avant le comptage pour faciliter le dénombrement lorsque leur densité cellulaire est élevée. Les observations sont réalisées avec un microscope Nikon Optiphot.

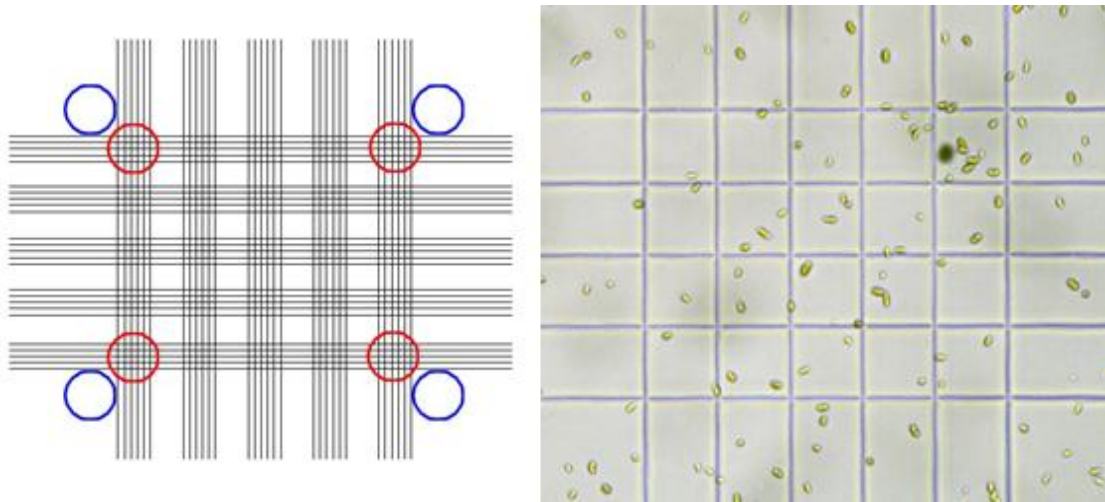


Figure 11 : Comptage des algues sur cellule de Malassez. Schéma d'une cellule de Malassez (gauche) et détail d'une zone cerclée de rouge vue au microscope (droite)

Le comptage est réalisé sur quatre zones distinctes (zones cerclées en rouge ou en bleu sur la Figure 11) puis la moyenne et l'écart-type de ces comptages sont calculés. Nous avons utilisé deux méthodes de comptage :

- Le comptage « manuel » : l'opérateur compte au microscope les cellules dans les zones cerclées de rouge
- Le comptage manuel est fastidieux lorsqu'on veut déterminer la densité cellulaire d'un nombre important d'échantillons. Nous avons développé, optimisé et validé une méthode de comptage automatisée afin de mettre en place une méthode de comptage rapide, simple et fiable. Une caméra AxioCam ERc 5s (Zeiss) montée sur le microscope avec un adaptateur C-mount et reliée à un ordinateur permet de photographier les zones cerclées de bleu sur la Figure 9 (les photos sont prises en dehors du quadrillage de la cellule de Malassez pour faciliter le dénombrement des cellules). Ces photographies sont ensuite analysées avec une macro que j'ai écrite pour le logiciel ImageJ et qui permet de déterminer la densité cellulaire des cultures (Annexe 7).

C. Mesure du rendement photochimique du photosystème II (rapport Fv/Fm)

La capacité photosynthétique des échantillons est évaluée par la mesure du rendement quantique maximum de la photochimie du photosystème II (PSII), le rapport Fv/Fm. Ce rapport correspond à l'efficacité quantique du photosystème II – c'est-à-dire la probabilité qu'une molécule de chlorophylle du photosystème II excitée par un photon se désactive via la photochimie (plutôt que par émission de fluorescence ou par dissipation de chaleur) – lorsque tous ses centres sont ouverts, c'est-à-dire prêts à accepter une excitation et à transférer un électron (Baker, 2008; Maxwell and Johnson, 2000; Suresh Kumar et al., 2014). La mesure du Fv/Fm est non invasive, elle est réalisée *in vivo* et ne perturbe pas le développement des échantillons.

Le rapport Fv/Fm des échantillons est mesuré avec un fluorimètre PAM-101 (Walz). La mesure est réalisée à travers un contenant transparent en verre ou en plastique (tubes coniques, erlenmeyers, ballons, etc), sur un échantillon prélevé de la culture à analyser (prélèvement de 5 mL placé dans un tube conique de 15 mL) ou sur la culture dans son ensemble (dans le cas des cultures en erlenmeyers par exemple).

La séquence de mesure du Fv/Fm se déroule en deux étapes. La fluorescence de l'échantillon est d'abord mesurée tandis qu'il est soumis à une lumière de très faible intensité, qui induit une fermeture négligeable des centres photochimiques (un centre photochimique fermé est un centre excité qui ne peut plus capter un photon supplémentaire). On obtient ainsi la valeur de fluorescence F_0 : c'est la fluorescence minimale de l'échantillon, à l'obscurité. L'échantillon est ensuite soumis à un flash lumineux de forte intensité durant environ une seconde : ce flash saturant entraîne la fermeture de tous les centres du photosystème et le blocage de la photochimie. La fluorescence est alors à nouveau mesurée : on obtient la valeur F_m , la fluorescence maximale de l'échantillon. Le rapport Fv/Fm est alors calculé, avec $F_v = F_m - F_0$.

Cette séquence est totalement automatisée, le fluorimètre indique directement la valeur du rapport Fv/Fm.

D. Exposition des algues aux métaux et récolte

L'impact de l'argent et du cobalt sur les algues est étudié par la mise en œuvre d'expositions contrôlées. L'exposition et la récolte des algues sont réalisées selon les

protocoles décrits ci-dessous.

1. Choix des contenants

L'argent ionique Ag^+ s'adsorbe facilement sur les parois des contenants, notamment le verre borosilicaté et sur certains polymères tels que le polypropylène, le polyéthylène ou le polystyrène (Struempfer, 1973; West et al., 1966). Il convient de limiter l'adsorption de l'argent sur les contenants pour étudier et quantifier son effet sur les algues. Une étude préalable, réalisée au CEA et à l'ILL, a montré que l'adsorption de l'argent sur les contenants en PETG (polyéthylène téréphtalate glycolisé) et en PET (polyéthylène téréphtalate) est négligeable. Nous avons donc utilisé des erlenmeyers en PETG (Nalgene) pour exposer les algues à des solutions d'argent et des tubes coniques en PET de 50 mL (FisherBrand) pour préparer les solutions d'argent.

Le cobalt sous forme Co^{2+} ne présente en revanche pas de problèmes d'adsorption particuliers. Nous avons travaillé avec les contenants classiques du laboratoire, en verre borosilicaté et en polypropylène.

Après avoir été utilisés pour exposer des algues aux métaux, les erlenmeyers sont lavés avec de l'eau de Javel pour éliminer les algues résiduelles et rincés avec une solution d'acide nitrique à 1 M pour éliminer les ions métalliques adsorbés sur les parois afin d'éviter la contamination d'échantillons futurs. Les erlenmeyers en verre sont ensuite stérilisés à l'autoclave tandis que les erlenmeyers en PETG, qui fondent à l'autoclave, sont stérilisés avec un mélange eau/éthanol avant d'être réutilisés.

2. Préparation des solutions d'argent et de cobalt pour l'exposition des algues aux métaux

a. Argent

Les solutions d'exposition à l'argent sont préparées à partir de nitrate d'argent ($\text{AgNO}_3 \geq 99.9\%$, *zur Proteinfärbung*, Roth). Le nitrate d'argent a une masse molaire de $169,87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. On prépare une solution mère à 1 M Ag^+ en dissolvant $169,87 \text{ mg}$ d' AgNO_3 dans 1 mL d'eau ultra pure, les solutions de plus faible concentration sont réalisées par dilutions successives. La concentration exacte des solutions préparées est déterminée par pesée. Les solutions d'argent sont préparées extemporanément, dans des tubes coniques en

PET protégés de la lumière par du papier d'aluminium pour éviter la photoréduction des ions Ag^+ .

b. Cobalt

Les solutions d'exposition au cobalt sont préparées à partir de chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *plant cell culture tested*, Sigma-Aldrich). Le chlorure de cobalt hexahydraté a une masse molaire de $237,9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. On prépare une solution mère à 1 M Co^{2+} en dissolvant $237,9 \text{ mg}$ d' AgNO_3 dans 1 mL d'eau ultra pure, les solutions de plus faible concentration sont réalisées par dilutions successives. La concentration exacte des solutions préparées est déterminée par pesée. Les solutions de cobalt sont préparées extemporanément dans des tubes coniques en PET.

3. Exposition des algues aux métaux

Les algues sont récoltées par centrifugation à 2000 g , pendant 5 minutes et à 4°C . Les culots d'algues sont transférés dans des tubes coniques de 50 mL et lavé deux à trois fois. Un lavage consiste à re-suspendre le culot d'algues dans 50 mL d'eau ultra pure et à centrifuger à nouveau la solution à 2000 g , pendant 5 minutes et à 4°C . Les lavages ont pour but d'éliminer les composés présents dans le milieu de culture, qui peuvent s'adsorber aux parois des algues, afin qu'ils n'interagissent pas avec les métaux d'intérêt lors de l'exposition. Entre chaque centrifugation, les tubes contenant les algues sont placés dans de l'eau glacée à 0°C afin d'abaisser la température de la solution d'algues pour éviter la dégradation des cellules par hypoxie.

Suite aux opérations de lavage, la masse du culot d'algues obtenu est pesée : c'est la masse fraîche des algues exposées. Sauf mention contraire, les algues sont remises en solution dans de l'eau ultra pure stérile et le volume d'eau est ajusté pour avoir une concentration massique de 2 g de masse fraîche d'algues par litre de solution, soit environ 10^6 cellules/ml. Cette solution d'algues est répartie dans les contenants pour l'exposition.

Les solutions de métal sont enfin ajoutées aux solutions d'algues. Les volumes ajoutés sont ajustés de façon à obtenir la concentration souhaitée. On utilise des solutions de métal 1000 fois plus concentrées que la concentration d'exposition ciblée : on ajoute par exemple $100 \mu\text{L}$ de solution de métal à 10^{-3} M à 100 mL de solution d'algues pour une exposition à 10^{-6} M . Les expositions à 10^{-2} M sont une exception, on utilise dans ce cas une solution de

métal mère 100 fois plus concentrée que la concentration cible : on ajoute par exemple 1 mL de solution de métal à 1 M à 100 mL de solutions d'algues.

La spéciation des métaux lors de l'exposition a un impact sur leur toxicité et les mécanismes d'accumulation à l'œuvre. L'étude théorique de la spéciation de l'argent et du cobalt dans le BBM dilué deux ou dix fois, réalisée par Eric Ansoborlo (CEA/DEN/DRCP/CETAMA, Marcoule), montre que les métaux peuvent être complexés par l'EDTA, les phosphates et les ions chlorures du BBM (Annexe 8). Nous avons choisi d'exposer les algues aux métaux dans de l'eau ultra pure pour éviter la formation de ces complexes, les algues sont ainsi exposées à l'argent et au cobalt sous forme Ag^+ et Co^{2+} libres.

Ces manipulations sont réalisées en milieu stérile. On veille à maintenir la température des algues autour de 0-4°C afin de ralentir le métabolisme des cellules, pour éviter par exemple l'anoxie lors des centrifugations.

4. Récolte des algues

Une fois la durée d'exposition écoulée, on récolte les algues en centrifugeant la solution. Sauf mention contraire, les solutions sont centrifugées pendant 5 minutes, à 2000 g et à 4°C. Une fraction du surnageant (4,5 mL) peut être récupérée pour doser les métaux par ICP-MS, le reste du surnageant est éliminé. Les algues sont ensuite lavées deux ou trois fois par re-suspension dans de l'eau ultra pure, centrifugation (mêmes paramètres) et élimination du surnageant. Ces lavages ont pour but d'éliminer les métaux adsorbés aux parois de l'algue et le métal présent dans le liquide interstitiel. Ces lavages successifs permettent de regrouper les culots d'algues provenant d'un même échantillon. Une fraction connue de la solution (typiquement 500 μL de 50 mL, soit 1% v/v) peut être prélevée avant la dernière centrifugation pour quantifier l'accumulation de métal par les algues par ICP-MS.

Après les lavages, la masse fraîche d'algues exposées obtenue est pesée, et l'échantillon est conservé selon le besoin de l'expérience (congélation à -80°C, lyophilisation, etc.).

Comme précédemment, on veille à conserver la température des échantillons autour de 0-4°C durant ces manipulations. En revanche, il n'est pas forcément nécessaire, selon l'expérience réalisée, de travailler en milieu stérile (la contamination microbienne est généralement négligeable si les algues ne sont pas remises en culture par la suite).

E. Quantification des métaux par ICP-MS

La spectroscopie par torche plasma couplée à la spectrométrie de masse, ou ICP-MS (inductively coupled plasma – mass spectroscopy), permet de doser la quasi-totalité des éléments chimiques d'un échantillon liquide, et notamment l'argent et le cobalt. Le principe de la méthode est décrit en Annexe 9.

On utilise un appareillage *Hewlett-Packard 4500 ICP MS System*. Les échantillons sont analysés sous forme liquide, en solution dans de l'acide nitrique à 1% (v/v) (préparé à partir de *HNO₃ 65% (v/v) Merck qualité SUPRAPUR*). Ils sont préparés comme suit :

- Pour les échantillons liquides (surnageant de cultures, solutions de métal en solution à doser), on ajoute simplement à l'échantillon un volume de solution d'acide nitrique à 10% égal au dixième du volume final de l'échantillon. Par exemple, on ajoute 500 μ L de solution d'acide nitrique à 10% à un prélèvement de surnageant de 4,5 mL, de telle sorte qu'on a un échantillon final de 5 mL à 1% d'acide nitrique.
- Dans le cas d'échantillons d'algues, il est nécessaire de minéraliser la biomasse pour extraire les métaux et éliminer les résidus solides qui encrasseraient l'appareil. Pour ce faire, après deux ou trois lavages de l'échantillon d'algues, on centrifuge l'échantillon prélevé pour doser le métal dans les algues, on élimine le surnageant à l'aide d'une micropipette, on reprend le culot dans 250-500 μ L d'acide nitrique à 65% (le volume d'acide nitrique est adapté en fonction du volume du culot) et on laisse incuber au moins 24 h à température ambiante. Après avoir vérifié visuellement que le culot d'algues est bien digéré (la solution doit être limpide, on ne doit pas y observer des traces d'algues), on dilue l'acide 65 fois avec de l'eau ultra pure pour avoir une solution d'acide à 1% et on centrifuge l'échantillon avant analyse.

Pour les deux métaux, les courbes d'étalonnage sont établies avec des solutions standard de concentration 0, $2 \cdot 10^{-9}$, 10^{-8} et 10^{-7} M dans de l'acide nitrique 1% v/v. Les solutions standards sont préparées par pesée afin de connaître leur concentration exacte. La réponse de l'appareil dans cette gamme de concentrations est parfaitement linéaire.

Les échantillons à analyser sont dilués avec de l'acide à 1% pour que leur concentration soit comprise dans cette gamme. En effet, l'analyse d'échantillons dont la

concentration d'Ag ou de Co est supérieure à environ $5 \cdot 10^{-7}$ M pollue l'appareil, perturbe les mesures suivantes et oblige à faire de nombreux lavages ; tandis que les échantillons dont la concentration est inférieure à environ 10^{-9} M sont sous la limite de détection. Ces dilutions sont réalisées par pesée. La concentration initiale des échantillons est ensuite déterminée en fonction du nombre de coups comptés, de l'équation de la droite de calibration et du facteur de dilution appliqué.

La mesure de la gamme d'étalonnage est répétée toutes les dix mesures environ car la réponse de l'appareil évolue au fil du temps, les écarts relatifs observés pouvant atteindre des valeurs de l'ordre de 10%.

II. Caractérisation de l'accumulation des métaux par les algues

A. Argent

1. Cinétiques d'accumulation de l'argent

Les cinétiques d'accumulation de l'argent ont été étudiées par Emmanuel Schmitt lors de son stage de master 2. Ces expérimentations ont été réalisées avant le début de ma thèse, je n'y ai pas pris part. Nous reprenons le matériel et méthodes décrit dans son rapport de stage (Schmitt et al., 2010).

Des algues cultivées en erlenmeyers (cultures en lots) ont été récoltées en phase de croissance et mises en solution dans l'eau ultra pure à des concentrations massiques de 20 et 200 $\text{mg}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$. Ces solutions d'algues ont été exposées à des concentrations d' Ag^+ allant de 10^{-8} M à 10^{-3} M. Pour chaque échantillon, 300 mL de solution d'algues ont été exposés dans des erlenmeyers en PETG de 500 mL. L'exposition a été faite à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, sous une illumination continue de $50 \pm 10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Des prélèvements de 10 mL ont été effectués après 5, 15, 30 et 45 minutes d'exposition, dans chacun des échantillons. Ces prélèvements ont été placés dans des tubes coniques en PP de 15 mL et centrifugés à 2000 g durant 5 minutes. Les quantités d'argent dans les surnageants et dans les culots ont été dosées par ICP-MS.

2. Quantité d'argent accumulé par les algues après deux heures d'exposition

Les quantités d'argent accumulées par *C. actinabiotis* après deux heures d'exposition

ont été évaluées pour des concentrations d'exposition comprises entre $3 \cdot 10^{-8}$ et 10^{-2} M Ag^+ sur des algues cultivées en photobioréacteur de 10 L. Ces expérimentations sont décrites dans la section « matériels et méthodes » de la publication présentée au chapitre 3.

B. Cobalt : cinétiques d'accumulation et quantités accumulées

Des algues cultivées en photobioréacteur de 10 L ont été récoltées en phase de croissance, lavées et mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2g_{\text{MF}} \cdot L^{-1}$. La densité cellulaire de cette solution d'algues et son Fv/Fm ont été mesurés.

La solution d'algues a été répartie dans huit erlenmeyers de 250 mL en verre borosilicaté (100 mL de solution par erlenmeyers). Six de ces cultures ont été exposées à des concentrations de Co^{2+} comprises entre 10^{-7} M et 10^{-2} M, les deux autres ont servi de témoins. Ces cultures ont été placées dans des incubateurs INFORS (100 tours par minute, 21 ± 1 °C, lumière continue $80 \pm 10 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) durant 9 à 11 jours.

Pour chacune des cultures, des prélèvements de 7 mL ont été effectués après 10, 60, 90, 120 et 180 minutes et après 1, 2, 3, 4, 7, 9 et 11 jours d'exposition. La densité cellulaire⁵ et le Fv/Fm de ces prélèvements ont été mesurés, ces données sont exploitées pour déterminer l'effet du cobalt sur la croissance et sur le photosystème des algues. Les prélèvements sont ensuite centrifugés (2000 g, 5 minutes, 4°C) et conditionnés pour doser le cobalt dans le surnageant et les algues par ICP-MS.

Cette expérimentation a été répétée trois fois, sur des échantillons biologiques distincts cultivés à plusieurs semaines d'intervalle.

III. Imagerie et distribution subcellulaire des métaux incorporés par les micro-algues

La distribution subcellulaire des métaux incorporés par les micro-algues a été étudiée par nano-imagerie par fluorescence X, par microscopie optique à fluorescence et par microscopie électronique à transmission.

⁵ La densité cellulaire n'a pas été mesurée pour les échantillons prélevés avant 24 h, sa variation est négligeable sur de si courtes périodes

A. Nano-imagerie par fluorescence X et microscopie optique à fluorescence

La mise en œuvre des expérimentations de nano-imagerie par fluorescence X et de microscopie optique à fluorescence est détaillée dans la section « matériels et méthodes » de la publication présentée au chapitre 2. La méthodologie pour l'analyse des résultats obtenus par nano-fluorescence X est détaillée en Annexe 13.

B. Microscopie électronique

Six échantillons ont été analysés en microscopie électronique :

- Des cultures exposées à Ag^+ 10^{-4} et 10^{-2} M durant 2 heures et une culture « témoin argent » exposée dans l'eau ultra pure durant 2 heures
- Des cultures exposées à Co^{2+} 10^{-6} et 10^{-4} M durant 24 heures et une culture « témoin cobalt » exposée dans l'eau ultra pure durant 24 heures

Ces échantillons ont été préparés à partir d'algues cultivées en photobioréacteur de 10 L récoltées en phase de croissance, lavées et mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2 \text{ g}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$. Pour chaque échantillon, 100 mL de solution d'algues ont été utilisés. Les échantillons ont été exposés dans des erlenmeyers de 350 mL placés dans un incubateur INFORS (100 tours par minute, 21 ± 1 °C, lumière continue $80 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Le mélange fixateur ne se conserve pas, il a été préparé une heure avant la récolte des algues en mélangeant volume à volume un tampon de cacodylate de sodium 0,2 M à pH 6-7 et une solution de glutaraldéhyde à 4% (m/v) et conservé à température ambiante jusqu'à utilisation. Ces solutions ont été préparées par Christelle Boulé à Lyon (Centre Technologique des Microstructures, CTμ).

Le temps d'exposition aux métaux écoulé, chaque échantillon a été récolté dans deux tubes coniques de 50 mL et centrifugé doucement (5 minutes, 750 g, 4°C), les deux culots d'algues ont été regroupés, remis en suspension dans 50 mL d'eau ultra pure et centrifugés à nouveau (mêmes paramètres). Le culot d'algues a été remis en suspension dans 2 mL d'eau ultra pure, transféré dans un microtube de 2 mL et centrifugé 45 s avec une mini centrifugeuse Eppendorf (~ 1000-2000 g). Le surnageant a été éliminé et les algues ont été délicatement remises en suspension dans 1,5 mL de mélange fixateur en retournant le microtube de haut en bas. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'échantillon a été centrifugé 45 s,

le surnageant a été éliminé (sans laisser le culot sécher) et les algues ont été remises en suspension dans 1,5 mL de tampon de cacodylate de sodium à 0,2 M durant 15 minutes. Cette dernière étape de rinçage a été répétée trois fois. Les algues ont été conservées en suspension dans le troisième bain de rinçage et stockées à 4°C (les échantillons peuvent alors être conservés une semaine dans ces conditions avant l'étape suivante).

Christelle Boulé (CT μ) a réalisé la suite des opérations de préparation des échantillons. Les échantillons ont été inclus dans une résine Epon, des coupes ultra fines (60 nm) ont été faites à l'ultra-microtome (Leica UC7) et déposées sur des grilles d'observation en cuivre recouvertes d'une membrane de Formvar. Les coupes ont été colorées au tetroxyde d'osmium, à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Une partie des coupes des échantillons exposés à l'argent ont été colorées uniquement au tetroxyde d'osmium pour permettre la caractérisation chimique de l'argent par analyse dispersive en énergie (EDS).

Les coupes ont été observées avec un microscope électronique en transmission Philips CM120 à 80 kV. La distribution de l'argent dans les échantillons exposés à l'argent a été analysée avec un microscope électronique en transmission à balayage JEOL 2100F couplé à un détecteur SDD Oxford X-Max 80 mm² à 200 kV. Ces observations ont été réalisées par Annie Rivoire (CT μ) au centre technologique des microstructures (plateforme de l'Université Claude Bernard Lyon 1).

IV. Spéciation des métaux

A. Etude de la spéciation de l'argent internalisé par les algues par spectroscopie d'absorption X et par diffraction de rayons X

La spéciation de l'argent internalisé par *C. actinabiotis* a été étudiée par spectroscopie d'absorption X et par diffraction de rayon X. Ces expérimentations sont décrites dans la section « matériels et méthodes » de la publication présentée au chapitre 3. Le principe de la spectroscopie d'absorption X et la méthodologie d'analyse des spectres sont décrits en Annexe 14.

B. Etude de la spéciation du cobalt internalisé par les algues par spectroscopie d'absorption X

1. Préparation des échantillons

Des algues cultivées en photobioréacteur de 2 L ont été récoltées en phase de croissance, lavées et mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2g_{MF}.L^{-1}$. Dix échantillons ont été préparés à partir de cette solution : les algues ont été exposées à Co^{2+} à des concentrations de 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} et 10^{-2} M, durant 1 et 3 jours pour chaque concentration. Pour chaque échantillon, 75-100 mL de solution d'algues ont été utilisées. Les solutions ont été exposées au cobalt dans des erlenmeyers en verre borosilicaté et ont été placées dans des incubateurs INFORS pour l'incubation (100 tours par minute, 21 ± 1 °C, lumière continue 80 ± 10 $\mu mol photons.m^{-2}.s^{-1}$).

Le temps d'exposition aux métaux écoulé, les algues de chaque échantillon ont été récoltées par centrifugation et lavées trois fois à l'eau ultra pure (centrifugations : 2000 g, 5 minutes, 4°C). Les culots d'algues provenant d'un même échantillon ont été regroupés au cours de ces lavages. Après la dernière centrifugation, le surnageant a été éliminé et la masse fraîche des algues a été pesée. Une fraction du surnageant a été prélevée après la première centrifugation pour doser le cobalt résiduel en solution après l'exposition et un prélèvement a été réalisé après le dernier lavage pour doser le cobalt dans les algues. Le cobalt dans ces prélèvements a été dosé par ICP-MS.

Environ 100 μL du culot d'algues ont été transférés dans un porte-échantillon spécifique, fourni par Olivier Proux (CNRS, Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble) (cf. Figure 12), percé de quatre orifices scellés de Kapton sur leur face inférieure.

Le culot d'algues est très épais (pâteux) lors du transfert dans le porte échantillon, on utilise une micropipette de 200 μL avec un cône dont on a coupé la pointe en biseau pour faciliter l'écoulement des algues pour remplir le porte échantillon. On veille, afin de garantir la qualité de la mesure, à ne pas emprisonner de bulle d'air dans l'échantillon et à aplanir autant que possible sa surface. Les bulles d'air présentes dans l'échantillon peuvent être remontées à sa surface puis percées à l'aide d'une aiguille stérile. Le transfert des culots d'algues est réalisé rapidement et, dans la mesure du possible, en conservant les algues dans la glace.

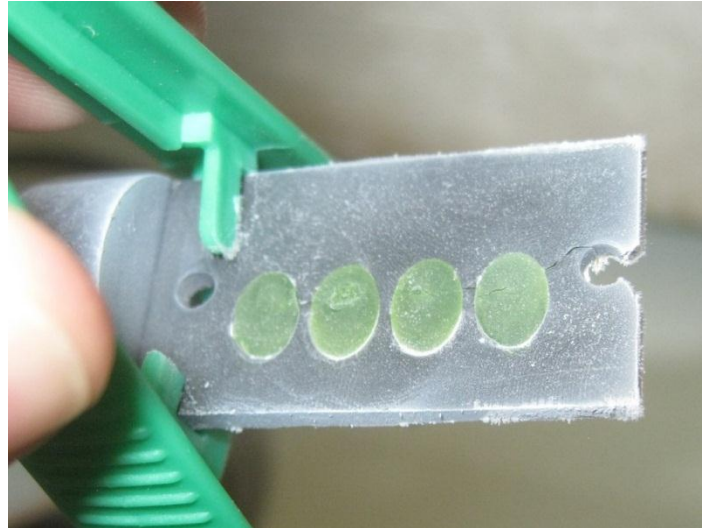


Figure 12 : Quatre échantillons d'algues exposées au cobalt disposés dans un porte échantillon adapté à l'analyse sur la ligne de lumière BM30b de l'ESRF

Une fois en place dans le porte-échantillon, les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide et recouvert d'un film de Kapton. Ils ont été conservés à -80°C jusqu'à la mesure.

2. Réglages de la ligne de lumière et mesures

Les mesures d'absorption par rayons X sont réalisées en collaboration avec Olivier Proux sur la ligne BM30b (FAME) de l'ESRF (European synchrotron radiation facility, Grenoble) (Hazemann et al., 2009; Proux et al., 2005, 2006). Le faisceau incident est filtré par un monochromateur de type deux-cristaux Si (220) et focalisé par focalisation dynamique sagittale. Le flux de photons à l'énergie de travail est de l'ordre de 5.10^{11} photons. s^{-1} et la taille du faisceau est de 300 μm (horizontal) sur 100 μm (vertical) (largeur à mi-hauteur). Le portoir contenant les échantillons est placé dans un cryostat d'hélium, l'ensemble des

acquisitions sont réalisées à 10 K. Cette basse température permet de limiter fortement la dégradation des échantillons et les phénomènes d'oxydo-réduction sous faisceau. Les spectres ont été collectés en fluorescence et en transmission au seuil K du cobalt (7550-8558 eV), avec un détecteur solide au germanium 30-éléments (fluorescence) et des diodes silicium (transmission). La calibration en énergie de la ligne a été réalisée en mesurant le spectre d'une feuille métallique de cobalt et en choisissant le premier point d'inflexion du spectre, à 7709 eV, comme référence. Pour chaque échantillon, 6 à 10 spectres acquis durant 50 minutes environ ont été moyennés. La position du faisceau a été modifiée entre chaque acquisition de spectre afin d'éviter les dommages dus aux radiations.

3. Analyse des spectres

L'analyse des données a été réalisée avec les logiciels Athena et Artemis de la suite Iffeffit (Ravel and Newville, 2005). Nous avons exploité les spectres collectés en fluorescence qui sont adaptés à l'analyse d'échantillons faiblement concentrés.

Les spectres XANES ont été calibrés en énergie et normalisés avec Athena. Nous les avons notamment interprétés par comparaison avec des spectres de plusieurs composés de référence acquis dans des conditions similaires et publiés par Collins *et al.* (2010), que les auteurs ont partagés avec nous : acétate de cobalt tétrahydrate $\text{Co}^{\text{II}}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, complexe Co(II)-cystéine, nitrate de cobalt hexahydrate $\text{Co}^{\text{II}}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, acétylacétonate de cobalt $\text{Co}^{\text{III}}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ et feuille de cobalt métallique Co(0).

Les spectres EXAFS des échantillons ont été extraits avec Athena et pondérés par k^3 (voir Annexe 14). Leur transformée de Fourier a été calculée sur l'intervalle $k = 2,125-12 \text{ \AA}^{-1}$ en utilisant une fenêtre d'apodisation de Hanning. Les spectres EXAFS ont été analysés par comparaison avec les spectres des références et des échantillons publiés par Collins *et al.* (2010). Ils ont également été ajustés, pour des valeurs de R^+ comprises entre 1 et 3 Å , avec le spectre calculé d'un modèle structural constitué d'un atome de cobalt entouré de six atomes d'oxygène situés à 2,08 Å de l'atome central. La procédure d'ajustement a été réalisée avec le logiciel Artemis, le modèle structural utilisé a été produit en utilisant la fonction *quick first shell theory* de ce même logiciel et les fonctions d'amplitude et de phase théoriques ont été calculées *ab initio* avec le code Feff 6.0 (Rehr and Albers, 2000).

V. Etude de l'impact physiologique et métabolique des métaux sur *C. actinabiotis*

A. Etude de l'impact des métaux sur la croissance des algues et le photosystème

1. Argent

Des algues cultivées en photobioréacteur de 10 L ont été récoltées en phase de croissance, lavées et mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2g_{MF}.L^{-1}$. La densité cellulaire de cette solution d'algues et son Fv/Fm ont été mesurés.

La solution d'algues a été répartie dans dix erlenmeyers de 250 mL en PETG (80 mL de solution par erlenmeyers). Huit cultures ont été exposées à des concentrations d'Ag⁺ comprises entre 10^{-9} M et 10^{-2} M, les deux autres ont servi de témoins. Ces cultures ont été placées dans des incubateurs INFORS (100 tours par minute, 21 ± 1 °C, lumière continue 80 ± 10 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Après 2 h d'incubation, 40 mL de solution ont été prélevés dans chaque erlenmeyer, les algues ont été lavées deux fois à l'eau ultra pure (centrifugation à 2000 g, 5 minutes, 4°C) et remises en suspension dans des erlenmeyers de 250 mL dans 40 mL de solution de BBM diluée deux fois (milieu de culture ne contenant pas d'argent). Ces cultures ont également été placées dans un incubateur INFORS (même paramètres).

La même opération a été répétée après 24 h d'incubation (par rapport à l'exposition initiale à l'argent) sur les 40 mL restant dans les erlenmeyers initiaux : les algues ont été récoltées, lavées deux fois à l'eau ultra pure et remises en suspensions dans 40 mL de BBM dilué deux fois.

Nous avons ainsi obtenu vingt échantillons :

- Huit cultures d'algues exposées durant 2 h à l'argent et deux cultures témoins en solution dans l'eau ultra pure durant 2 h puis remises en solution dans du milieu nutritif
- Huit cultures d'algues exposées durant 24 h à l'argent et deux cultures témoins en solution dans l'eau ultra pure durant 24 h puis remises en solution dans du milieu nutritif

La croissance et le rapport Fv/Fm de ces vingt échantillons ont été mesurés avant le transfert dans le milieu BBM (juste avant l'exposition à l'argent, 2 h après et 24 h après le cas échéant) et durant les 5 à 8 jours après ce transfert. Ces paramètres ont été mesurés sur des prélèvements de 3 mL effectués juste après le transfert dans le milieu nutritif puis 1,2, 5,6 et 8 jours après le transfert pour les algues exposées durant 2 h à l'argent, et 1, 4,5 et 7 jours après le transfert pour les algues exposées durant 24 h à l'argent.

2. Cobalt

L'impact du cobalt sur la croissance des algues et sur leur photosystème est évalué à partir des comptages cellulaires et des mesures de rapport Fv/Fm effectués lors des expérimentations d'exposition des algues à différentes concentrations de cobalt durant 9 à 11 jours (voir ci-dessus : II.B. Cobalt : cinétiques d'accumulation et quantités accumulées).

B. Analyses du métabolome par RMN et par HPLC

Six séries d'échantillons ont été analysées par RMN et par HPLC :

- Une série de cultures exposées à des concentrations d'Ag⁺ comprises entre 10⁻⁷ et 10⁻² M durant 2 heures et une culture témoin « H₂O 2 h » exposée dans l'eau ultra pure durant 2 heures
- Deux répétitions des expositions aux concentrations d'Ag⁺ comprises entre 10⁻⁶ et 10⁻⁴ M durant 2 heures
- Une série de cultures exposées à des concentrations de Co²⁺ comprises entre 10⁻⁷ et 10⁻² M durant 24 heures et une culture témoin « H₂O 24 h » exposée dans l'eau ultra pure durant 24 heures
- Deux répétitions des expositions aux concentrations de Co²⁺ comprises entre 10⁻⁶ et 10⁻⁴ M durant 24 heures et de l'exposition dans l'eau ultra pure durant 24 h

Les répétitions ont été réalisées sur des échantillons biologiques distincts, cultivés à plusieurs semaines d'intervalle. Un échantillon des cultures d'algues utilisées pour les expérimentations a également été prélevé avant l'exposition aux métaux (juste après la récolte et les lavages). L'analyse de ces « témoins BBM » renseigne sur le métabolome des cultures utilisées.

Des algues cultivées en photobioréacteur de 10 L ont été récoltées en phase de croissance, lavées et mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de

$2g_{MF}.L^{-1}$.

Pour chaque échantillon, 400 mL de solution d'algues ont été utilisés. Les échantillons ont été exposés dans des erlenmeyers de 500 mL et placés dans un INFORS (100 tours par minute, 21 ± 1 °C, lumière continue 80 ± 10 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Le temps d'exposition aux métaux écoulé, chaque échantillon a été réparti dans huit tubes coniques de 50 mL, les algues ont été récoltées par centrifugation et lavées deux fois à l'eau ultra pure. Les culots ont été regroupés dans deux tubes coniques de 50 mL : le premier, pour l'analyse des métabolites par RMN, regroupe les culots de six tubes (équivalent à 300 mL de solution d'algues exposées), tandis que le second, pour l'analyse par HPLC, regroupe les culots des deux autres tubes (équivalent à 100 mL de solutions d'algues exposées). La masse fraîche des échantillons RMN et HPLC récoltés a été pesée, 1 mL et 500 μL d'eau ultra pure ont respectivement été ajoutés aux échantillons et après une homogénéisation sommaire les culots ont été congelés dans l'azote liquide. L'ajout aux culots permet d'augmenter leur volume et facilite l'étape de broyage mise en œuvre par la suite pour extraire les métabolites des cellules.

Les échantillons ainsi congelés ont été conservés à -80°C avant les étapes suivantes.

1. RMN : extraction des métabolites et analyse

Les métabolites hydrophiles des échantillons destinés à l'analyse par RMN ont été isolés par extraction à l'acide perchlorique, suivant le protocole présenté en Annexe 10. Ces extractions ont été réalisées par Anne-Marie Boisson (CNRS, CEA/DSV/PCV).

Les analyses en RMN du proton ont été réalisées par Marina Gromova (CEA Grenoble, DSM/INAC/SCIB/LRM) à 15 ou 25°C, sur un spectromètre RMN Bruker Avance à 400 MHz. Les conditions d'acquisition sont celles décrites dans Gromova et Roby (2010). Pour chaque échantillon, entre 64 et 512 scans ont été acquis. Le déplacement et l'amplitude des pics des différents échantillons ont été calibrés avec les pics du maléate et de l'acide triméthylsilylpropanoïque (standards internes) afin de permettre la comparaison des spectres RMN.

2. HPLC : extraction des métabolites et analyse

Les pigments et les tocophérols des échantillons destinés à l'analyse HPLC ont été isolés par extraction au méthanol et au chloroforme, suivant le protocole présenté en Annexe 11. L'étape de broyage de ces extractions a été réalisée par Anne-Marie Boisson (CNRS,

CEA/DSV/PCV).

L'analyse des échantillons a nécessité de les diluer dans des volumes de diméthylformamide (DMF) allant de 300 à 1200 μ L. Les conditions de l'analyse sont similaires à celles décrites par Simkin *et al.* (2010). Le chaîne HPLC utilisée, de marque Varian, comprend un détecteur à absorption UV-visible à barette de diodes et un détecteur à fluorescence. La séparation est effectuée sur une colonne C30 à phase inverse en silice greffée de chaînes alkyles de marque YMC (250 x 4,6 mm). La phase mobile est constituée d'un mélange de méthanol (A), d'une solution d'eau et de méthanol (rapport 20/80 en volume) contenant 0,2 % d'acétate d'ammonium (B) et de méthyl tert-butyl éther (C). L'analyse dure 30 minutes, elle est conduite avec une élution isocratique à 95% A/5% B durant 12 minutes, à 12 minutes un saut à 80% A/5% B/15% C est effectué, puis un gradient linéaire est appliqué à la composition de la phase mobile pour arriver à 30% A/5% B/65% C à 30 minutes. L'analyse est suivie d'une période de ré-équilibrage de la colonne d'une durée de 30 minutes. Les molécules analysées ont été identifiées en fonction de leur temps de rétention et par comparaisons de leurs spectres d'absorption avec des spectres de référence.

Les analyses HPLC ont été conduites avec l'aide de Marcel Kuntz (CNRS, CEA/DSV/PCV).

Chapitre 1 : Caractérisation de
l'accumulation de l'argent et du cobalt
par *C. actinabiotis*

La première partie de notre étude a consisté à caractériser l'accumulation de l'argent et du cobalt par la micro-algue *C. actinabiotis*. Pour chacun de ces métaux, nous avons étudié les cinétiques d'accumulation et évalué les quantités de métal accumulées par les algues. Nous présentons successivement dans ce chapitre les résultats obtenus pour l'argent et pour le cobalt.

I. Argent

A. Cinétiques d'accumulation de l'argent

Les cinétiques d'accumulation de l'argent ont été étudiées par Emmanuel Schmitt lors de son stage de master 2. Ces expérimentations ont été réalisées avant le début de ma thèse, je n'y ai pas pris part. Nous reprenons ici les résultats présentés par Emmanuel dans son rapport de stage (Schmitt et al., 2010) car ils sont essentiels pour fixer les durées d'exposition des algues à l'argent lors des études réalisées pour ma thèse.

Des algues cultivées en erlenmeyers (cultures en batch) ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à des concentrations massiques de 20 et 200 $\text{mg}_{\text{MF}}\cdot\text{L}^{-1}$ et exposées dans des erlenmeyers à des concentrations de Ag^+ allant de 10^{-8} M à 10^{-3} M. L'accumulation de l'argent par les algues a été suivie pendant 45 minutes après l'exposition : pour chacun des échantillons, quatre prélèvements ont été effectués et la quantité d'argent dans les algues a été mesurée par ICP-MS.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 13. Les cinétiques des échantillons contenant 200 $\text{mg}_{\text{MF}}\cdot\text{L}^{-1}$ d'algues exposées à des concentrations d'argent comprises entre 10^{-8} M et 10^{-6} M montrent que le métal présent dans le milieu extérieur est très rapidement incorporé dans les cellules pendant une première phase d'environ cinq minutes. En 45 minutes, les algues ont fixé respectivement 100%, 80% et 45% de l'argent initialement présent en solution à la concentration de 10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M. La quantité d'argent accumulée par les algues reste ensuite stable ou augmente peu. Pour des concentrations supérieures, de 10^{-4} et 10^{-3} M, on observe toujours une phase d'accumulation rapide durant les 5 premières minutes, suivie d'une deuxième phase où la quantité d'argent dans les algues augmente plus lentement. Dans tous les cas, la vitesse d'incorporation durant cette deuxième phase est dépendante de la quantité de métal présent dans le milieu, ce qui suggère une accumulation de l'argent liée au gradient de concentration, sans régulation de la quantité intracellulaire.

Les cinétiques des échantillons contenant $20 \text{ mg}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$ d'algues exposées à des concentrations d'argent de 10^{-8} M et 10^{-7} M ont également un profil similaire, sauf que les deux phases d'incorporation apparaissent pour des concentrations plus faibles (on observe une deuxième phase durant laquelle la cellule accumule lentement l'argent dès 10^{-7} M). La cinétique de l'échantillon contenant $20 \text{ mg}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$ d'algues exposées à 10^{-3} M d'argent paraît en revanche linéaire durant les 45 minutes de l'expérimentation. Dans cette condition particulière, forte concentration d'argent et faible quantité d'algues, la vitesse d'incorporation de la deuxième phase est alors proche de la phase rapide initiale. Il est aussi possible que les membranes plasmiques des algues de cet échantillon soient fragilisées et rendues perméables par l'exposition à ces quantités importantes d'argent, le métal envahissant alors les cellules en suivant le gradient de concentration.

Plusieurs auteurs décrivent des cinétiques d'accumulation de métal par des microalgues vertes constituées d'une première phase courte d'accumulation rapide et d'une seconde phase plus longue durant laquelle l'accumulation est plus faible. Les cinétiques d'accumulation du cuivre chez *Scenedesmus subspicatus* ou du cobalt, du zinc et du manganèse par *Chlorella Salina* ont par exemple ce profil (Garnham et al., 1992; Knauer et al., 1997). Ces auteurs proposent un mécanisme d'accumulation pour ces métaux faisant intervenir deux processus, qui pourrait expliquer les deux phases observées sur les cinétiques : un processus de sorption rapide des ions métalliques à la surface de la cellule, indépendant du métabolisme, dominerait la cinétique dans un premier temps. Il serait suivi d'un processus d'internalisation de l'argent (par diffusion ou transport actif) plus lent qui contrôlerait la cinétique lorsque les sites de sorption sont tous occupés (Garnham et al., 1992; Knauer et al., 1997). Dans le cas de l'argent, après la phase rapide de biosorption, ce métal peut être incorporé dans les cellules par transport actif, l'argent Ag^+ pouvant emprunter les transporteurs de cuivre Cu^+ (Fortin and Campbell, 2000; Pillai et al., 2014; Solioz and Odermatt, 1995), ou par transport passif en empruntant par exemple les nombreux canaux ioniques transmembranaires qui assurent un transport passif non sélectif des ions Na^+ , K^+ ou d'éventuels métaux monovalents vers le cytoplasme, d'autant plus facilement que le gradient de concentration est élevé.

Des observations réalisées sur des temps plus longs montrent que lorsque la fixation de l'argent n'est pas totale, la quantité d'argent accumulé par les algues (lorsque celles-ci sont à une concentration supérieure ou égale à 200 mg/L) varie généralement peu au-delà de la

première heure d'exposition. Nous avons donc choisi d'exposer les algues à l'argent durant deux heures lors de la plupart de nos expérimentations.

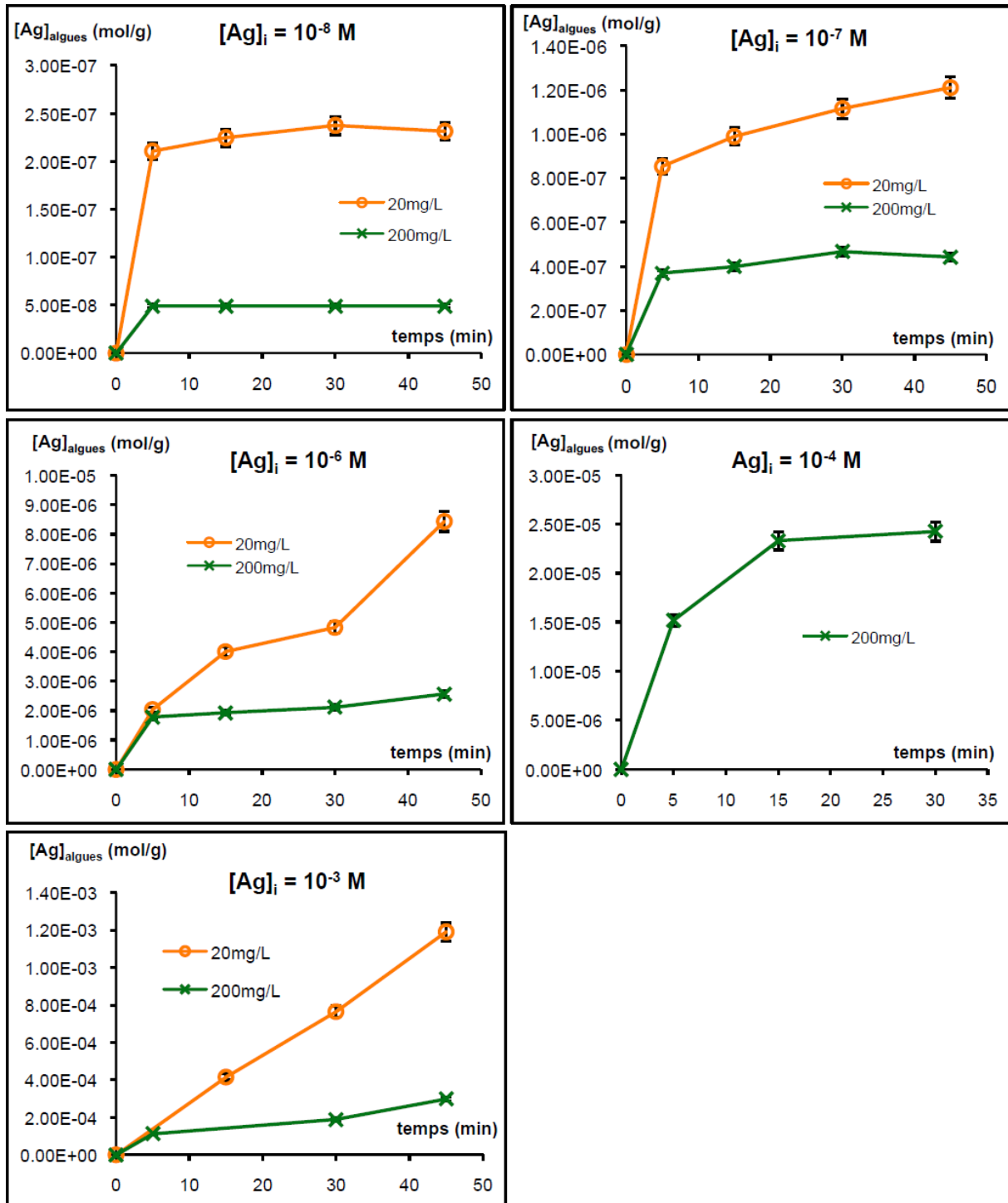


Figure 13 : Cinétiques d'accumulation de l'argent par *C. actinabiotis* à des concentrations d'exposition comprises entre 10^{-8} et 10^{-3} M, d'après Schmitt (2010)

B. Quantités d'argent accumulées

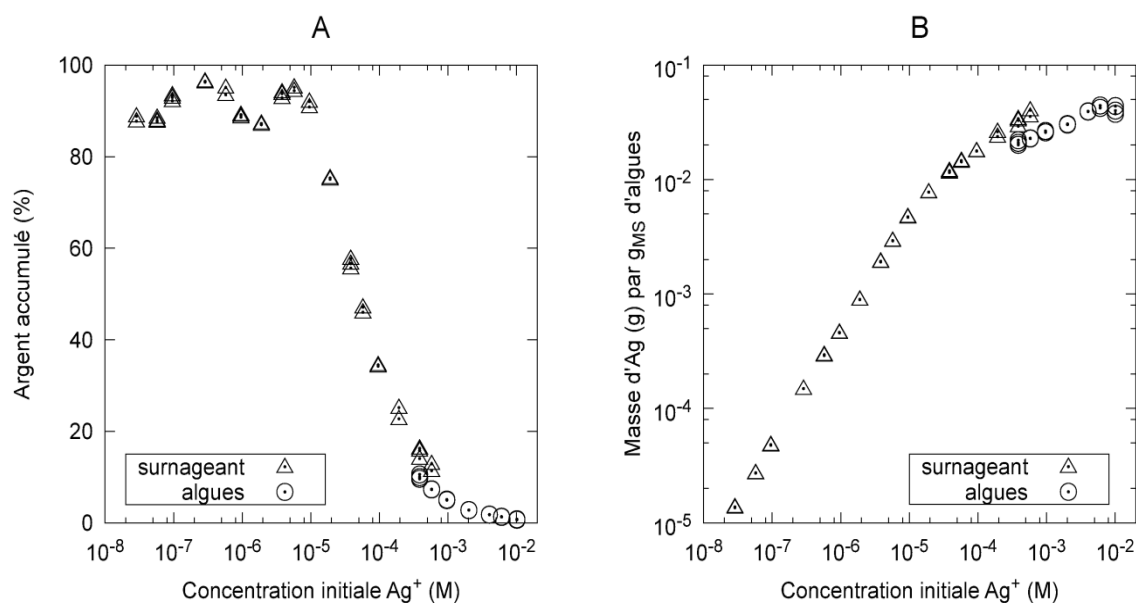


Figure 14 : Argent accumulé par *C. actinabiotis* en fonction de la concentration d'exposition, représenté en pourcentage de l'argent initialement présent en solution (A) et en masse d'argent dans les algues (B). Les algues à la concentration de $2 \text{ g}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$ sont exposées pendant 2 heures à différentes concentrations d' $AgNO_3$ dans de l'eau ultrapure. Les mesures, reproduites 2 ou 3 fois pour chaque concentration, sont toutes représentées sur les graphes. L'accumulation de l'argent a été quantifiée directement sur les algues (cercles) ou indirectement sur le surnageant des échantillons (triangles).

Nous avons quantifié l'argent accumulé par *C. actinabiotis* lors de l'exposition des algues à différentes concentrations d'argent durant deux heures. Des algues cultivées en photobioréacteur ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à des concentrations massiques de $2 \text{ g}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$ et exposées durant deux heures à des concentrations de Ag^+ allant de $3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ à 10^{-2} M . L'argent accumulé par les algues a été quantifié par ICP-MS.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 14. Les quantifications indirectes de l'argent accumulé par les algues, mesurées à partir du surnageant des échantillons (triangles), et les quantifications directes sur les algues (cercles) peuvent être comparées pour les concentrations d'exposition de $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Ag^+ . Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont concordants, on voit sur les graphes que les résultats obtenus sont quasiment superposés. Les valeurs obtenues par quantification indirecte sont toutefois supérieures (30 à 50 %) à celles obtenues par quantification directe. Des imprécisions inhérentes à la quantification des métaux dans les algues peuvent être à l'origine de cette différence : une

partie des algues peut être perdue lors de la récolte et du lavage des échantillons, ce qui entraîne une diminution de la quantité d'argent mesurée.

Comme déjà suggéré par les courbes de la Figure 13, aux faibles concentrations d'exposition ($\leq 10^{-5}$ M), les micro-algues accumulent quasiment tout l'argent initialement introduit en solution : 87 à 97 % de l'argent se retrouve dans les algues (Figure 14, A), les variations observées étant certainement liées à la variabilité de la mesure par ICP-MS ainsi qu'à la variabilité biologique. Le pourcentage d'argent accumulé décroît aux plus fortes concentrations, jusqu'à une valeur de 0,7 % pour les algues exposées à 10^{-2} M Ag^+ . La quantité d'argent accumulé par les algues croît néanmoins régulièrement avec la concentration d'exposition, de $13 \mu\text{g Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$ pour les algues exposées à $3 \cdot 10^{-8}$ M Ag^+ à $40 \text{ mg Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$ pour celles exposées à 10^{-2} M Ag^+ , sans atteindre de plateau (Figure 14, B).

La comparaison des quantités d'argent accumulées par *C. actinabiotis* avec celles rapportées par d'autres auteurs est à considérer avec précaution car les valeurs mesurées dépendent de nombreux paramètres qui varient selon les expérimentations : concentration du métal, concentration des algues en solution, durée de l'expérimentation, apport ponctuel ou continu de métal, état physiologique des algues, etc. On note toutefois qu'une accumulation de $40 \text{ mg Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$ par *C. actinabiotis* est supérieure aux valeurs maximales rapportées dans la littérature pour d'autres micro-algues (Tableau 7). A notre connaissance, la plus importante accumulation d'argent par un organisme vivant est rapportée par Charley *et al.* (1979) qui ont mesuré $300 \text{ mg Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$ pour une communauté bactérienne.

Espèce	Concentration maximale rapportée	Référence
<i>Scenedesmus sp.</i>	$7,5 \text{ mg Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$	(Terhaar <i>et al.</i> , 1977)
<i>Pavlova viridis</i> Tseng	$260 \mu\text{g Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$	(Chen <i>et al.</i> , 1998)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	$3 \mu\text{g Ag.g}^{-1}$	(Ratte, 1999)

Tableau 7 : Quantités maximales rapportées dans la littérature pour l'accumulation d'argent par des micro-algues

La diminution du pourcentage d'argent accumulé par *C. actinabiotis* à partir de 10^{-5} M Ag^+ (Figure 14, A) est associée à une rupture de pente de la courbe représentant la quantité d'argent accumulé par les algues aux alentours de cette même concentration (Figure 14, B). Gardea-Torresdey *et al.* (2002) ont observé une inflexion similaire lors de l'étude de l'accumulation d'ions Au^{3+} par de la biomasse inactivée de luzerne et suggèrent qu'elle pourrait indiquer que des mécanismes distincts contrôlent l'accumulation du métal aux faibles

et aux fortes concentrations. Nous reviendrons plus en détail sur ce point dans les chapitres suivants.

II. Cobalt

L'accumulation du cobalt par *C. actinabiotis* a été caractérisée par Stéphanie Bellego lors de son stage de master 2, sous notre supervision.

A. Cinétiques d'accumulation du cobalt

Des algues cultivées en photobioréacteur ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2\text{g}_{\text{MF}}\cdot\text{L}^{-1}$ à des concentrations de Co^{2+} comprises entre 10^{-7} M et 10^{-2} M . L'accumulation du cobalt par les algues a été suivie durant 9 à 11 jours, des prélèvements étant régulièrement effectués dans les échantillons et analysés par ICP-MS. L'expérimentation a été réalisée trois fois, sur des échantillons biologiques distincts.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 15. Quelle que soit la concentration initiale de cobalt en solution, les cinétiques d'accumulation par les algues sont constituées de deux phases principales. La quantité de cobalt accumulé par les algues augmente considérablement pendant la première phase, qui dure un à deux jours, puis elle évolue peu durant la dizaine de jours suivants. Il est à noter qu'au tout début de la première phase, pendant les 15-30 premières minutes, on observe une accumulation limitée, mais très rapide du cobalt (peu visible sur la Figure 15). Cette partie de la courbe est sans doute à rapprocher de ce que l'on observe avec l'accumulation de l'argent pendant les cinq premières minutes (voir Figure 13). Deux échantillons font exception à ce profil d'évolution général :

- La première phase dure un peu plus longtemps pour les algues exposées à 10^{-5} M Co^{2+} , elle s'étend sur 3-4 jours (Figure 15-A)
- La quantité de cobalt accumulée par les algues exposées à 10^{-2} M Co^{2+} décroît pendant la deuxième phase, après avoir augmenté durant un jour (Figure 15-B)

Ces mesures révèlent une différence notable entre les cinétiques d'accumulation de l'argent et du cobalt : l'accumulation des deux métaux se fait sur des échelles de temps très différentes. Tandis que la phase durant laquelle la quantité de métal accumulé par les algues varie de manière importante ne dure que quelques minutes pour l'argent, elle s'étend sur un à deux jours dans le cas du cobalt.

Ces profils cinétiques nous ont conduits à choisir d'exposer les algues au cobalt durant au moins 24 h lors de la plupart de nos expérimentations.

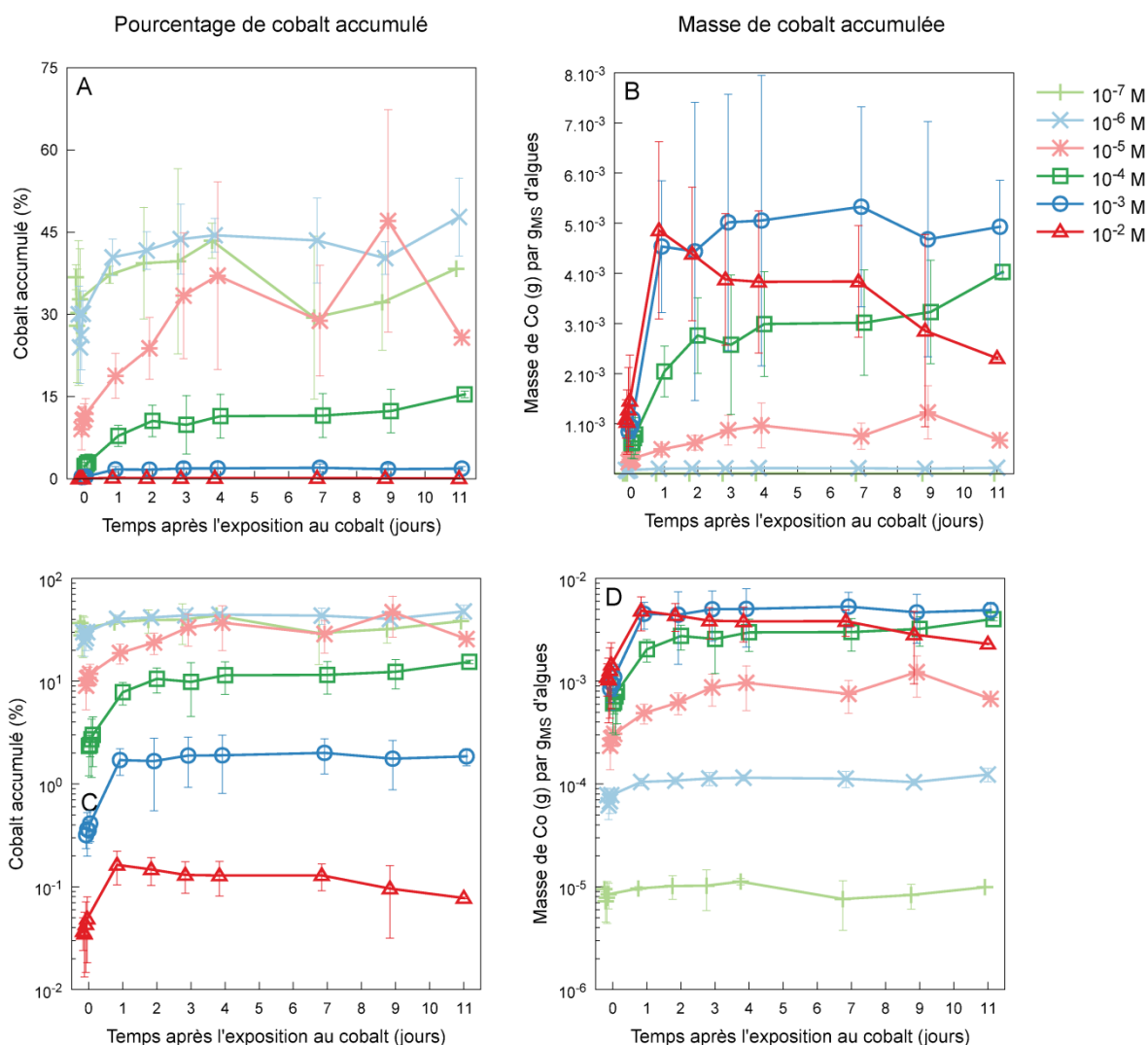


Figure 15 : Cinétiques d'accumulation du cobalt par *C. actinabiotis* pour des concentrations d'exposition comprises entre 10^{-7} et 10^{-2} M Co^{2+} . Les quantités accumulées sont représentées en pourcentage de la quantité de cobalt initialement présente en solution (A, C) et en masse de cobalt dans les algues (B, D). Les axes verticaux sont représentés avec une échelle linéaire (A, B) ou logarithmique (C, D). Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes mesurées lors de trois répétitions de l'expérimentation, les barres d'erreur représentent deux fois l'écart-type. Les données sont légèrement décalées en abscisse pour faciliter la lecture des barres d'erreur.

La Figure 16 représente les vitesses d'accumulation initiales d'argent et de cobalt par les algues en fonction de la concentration des métaux en solution.

La vitesse initiale d'incorporation déterminée pour l'argent est une vitesse par défaut, probablement sous-estimée. Elle est en effet déterminée à partir de la mesure effectuée 5 minutes après l'exposition des algues à $200 \text{ mg}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$ à l'argent. On observe sur la Figure 13 une abrupte rupture de pente autour de ce point pour les algues à $200 \text{ mg}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$ et pour des concentrations d'exposition inférieures ou égales à 10^{-6} M, ce qui suggère que la phase

d'accumulation rapide de l'argent dure en réalité moins de 5 minutes dans ces conditions, le milieu étant probablement rapidement épuisé.

Nous pouvons néanmoins conclure que, dans les conditions des expérimentations, la vitesse initiale d'accumulation de l'argent est au moins 100 fois supérieure à celle du cobalt.

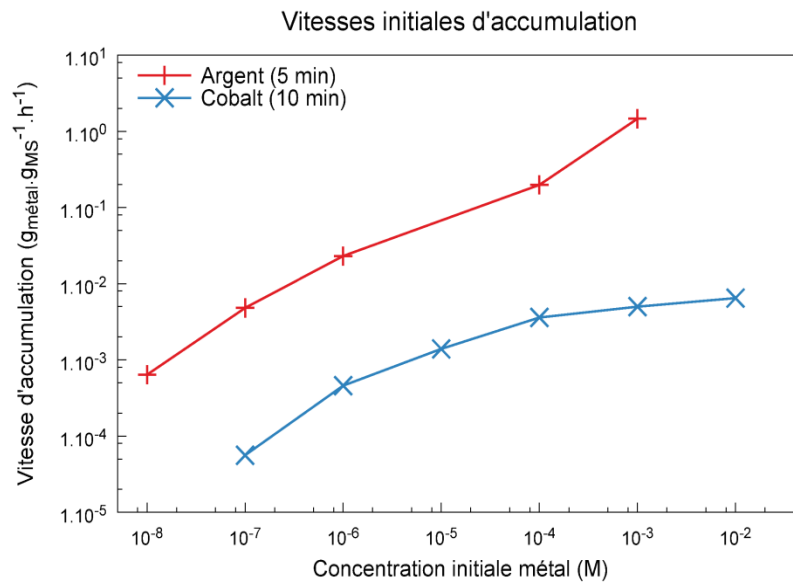


Figure 16 : Vitesses initiales d'accumulation de l'argent et du cobalt par *C. actinabiotis* en fonction de la concentration d'exposition.

Vitesses moyennes calculées sur les 5 premières minutes d'exposition sur des algues à 200 mg_{MF}L⁻¹ pour l'argent ; et sur les 10 premières minutes sur des algues à 2 g_{MF}L⁻¹ pour le cobalt.

B. Quantités de cobalt accumulées

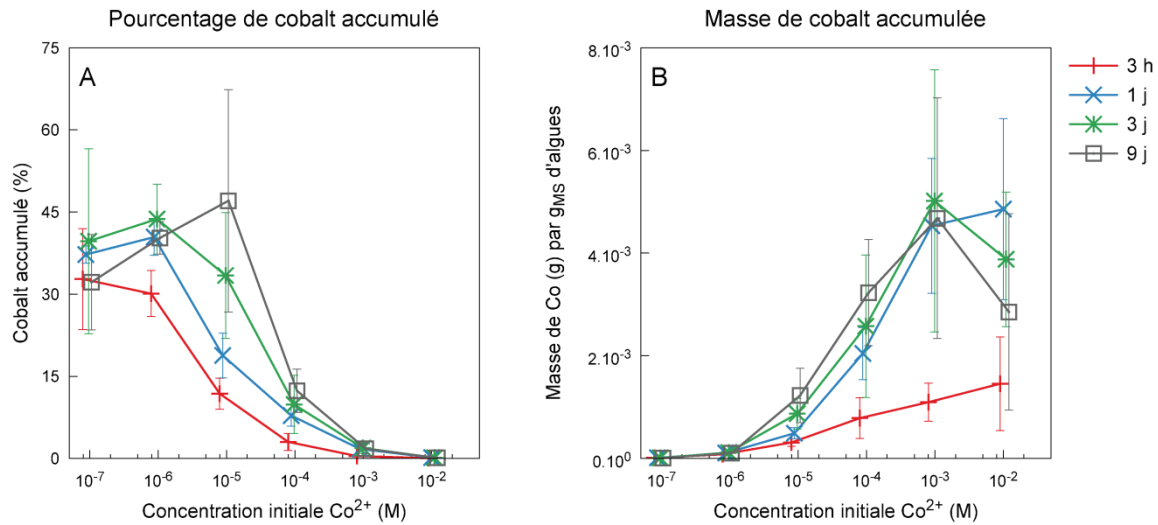


Figure 17 : Cobalt accumulé par *C. actinabiotis* après 3 h, 1 j, 3 j et 9 j d'exposition, en fonction de la concentration de cobalt initialement présente en solution. Les quantités accumulées sont représentées en pourcentage de la quantité de cobalt initialement présente en solution (A) et en masse de cobalt dans les algues (B). Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes mesurées lors de trois répétitions de l'expérimentation, les barres d'erreur représentent deux fois l'écart-type. Les données sont légèrement décalées en abscisse pour faciliter la lecture des barres d'erreur.

La Figure 17 représente les quantités de cobalt accumulées par *C. actinabiotis* en fonction de la concentration de cobalt initialement en solution, après des durées d'exposition de 3 heures, 1 jour, 3 jours et 9 jours. Les données présentées sont les mêmes que celles décrites au paragraphe précédent.

La fraction de cobalt incorporée dans les algues décroît lorsque la concentration initiale augmente : environ 30 à 45 % du cobalt en solution est accumulé par les algues exposées à des concentrations initiales de 10^{-7} et 10^{-6} M Co^{2+} pour des durées comprises entre 3 h et 9 jours, puis elle diminue jusqu'à une valeur de l'ordre de 0,1 % pour les algues exposées 10^{-2} M Co^{2+} sur les mêmes durées (Figure 17-A, Figure 15-C).

La quantité de cobalt accumulée par les algues augmente avec la concentration initiale pour les durées d'exposition de 3 h et 1 jour. Cette tendance est conservée lorsque les algues sont exposées sur des périodes plus longues (3 jours et 9 jours), mais le relargage de cobalt par les algues exposées à 10^{-2} M entraîne une diminution de la quantité de cobalt intracellulaire entre 10^{-3} et 10^{-2} M.

Dans les conditions de l'expérience, les valeurs maximales de cobalt accumulées par

C. actinabiotis sont, dès 24 h d'exposition, de l'ordre de 5 mg Co.g_{MS}⁻¹. Ces valeurs sont de l'ordre des valeurs les plus importantes rapportées dans la littérature pour d'autres micro-algues et pour les plantes supérieures Tableau 8.

Espèce	Concentration maximale rapportée	Référence
Micro-algues		
<i>Pavlova viridis</i> Tseng	1,3 mg Co.g _{MS} ⁻¹	(Chen et al., 1998)
<i>Chlorella salina</i>	0,1 µg Co.g _{MS} ⁻¹	(Garnham et al., 1992) ⁶
Plantes supérieures		
<i>Thlaspi caerulescens</i>	6 mg Co.g _{MS} ⁻¹	(Baker et al., 1994)
<i>Haumaniastrum sp.</i>	4,3 mg Co.g _{MS} ⁻¹	(Brooks, 1977)

Tableau 8 : Quantités maximales rapportées dans la littérature pour l'accumulation du cobalt par des micro-algues et des plantes supérieures

⁶ Garnham *et al.* donnent leur résultats en moles de Co²⁺ par million de cellules. Nous l'avons converti en faisant l'approximation suivante, valable de le cas de *C. actinabiotis* : 1 million de cellules ≈ 1 mg_{MF} ≈ 0,1 mg_{MS}

III. Conclusion

Les cinétiques d'accumulation de l'argent et du cobalt par *C. actinabiotis* ont une allure générale similaire, classiquement observée lors de l'accumulation de métal par des algues. Elles se décomposent globalement en deux phases : une première phase durant laquelle la quantité de métal accumulé par les algues augmente rapidement, suivie d'une seconde phase durant laquelle cette quantité varie peu et plus lentement. Les échelles de temps en jeu sont toutefois nettement différentes pour les deux métaux : tandis que la première phase ne dure que quelques minutes dans le cas de l'argent, elle s'étend sur un à deux jours pour le cobalt. Nos résultats suggèrent que les mécanismes d'incorporation de ces deux métaux dans les cellules sont différents.

Dans le cas du cobalt, une partie seulement des ions Co^{2+} initialement présent dans le milieu est accumulée par les algues. Pour les expositions aux faibles concentrations de cobalt (10^{-7} à 10^{-5} M), la masse de cobalt accumulée dans les cellules au-delà de 24 h d'exposition est proportionnelle à la quantité de cobalt initialement en solution : lorsque l'on augmente la concentration dans le milieu d'un facteur 10, la masse de cobalt par gramme de matière sèche est décuplée (Figure 15-D). Cela suggère un équilibre entre le milieu extérieur et le milieu intracellulaire.

Pour les plus fortes concentrations d'exposition, la masse de cobalt accumulée par gramme de matière sèche est à peu près identique pour toutes les concentrations, et décroît même pour la plus forte. Cela suggère un mécanisme de rejet, la cellule ré-expulsant le métal vers le milieu extérieur au-delà d'une certaine concentration intracellulaire.

Dans le cas de l'argent, les algues fixent la totalité des ions Ag^+ initialement en solution aux faibles concentrations d'exposition (de $2 \cdot 10^{-8}$ à 10^{-5} M, pour des algues à $2 \text{ g}_{\text{MF}} \cdot \text{L}^{-1}$). S'agit-il d'une simple sorption des atomes d'argent, par exemple au niveau du mucilage ou de la paroi des algues ? Les atomes d'argent sont-ils internalisés par un mécanisme de transport passif ? Ou par un mécanisme de transport actif, l'ion Ag^+ pouvant « emprunter » les systèmes impliqués dans le transport du cuivre ?

La fraction d'argent accumulée par les algues diminue lorsque la concentration d'exposition augmente. On observe alors, après la première phase d'accumulation rapide, une seconde phase plus lente durant laquelle la quantité d'argent fixée par les algues continue à augmenter. Cette phase n'est pas saturable, c'est-à-dire que l'accumulation est d'autant plus

importante que la concentration dans le milieu extérieur est élevée (Figure 14). Cette deuxième phase correspond peut-être à un envahissement passif de la cellule, la perméabilité des membranes étant affectée au-delà d'une certaine dose d'argent, ou à une internalisation des atomes d'argent initialement fixés sur les structures externes de la cellule (paroi, mucilage).

La vitesse initiale d'accumulation et la quantité maximale fixée par les algues sont nettement plus importantes pour l'argent que pour le cobalt. Nous avons ainsi mesuré jusqu'à $40 \text{ mg Ag.g}_{\text{MS}}^{-1}$ dans les algues après 2 h d'exposition seulement à des solutions fortement concentrées, tandis que les valeurs maximales que nous avons mesurées pour le cobalt dans des conditions similaires sont d'environ $5 \text{ mg Co.g}_{\text{MS}}^{-1}$ à partir de 24 h d'exposition. Pour les deux métaux, ces valeurs sont parmi les plus importantes rapportées dans la littérature (cf. chapitre Etat de l'art).

L'ensemble de ces observations permettent de supposer que l'accumulation de l'argent ou du cobalt par *C. actinabiotis* relève de mécanismes d'accumulation, ou d'un ensemble de mécanismes d'accumulation, qui sont distincts. Les deux chapitres suivants visent à préciser la nature de ces mécanismes, à travers l'étude de la distribution subcellulaire et de la spéciation des métaux accumulés. Nous allons dans un premier temps nous intéresser à la distribution intracellulaire de l'argent et du cobalt, afin de déterminer s'il y a des compartiments cellulaires où ils s'accumulent préférentiellement. Cette analyse sera abordée à l'aide de techniques d'imagerie basées sur la fluorescence de rayons X et la microscopie électronique.

Chapitre 2 : Distribution subcellulaire
de l'argent et du cobalt accumulés par *C.*
actinabiotis

Les algues mettent en œuvre des mécanismes de détoxification afin de contrôler la concentration des ions métalliques libres dans le cytosol, en particulier lorsque ces concentrations excèdent les besoins métaboliques des cellules. Ces mécanismes peuvent viser à diminuer la quantité de métal accumulée par les algues (complexation extracellulaire par sécrétion de ligands formant des complexes qui ne peuvent pas pénétrer la cellule, excrétion des métaux internalisés) ou à limiter la toxicité des métaux accumulés (complexation à la surface de la cellule, compartimentation subcellulaire dans les vacuoles ou chélation par des polyphosphates, par exemple, pour diminuer la toxicité des métaux) (cf. chapitre Etat de l'art). L'analyse de la distribution subcellulaire des métaux accumulés par les algues apporte ainsi des éléments de réponse sur la nature des mécanismes d'accumulation et de détoxification à l'œuvre.

I. Nano-imagerie par fluorescence de rayons X : une technique de choix pour l'analyse de la distribution subcellulaire des métaux chez *C. actinabiotis*

Différentes méthodes permettent de déterminer la distribution subcellulaire de métaux. Une première approche consiste à séparer le contenu des différents compartiments subcellulaires par fractionnement et à évaluer la concentration en métal dans chacune des fractions. Cette méthode permet par exemple d'isoler le contenu du chloroplaste, du cytosol et des mitochondries chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Klein et al., 1983). Le fractionnement repose sur des méthodes mécaniques (broyage, centrifugation différentielle) et chimiques (perméabilisation sélective de la paroi et des membranes par des enzymes ou des réactifs chimiques) (Berkelman and Lagarias, 1990; Garnham et al., 1992; Hörcsik and Balogh, 2002; Klein et al., 1983; Nagel et al., 1996). Ces méthodes présentent plusieurs inconvénients :

- Les fractions peuvent être contaminées par le contenu d'autres fractions, il est difficile d'obtenir des fractions pures, correspondant à un compartiment subcellulaire unique (Klein et al., 1983).
- Les organites analysés peuvent être endommagés durant les phases de séparation mécanique et être partiellement vidés de leur contenu (Nagel et al., 1996).
- Les méthodes chimiques reposent sur l'utilisation d'enzymes et de réactifs chimiques spécifiques à l'espèce analysée et sont rarement applicables à d'autres

espèces d'algues. De tels réactifs ne sont pas disponibles pour *C. actinabiotis* (Berkelman and Lagarias, 1990; Garnham et al., 1992; Klein et al., 1983)

D'autres méthodes permettent l'observation et la quantification *in situ* des métaux, sans passer par une étape de fractionnement. Des biosenseurs fluorescents permettent d'observer la distribution subcellulaire d'ions libres tels que Ca^{2+} ou Zn^{2+} par microscopie optique à fluorescence (Carter et al., 2014; Park and Palmer, 2014). Ces biosenseurs doivent être spécifiques de l'ion observé et il n'en existe pas, à notre connaissance, qui soient adaptés à l'observation directe de l'argent ou du cobalt (la présence de Co^{2+} désactive la fluorescence de la calcéine liée à des ions Ca^{2+} , mais il est difficile d'utiliser cette propriété pour localiser le cobalt) (Johnson, 2010; Oku et al., 1982).

La distribution des métaux peut enfin être analysée par des méthodes d'imagerie chimique : une sonde (par exemple des rayons X) dont la résolution spatiale est inférieure à la dimension de l'échantillon est utilisée pour balayer l'échantillon et acquérir des spectres en plusieurs points, permettant de réaliser des cartographies de la distribution de l'élément étudié. Plusieurs méthodes reposent sur ce principe : la micro ou nano fluorescence X (μXRF ou nXRF), la micro PIXE (*particle-induced X-ray emission* ou *proton-induced X-ray emission*), la spectroscopie de masse à ionisation secondaire (SIMS, pour *secondary ion mass spectroscopy*), l'ablation laser couplée à d'autres méthodes analytiques ou encore la microscopie électronique couplée à la spectroscopie par perte d'énergie d'électron (EELS, pour *electron energy loss spectroscopy*) ou à l'analyse dispersive en énergie de rayons X (EDS ou EDX, pour *energy dispersive X-ray spectroscopy*). Plusieurs auteurs décrivent le principe de fonctionnement de ces techniques et comparent leurs performances pour une utilisation sur du matériel biologique (Lombi et al., 2011; Ortega, 2005; Sarret et al., 2013).

La comparaison de ces techniques repose sur trois critères principaux : la résolution spatiale des sondes disponibles, leur sensibilité et le type d'échantillon qui peuvent être analysés (tissus, cellules entières, ou coupes minces ultrafines comme en microscopie électronique). Tenant compte de ces critères, nous avons choisi d'analyser la distribution subcellulaire de l'argent et du cobalt accumulés par *C. actinabiotis* par imagerie de fluorescence X (XRF). La XRF est une technique d'analyse élémentaire⁷ qui permet la

⁷ La XRF permet d'identifier et de quantifier des éléments chimiques, pas des molécules. Si par

quantification simultanée de tous les atomes dont le numéro atomique Z est supérieur à 11-13 environ ; elle permet donc, en plus de l'argent et du cobalt, d'analyser des éléments endogènes des algues. Les rayons X utilisés pour sonder l'échantillon peuvent provenir de différents types de sources (source radioactive, tube à cathode chaude ou rayonnement synchrotron par exemple). Les améliorations de l'énergie et de la brillance des rayonnements synchrotron permettent de nos jours d'analyser des cellules entières, à l'air ambiant, avec peu de préparations préalables. Nous avons réalisé nos mesures sur la ligne de lumière ID22 de l'*European synchrotron radiation facility* (ESRF), dont les optiques de focalisation permettent de sonder la composition élémentaire des algues avec une résolution spatiale de 100 nm x 100 nm. Le principe de fonctionnement de l'imagerie par XRF est décrit dans l'Annexe 12.

II. Article

Nous avons quantifié la distribution de l'argent, du cobalt et de certains éléments endogènes chez des cultures de *C. actinabiotis* exposées à différentes concentrations d' Ag^+ ou de Co^{2+} , ainsi que chez des cultures témoins (algues non exposées aux métaux). Ces analyses ont été réalisées par imagerie XRF et ont été complétées par des observations en microscopie électronique en transmission couplées à des analyses EDS et par des observations en microscopie optique à fluorescence.

Nous reproduisons ci-après l'article *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*, publié dans la revue *Metallomics* en février 2014, qui rend compte des résultats obtenus.

La démarche, les contraintes et la mise en œuvre du traitement des données acquises par XRF sont précisées dans l'Annexe 13.

Les mesures XRF ont été acquises sur la ligne de lumière ID22 de l'ESRF. Peter Cloetens (ESRF, Grenoble) et Rémi Tucoulou (ESRF, Grenoble) nous ont aidés à mettre en œuvre ces mesures. Sylvain Bohic (ESRF/INSERM, Grenoble) nous a conseillé pour la

exemple on mesure la quantité d'atomes de phosphore dans un échantillon, la XRF seule ne permet de déterminer si ces atomes appartiennent à des molécules de phosphate.

préparation des échantillons et s'est chargé de l'étape de cryofixation des algues.

Les observations en microscopie électronique ont été réalisées au Centre Technologique des Microstructures (CT μ), à l'université Lyon 1. Après que nous leur ayons transmis les échantillons fixés, Annie Rivoire (CT μ) et Christelle Boulé (CT μ) ont réalisé leur inclusion, les coupes en ultra-microtomie et les observations en microscopie électronique.

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées en collaboration avec Jérôme Vial (ESPCI/LSABM).

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*†

Cite this: *Metallomics*, 2014, 6, 316

T. Leonardo,^{abcde} E. Farhi,^e A.-M. Boisson,^{abcd} J. Vial,^f P. Cloetens,^g S. Bohic^{gh} and C. Rivasseau^{*abcd}

The newly discovered unicellular micro-alga *Coccomyxa actinabiotis* proves to be highly radio-tolerant and strongly concentrates radionuclides, as well as large amounts of toxic metals. This study helps in the understanding of the mechanisms involved in the accumulation and detoxification of silver and cobalt. Elemental distribution inside *Coccomyxa actinabiotis* cells was determined using synchrotron nano X-ray fluorescence spectroscopy at the ID22 nano fluorescence imaging beamline of the European Synchrotron Radiation Facility. The high resolution and high sensitivity of this technique enabled the assessment of elemental associations and exclusions in subcellular micro-algae compartments. A quantitative treatment of the scans was implemented to yield absolute concentrations of each endogenous and exogenous element with a spatial resolution of 100 nm and compared to the macroscopic content in cobalt and silver determined using inductively coupled plasma-mass spectrometry. The nano X-ray fluorescence imaging was complemented by transmission electron microscopy coupled to X-ray microanalysis (TEM-EDS), yielding differential silver distribution in the cell wall, cytosol, nucleus, chloroplast and mitochondria with unique resolution. The analysis of endogenous elements in control cells revealed that iron had a unique distribution; zinc, potassium, manganese, molybdenum, and phosphate had their maxima co-localized in the same area; and sulfur, copper and chlorine were almost homogeneously distributed among the whole cell. The subcellular distribution and quantification of cobalt and silver in micro-alga, assessed after controlled exposure to various concentrations, revealed that exogenous metals were mainly sequestered inside the cell rather than on mucilage or the cell wall, with preferential compartmentalization. Cobalt was homogeneously distributed outside of the chloroplast. Silver was localized in the cytosol at low concentration and in the whole cell excluding the nucleus at high concentration. Exposure to low concentrations of cobalt or silver did not alter the localization nor the concentration of endogenous elements within the cells. To our knowledge, this is the first report on element co-localization and segregation at the sub-cellular level in micro-algae by means of synchrotron nano X-ray fluorescence spectroscopy.

Received 1st October 2013,
Accepted 5th December 2013

DOI: 10.1039/c3mt00281k

www.rsc.org/metallomics

^a CEA, IRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, F-38054 Grenoble, France

^b CNRS, UMR5168, F-38054 Grenoble, France

^c Université Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, France

^d INRA, F-38054 Grenoble, France. E-mail: corinne.rivasseau@cea.fr; Fax: +33 438785091; Tel: +33 438782404

^e Institut Laue-Langevin, Division Science, Grenoble F-38042, France

^f ESPCI-ParisTech, UMR7195, Paris F-75231, France

^g European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), BP220, Grenoble F-38043, France

^h Inserm U-836, Team 6, Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicales, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble F-38042, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3mt00281k

Introduction

Many metals such as iron, copper, zinc and cobalt are vital for all living organisms as they are involved in many biological processes. Their concentration is usually tightly regulated and any deficiency or excess can cause cellular damage. Cobalt is involved in coenzymes as the active center of cobalamins, among which is vitamin B₁₂. Though being a physiological metal, cobalt may become toxic at high concentrations. In plants, high cobalt concentrations induce chlorosis and low concentrations also result in a reduction in biomass and chlorophyll content, a decrease in the Hill reaction activity and an increase in peroxidase activity.¹ In the marine micro-alga *Pavlova viridis*, cobalt was shown to increase lipid peroxidation, indicating oxidative damage, and glutathione content, as well as to stimulate the activity of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase.² Conversely, silver is a non-physiological metal used as algicide and bactericide due to its toxicity toward living organisms at very low concentration. It inhibits the growth of the micro-alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a 50% effective concentration (EC₅₀) below 20 nmol L⁻¹.³ It ranks among the most toxic metal class together with cadmium, surpassed only by mercury.⁴ Silver generates an oxidative stress, producing reactive oxygen species, inactivating respiration enzymes⁵ and inducing metallothionein transcription.⁶

A unicellular green micro-alga called *Coccomyxa actinabiotis* with amazing properties was recently isolated from a nuclear facility.⁷ Apart from displaying exceptional resistance to ionizing radiation for a eukaryote, it is also able to accumulate large amounts of toxic metals. Accumulation of up to about 200 mg of silver per g of dry weight (DW) and 15 mg of cobalt g_{DW}⁻¹ was obtained, at the same order or above the extreme values reported.^{4,8} A maximum concentration of 300 mg Ag g_{DW}⁻¹ has been reported in bacteria⁹ and 6 mg Co g_{DW}⁻¹ in the zinc hyper accumulator *Thlaspi caerulescens*.¹⁰ Algae, like plants, can chelate and immobilize metal contaminants on their surface, as well as incorporate and sequester them in the cytosol or in vacuoles, changing their speciation into less toxic forms.^{11,12}

Resolving the subcellular distribution of cobalt and silver is essential to understand the mechanisms involved in their accumulation and detoxification in the micro-alga *Coccomyxa actinabiotis*. *C. actinabiotis* cells are ellipsoids measuring about 7 μm × 3.5 μm. Elemental subcellular localization at this scale requires appropriate tools.

Subcellular localization in unicellular micro-algae can be performed through the determination of the element content in different fractions obtained by chemical or mechanical fractionation of the cells. The subcellular distribution of cadmium in *Chlamydomonas reinhardtii*¹³ and calcium in *Mesotaenium caldariorum*¹⁴ were thus studied. However, the method requires, prior to separation of organelles by differential centrifugation, the preparation of protoplasts using enzymes which are specific to each species.^{14,15} Moreover, the chloroplast fraction may be contaminated by mitochondrial and cytoplasmic fractions¹⁵ and chloroplasts may be considerably damaged, leading to the underestimation of the element content.¹³ Mechanical cell disruption

was also used prior to centrifugation to study the intracellular distribution of chromium in *Chlorella pyrenoidosa*.¹⁶ Last, the intracellular localization of cobalt, manganese and zinc in *Chlorella salina* was assessed by differentially extracting the metal pools from cell compartments after cell permeabilization using specific reagents.¹⁷ Probably due to this specificity, this method was not suited to the compartmental differential extraction of cobalt in *Coccomyxa actinabiotis*, as shown by preliminary experiments.

Other micro-analytical techniques are hence currently employed, enabling the *in situ* imaging and quantification of chemical elements in single cells. These chemical imaging techniques are attractive for studying sub-cellular distribution because the chemical information and the spatial information are measured simultaneously. Spatially resolved techniques are however less common and mostly rely on highly sophisticated and complex instrumentation. They have been recently reviewed and their performances compared.^{18–20} They include electron microscopy associated with X-ray microanalysis such as energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) and electron energy loss spectrometry (EELS), nuclear microprobe analysis by particle-induced X-ray emission (micro-PIXE), synchrotron radiation microprobe by micro X-ray fluorescence (μXRF or SR-μXRF), secondary ion mass spectrometry (SIMS) and laser ablation. The spatial resolution of these techniques is of the order of 1 μm, except for techniques associated with electron microscopy whose resolution is nanometric. Despite their unsurpassed spatial resolution, the drawback of the electron microscopy techniques is the ultrathin sample section needed and their poor sensitivity with detection limits above 100 μg g⁻¹, whereas μXRF and SIMS detection limits are at the 0.1 μg g⁻¹ level or below. The medical field is an important application field¹⁹ especially for the study of the subcellular distribution of anticancer drugs in human cells *via* platinum, gallium, iodine or boron localization.¹⁸ Concerning cobalt in particular, its distribution was studied in keratinocytes using scanning transmission ion microscopy (STIM), PIXE and backscattering spectrometry (BS).²¹

SR-μXRF is attractive for studying sub-cellular distribution because this multi-element spectroscopy technique allows co-localization or segregation studies, with a high sensitivity, and is quantitative. In the hard X-ray range, analysis can be conducted in air, which means little sample preparation. It is also non-destructive provided that collecting times are not too long.²² Although the potential of SR-μXRF has been demonstrated for analyzing plant tissues since the late 1990s, there are still few studies on plants and algae, probably because of limited availability to synchrotron facilities. Such applications reveal the distribution of cadmium, zinc, selenium, arsenic, copper, manganese, cobalt, *etc.* at the plant level.^{20,22,23} Study of cobalt and zinc distribution in the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* showed a preferential localization of cobalt near leaf tips/margins;²⁴ differential zinc partitioning between the veins and the leaf tissue was evidenced;²⁵ cadmium was shown to localize in vascular bundles of plant roots and in trichomes (epidermal hairs) of leaves.²⁶ No study relates silver distribution in plant. Moreover, the micrometric spatial resolution of μXRF is not adapted to the micro-algae size.

Recent development of high brilliance and high energy synchrotrons, coupled with advances in manufacturing of focusing optics, has led to significant improvement in sub-micrometer probes for spectroscopy and imaging applications.¹⁹ The access to K-absorption edges and XRF emission lines of most elements, and the high penetration depth of hard X-rays allow imaging of thick samples and *in situ* experiments. The ID22 beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) now offers high spatial resolution with sub-micrometer focusing, below 100 nm, and a very high X-ray flux, up to 10^{12} photons s^{-1} .^{27,28}

Until now, *in situ* elemental distribution in micro-algae is hardly studied due to the lack of adapted techniques in terms of sensitivity and spatial resolution. Only one group reports elemental subcellular localization in unicellular micro-algae.^{29,30} Electron energy loss spectroscopy (EELS) and electron spectroscopic imaging (ESI) were applied to measure intracellular distribution of chromium and other elements in *Micrasterias Denticulata* with nanometer resolution. The drawback of this technique however is its poor sensitivity, as mentioned above.

To investigate the mechanisms involved in cobalt and silver tolerance and accumulation, *Coccomyxa actinabiotis* imaging was hence performed at the ID22 imaging beamline at the European Synchrotron Radiation Facility whose resolution was adapted to the size of the cells. This is the first report of the use of SR nano XRF to determine elemental distribution in micro-algae. The high resolution and high sensitivity of the technique enabled the assessment of elemental associations and segregations in subcellular compartments. A quantitative treatment of the scans was implemented to determine the element concentrations in cells and compared to the macroscopic determination of cobalt and silver using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). In order to get deeper insight into the mechanisms involved in silver accumulation in the micro-alga, SR nano XRF was complemented by transmission electron microscopy coupled to X-ray micro-analysis, yielding differential silver distribution in the cell wall, cytosol, nucleus, chloroplast and mitochondria with unique resolution.

Materials and methods

Biological material and growth conditions

The unicellular micro-alga *Coccomyxa actinabiotis* used in this study is described by Rivasseau *et al.*⁷ Micro-algae were grown in a modified Bold Basal Medium (BBM) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) culture solution diluted twice with ultrapure Milli-Q water (MilliQ filtration system, Millipore, Molsheim, France). The cultures, corresponding to a 150 mL volume, were grown in 800 mL round-bottom flasks, aerated on an orbital shaker (Innova 2300, New Brunswick Scientific, Enfield, CT) at 100 rpm, at a temperature of 21 °C, under a continuous illumination of 70 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. They were regularly sub-cultured to maintain cell growth. All experiments were performed with micro-algae harvested in the growing phase.

Sample preparation

Subcellular distribution of endogenous and exogenous elements was determined in different samples, including control micro-algae, micro-algae exposed to cobalt and micro-algae exposed to silver.

After cultivation, all micro-algae samples were harvested by centrifugation at 2000g for 5 min, at 4 °C, and washed twice by re-suspending them in ultrapure water prior to centrifugation (2000g, 5 min, 4 °C) to remove external elements originating from the culture medium.

Control micro-algae samples. Different control samples were prepared. Control 1 consisted of micro-algae suspended in BBM diluted 10 times with ultrapure water for 15 h. It corresponded to the sample exposed to the high silver concentration. Controls 2A and 2B (corresponding to two biological replicates) consisted of micro-algae suspended in ultrapure water for 48 h. Controls 2A and 2B corresponded to the sample exposed to the low cobalt concentration.

Micro-algae exposure to cobalt and silver metallic ions. To examine the distribution of Co and Ag, micro-algae were suspended at a concentration of 8.5×10^6 cell mL^{-1} in CoCl_2 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, plant cell culture tested, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) or AgNO_3 ($\text{AgNO}_3 \geq 99.9\%$, Roth, Karlsruhe, Germany) solutions at different concentrations.

For nano X-ray fluorescence analysis of Co distribution, they were exposed for 48 h in the light to 10^{-5} mol L^{-1} of CoCl_2 in ultrapure water (Co 10^{-5} M sample) and to 10^{-3} mol L^{-1} of CoCl_2 in BBM diluted 10 times with ultrapure water (Co 10^{-3} M sample). For nano X-ray fluorescence analysis of Ag distribution, micro-algae were exposed for 15 h in darkness to 10^{-6} mol L^{-1} of AgNO_3 in ultrapure water (Ag 10^{-6} M A and B samples, corresponding to two biological replicates), to 10^{-3} mol L^{-1} of AgNO_3 in ultrapure water (Ag 10^{-3} M sample) and to 10^{-2} mol L^{-1} of AgNO_3 in BBM diluted 10 times with ultrapure water (Ag 10^{-2} M sample). The media, namely pure water for the lower metal concentrations and BBM diluted 10 times for the upper metal concentrations, were selected so that the micro-algae were exposed to the chemical forms Co^{2+} and Ag^+ with a minimal supply of nutrients when possible.

For transmission electron microscopy analysis, micro-algae were exposed for 2 h to 10^{-2} and 10^{-4} mol L^{-1} of AgNO_3 in ultrapure water.

After given exposure time, aliquots were taken from each sample to determine the metal concentration fixed by micro-algae using ICP-MS and to examine the subcellular distribution of Co, Ag and endogenous elements using transmission electron microscopy or nano X-ray fluorescence techniques. Prior to these analyses, all samples were washed twice with ultrapure water and centrifuged at 2000g for 5 min.

Transmission electron microscopy coupled with X-ray micro-analysis (TEM-EDS)

Micro-algae exposed to 10^{-2} and 10^{-4} mol L^{-1} of silver and controls were fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 mol L^{-1} cacodylate buffer for 1 h at room temperature. Samples were

then washed three times with 0.2 mol L⁻¹ cacodylate buffer, stored at 4 °C for one day, dehydrated in ethanol and infiltrated with an ethanol–Epon mixture. Ultrathin sections (60 nm) were prepared with a diamond knife on a Leica UC7 ultra-microtome (Leica, Solms, Germany) and placed on formvar-coated copper grids. Half ultrathin sections were post-stained with osmium tetroxide, uranyl acetate and lead citrate; while the other half were post-stained with osmium tetroxide only, in order not to hinder silver response analysis.

Ultrathin sections were observed using a Philips CM120 transmission electron microscope (TEM) operated at 80 kV for organelle identification, and using a JEOL 2100F Scanning transmission electron microscope (STEM) coupled with a SDD Oxford X-Max 80 mm² detector operated at 200 kV for energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis. The analyses were performed at the Centre Technologique des Microstructures – Plateforme de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Synchrotron radiation nano X-ray fluorescence (SR-nXRF)

An aliquot of 10⁵ cells in 10 µL was allowed to sediment on 3 × 3 mm² silicon nitride plates (Silson, Blisworth, UK), quickly cryofixed at -160 °C by plunge freezing into isopentane chilled with liquid nitrogen and further freeze-dried at -80 °C. This protocol was preferred to chemical fixation because it preserves the subcellular structures and chemical distribution in the cells, thus allowing *in situ* observations of elemental distribution.¹⁹ An optical microscope equipped with a camera was used to select cells of interest, record their pictures and perform preliminary organelle recognition.

Nano XRF measurements were carried out at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) nano-imaging station ID22NI, which is dedicated to hard X-ray micro-fluorescence, micro-imaging and micro-diffraction experiments. The beam-line station was configured as described by Kosior *et al.*²⁸ Silicon nitride plates were mounted in air, at room temperature, on a piezo nano-positioner platform, in the X-ray beam focal plane, where the X-ray beam was focused down to 80 nm vertically and horizontally, with a flux ranging from 1.3 to 3.5 × 10¹¹ photon s⁻¹ at an energy of 29 keV. Alignment of samples with the beam was first performed using an optical microscope mounted camera, and refined with a fast X-ray scan. Algae were bi-dimensionally scanned, in a plane perpendicular to the beam, by 100 nm steps. A fluorescence spectrum was recorded at each position, with a dwell time per scan ranging from 500 ms to 1 s.

Several algal cells were analyzed in each sample: 4, 1 and 5 cells in Control 1, Control 2A and Control 2B, respectively, 5 cells in each of the samples exposed to 10⁻⁵ mol L⁻¹ and 10⁻³ mol L⁻¹ of Co²⁺, and 5, 3, 4 and 8 cells in samples exposed, respectively, to 10⁻⁶ mol L⁻¹ (replicates A and B), 10⁻³ mol L⁻¹ and 10⁻² mol L⁻¹ of Ag⁺.

Quantitative mapping of elements

Fluorescence spectra for each pixel were analyzed using the PyMCA software,³¹ which allows interactive as well as batch quantitative fitting of large data sets. Fluorescence spectra of each cell were normalized by the photon flux measured during

acquisition and by the dwell time, detector dead time was corrected, and quantitative analyses were calibrated using the National Institute of Standards and Technology's Standard Reference Material 1577b (bovine liver) as standard. K-fluorescence lines were used to map elements. Fitting parameters were adjusted using interactive fitting on a couple of samples, and then used for batch fitting. For each XRF spectrum, PyMCA provides the count of detected photons for each element, and the corresponding mass fractions per pixel. This last output was converted into element mass per pixel, and plotted as bi-dimensional maps using a Python script. This conversion allows comparing values between elements, which is rather difficult when considering fluorescence photon counts since every element has a particular fluorescence yield.

For each cell, a mask identifying the pixels located inside the cell was created, based on the distribution of elements that highlight the cell boundaries (usually K, or Ag for algae exposed to silver concentrations equal to or above 10⁻³ mol L⁻¹). These masks were validated by comparison with optical microscope pictures previously taken. For each cell and each element, element's mass per cell (in g cell⁻¹) was computed by summing the masses of the element over all the pixels belonging to the previous mask, *i.e.* located inside the cell. The element masses per cell were finally normalized to an average cell size (for a given cell, the calculation was performed as follows: normalized element mass per cell = (element mass per cell/cell area) × mean area of all the studied cells). In each sample, the mean value of the normalized mass for each element was calculated (Fig. 4). Mean values of each element were statistically compared among samples (Fig. S3, ESI†). For each element, the homogeneity of the samples' variance was assessed using four different tests (Barlett, Levene, Brown–Forsythe and O'Brien). The means of the samples were then compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) for samples with homogeneous variances and using a Welch's test otherwise. The significance level of all the tests was set to 5%.

The quantity of silver fixed to the mucilage was assessed for cells exposed to 10⁻³ mol L⁻¹ and 10⁻² mol L⁻¹ of Ag⁺. Silver bi-dimensional maps of these cells reveal the mucilage planar projection around the cell when plotted with a logarithmic color-scale, hence allowing selecting the pixels which constitute the mucilage and summing the mass of silver over them. Silver concentration in this mucilage projection was extrapolated to all the mucilage volume. This mass was then divided by the total silver mass in the cell to estimate the proportion of silver fixed to the mucilage.

To assess the volume concentration of various elements in subcellular compartments, in g µm⁻³, the masses of the elements were summed over the pixels constituting the compartment and divided by its volume. The volume of each compartment is equal to its surface (in µm²) multiplied by its thickness, which was set equal to the cell average thickness (3.5 µm). Volume concentrations are given in the text as the means of the values obtained for each cell in the considered sample ($n = 1$ to 8) ± standard deviation.

These computations were performed using Matlab and the iFit library, which facilitates the loading, data processing, analysis, plotting and export of diverse data formats.³²

Sub-cellular distribution analysis

Principal component analysis (PCA)³³ and hierarchical clustering analysis (HCA)³⁴ were carried out to assess the subcellular co-localization of elements. Nine to ten elements of interest were assessed: Cl, Cu, Fe, K, Mn, Mo, P, S, Zn and Ag or Co when applicable. Pre-processing was performed using Matlab and the iFit library. For each element, photon count maps obtained from PyMCA were loaded, smoothed using a Savitzky–Golay filter, normalized by their maximum value, the previously computed mask of the cell was applied to remove data from pixels located outside the cell, data were thresholded so that pixels under half the maximum value were set to 0 (Fig. 1), and the resulting matrix was vectorized to a single-column vector. Finally, all the vectors obtained for a given cell (one per element) were concatenated into a matrix, and all the matrices obtained for cells belonging to the same sample were concatenated to obtain a merged data set for each sample. PCA was performed using the R software and the ade4 library,³⁵ both on individual cells and on sample data sets. The data were centered and scaled by their standard deviation in order to give all the elements the same importance; the elements of interest were used as variables and the set of pixels inside the cells as individuals.

The loadings of the variables on all the principal components were then used to perform cluster analysis and classify the variables. HCA was performed using the R software, with a similarity measure based on the Euclidean distance and a single linkage clustering method.³⁴ This representation yielded co-localization and exclusion of various elements.

Fluorescence microscopy

The nucleus and chloroplast of control algae were visualized using fluorescence microscopy. Nuclei were stained using DAPI by incubating 45 μL of algal solution with 5 μL of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of DAPI solubilized in 2% Triton for 10 min, in the dark, at 21 °C. After incubation, 50 μL of 0.3% (m/v) agarose gel at room temperature were shaken and added to thicken the mixture

in order to limit the cell motion during observations. The suspension obtained was placed between a slide and slip cover and observed using a Zeiss AxioCam fluorescence microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) equipped with a 100 \times immersion objective and a video camera. Cell nuclei were visualized using a DAPI filter, and chloroplasts were visualized thanks to their auto-fluorescence using a FITC filter.

ICP-MS measurements

After micro-algae exposure to metal solutions, Ag and Co uptake by algae was quantified both directly and indirectly using an inductively coupled plasma-mass spectrometer (Hewlett-Packard 4500 Series, Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a Babington nebulizer and a Peltier-cooled double-pass Scott spray chamber as previously described.³⁶ Micro-algae were separated from incubation solutions by centrifugation at 2000g at room temperature for 4 min. The supernatant was sampled for indirect ICP-MS measurement of metal uptake by quantifying the residual Ag and Co concentration in the incubation solutions, especially at low metallic ion concentrations. For direct metal uptake assessment, the micro-algae pellet was quickly washed twice with ultrapure MilliQ water to remove interstitial incubation solution and centrifuged at 2000g at room temperature. Micro-algae were mineralized to dryness at 170 °C in 5 mL of concentrated HNO_3/HCl (2/1, v/v) (Suprapur[®] HNO_3 and Suprapur[®] HCl , Merck, Darmstadt, Germany). The residue was recovered in 1% HNO_3 (v/v) after preliminary dissolution in 10% HNO_3 (v/v). This step was repeated to ensure the complete recovery of the target elements. Ag and Co concentration in the resulting solutions was determined using ICP-MS after appropriate dilution in 1% HNO_3 . The apparatus was calibrated at m/z 59 for Co and 107 and 109 for Ag using standard solutions (Analab, Hoenheim, France) in 1% HNO_3 . Assessment of Ag and Co concentration in the initial incubation solutions enabled us to check the complete recovery of metals. Each experiment was performed in triplicate.

Results and discussion

Control micro-algae samples

Subcellular localization and association of endogenous elements.

SR-nXRF was used to determine the subcellular distribution of endogenous elements in control *Coccomyxa actinabiotis* micro-algae and to quantify them. Nine elements were above the detection limit and could be analyzed. Analysis of each algal cell was performed within half an hour. Four, one and five different micro-algae were scanned in Control 1 exposed to the minimal nutritive medium and in Control 2A and 2B exposed to water, respectively. All of them presented similar distribution patterns. Resulting elemental maps of three of these algae are presented in Fig. 2, Fig. S1 and S2 (ESI[†]), as well as the optical microscope picture taken prior to SR-nXRF analysis.

Elements appear to have specific distribution patterns, some of them being partially or entirely co-localized, or in contrast segregated. Based on these patterns, elements can be divided into three groups: iron has a unique distribution; zinc,

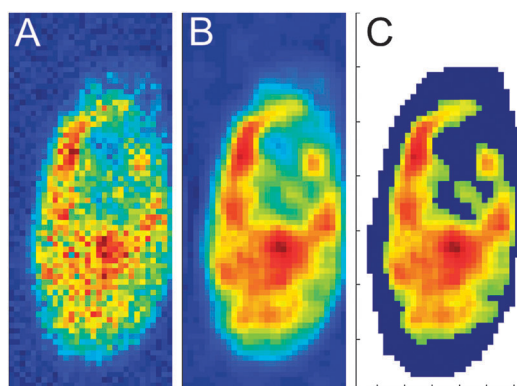


Fig. 1 Data processing prior to principal component analysis. (A) Raw output from PyMCA software; (B) data are smoothed by applying a Savitzky–Golay filter; (C) pixels outside the cell area are discarded (white), data are normalized by the maximum value and pixels under half the maximum value are set to zero (blue). PCA is applied to the resulting data set.

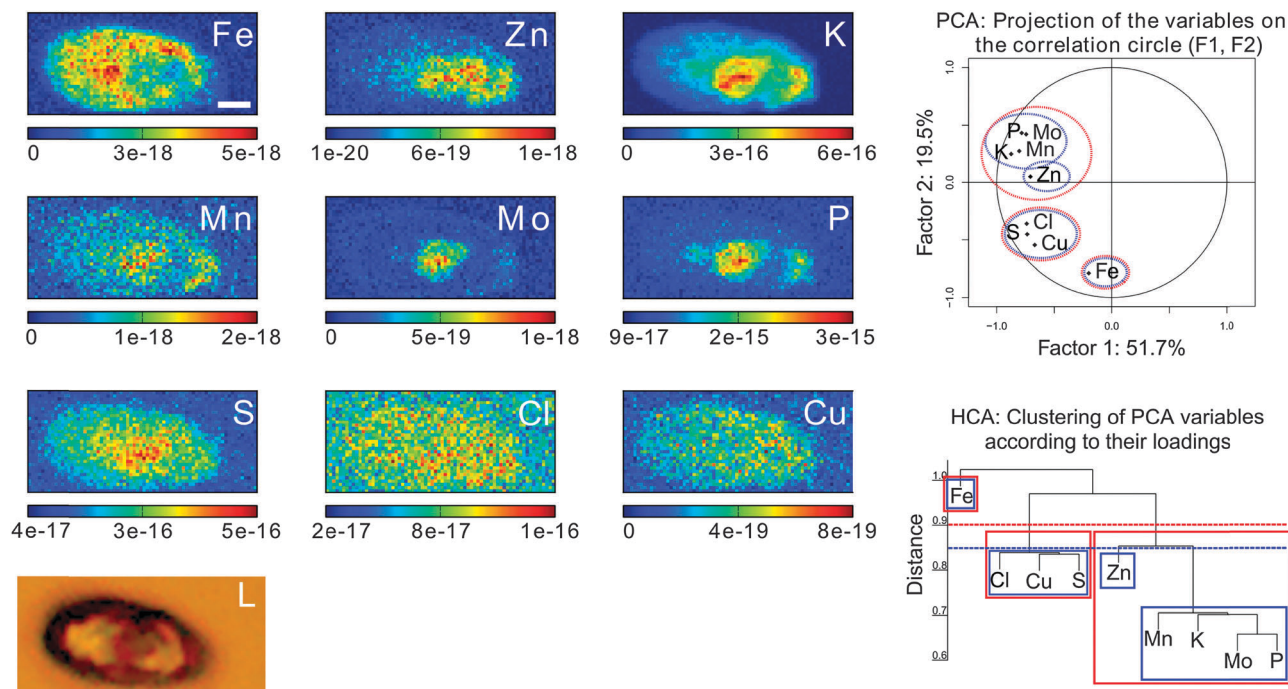


Fig. 2 Elemental distribution and abundance determined using SR-nXRF in a control micro-alga. The micro-alga originates from Control 1. Experiments were performed on beamline ID22NI at ESRF. (Fe), (Zn), (K), (Mn), (Mo), (P), (S), (Cl), (Cu): respective SR-nXRF quantitative distribution maps of the elements. The color bar indicates intensities in g pixel^{-1} ; each pixel is $100 \text{ nm} \times 100 \text{ nm}$. The white scale bar in the Fe map represents $1 \mu\text{m}$. (L): light microscopy picture of the analyzed cell. (PCA): projection of the variables used for PCA in the factor plane obtained with the first and second principal components. The PCA was performed on a data set representing all the analyzed cells in Control 1. The color circles show the clustering resulting from the HCA (HCA): hierarchical clustering analysis performed on the loadings of the elements on all the principal components. The horizontal lines and corresponding color boxes indicate threshold distances and their corresponding clusters.

potassium, manganese, molybdenum, and phosphate have their maxima located in the same area; and sulfur, copper and chlorine are almost homogeneously distributed throughout the whole cell (Fig. 2).

Iron is an essential micro-nutrient for chlorophyll containing cells, notably involved in photosynthesis as a redox-active metal. Chloroplasts contain up to 80% of the cellular iron, which is consistent with its major function in photosynthesis.^{37–39} Iron distribution is therefore a good indicator of the chloroplast's

location in the observed cell. The localization of the chloroplast thus obtained matches the fluorescence microscopy and TEM observations showing that each *C. actinabiotis* cell contains one chloroplast, which occupies the major part of the cell volume (Fig. 3).

Iron and zinc are segregated and complementary. Taken together, their distributions define the whole cell area, excluding the cell wall (Fig. 2, Fig. S1 and S2, ESI[†]). Zinc is therefore essentially located outside the chloroplast, which is consistent

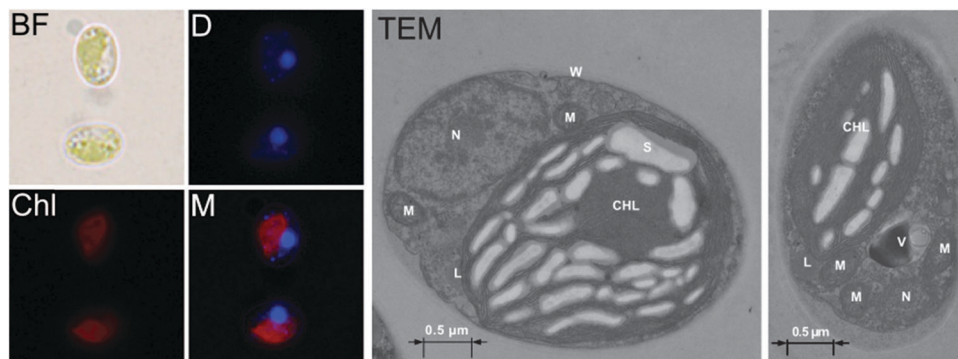


Fig. 3 Control micro-algae observed using fluorescence and transmission electron microscopy. (BF): bright field optical microscopy; (D): DAPI staining fluorescence; (Chl): chloroplast auto-fluorescence; (M): (BF), (D) and (Chl) channels merged. The black scale bar in BF represents $1 \mu\text{m}$. Cells were observed with a $100\times$ immersion objective. (TEM): transmission electron microscopy. Cells contain a nucleus (N), a chloroplast (CHL), mitochondria (M), lipid droplets (L), starch granules (S), cell wall (W) and vacuoles (V).

with its biological role in plants. More than 1200 proteins are predicted to contain, bind or transport zinc in higher plants, forming the largest group of essential micronutrients–proteins. Zinc enzymes are implied in many plant cell essential functions, most of which take place outside the chloroplast: protein synthesis, energy production, DNA-transcription, RNA-processing and translation, *etc.*³⁸ Zinc proteins also play an important role in chloroplast but their amount in chloroplast is probably negligible compared to the zinc content in other compartments.

Potassium is detected in the whole cell, with higher concentrations in the same area as zinc. In brain PC12⁴⁰ and keratinocyte²¹ cells, potassium is known to be homogeneously distributed. Here, it appears to be less concentrated in the chloroplast than in the cytosol. Furthermore, the low concentrations which appear to be co-localized with iron might not come from the chloroplast itself, but from the surrounding cytosol, since the maps represent the planar projection of the whole cell volume.

Manganese, molybdenum and phosphate are more specifically located, and their maxima are co-localized with potassium's (Fig. 2, Fig. S1 and S2, ESI[†]). Calculations based on fractionation studies performed with *Chlorella salina*, a green unicellular micro-alga, assessed manganese concentration to be ten times higher in the vacuole than in the cytosol.¹⁷ In brain PC12 cells, manganese has been reported to accumulate in the nucleus when added to the culture medium,⁴¹ and to locate in the Golgi apparatus under physiological growth conditions.⁴² Molybdenum subcellular distribution, studied by fractionation of sea turtle liver tissues, yielded the largest amounts in the cytosol for green turtle liver, but in the nuclear and mitochondrial fraction for hawksbill turtles. In the *C. actinabiotis* micro-alga, molybdenum seems to be located in the nucleus or the perinuclear region, which can be discerned from the optical microscopy image of the cell (Fig. 2). Besides, despite cells analyzed by SR-nXRF could not be stained for fluorescence microscopy imaging because they were cryofixed, observation of similarly cultured cells shows a typical nucleus size and positioning in the cell in accordance with this hypothesis.

Finally, sulfur, chlorine and copper are distributed in the whole cell. Similar observations have been obtained on PC12 cells for sulfur and chlorine.⁴⁰

PCA and HCA were carried out to objectively assess the correlations between element distributions in each cell analyzed using SR-nXRF and to assess the robustness of these correlations among cells. PCA is a powerful tool for the interpretation of large data tables. It allows extracting the main information from a data set by projecting it on a dimensionally reduced space. It was recently used in a somewhat similar approach to assess elemental distribution and co-localization in *Dioscorea balcanica*.⁴³ In our study, it allows us to visualize on a simple bi-dimensional plot similarities between data corresponding to four algae, more than 1000 pixel per algae, and 9 elements per pixel.

Data were first pre-processed as described in the Materials and methods section, notably by applying a smoothing filter to de-noise the data and enhance patterns at a scale bigger than the pixel – like the subcellular compartments which are looked

at – and by setting to zero data under a significant threshold, so that segregations could be better revealed. The PCA was computed on every control cell, yielding similar results. Consequently, the PCA was performed on a global data set taking into account all Control 1 cells. The correlation circle showing the projection of the initial variables (the elements) in the plane defined by the first and second principal components F1 and F2 is shown in Fig. 2. Altogether, F1 and F2 correspond to 71.2% of the variance of the data, ensuring the relevance of this two dimensional projection space. Besides, all variables are reasonably far from the center of the circle, meaning that they are all well represented with factors F1 and F2.

HCA was carried out on the output of the PCA, in order to classify the elements depending on their loadings on the computed principal components. HCA yields two main benefits: it allows automatic, and hence objective, clustering; and it takes into account all the principal components computed by PCA, while the correlation circle represents two of them only, it therefore retrieves the information lost in this graphic representation of PCA. Elements are grouped into three main clusters by setting a threshold at a distance of 0.9: iron; zinc, manganese, potassium, molybdenum and phosphorus; and chlorine, copper and sulfur (Fig. 2). These three clusters match visual observations detailed above, and can be interpreted as, respectively, corresponding to elements located in the chloroplast, elements located outside the chloroplast, and elements distributed throughout the cell. Setting a threshold at a slightly lower distance of 0.85 splits off zinc from the second cluster. This underlines the fact that zinc has a different distribution than the other four elements of its cluster: it is homogeneously distributed outside the chloroplast, while manganese, potassium, molybdenum and phosphorus maxima delimit a smaller area.

Quantification of endogenous elements. XRF acquisitions were used to quantify the average amount of each element per cell. Quantitative imaging of elements in biological samples is a challenging task: the thickness and composition of the biological matrix have to be characterized at the same spatial resolution as the studied elements in order to compute a true volume concentration or mass fraction at each pixel. In SR- μ XRF, and consequently in SR-nXRF, the heterogeneity in thickness and density of the sample over the scanned area may result in considerable errors if no internal reference is used to correct these errors.⁴⁴ This is the reason why many SR-XRF results are displayed as qualitative or relative quantitative data.

Here, we had no means to characterize the sample matrices with such high spatial resolution. Furthermore, its water composition had been modified by the cryofixation and freeze-drying preparation steps, and was thus irrelevant to study *in vivo* concentrations. To bypass this limitation, we considered the masses of elements projected per pixel – which do not depend on the sample's matrix – rather than their concentrations in the sample. When given the matrix composition, thickness and density, PyMCA can infer element mass fraction from fluorescence photon counts. To do so, it approximates the total mass of a pixel to the mass of its matrix only (while the

real mass of a pixel is the sum of the mass of its matrix and the mass of all the trace elements that are not defined in the matrix). We therefore set a simple dummy matrix composition in PyMCA (water, 1 μm thickness, density = 1), make it compute the elements' mass fractions for every pixel, and convert them to elements' mass per pixel by multiplying the previous results by the mass of a pixel's matrix, therefore neutralizing the matrix properties we previously set (elements' mass = element's mass fraction \times total mass). The reason why we used PyMCA and this procedure to finally get the mass per pixel mapping is because PyMCA takes into account all the XRF physics to convert fluorescence counts to fraction masses, which is not straightforward since many parameters have to be taken into account.

Finally, the elemental masses per cell were computed as described in the Materials and methods section. This supposes the scanning spatial resolution to be adapted to the size of the X-ray probe beam. The settings we used (100 nm steps scan, 80 nm full diameter at half maximum X-ray probe beam) ensure a good sampling of the cells: shorter steps would have led to over-sampling, *i.e.* overlapping pixels, which induces over-estimation of the masses per cell; and in contrast bigger steps would have led to under-sampling, *i.e.* gaps between pixels, which induces under-estimation of the masses per cell.

Results of this quantification are presented in Fig. 4. The mean concentration in phosphorus, sulfur, potassium, chlorine, iron, manganese, zinc, copper and molybdenum in the algae maintained in the minimal nutritive medium were, respectively, quantified at $8.9 \pm 0.8 \times 10^{-13}$, $2.7 \pm 0.2 \times 10^{-13}$, $2.1 \pm 0.3 \times 10^{-13}$, $8.8 \pm 0.1 \times 10^{-14}$, $2.4 \pm 0.4 \times 10^{-15}$, $8 \pm 2 \times 10^{-16}$, $4.2 \pm 0.7 \times 10^{-16}$, $3.4 \pm 0.5 \times 10^{-16}$ and $1.7 \pm 0.1 \times 10^{-16}$ grams per cell (Fig. 4). The mean concentration values in each element obtained in Control 1 was statistically compared to that obtained in Control 2 (Fig. 4). No significant difference was observed between the mean zinc,

copper and chlorine concentrations in both control samples (Fig. S3, ESI \dagger). The mean concentration of iron, manganese, phosphorus, sulfur, potassium and molybdenum however was slightly lower in Control 2. Mean values were about 1.5 times lower for most elements and three times lower for molybdenum (Fig. S3, ESI \dagger). Control 1 was maintained for 15 h in a minimal nutritive medium, namely BBM diluted 10 times with water, whereas Control 2 was maintained for 48 h in pure water, this difference may be due to the longer stay of the algae in a medium devoid of nutrients.

The maximal surface concentration in phosphorus, potassium, manganese, zinc and molybdenum determined in the area where these elements are co-localized and highly concentrated in the cell shown in Fig. 2 is, respectively, of 3×10^{-13} , 6×10^{-14} , 2×10^{-16} , 1×10^{-16} and 1×10^{-16} $\text{g } \mu\text{m}^{-2}$. The very high local phosphorus concentration may correspond to the storage of phosphate in cell as polyphosphates which were detected in huge concentration when analyzing the metabolic content of these micro-algae using *in vivo* nuclear magnetic resonance.

Besides surface concentration and the global element amount in the cell, quantitative SR-nXRF also enabled us to assess, though with less precision, the volume concentration of various elements inside subcellular compartments. Using the surface concentration of the elements determined by quantitative SR-nXRF and assuming that the thickness of all cell compartments was equal to that of the cell, the iron content in the chloroplast of Control 1 algae was evaluated roughly to $8 \pm 1 \times 10^{-17}$ $\text{g } \mu\text{m}^{-3}$ and the phosphorus, potassium, zinc and molybdenum content in their subcellular compartment to $7 \pm 2 \times 10^{-14}$, $1.2 \pm 0.2 \times 10^{-14}$, $2 \pm 1 \times 10^{-17}$ and $1.3 \pm 0.3 \times 10^{-17}$ $\text{g } \mu\text{m}^{-3}$, respectively.

Incidentally, it is noteworthy that the mean ratio of the manganese to the iron content in *C. actinabiotis* cells determined using SR-nXRF is 0.14. For bacteria resistant to ionizing radiation levels higher than 2 kGy, this ratio is in the range 0.17 to 0.46, whereas values below 0.01 are recorded for standard bacteria.⁴⁵

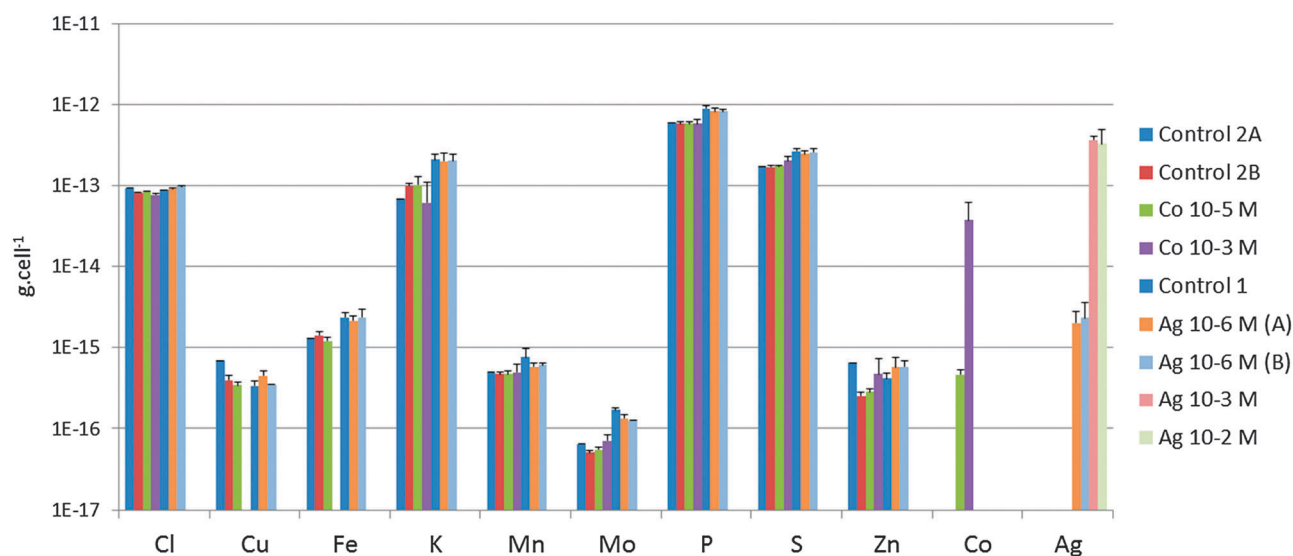


Fig. 4 Average elemental quantification per cell in control algae, algae exposed to cobalt and algae exposed to silver, obtained by SR-nXRF data analysis. Average values, in g cell^{-1} , over all cells are plotted for each sample. The error bars represent the standard deviation ($n = 4$ to 8).

The high value determined for the micro-alga may be related to its extreme radio-tolerance.

Cobalt accumulation in micro-algae

C. actinobiotis cells were exposed to cobalt and cobalt distribution was assessed to determine in which subcellular compartment this metal accumulates. Distribution of endogenous elements was also analyzed to look for cobalt impact on other elements. Two samples were, respectively, exposed for 48 h to 10^{-5} mol L $^{-1}$ and 10^{-3} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ and were analyzed using SR-nXRF and ICP-MS.

Cobalt localization and impact on the localization of endogenous elements

Low cobalt concentration. Five cells exposed to 10^{-5} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ were analyzed using SR-nXRF. The resulting distribution maps obtained for one of them are presented in Fig. 5. Cobalt is localized within the cell rather than in the cell wall, with preferential intracellular compartmentalization. It appears to be perfectly co-localized with zinc, and both are complementary to iron distribution. Zinc and iron complementarity was observed as in control cells. As stated before, iron distribution is a good indicator of the chloroplast location in the cell. Cobalt is therefore localized outside the chloroplast, probably in the nuclear region and the cytosol. This is consistent with the light microscope observation of the cell, which could not be DAPI stained but seems to have its nucleus at the spot where cobalt

mostly concentrates (Fig. 5). Fluorescence microscopy as well as TEM observations also support this hypothesis, the shape and the size of the considered areas being comparable to the typical geometry and localization of the nucleus and the cytosol (Fig. 3). Furthermore, cobalt has been reported to accumulate in the nuclear and perinuclear areas in keratinocytes, 21 which is consistent with our findings.

Potassium, manganese and phosphorus maxima are co-localized in small 0.1 ± 0.06 μm^2 spots which cover part of the zinc location (Fig. 5), as in control cells (Fig. 2). The highly localized maxima of these elements could correspond to a vacuole. Chlorine, copper and sulfur also have distributions similar to the ones they have in control cells, being roughly distributed in the whole cell. Cobalt presence hence does not seem to disturb the distribution of endogenous elements. Molybdenum distribution can hardly be observed, its signal to noise ratio being quite low. This is also observed in Control 2A and 2B samples, and is likely due to the incubation of these samples in water for 48 h.

PCA and HCA performed on a global data set taking into account all the cells exposed to 10^{-5} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ confirm these observations (Fig. 5). Cobalt is grouped in the same cluster as zinc, molybdenum, manganese, potassium and phosphorus by setting a threshold distance at 1.1 on the HAC graph, which accounts for its localization outside the chloroplast. Setting a threshold at a slightly lower distance of 1.0 splits the elements into four clusters: iron; copper, chlorine and sulfur;

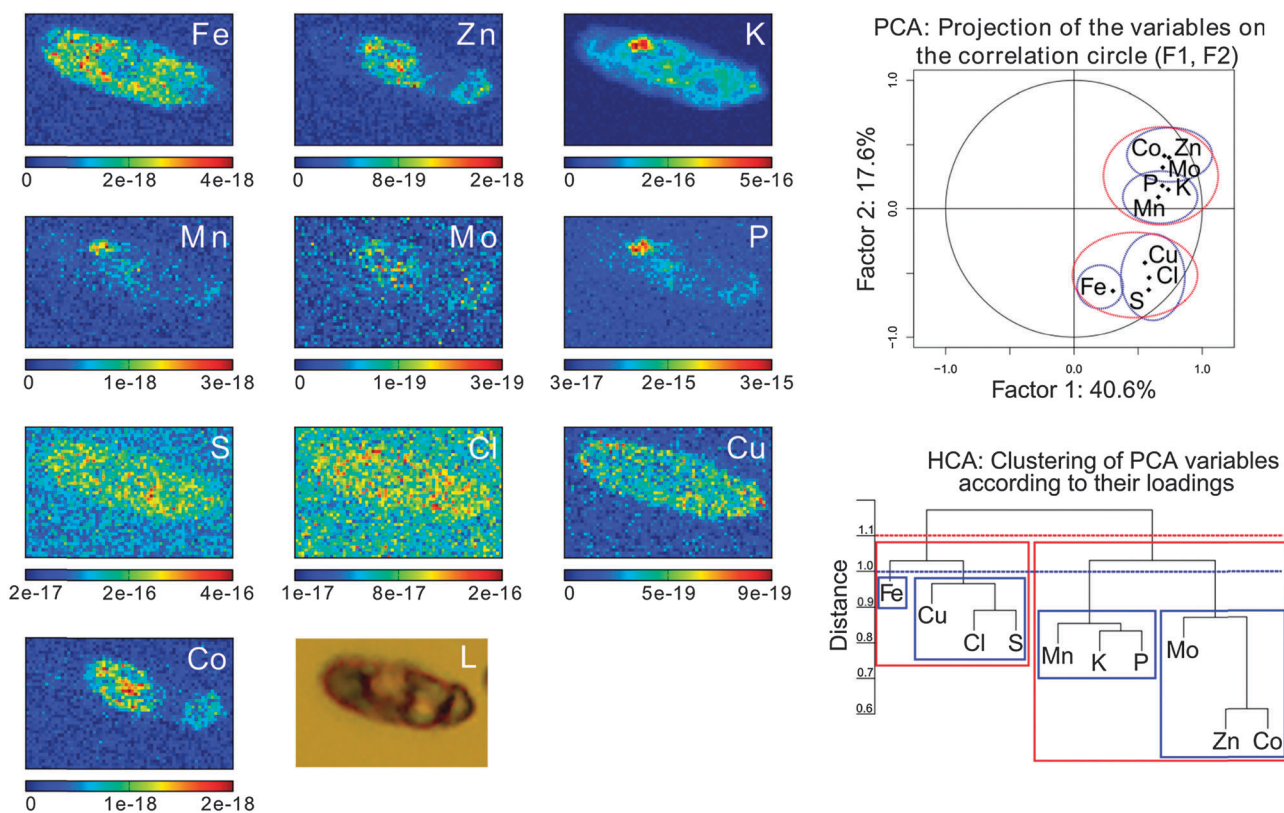


Fig. 5 Elemental distribution and abundance determined using SR-nXRF in a micro-alga exposed to 10^{-5} mol L $^{-1}$ of cobalt. The micro-alga originates from the Co 10^{-5} M sample. Experimental conditions and figure legend as in Fig. 2 with results for cobalt added (Co), except that the PCA and the HCA were performed on a data set representing all the analyzed cells for this sample.

manganese, potassium, and phosphorus; and zinc, copper and molybdenum. These four clusters correspond to the ones found in Control 1 cells, except for molybdenum. This supports the idea that cobalt did not alter the distribution of the studied endogenous elements. The singular behavior of molybdenum is likely due to its low signal in this sample, as stated before. Finally, cobalt and zinc co-localization is clearly displayed by the fact that even a very low threshold distance of 0.62 keeps them grouped in one cluster, while all the other elements form their own cluster below threshold distances of 0.82.

High cobalt concentration. Five cells exposed to 10^{-3} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ were analyzed using SR-nXRF, which allowed very good mapping of the cobalt distribution. As for cells exposed to lower concentrations, cobalt is localized in a well-defined area, which, given its size and shape, is certainly complementary to the chloroplast (Fig. 6). Nevertheless, this could not be confirmed by the iron distribution, which could not be determined at high cobalt concentrations. The high amount of cobalt in these cells induces a broadening of the cobalt peak and a distortion of the XRF spectral baseline in the energy range overlapping the cobalt K-lines. Because of this distortion the peak area quantification is altered. This is particularly the case for iron and copper whose lines stand near the cobalt K-lines. These elements were therefore removed for further spectral treatment. The XRF spectra in Fig. 6 show how the high amount of cobalt generates artifacts on the iron distribution map. Peak areas of the iron K-lines obtained after manual baseline correction are higher in the Z2 zone (red spectrum) than in the Z1 zone (blue spectrum) yielding a higher true iron amount in the Z2 zone than in the Z1 zone. But due to the strong noise resulting in a baseline very difficult to fit and to the overlapping of the iron K α and K β peaks with the cobalt K α peak in the Z1 zone, more iron is automatically mapped in the Z1 zone than in the Z2 zone.

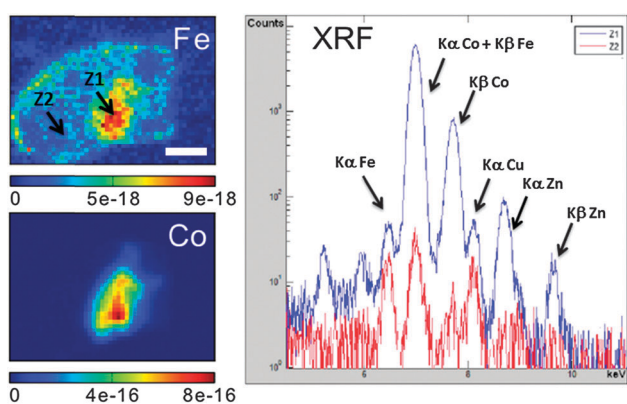


Fig. 6 Iron and cobalt distribution and abundance determined using SR-nXRF in a micro-alga exposed to 10^{-3} mol L $^{-1}$ of cobalt. The micro-alga originates from the Co 10^{-3} M sample. Experimental conditions as in Fig. 2. (Fe), (Co): respective SR-nXRF quantitative distribution maps of the elements. The color bar indicates intensities in g pixel $^{-1}$; the white scale bar in the Fe map represents 1 μ m. Z1 and Z2 arrows indicate the center of two zones containing 5×5 pixels. (XRF): summed XRF spectra for pixels in Z1 (blue) and Z2 (red) zones. K α and K β peaks of the elements of interest are indicated on the spectra.

Quantification of cobalt and of content of other elements.

The mean elemental mass per cell was calculated for both samples exposed to cobalt, based on the XRF quantification computed for every cell analyzed in each sample. The mean concentrations of the different elements in both Co samples are shown in Fig. 4. Statistical comparison to Control 2 values reveals that cobalt concentrations of 10^{-5} and 10^{-3} mol L $^{-1}$ have little or no effect on the concentration of the other elements in the micro-algae (Fig. S3, ESI †). No significant difference was detected in the mean content in all the target elements between algae exposed to 10^{-5} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ and Control 2, nor in the mean content in phosphorus, potassium, manganese, zinc and molybdenum between algae exposed to 10^{-3} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ and Control 2. A small decrease in chlorine and an increase in sulfur were statistically detected in algae exposed to 10^{-3} mol L $^{-1}$ of Co $^{2+}$ but the difference to the control was minute, by a 1.1–1.2 factor.

As in control samples, the volume concentration of various elements including phosphorus, potassium, iron, manganese and zinc in their subcellular compartments could be assessed, yielding no significant difference to the control. Cobalt concentration was evaluated to be $3 \pm 1 \times 10^{-17}$ and $6 \pm 6 \times 10^{-15}$ g μ m $^{-3}$ in its subcellular compartment in algae exposed to 10^{-5} and 10^{-3} mol L $^{-1}$ of cobalt, respectively.

ICP-MS analysis showed that algae exposed to 10^{-5} mol L $^{-1}$ and 10^{-3} mol L $^{-1}$ Co $^{2+}$ contained, respectively, an average concentration of 1.3×10^{-15} g and 4.4×10^{-14} g of cobalt per cell (Table 1). Compared to the average cobalt concentration determined using XRF quantification (Table 1), both results have the same order of magnitude, which shows the relevance of the performed SR-nXRF quantifications. The differences may originate from discrepancies which exist in cobalt concentration between individual micro-algae. Moreover, the XRF value results from a mean calculated on a limited number of cells ($n = 5$). ICP-MS is an elemental analytical technique better suited to concentration assessment than SR-nXRF and the determination is performed on a much larger cell number yielding a value closer to the mean of the distribution; therefore more credit should be given to its results.

Silver accumulation in micro-algae

Three *C. actinabiotis* samples were exposed to 10^{-6} , 10^{-3} and 10^{-2} mol L $^{-1}$ of Ag $^{+}$ and were analyzed using SR-nXRF and ICP-MS.

Table 1 Comparison of ICP-MS and SR-nXRF based quantification for cobalt and silver in micro-algae exposed to various metal concentrations

Sample	ICP-MS quantification (g cell $^{-1}$)	SR-nXRF quantification (g cell $^{-1}$)	SR-nXRF/ICP-MS ratio
Cobalt 10^{-5} mol L $^{-1}$	1.3×10^{-15}	4.6×10^{-16}	0.35
Cobalt 10^{-3} mol L $^{-1}$	4.4×10^{-14}	3.7×10^{-14}	0.85
Silver 10^{-6} mol L $^{-1}$	1.2×10^{-14}	1.2×10^{-14}	0.96
Silver 10^{-3} mol L $^{-1}$	1.9×10^{-13}	3.7×10^{-13}	1.90
Silver 10^{-2} mol L $^{-1}$	6.7×10^{-13}	3.3×10^{-13}	0.49

Silver localization and impact on the localization of endogenous elements

Low silver concentration. Five cells exposed to 10^{-6} mol L $^{-1}$ of Ag $^{+}$ were analyzed using SR-nXRF. Distribution maps obtained for one of them are presented in Fig. 7. Elements other than silver show the same distribution patterns as in control cells meaning that silver did not affect the distribution of the endogenous elements at this concentration. Iron indicates the localization of the chloroplast and zinc is complementary to its distribution. Potassium, manganese and phosphorus have co-localized maxima, which cover part of the zinc location. Molybdenum seems to be located in the nuclear or perinuclear area. Chlorine, copper and sulfur are located throughout the cell. Silver is localized inside the cell rather than on the cell wall or on the mucilage surrounding the cell. It shows a very unique pattern: it is mainly concentrated in zones where neither iron nor zinc is highly localized, and its distribution pattern seems to surround the nucleus.

PCA and HCA performed on a global data set taking into account all the cells exposed to 10^{-6} mol L $^{-1}$ of Ag $^{+}$ confirm these observations (Fig. 7). Silver unique distribution pattern is underlined by the fact that it is the first element to split off from all the other ones at high threshold distances. A threshold

distance of 1.1 yields three clusters which match visual observations detailed above: silver; iron, sulfur, chlorine and copper; and zinc, molybdenum, phosphorus, potassium and manganese. These clusters can, respectively, be interpreted as corresponding to silver's distribution pattern, elements located throughout the cell or in the chloroplast (which covers most of the cell's projection area), and elements located outside the chloroplast.

High silver concentration. Four and eight cells, respectively, exposed to 10^{-3} and 10^{-2} mol L $^{-1}$ of Ag $^{+}$ were analyzed using SR-nXRF. The silver distribution in the cells was thus determined. The map obtained for one of the cells exposed to 10^{-2} mol L $^{-1}$ is shown in Fig. 8. Silver is present within the cell rather than on the cell wall. It is present at high levels on the whole cell projection, with a very high concentration spot and a less concentrated zone in the center of the cell. The proportion of silver fixed to the mucilage was assessed to be $2.5 \pm 0.7\%$ and $1.5 \pm 0.7\%$ in the samples exposed to 10^{-3} and 10^{-2} mol L $^{-1}$ of Ag $^{+}$ respectively. The high concentration spot might correspond to silver accumulation in a vacuole, which is known to be the main storage compartment for toxic compounds in plant cells.⁴⁶ TEM observations support this hypothesis: vacuoles can be located close to the nucleus (Fig. 3), and the size of the spot observed by SR-nXRF is in the range of

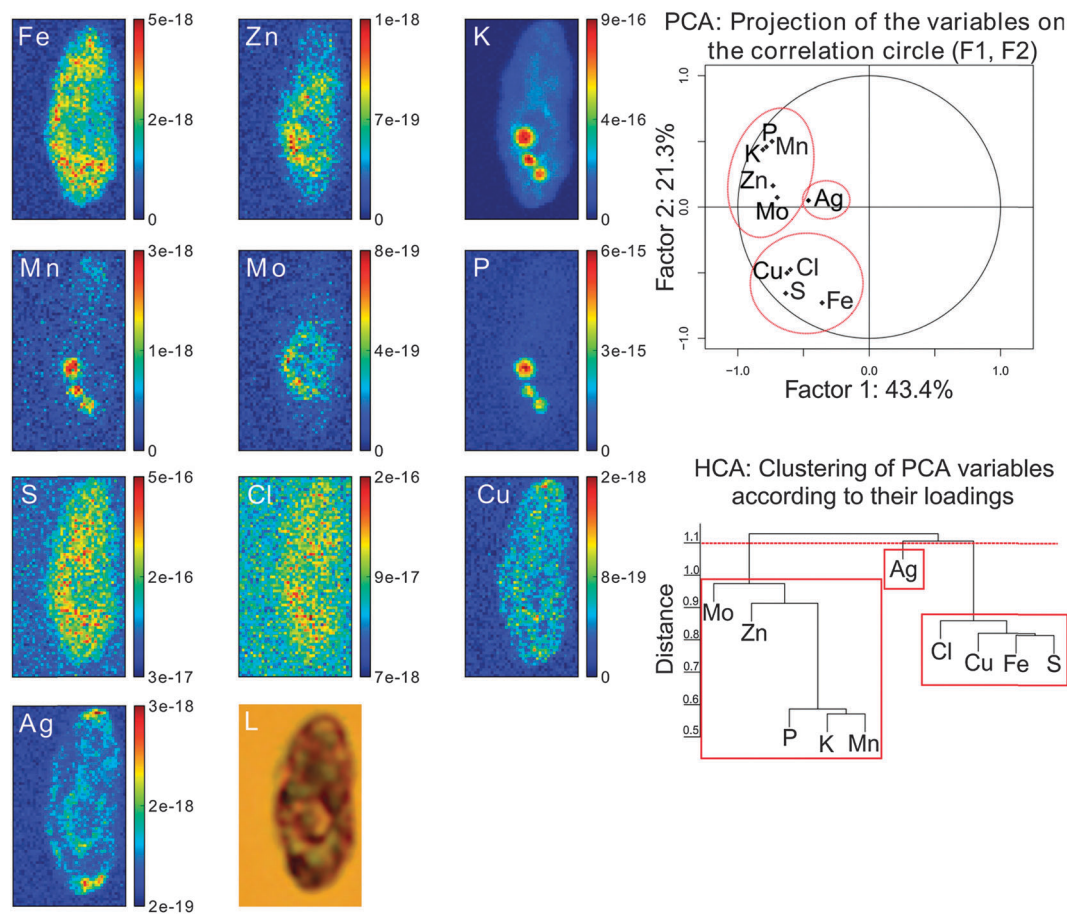


Fig. 7 Elemental distribution and abundance determined using SR-nXRF in a micro-alga exposed to 10^{-6} mol L $^{-1}$ of silver. The micro-alga originates from the Ag 10^{-6} M (A) sample. Experimental conditions and figure legend as in Fig. 2 with results for silver added (Ag), except that the PCA and the HCA were performed on a data set representing all the analyzed cells for this sample.

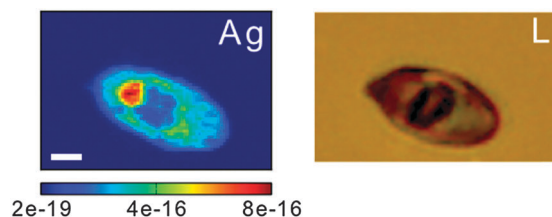


Fig. 8 Silver distribution and abundance determined using SR-nXRF in a micro-alga exposed to 10^{-2} mol L $^{-1}$ of silver. The micro-alga originates from the Ag 10^{-2} M sample. Experimental conditions as in Fig. 2. (Ag): SR-nXRF quantitative distribution maps of silver. The color bar indicates intensities in g pixel $^{-1}$; the white scale bar represents 1 μ m. (L): light microscopy picture of the analyzed cell.

vacuoles' characteristic dimensions. This pattern is not common to all the analyzed algae though: some other cells presented several high concentration spots rather than one only, some spots were much smaller than the one shown here, and the spots were not always vacuoles. In other cells, the zone containing less silver in the center of the image seems to be the projection of the nucleus. Distribution maps of the other analyzed cells support this hypothesis, as well as fluorescence microscopy and TEM observations (Fig. 3). Silver is therefore heterogeneously located in the whole cell, with the exception of its exclusion from the nuclear area.

The distribution of other elements of interest could not be properly mapped for these two samples, for two reasons. First, the silver signal was so high that it distorted a lot the XRF spectral baseline; even more than the high concentration of cobalt did (Fig. 6). Secondly, because its fluorescence X-rays have high energies (22 keV and 25 keV for the K α and K β lines respectively), silver performed as a local X-ray source, enhancing the signal of the other elements wherever it was located, and thus leading to the artifact that all the elements were co-localized with its spots. Other elements were therefore discarded for further analyses.

In order to get deeper insight into the potential structures where silver accumulates at high concentration, algae exposed to 10^{-2} and 10^{-4} mol L $^{-1}$ of Ag $^{+}$ as well as control samples were imaged and analyzed by TEM-EDS. For both concentrations, opaque spots appeared on the TEM image (black spots). These aggregates are not present in control algae (Fig. 3). In algae exposed to silver, they are detected in the chloroplast, mitochondria, lipid droplets, the cytosol, but not in the nucleus. EDS analysis of these clusters proves they contain silver, among other components; while control analyses on areas without opaque cluster did not show any silver (Fig. 9). The cluster size ranges from some nm to 30 nm (Fig. 9).

Silver is therefore located in the whole cell with the exception of the nucleus, and aggregates in clusters. These observations support the SR-nXRF performed on algae exposed to similar concentrations of silver, in particular concerning the exclusion of silver from the nucleus.

Quantification of silver and of content of other elements.

The average elemental mass per cell was computed, based on XRF quantification, for all the cells exposed to silver and for

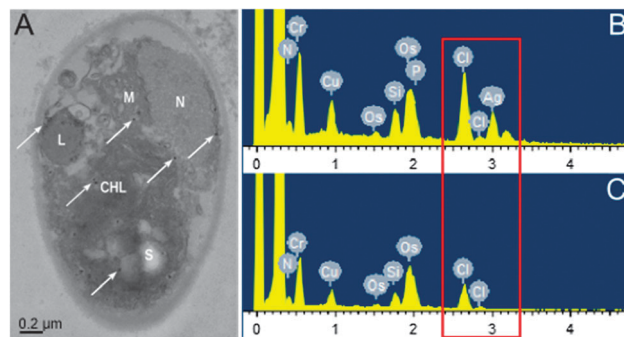


Fig. 9 TEM-EDS imaging of micro-algae exposed to 10^{-2} mol L $^{-1}$ of silver. (A): TEM imaging of an ultrathin section. The cell contains a nucleus (N), a chloroplast (CHL), starch granules (S), a mitochondria (M), a lipid droplet (L). White arrows indicate the localization of aggregates opaque to electrons. (B): EDS spectrum of such an aggregate. (C): EDS spectrum of a zone free of aggregates.

relevant elements. Results are shown in Fig. 4. Comparison with control samples shows that the exposure to 10^{-6} mol L $^{-1}$ of silver has little or no effect on the other element concentrations in the algae. At higher concentrations, this comparison could not be done for the reasons described above.

As in control samples, the volume concentration of various elements including phosphorus, potassium, iron, manganese and zinc in their subcellular compartments could be assessed, yielding no significant difference to the control. In the spots where it highly concentrated, silver concentration was evaluated to be $7 \pm 2 \times 10^{-14}$ and $4 \pm 3 \times 10^{-14}$ g μ m $^{-3}$ in algae exposed to 10^{-3} and 10^{-2} mol L $^{-1}$ of silver, respectively.

ICP-MS measurements showed that the algae exposed to 10^{-6} mol L $^{-1}$, 10^{-3} mol L $^{-1}$ and 10^{-2} mol L $^{-1}$ contained, respectively, an average concentration of 1.2×10^{-14} , 1.9×10^{-13} and 6.7×10^{-13} g of silver per cell (Table 1). Silver average concentrations determined by XRF quantification and by ICP-MS were compared (Table 1). As for cobalt, both results have the same order of magnitude, despite some differences. This supports the relevance of the performed SR-nXRF quantifications, whereas this technique is usually used for qualitative or semi-quantitative studies.

Conclusions

Elemental distribution at the subcellular level is scarcely analyzed in micro-algae using *in situ* imaging because the spatial resolution and the sensitivity of most tools are not adapted to the micrometer size of the cells and to their low elemental concentrations. Recent technical developments in synchrotron sources and in optics make these analyses possible on the beamline ID22NI of the ESRF synchrotron. This synchrotron nano X-ray fluorescence technique combines spatial resolution and sensitivity adapted to the imaging and the quantification of endogenous and exogenous elements in unicellular micro-algae. Applied for the first time to the *in situ* imaging of unicellular micro-algae samples, it revealed the subcellular distribution and association of iron, zinc, phosphorus, manganese, molybdenum, potassium, sulfur, chloride

and copper in *Coccomyxa actinabiotis*. Iron and zinc were well segregated and displayed complementary distributions, iron being essentially located inside the chloroplast whereas zinc was outside the chloroplast. Potassium was detected throughout the cell with the maximal amount localized outside the chloroplast. Manganese, molybdenum and phosphate were co-localized in more specific subcellular compartments, including the nucleus, the perinuclear area and probably vacuoles. Their maximal concentration was located in the same areas as the potassium maximal concentration. Other elements were homogeneously distributed. Accurate quantification of each element was implemented, yielding for example concentrations of 0.4 femtogram of iron per square micrometer (in a two-dimensional projection of the cell) in chloroplast, zinc concentrations of the order $0.06 \text{ fg } \mu\text{m}^{-2}$ outside the chloroplast, a mean sulfur concentration of $40 \text{ fg } \mu\text{m}^{-2}$ throughout the cell and storage of phosphorus with a high concentration reaching $300 \text{ fg } \mu\text{m}^{-2}$ in a presumable vacuolar compartment. Assuming that all subcellular compartments had the thickness of the algal cell, these values corresponded roughly to $0.08 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ of iron in the chloroplast, $0.006 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ of zinc outside the chloroplast, $7 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ of sulfur throughout the cell and $50 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ of phosphorus in a presumable vacuole.

As *Coccomyxa actinabiotis* was able to accumulate large amounts of cobalt and silver, above the toxic level for other organisms, SR nanoXRF was employed to gain insight into the mechanisms implemented by the micro-alga to accumulate and tolerate these metals. Their subcellular distribution and quantification in micro-alga, assessed after controlled exposure to various cobalt and silver concentrations, revealed that exogenous cobalt and silver were mainly sequestered inside the cell rather than on mucilage or the cell wall. Cobalt was homogeneously distributed outside the chloroplast. Silver was probably localized in the cytosol when present at low concentration and in the whole cell excluding the nucleus when present at high concentration, with locally strong accumulation spots. Quantification of silver in these spots revealed concentrations up to $300 \text{ fg } \mu\text{m}^{-2}$, corresponding roughly to $50 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$. The mean concentration of both cobalt and silver in individual cells matched the content determined in macroscopic samples using ICP-MS. Exposure to cobalt or silver at the lower concentrations did neither alter the localization nor the amount of endogenous elements within the cells. Transmission electron microscopy observations and energy dispersive X-ray spectroscopy analyses corroborated these results, revealing silver containing clusters in all intracellular compartments with the exception of the nucleus. Work is underway to further elucidate the mechanisms involved in the accumulation and the detoxification of these metals, and to get insight into the local structure of the observed silver clusters through the study of their *in vivo* speciation in micro-algae using X-ray absorption spectroscopy techniques.

Acknowledgements

This work was performed with financial support of the Transversal Nuclear Toxicology program of the CEA and of the ILL. The authors thank Annie Rivoire and Christelle Boulé (Centre Technologique

des Microstructures, Lyon) for TEM measurements, Sylvie Motellier (CEA, Laboratoire d'Innovation pour les Technologies des Energies Nouvelles et les nanomatériaux, Grenoble) for her support in the ICP-MS experiments and Diane de Gouvion Saint Cyr (Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble) for her participation in the SR nanoXRF experiment. Rémi Tucoulou (ESRF, Grenoble) is greatly acknowledged for his continuous support during the ID22 experiment.

References

- 1 C. Chatterjee, R. Gopal and B. K. Dube, *J. Plant Nutr.*, 2006, **29**, 127–136.
- 2 M. Li, Q. Zhu, C. Hu, L. Chen, Z. Liu and Z. Kong, *J. Environ. Sci.*, 2007, **19**, 1330–1335.
- 3 V. Hiriart-Baer, C. Fortin, D. Lee and P. Campbell, *Aquat. Toxicol.*, 2006, **78**, 136–148.
- 4 H. T. Ratte, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, **18**, 89–108.
- 5 Q. Li, S. Mahendra, D. Y. Lyon, L. Brunet, M. V. Liga, D. Li and P. J. J. Alvarez, *Water Res.*, 2008, **42**, 4591–4602.
- 6 G. D. Mayer, A. Leach, P. Kling, P.-E. Olsson and C. Hogstrand, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **134**, 181–188.
- 7 C. Rivasseau, E. Farhi, A. Atteia, A. Couté, M. Gromova, D. de Gouvion Saint Cyr, A.-M. Boisson, A.-S. Férét, E. Compagnon and R. Bligny, *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 1230–1239.
- 8 C. Bresson, E. Ansoborlo, V. Malard, F. Eyrolle and B. Fievet, in *Toxicologie nucléaire, environnementale et humaine*, ed. Lavoisier, TEC & DOC., Paris, France, 2009, p. 748.
- 9 R. C. Charley and A. T. Bull, *Arch. Microbiol.*, 1979, **123**, 239–244.
- 10 A. J. M. Baker, R. D. Reeves and A. S. M. Hajar, *New Phytol.*, 1994, **127**, 61–68.
- 11 G. M. Gadd, *Microbiology*, 2010, **156**, 609–643.
- 12 S. Clemens, *Biochimie*, 2006, **88**, 1707–1719.
- 13 K. Nagel, U. Adelmeier and J. Voigt, *J. Plant Physiol.*, 1996, **149**, 86–90.
- 14 T. Berkelman and J. C. Lagarias, *Plant Physiol.*, 1990, **93**, 748–757.
- 15 U. Klein, C. Chen, M. Gibbs and K. A. Platt-Aloia, *Plant Physiol.*, 1983, **72**, 481–487.
- 16 Z. T. Hörcsik and Á. Balogh, *Acta Biol.*, 2002, **46**, 57–58.
- 17 G. W. Garnham, G. A. Codd and G. M. Gadd, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **37**, 270–276.
- 18 R. Ortega, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, 2005, **231**, 218–223.
- 19 S. Bohic, M. Cotte, M. Salomé, B. Fayard, M. Kuehbacher, P. Cloetens, G. Martinez-Criado, R. Tucoulou and J. Susini, *J. Struct. Biol.*, 2012, **177**, 248–258.
- 20 G. Sarret, E. A. H. P. Smits, H. C. Michel, M. P. Isaure, F. J. Zhao and R. Tappero, in *Advances in Agronomy*, ed. Donald L. Sparks, Academic Press, 2013, vol. 119, pp. 1–82.
- 21 R. Ortega, C. Bresson, A. Fraysse, C. Sandre, G. Devès, C. Gombert, M. Tabarant, P. Bleuët, H. Sez nec, A. Simionovič, P. Moretto and C. Moulin, *Toxicol. Lett.*, 2009, **188**, 26–32.

- 22 E. Lombi, K. G. Scheckel and I. M. Kempson, *Environ. Exp. Bot.*, 2011, **72**, 3–17.
- 23 T. Punshon, M. L. Guerinot and A. Lanzirrotti, *Ann. Bot.*, 2009, **103**, 665–672.
- 24 R. Tappero, E. Peltier, M. Gräfe, K. Heidel, M. Ginder-Vogel, K. J. T. Livi, M. L. Rivers, M. A. Marcus, R. L. Chaney and D. L. Sparks, *New Phytol.*, 2007, **175**, 641–654.
- 25 G. Sarret, G. Willems, M.-P. Isaure, M. A. Marcus, S. C. Fakra, H. Frérot, S. Pairis, N. Geoffroy, A. Manceau and P. Saumitou-Laprade, *New Phytol.*, 2009, **184**, 581–595.
- 26 M.-P. Isaure, A. Fraysse, G. Devès, P. Le Lay, B. Fayard, J. Susini, J. Bourguignon and R. Ortega, *Biochimie*, 2006, **88**, 1583–1590.
- 27 G. Martínez-Criado, R. Tucoulou, P. Cloetens, P. Bleuet, S. Bohic, J. Cauzid, I. Kieffer, E. Kosior, S. Labouré, S. Petitgirard, A. Rack, J. A. Sans, J. Segura-Ruiz, H. Suhonen, J. Susini and J. Villanova, *J. Synchrotron Radiat.*, 2011, **19**, 10–18.
- 28 E. Kosior, S. Bohic, H. Suhonen, R. Ortega, G. Devès, A. Carmona, F. Marchi, J. F. Guillet and P. Cloetens, *J. Struct. Biol.*, 2012, **177**, 239–247.
- 29 S. Volland, A. Andosch, M. Milla, B. Stöger, C. Lütz and U. Lütz-Meindl, *J. Phycol.*, 2011, **47**, 565–579.
- 30 S. Volland, C. Lütz, B. Michalke and U. Lütz-Meindl, *Aquat. Toxicol.*, 2012, **109**, 59–69.
- 31 V. A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter and J. Susini, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 63–68.
- 32 E. Farhi, Y. Debab and P. Willendrup, *J. Neutron Res.*, 2013, **17**, 5–18.
- 33 K. Le Mapihan, J. Vial and A. Jardy, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1144**, 183–196.
- 34 D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. D. Jong, P. J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Elsevier, Amsterdam, 1997, p. 57.
- 35 S. Dray, A. B. Dufour and D. Chessel, *R News*, 2007, **7**, 47–52.
- 36 C. Rivasseau, M. Seemann, A.-M. Boisson, P. Streb, E. Gout, R. Douce, M. Rohmer and R. Bligny, *Plant, Cell Environ.*, 2009, **32**, 82–92.
- 37 J.-F. Briat, Proc. Int. Plant Nutr. Colloq. XVI, Dep. Plant Sci., UC Davis, 2009.
- 38 R. Hänsch and R. R. Mendel, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2009, **12**, 259–266.
- 39 T. Shikanai, P. Müller-Moulé, Y. Munekage, K. K. Niyogi and M. Pilon, *Plant Cell*, 2003, **15**, 1333–1346.
- 40 A. Carmona, P. Cloetens, G. Devès, S. Bohic and R. Ortega, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 1083.
- 41 K. Kalia, W. Jiang and W. Zheng, *Neurotoxicology*, 2008, **29**, 466–470.
- 42 A. Carmona, G. Devès, S. Roudeau, P. Cloetens, S. Bohic and R. Ortega, *ACS Chem. Neurosci.*, 2010, **1**, 194–203.
- 43 T. Dučić, M. Borchert, A. Savić, A. Kalauzi, A. Mitrović and K. Radotić, *J. Synchrotron Radiat.*, 2013, **20**, 339–346.
- 44 H.-J. Wang, M. Wang, B. Wang, X.-Y. Meng, Y. Wang, M. Li, W.-Y. Feng, Y.-L. Zhao and Z.-F. Chai, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 328.
- 45 M. J. Daly, *Science*, 2004, **306**, 1025–1028.
- 46 S. Clemens, *Planta*, 2001, **212**, 475–486.

Electronic Supplementary information for:

“Elemental distribution in green micro-algae using combined 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*.”

T. Leonardo, E. Farhi, A.-M. Boisson, J. Vial, P. Cloetens, S. Bohic and C. Rivasseau*

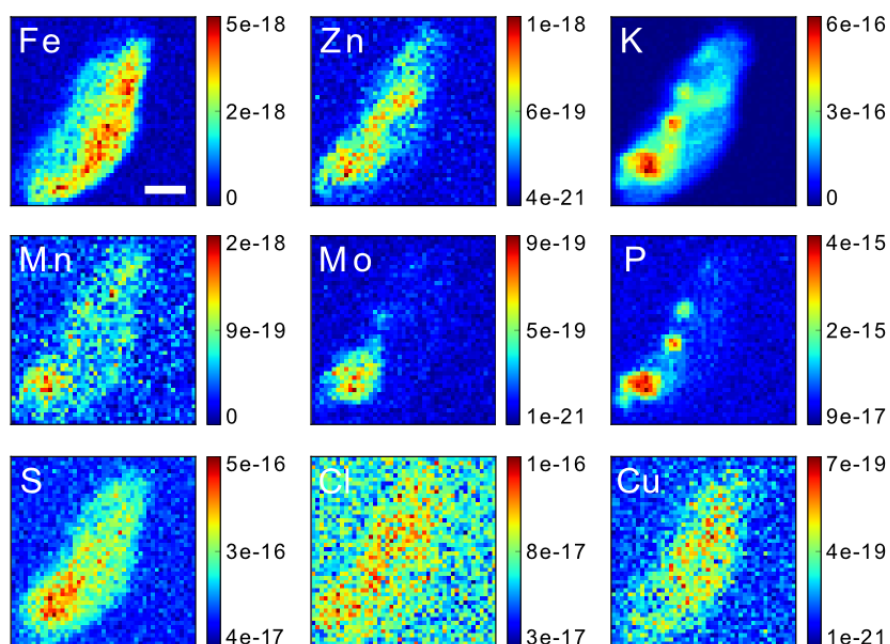


Figure S1. Elemental distribution and abundance determined using SR-nXRF in a control micro-alga. Micro-alga originating from Control 1. Experimental conditions and figure legend as in Figure 2.

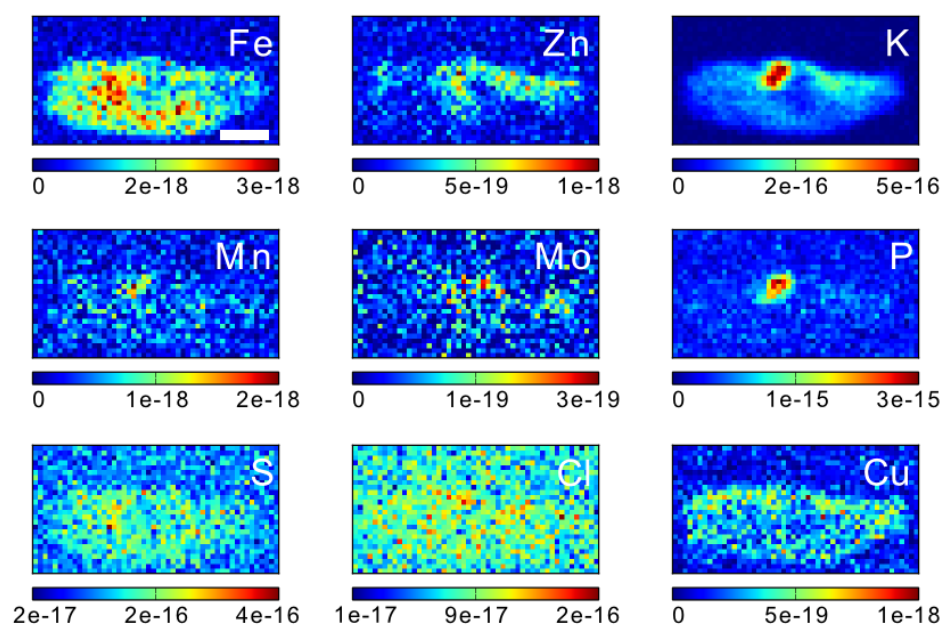


Figure S2. Elemental distribution and abundance determined using SR-nXRF in a control micro-alga. Micro-alga originating from Control 2B. Experimental conditions and figure legend as in Figure 2.

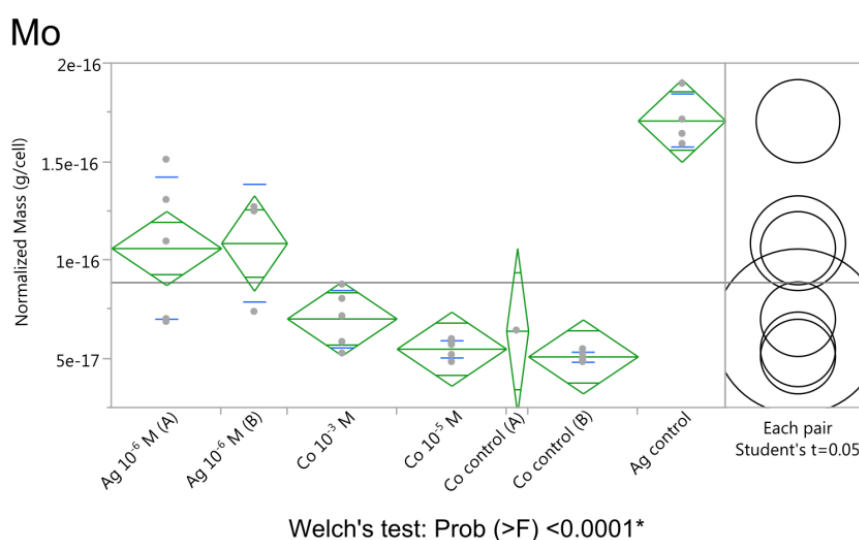
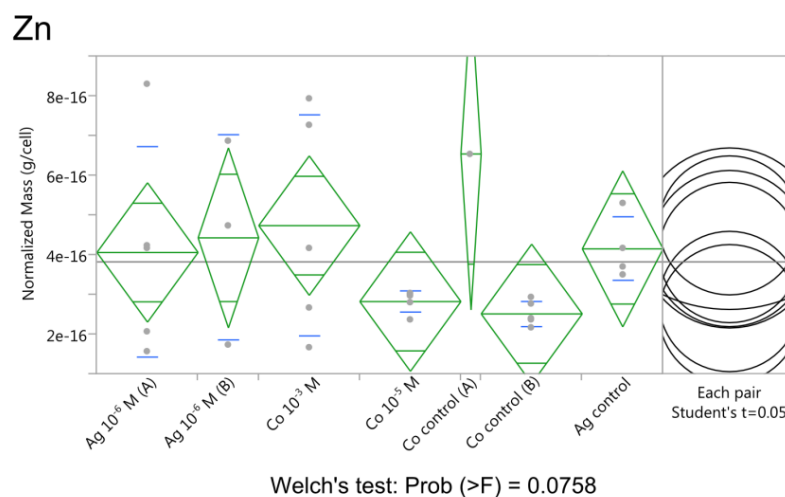


Figure S3. Comparison of the mean Zn and Mo content in the different samples. Statistical analyses of the results presented in Figure 4. The mean content in each element displayed on Figure 4 was compared for the different samples. For each element, the homogeneity of the samples' variance was assessed using four different tests (Barlett, Levene, Brown-Forsythe and O'Brien). The means of the samples were then compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) for samples with homogeneous variances and using a Welch's test otherwise. The significance level of all the tests was set to 5%.

For the examples of Zn and Mo presented in this figure, the Welch's test yielded no statistical difference in the mean Zn content between all the samples ($p\text{-value} = 0.076$) whereas the mean Zn content was statistically different ($p\text{-value} < 0.0001$). Mean values were then compared by pairs using Student's t test.

III. Synthèse des principaux résultats

A. Distribution subcellulaire des éléments endogènes de l'algue

L'imagerie par fluorescence X de cellules de *C. actinabiotis* témoins nous a permis de déterminer la distribution subcellulaire du fer, du zinc, du phosphore, du manganèse, du molybdène, du potassium, du soufre, du chlore et du cuivre. Le fer et le zinc ont des distributions distinctes et complémentaires : prises ensemble, elles « remplissent » l'ensemble de la cellule, à l'exception de la paroi et du mucilage. Le fer est essentiellement situé dans le chloroplaste, tandis que le zinc est situé à l'extérieur du chloroplaste. Le potassium est détecté dans l'ensemble de la cellule avec zones de concentration maximales situées en dehors du chloroplaste. Le manganèse, le molybdène et le phosphate sont co-localisés dans des compartiments subcellulaires mieux définis, qui incluent le noyau, la zone péri-nucléaire et probablement des vacuoles. Les maxima de ces trois éléments sont co-localisés avec les maxima du potassium. Le soufre, le chlore et le cuivre sont eux distribués de façon homogène dans toute la cellule.

Ces éléments ont été quantifiés. Pour une projection des cellules dans le plan perpendiculaire au faisceau X, nous avons mesuré des concentrations l'ordre de $0,4 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ de fer dans le chloroplaste, $0,06 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ de zinc en dehors du chloroplaste, $40 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ de soufre à travers l'ensemble de la cellule et des concentrations maximales de phosphore d'environ $300 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ dans des compartiments de stockage qui pourraient être des vacuoles ou des polyphosphates. Nous avons converti ces concentrations surfaciques en concentrations volumiques en faisant l'hypothèse que les compartiments subcellulaires où se trouvent les éléments ont une épaisseur moyenne de $3,5 \mu\text{m}$. On calcule ainsi des concentrations d'environ $0,08 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ de fer dans le chloroplaste, $0,006 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ de zinc à l'extérieur du chloroplaste, $7 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ de soufre dans l'ensemble de la cellule et $50 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ de phosphore dans les compartiments de stockage.

B. Distribution subcellulaire de l'argent et du cobalt

Des algues *C. actinabiotis* exposées à des concentrations d'argent de 10^{-6} , 10^{-3} et 10^{-2} M et à des concentrations de cobalt de 10^{-5} et 10^{-3} M ont également été analysées.

L'observation de la distribution subcellulaire de l'argent et du cobalt exogènes accumulés par l'algue indique que ces métaux sont principalement accumulés à l'intérieur de

l'algue plutôt que sur la paroi cellulaire ou le mucilage. La distribution du cobalt est similaire à celle du zinc : il est localisé à l'extérieur du chloroplaste aux deux concentrations étudiées. La distribution de l'argent dépend des concentrations étudiées : aux faibles concentrations (10^{-6} M) il est probablement localisé dans le cytosol, tandis qu'aux fortes concentrations (10^{-3} et 10^{-2} M) il est réparti dans toute la cellule à l'exception du noyau, avec des zones ponctuelles de très forte concentration. Nous avons mesuré dans ces zones des concentrations d'argent allant jusqu'à $300 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, ce qui correspond à environ $50 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$. Les expositions au cobalt et aux faibles concentrations d'argent n'ont modifié ni la distribution subcellulaire ni la concentration des éléments endogènes. L'évaluation de la concentration moyenne de cobalt et d'argent dans les algues à partir des quantifications XRF sur quelques cellules a donné des valeurs comparables aux concentrations mesurées par ICP-MS sur des échantillons contenant plusieurs millions de cellules.

Les observations réalisées en microscopie électronique en transmission couplées à l'analyse EDX corroborent les résultats obtenus en imagerie XRF aux fortes concentrations d'argent : on observe dans des algues exposées à de fortes concentrations d'argent des agrégats contenant de l'argent. Ces agrégats sont présents dans tous les compartiments cellulaires, à l'exception du noyau de la cellule. La taille de ces agrégats, mesurée sur les clichés de microscopie électronique, va de quelques nanomètres à une trentaine de nanomètres.

IV. Conclusion

L'analyse de leur distribution montre clairement l'internalisation de l'argent et du cobalt accumulés par *C. actinabiotis* : la complexation de ces métaux à la surface de l'algue influe peu sur la détoxification des métaux, qui repose sur d'autres mécanismes.

Le cobalt accumulé est compartimenté en dehors du chloroplaste, où il est probablement chélaté par des ligands organiques. La distribution de l'argent dans les algues varie avec la concentration d'exposition, et des agrégats se forment aux fortes concentrations, laissant supposer que les mécanismes de détoxification à l'œuvre évoluent également avec la concentration.

Dans le chapitre précédent et dans celui-ci, nous avons montré que l'argent et le cobalt peuvent s'accumuler en grandes quantités dans les algues, et nous avons cherché à savoir dans quels territoires de la cellule ces deux métaux sont stockés. La toxicité de ces métaux dépend de leur spéciation intracellulaire. Nous avons donc analysé la spéciation de l'argent et du cobalt accumulés par l'algue afin de mieux comprendre les mécanismes de détoxification à l'œuvre chez *C. actinabiotis* et de mieux connaître la nature des ligands impliqués dans la chélation des métaux. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Spéciation de l'argent et du cobalt accumulés par *C. actinabiotis*

La spéciation des métaux est un paramètre important de leur homéostasie chez les organismes vivants. Les plantes, par exemple, modifient l'état d'oxydation et l'environnement chimique des métaux afin de contrôler leur transport et/ou leur détoxification. Les métaux peuvent être directement chélatés (ex : Cd, Zn, Ni), réduits (ex : Cr, Se), ou réduits pour former ensuite des complexes stables (ex : As), afin de minimiser leur toxicité ou de faciliter leur transport (Salt et al., 2002). La connaissance de la spéciation des métaux internalisés par les organismes vivants participe donc à la compréhension des mécanismes d'accumulation, de tolérance et de détoxification à l'œuvre au sein de ces organismes. Nous avons étudié la spéciation de l'argent et du cobalt lorsqu'ils sont internalisés par *C. actinabiotis* ; nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus.

I. Spéciation de l'argent internalisé par *C. actinabiotis*

A. La spectroscopie d'absorption X : une technique de choix pour l'étude de la spéciation des métaux en biologie

De nombreuses méthodes analytiques permettent l'étude de la spéciation dans les milieux biologiques et environnementaux : spectroscopie UV-visible, infra-rouge, Raman ou d'absorption X, spectrométrie laser ou de masse, résonance magnétique nucléaire, techniques séparatives (chromatographie, résines, etc.) suivies d'une analyse élémentaire, etc. (Gilbin et al., 2009). Ces techniques diffèrent de par leur principe de fonctionnement, les informations auxquelles elles permettent d'accéder et la nature des échantillons qu'elles peuvent sonder (état physique, complexité de la matrice, concentration des éléments étudiés). Les milieux biologiques et environnementaux étant particulièrement complexes, ce dernier paramètre est d'une importance singulière, l'objectif étant de réaliser une mesure exploitable tout en préservant l'intégrité de l'environnement chimique étudié.

Parmi ces méthodes, la spectroscopie d'absorption X (SAX) présente l'avantage de permettre l'étude d'échantillons complexes et hétérogènes, avec peu ou pas de prétraitements. Cette technique renseigne sur la spéciation moyenne d'un élément chimique donné au sein d'un échantillon. Les principes d'acquisition et d'analyse des spectres sont décrits en Annexe 14. Un spectre d'absorption X se décompose en deux parties : le XANES (X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy) qui renseigne sur le degré d'oxydation et la géométrie de coordination de l'atome étudié (également appelé atome central), et l'EXAFS (Extended X-ray Absorption Spectroscopy) qui reflète les propriétés des atomes environnant l'atome

central (nature, nombre et distance). La SAX sonde l'environnement chimique proche des atomes (dans un rayon inférieur à 6 Å), elle est donc adaptée à des échantillons solides, liquides ou gazeux, cristallins ou amorphes. La sensibilité de la méthode est de l'ordre de quelques ppm lorsque les mesures sont réalisées dans de bonnes conditions. (Kelly et al., 2008; Lombi et al., 2011). Ces mesures nécessitent un faisceau de rayons X d'une brillance importante, et dont l'énergie doit pouvoir être finement ajustée, elles sont donc réalisées avec des rayonnements synchrotron (Lombi and Susini, 2009).

La « souplesse » des caractéristiques des échantillons pouvant être analysés et les améliorations technologiques sur les lignes synchrotron (amélioration de la focalisation des faisceaux, des propriétés des monochromateurs, des détecteurs, etc.) ont permis d'appliquer la SAX à l'étude de la spéciation des métaux *in situ/in vivo* chez les organismes vivants, et notamment chez les micro-organismes et les plantes, comme le rapportent plusieurs revues récentes (Donner et al., 2012; Gardea-Torresdey et al., 2005; Lombi and Susini, 2009; Lombi et al., 2011; Salt et al., 2002; Sarret et al., 2013).

B. Etude de la spéciation de l'argent chez *C. actinabiotis*

Nous avons étudié la spéciation de l'argent internalisé par *C. actinabiotis* par spectroscopie d'absorption X. Les mesures de SAX ont été réalisées sur la ligne de lumière BM20 de l'ESRF (ROBL, The Rossendorf Beamline) avec l'aide de Dipanjan Banerjee (ESRF) et l'analyse des spectres a été réalisée en collaboration avec Christophe Den Auwer (Université de Nice-Sophia Antipolis, ICN/PCRE).

Les résultats obtenus ont été complétés par des mesures de diffraction de rayons X (DRX). L'acquisition et l'analyse des spectres DRX ont été réalisées en collaboration avec Stéphanie Pouget (CEA Grenoble, DSM/INAC/SP2M/SGX).

Ces résultats sont décrits dans l'article « **Silver accumulation, toxicity, *in situ* speciation and localization in the green microalga *Coccomyxa actinabiotis*. Mechanism investigation using synchrotron XAS, XRD and TEM** », que nous allons soumettre à la revue *Environmental Science and Technology*. Dans cet article, les résultats de l'analyse de la spéciation de l'argent internalisé par *C. actinabiotis* sont mis en perspective avec des mesures de l'impact physiologique de l'argent sur *C. actinabiotis* et de l'accumulation du métal par la micro-algue et avec les observations réalisées par microscopie électronique en transmission lors de l'étude de la localisation de l'argent.

Les formules utilisées dans l'article pour déduire la taille d'une nanoparticule à partir du nombre de coordination moyen de ses atomes et inversement sont décrites plus en détail dans l'Annexe 15.

C. Article

Silver accumulation, toxicity, *in situ* speciation and localization in the green microalga *Coccomyxa actinabiotis*. Mechanism investigation using synchrotron XAS, XRD and TEM.

Thomas Leonardo^{1,2}, Emmanuel Farhi², Stéphanie Pouget³, Dipanjan Barnejee⁴, Diane de Gouvion Saint Cyr^{1,2}, Christophe de Auwer⁵, and Corinne Rivasseau^{1*}

¹CEA, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. CNRS, UMR5168, 38054 Grenoble, France. Université de Grenoble, 38000 Grenoble, France. INRA, 38054 Grenoble, France.

²Institut Laue Langevin, Division Science, 71 rue des Martyrs, 38042 Grenoble, France.

³CEA, Institut Nanosciences et Cryogénie, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

⁴HZDR, ROBL beam line, European Synchrotron Radiation Facility, 71 rue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

⁵Université Nice Sophia Antipolis, Institut de Chimie de Nice, UMR7272, 06108 Nice, France.

*Corresponding author: corinne.rivasseau@cea.fr

Abstract

This study explores the cellular processes implemented by the green microalga *Coccomyxa actinabiotis* to take up and cope with silver over the concentration range 10^{-9} M to 10^{-2} M Ag^+ . Silver *in situ* speciation and localization were investigated using X-ray absorption spectroscopy (X-ray Absorption Near-Edge Structure and Extended X-ray Absorption Fine Structure), X-Ray diffraction and transmission electron microscopy. Toxicity was assessed by monitoring microalgal growth and photochemical yield of photosystem II. The combination of physiological, spectroscopic and physico-chemical investigations highlighted different mechanisms. At low micromolar concentration, microalgae fixed all silver initially present in solution, trapping it into the cytosol, mainly as unreduced Ag(I) bound by sulfur containing molecules. Silver was efficiently detoxified. When concentration increased, silver spread throughout the cell, particularly entering the chloroplast where it irreversibly damaged photosystem II, leading to cell death. Most silver was reduced to Ag(0) and aggregated to form crystalline silver nanoparticles of face-centered cubic structure. Minor interaction of silver with sulfur or oxygen containing molecules indicated the concomitant existence of the first mechanism and/or nanoparticle surface oxidation or capping. Nanoparticles also appeared on the plasma membrane, cytosolic membrane structures and in vacuoles. High silver amounts remained confined inside microalgae, showing their potential for the bioremediation of contaminated water.

Keywords. Silver, microalgae, toxicity, speciation, reduction, nanoparticles, synchrotron X-ray absorption spectroscopy, EXAFS, XANES, X-ray diffraction, electronic microscopy.

Introduction

Contamination of the environment by heavy metals and radionuclides is a world concern which evolves with changing human uses. Among these contaminants, silver constitutes one of the most toxic metals in aquatic environments, at the same level as cadmium and chromium, surpassed only by mercury (Ratte, 1999). Silver toxicity depends on its speciation, the free cationic form Ag^+ being highly toxic (Ratte, 1999; Stevenson et al., 2013). Silver has long been used in the photographic and imaging industry, in the electrical and electronics industry, in jewelry, in the manufacture of silverware and coinage (Purcell and Peters, 1998; Thomson Reuters GFMS, 2013) as well as for the treatment of diseases and infections (Rai et al., 2009). Recently, applications of its antimicrobial properties have strongly been developed, silver being now embedded in consumer products such as plasters, textiles, food containers, toothpaste or air filters in the form of nanoparticles and colloids (Klaine et al., 2008). As a result, silver is discharged to the environment not only from mining and from its industrial applications as this was the case until lately (Purcell and Peters, 1998) but also from the normal use of these products which release silver nanoparticles, colloids and Ag^+ (Benn and Westerhoff, 2008; Kaegi et al., 2010). Additionally, silver also constitutes one of the main gamma emitting radioactive contaminant present in liquid effluents issuing from nuclear pressurized water reactors operating in normal conditions, representing up to 48% of the gamma emitting radionuclides released (Florence and Hartmann, 2003).

Remediation of effluents or of environmental water contaminated by heavy metals and radionuclides is currently mostly performed using conventional physico-chemical methods such as precipitation, oxidation/reduction or adsorption on ion-exchange resins. These methods suffer from several drawbacks including cost, intolerance to organic species, little efficiency for the removal of very low contaminant concentration and generation of large secondary waste volumes (Eccles, 1999). Biological remediation technologies based on organisms such as bacteria, fungi and plants have offered competitive alternatives in various fields. They generally present a high efficiency, a wider field of application and lower cost and impact on the environment than physico-chemical technologies (Gadd, 2010; Gillespie and Philp, 2013). Microalgae are good candidates for heavy metal and radionuclide bioremediation strategies owing to their ability to fix a wide range of contaminants and to resist to their chemical toxicity thanks to their large surface-to-volume ratio, the structure of

their cell wall carrying functional groups able to bind and immobilize contaminants and various mechanisms enabling metal incorporation and subcellular sequestration, excretion, or detoxification by speciation changes (Monteiro et al., 2012). Algae-based biotechnologies for pollution remediation employ common green algae such as *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cladophora*, cyanobacteria or consortia of both (Perales-Vela et al., 2006). Best metal accumulation performance is obtained with microalgal species isolated from long-term metal contaminated sites (Monteiro et al., 2012). Recently, a unicellular green microalga, *Coccomyxa actinabiotis*, was isolated from an extreme environment contaminated with radioactive silver (Rivasseau et al., 2013). High fixation capacities were demonstrated for non-radioactive silver, namely 30 mg Ag g⁻¹ fresh weight (FW), *i.e.* about 300 mg Ag g⁻¹ dry weight (DW), among the higher values reported for various organisms. When exposed to high Ag⁺ concentrations, up to 10⁻² M, silver accumulated mainly inside the cell and silver aggregates formed (Leonardo et al., 2014). *C. actinabiotis* showing also an extreme radiotolerance (Rivasseau et al., 2013), it is therefore an ideal candidate in view to remove stable and radioactive silver both for remediation of contaminated environmental water and for its recovery from industrial effluents.

The present study aims at exploring the mechanisms of silver accumulation and toxicity in *C. actinabiotis*. Silver uptake by *C. actinabiotis* suspended in Ag⁺ solutions ranging from nM to mM concentrations was first characterized. Toxic effects of such Ag⁺ concentrations to *C. actinabiotis* were then assessed by monitoring physiological and biochemical parameters such as microalgal growth and photosynthetic capacity which are commonly used to assess metal toxicity to microalgae (Cardol et al., 2008; Monteiro et al., 2012; Suresh Kumar et al., 2014). To gain insight into the mechanisms involved in response to silver, silver speciation was then studied directly *in situ* in microalgae. As mentioned above, metals in excess relative to the cellular metabolic needs must be stored and/or their speciation modified to make them less toxic or facilitate their transport. Reduction processes, chelation by specific peptides or proteins such as ferritin, metallothioneins and phytochelatin or by small molecules may be involved (Clemens, 2006; Meharg, 2005). A variety of analytical or spectroscopic methods have been used to study the speciation of metals in biological and environmental media, such as UV-visible, infrared, Raman, X-ray absorption spectroscopy (XAS), laser spectroscopy, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance or separation techniques followed by elemental analysis (Lombi et al., 2011; Ménager et al.,

2009). XAS has the advantage to allow the study of complex and heterogeneous samples, with little or no pretreatment, which preserves their integrity and focusses on the chemical environment of a given element (often the cation of interest). This technique probes the near chemical environment of the atoms within 4-5 Å, with a sensitivity of up to tens of ppm. XAS, comprising X-ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) and Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) spectra, informs on the oxidation state of the metal studied, its coordination geometry, and the nature and number of atoms in its coordination sphere. Analysis of liquid, crystalline or amorphous solid samples is classically performed but technological advances made XAS suitable to study the speciation of metals also *in situ* in living organisms (Sarret et al., 2013). In this work, XAS (XANES and EXAFS), complemented by X-Ray diffraction (XRD), were used to investigate silver speciation in *C. actinabiotis*, highlighting various oxidation state, coordination and structure according to silver concentration. Last, in order to offer a global view of silver management by this microalga, the progressive formation and localization of silver nanoparticles was investigated at different silver concentrations using electron microscopy (TEM), thus supplementing previous localization work (Leonardo et al., 2014). The original combination of physiological measurements and spectroscopic or physico-chemical techniques such as XAS, XRD and TEM revealed the implementation of different cellular processes in the microalgae according to silver concentration.

Experimental

Algae culture and conditioning before exposure to silver. The microalga *Coccomyxa actinabiotis* used in this study is described in Rivasseau *et al.* (2013). Algal biomass was either grown in batch mode in 800 mL round-bottom flasks aerated on an orbital shaker (Innova 2300, New Brunswick Scientific, Enfield, CT) at 100 rpm, under a continuous illumination of $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, at $21 \pm 2^\circ\text{C}$, in a modified Bold Basal Medium (BBM) culture solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) diluted twice with deionized water, and regularly sub-cultured to maintain cell growth, or continuously grown in a 10 L photobioreactor (PBR) sparged with air at $50 \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, under continuous illumination of $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, at $24 \pm 2^\circ\text{C}$, in

BBM. All experiments were performed with living micro-algae harvested in the growing phase.

Microalgae were harvested by centrifugation (2000 g, 5 min, 4°C), washed by three successive re-suspensions in deionized water followed by centrifugations (same conditions) to remove external elements coming from the culture medium, and finally re-suspended in ultrapure water (MilliQ, Millipore) at a concentration of 2 g_{FW}.L⁻¹ to perform the experiments. Algae were exposed to silver in ultrapure water rather than in culture medium in order to control silver speciation, which was in the free form Ag⁺ in all experiments.

Silver uptake. Silver uptake by microalgae was assessed on PBR-grown cultures. Microalgae solutions (10 mL) at 2 g_{FW}.L⁻¹ were spiked with silver nitrate (AgNO₃ ≥ 99.9%, Roth, Karlsruhe, Germany) at a final concentration ranging from 3 10⁻⁸ M to 10⁻² M in 15 mL polypropylene conical centrifuge tubes. Samples were prepared in duplicates or triplicates for each concentration. It was checked that silver did not adsorb on polypropylene. The tubes were capped and placed for 2 h on a vertical rotary mixer rotating at 6 rpm, at 22°C, under a continuous illumination of 50 μE.m⁻².s⁻¹. Samples were then centrifuged (2000 g, 6 min, 4°C) to separate algae from incubation solutions and silver was quantified in microalgae pellet and/or in supernatant using inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS).

For samples exposed to concentrations below 10⁻³ M, silver uptake was assessed indirectly from residual silver concentration in the supernatant after addition of 500 μL of 10% HNO₃ (v/v, Suprapur® HNO₃, Merck, Darmstadt, Germany) to 4.5 mL of supernatant for a final HNO₃ concentration of 1% (v/v).

For samples exposed to concentrations above 2 10⁻⁴ M, silver uptake was assessed directly from silver concentration in microalgae. Prior to ICP-MS analysis, microalgae pellets were quickly suspended in 1 mL of ultrapure water to rinse interstitial incubation solution and centrifuged (2000 g, 6 min, 4°C). The rinsing supernatant was removed and pellets were mineralized by suspension in 500 μL of 65% HNO₃ (v/v) for 48 h at room temperature before dilution to 1% HNO₃ (v/v).

Silver concentration was assessed using an Hewlett-Packard 4500 ICP-MS (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a Babington nebulizer and a Peltier-cooled double-pass Scott spray chamber, at m/z = 107 and 109, using calibration solutions in 1% HNO₃ (v/v). Results of silver uptake are presented in percentage of silver initially present in

the exposure solution and in mass of silver per gram of algal dry weight. Dry weight was estimated from fresh weight using a proportionality factor of 10.

Silver toxicity. Silver toxicity was assessed on PBR-grown algae by monitoring two parameters, namely the maximum quantum yield of photosystem II Fv/Fm, which gives insight into the physiological state of the photosystem, and cellular growth. Ten 250 mL polyethylene terephthalate glycol-modified (PETG) Erlenmeyer's flasks (Thermo Scientific Nalgene, Waltham, MA) were filled with 80 mL of algal solution. Two flasks were used as control. The others were spiked with 10^{-9} M to 10^{-2} M Ag^+ . It was previously checked that silver did not adsorb on PETG. After 2 and 24 h exposure, 40 mL were taken from each flask; algae were harvested by centrifugation, washed twice with water (2000 g, 5 min, 4°C) and re-suspended in flasks containing 40 mL of BBM diluted twice. The photochemical yield Fv/Fm was measured using a PAM-101 fluorometer (Walz, Germany) and growth was monitored by microalgae counting using a Malassez hemocytometer. Both parameters were measured for 8 days. During the whole experiment, samples were incubated using the same parameters as batch-grown cultures (see above).

X-ray Absorption Spectroscopy

Sample preparation. The speciation of silver accumulated by microalgae was studied *in situ* on batch-grown algae using XAS. Microalgae at $2 \text{ g}_{\text{FW}} \cdot \text{L}^{-1}$ were exposed to 10^{-6} M, 10^{-5} M and 10^{-4} M Ag^+ for 16 h and to 10^{-3} M Ag^+ for 5 h, in PETG flasks, and incubated in the light, temperature and aeration conditions listed above for batch-grown cultures. After exposure, algae were harvested by centrifugation and washed three times with water (2000 g, 5 min, 4°C). Silver concentration was determined in aliquots of pellet and supernatant by ICP-MS as described above. Pellets, in the form of a thick paste, were placed in polypropylene sample holders, sealed with Kapton®, plunged into liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis.

XAS measurements. Silver K-edge XANES and EXAFS spectra were collected at the Rossendorf Beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) (Matz et al., 1999). The beamline was equipped with a Si(111) double crystal

monochromator, operated in channel-cut mode, and calibrated at the Ag K-edge energy of a Ag metal foil. Two Pt-coated Si mirrors were used to collimate the X-ray beam and achieve third-order harmonics rejection. Spectra were collected at 15 K using a He cryostat. Samples were measured in fluorescence mode using a 13-element high purity Ge detector (Canberra) and in transmission mode with 1:1 Ar:He (I_0) and 1.5 bar pure Ar (I_1 and I_2) filled ionization chambers.

XAS analysis. XANES spectra were calibrated in energy using the Ag foil and normalized using the Athena code (Ravel and Newville, 2005). Silver oxidation state in the samples was assessed by phenomenological comparison with reference spectra, namely Ag foil for Ag(0), AgNO₃ for Ag(I), and AgO for Ag(II). EXAFS data treatment was performed using the Athena code and fitted using the Artemis code (Ravel and Newville, 2005). The EXAFS curves were extracted and k^2 -weighted for Fourier transformation between ca. 1.5 and 12 Å⁻¹. The fitting procedure was performed in real R space between 1 and 6 Å. Phases and amplitudes were calculated using Feff84 code (Rehr and Albers, 2000). For Ag-Ag contributions, face-centered cubic (Fcc) metallic silver was used as a model compound (crystallographic data from Kittel (2004)) for all the Ag-Ag contributions. The silver foil's spectrum was fitted with this model, using seven single (2 legs) or multiple (3 legs or more) scattering paths corresponding to a cluster of five neighboring spheres up to 5.78 Å. Selected paths were the following: 2.89 Å (2 legs), 4.09 Å (2 legs), 5.00 Å (2 legs), 5.39 Å (3 legs) and 5.78 Å (2, 3 and 4 legs). The fitted metrical parameters are in very good agreement with the reported crystallographic data of metallic silver and with distances reported for silver clusters (Dubiel et al., 2005; Montano et al., 1989), which confirms the relevance of our fitting procedure for Ag-Ag contributions. When Ag-S or Ag-O contributions were also needed in the fit, they were calculated using respectively the structures of Ag₂O and Ag₂S (respective crystallographic data from Madelung *et al.* (1998) and Frueh (1958)) using similar Feff cards in order to induce as less distortion of the threshold shift as possible. The spectra of samples exposed to low silver concentrations were best fitted using a combination of Ag-S and Ag-Ag single shell contributions; whereas the spectra of samples exposed to the higher silver concentrations were fitted with the previously specified seven Ag-Ag contributions together with an additional Ag-S or Ag-O single

shell contribution.

X-ray diffraction. Silver speciation was clarified on PBR-grown algae using XRD. Algae were exposed to 10^{-4} M, 10^{-3} M and 10^{-2} M Ag^+ , in PETG flasks, for 3 h, in the conditions described above for batch-grown cultures. After exposure, algae were harvested by centrifugation and washed twice with water (2000 g, 5 min, 4°C). Pellets were frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. Right before analysis, samples were freeze-dried and ground into a fine powder. A drop of water was added. The obtained paste was homogeneously spread on zero-background silicon sample holders, allowed to dry and covered with a Kapton® film. A control sample (not exposed to silver) was prepared in the same conditions to measure the algal baseline. Measurements were performed in Bragg-Brentano geometry, on a PANalytical X'Pert diffractometer equipped with an X'Celerator linear detector, at $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ (Cu K_{α} emission lines). International Centre for Diffraction Data (ICDD) database was used to identify peaks; datasheet 00-004-0783 was used as reference for Fcc silver.

Transmission electron microscopy. Silver localization in microalgae exposed to 10^{-4} M and 10^{-2} M Ag^+ was analyzed using TEM as described in Leonardo *et al.* (2014).

Results and discussion

Silver uptake by *C. actinabiotis*. Silver uptake by *C. actinabiotis* suspended in ultrapure water containing $3 \cdot 10^{-8}$ M to 10^{-2} M Ag^+ is presented in Figure 1. Indirect quantification from residual silver in supernatants and direct quantification in microalgae, compared between $2 \cdot 10^{-4}$ M and 10^{-3} M Ag^+ , showed good agreement. At low concentrations ($\leq 10^{-5}$ M), microalgae accumulated almost all silver initially in solution, namely 87 to 97%, the differences being probably due to both biological and analytical variability (Figure 1A). At higher concentrations, the accumulation yield decreased down to 0.7% when exposed to 10^{-2} M Ag^+ . The amount of silver accumulated by algae grew continuously from

13 $\mu\text{g Ag.g}_{\text{DW}}^{-1}$ at $3 \cdot 10^{-8} \text{ M Ag}^+$ up to 40 $\text{mg Ag.g}_{\text{DW}}^{-1}$ at 10^{-2} M Ag^+ , without reaching any plateau (Figure 1B). Although comparing uptake values is challenging since the measured capacity depends on the parameters of algae culture, on their physiological state and on the conditions fixed for the uptake experiments, the amount determined here is amongst the most important values reported for algae, plants and bacteria (Rivasseau et al., 2013). The decrease in the accumulation yield at about 10^{-5} M Ag^+ corresponded to the slope inflection in Figure 1B. Further analyses such as determination of silver speciation were conducted to explore the processes involved.

Silver toxicity. As silver was reported to be toxic to microalgae at nanomolar level (Lee et al., 2005), it was then interesting to investigate the toxic effects of the above mentioned silver concentrations to *C. actinabiotis*. Silver toxicity was assessed both during and after exposure to 10^{-9} M to 10^{-2} M Ag^+ for 2 and 24 h. Algal growth and photosynthetic capacity were monitored. Growth actually reflects the overall physiological state of the cell including various fundamental physiological and biochemical processes, and the photosynthetic activity is the basis for cell development in these autotrophically-grown algae. Photosynthetic capacity was assessed through the measurement of the chlorophyll-a fluorescence yield F_v/F_m which corresponds to the maximum quantum yield of photosystem II (Suresh Kumar et al., 2014). This parameter is very sensitive to metal toxicity (Baumann et al., 2009; Cardol et al., 2008).

Two different behaviors were brought out, depending on whether *C. actinabiotis* was exposed to low ($\leq 10^{-6} \text{ M}$) or high ($\geq 10^{-5} \text{ M}$) silver concentration. Prior to silver addition, microalgae presented a photochemical yield F_v/F_m of 0.75 (Figure 2A) reflecting a very good physiological state (Suresh Kumar et al., 2014). During exposure to silver, the photochemical yield F_v/F_m of microalgae exposed to low Ag^+ concentrations decreased slowly down to 0.57-0.65 after 2 h of incubation (Figure 2A) and 0.46-0.56 after 24 h. This decrease was the same whatever the silver concentration in the range from 10^{-9} M to 10^{-6} M and was also observed in controls. It is likely due to nutrient deficiency or osmotic stress induced by the suspension of microalgae in ultrapure water during this phase (Parkhill et al., 2001). Contrastingly, the photochemical yield F_v/F_m of microalgae exposed to higher Ag^+ concentrations quickly dropped to zero, within 2 h, indicating that the photosynthetic apparatus was strongly damaged. This may result from Ag^+ substitution to Cu^+ in photosynthetic metalloproteins,

both elements possessing close chemical reactivity. It was actually shown that the replacement of Cu^+ by Ag^+ in plastocyanine and cytochrome complex resulted in the inactivation of the photosynthetic electron transport (Sujak, 2005). Silver can also induce oxidative stress, which can lead to lipids, proteins, carbohydrate and DNA damage and could also explain the impairment of the photosynthetic apparatus (Ercal et al., 2001; Pillai et al., 2014).

The ability of *C. actinabiotis* to recover from silver exposure was further tested by transferring the microalgae into a silver-free culture medium. The photochemical yield F_v/F_m immediately rose to 0.6-0.7 in controls and samples exposed to low silver concentrations, confirming the previous decrease was due to the stress induced by suspending the algae in ultrapure water while silver had no impact on *C. actinabiotis* photosynthetic capacity (Figure 2A). The monitoring of cellular density showed similar growth rates in samples exposed to low silver concentrations and controls over one week after the transfer into the growth medium, with no effect of silver on growth up to 10^{-6} M (Figure 2B). On the contrary, the photochemical yield F_v/F_m as well as the growth rate of microalgae exposed to higher silver concentrations remained at zero after the transfer to a silver-free growth medium (Figures 2A and 2B), meaning that the photosynthetic apparatus was irreversibly damaged. This could be sufficient to prevent cell growth; however, other processes may also be affected.

The half maximum effective concentration (EC_{50}) of Ag^+ toxicity in these conditions was therefore comprised between 1 and 10 μM , which is substantially above toxicity values reported for other green microalgae. EC_{50} of about 10-20 nM and 25 nM have actually been reported for growth inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, respectively (Hiriart-Baer et al., 2006; Lee et al., 2005) and about 200 nM for photosynthetic yield inhibition in *Chlamydomonas reinhardtii* (Pillai et al. 2014).

Silver speciation within the algae. In order to get insight into the mechanisms involved in silver accumulation and tolerance, the *in situ* speciation of silver accumulated by *C. actinabiotis* was investigated. Algae exposed to 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M Ag^+ accumulated respectively 51, 520, 2500 and 6500 $\mu\text{g}_{\text{Ag}} \cdot \text{g}_{\text{FW}}^{-1}$, and were analyzed using XAS.

As for silver toxicity, two trends clearly appeared for silver oxidation state and chemical environment depending on whether microalgae were exposed to low or high silver concentration.

The XANES spectra (Ag K edge) of algae samples were compared to the reference spectra of Ag(0) (silver foil) and Ag(+I) (silver nitrate) in Figure 3. The XANES of the samples exposed to 10^{-6} M and 10^{-5} M Ag^+ are similar and display two weak oscillations separated by a plateau at ca. 25.52 and 25.54 keV. On the contrary, the samples exposed to 10^{-4} M and 10^{-3} M Ag^+ display two distinct oscillations at ca 25.52 and 25.55 keV. From a qualitative comparison, it appears that the first set of spectra resembles that of the Ag(+I) reference, whereas the second set is similar to the Ag(0) reference. One may therefore assume that the formal oxidation state of silver accumulated by the algae remains (+I) at low concentrations, while it is mostly reduced to Ag(0) at higher concentrations.

The EXAFS Ag K edge spectra are presented in Figure 4A and their corresponding Fourier transforms in Figure 4B, together with the fitted curves. In agreement with the above XANES data, spectra of the samples exposed to 10^{-4} M and 10^{-3} M Ag^+ are very similar and exhibit clear oscillations up to 14 \AA^{-1} . The high frequency of those oscillations and their shape suggests the presence of heavy backscattering atoms like Ag. In contrast, the spectra of algae exposed to 10^{-5} M and 10^{-6} M Ag^+ are different from the previous set. Despite the EXAFS spectrum of the latter being very noisy due to low silver concentration in the sample, both spectra show oscillations which are in phase and have comparable amplitudes.

At low silver concentration (10^{-5} M), the EXAFS spectrum was successfully fitted (R factor = 3%) using two independent shells of S and Ag. Ag-O and Ag-N contributions were tested and unambiguously ruled out. The corresponding Fourier transform exhibited two main contributions, at a pseudo-distance of $R + \Phi = 1.9 \text{ \AA}$ and 2.75 \AA . These contributions corresponded respectively to 2.0(1) S atoms located at an average distance of $2.41(1) \text{ \AA}$ and 0.9(1) Ag atoms located at $2.93(1) \text{ \AA}$ (Table 1). These fitted parameters were in good agreement with typical values reported in the literature for *in vitro* systems implying Ag and sulfur containing ligands. Silver EXAFS spectrum of $\text{Cd}_2\text{Ag}_{17}$ -metallothioneins complexes has been for instance reported to be successfully fitted using 2 S atoms at 2.40 \AA and an Ag contribution, without any indication of the coordination number, at 2.9 \AA (Hasnain et al., 1987). Ag-S average distances of $2.40(2) \text{ \AA}$ were observed in Ag(+I)-penicillamine solutions (Leung et al., 2013). These results suggest that Ag^+ ions accumulated by *C. actinabiotis* when exposed to low concentrations react with cellular molecules and complex to sulfur containing groups. This is consistent with the preferential interaction between silver(I) ions and thiol-containing species such as cysteine, glutathione, metallothioneins or phytochelatin in

biological systems (Bovenkamp et al., 2013; Leung et al., 2013; Nieboer and Richardson, 1980; Szpunar et al., 2003). Complexation of free Ag^+ ions by dedicated or not thiol-containing species might be a detoxification mechanism involved in the tolerance to silver toxicity.

At higher silver concentrations (10^{-4} M and 10^{-3} M), the EXAFS spectra were strongly dominated by Ag-Ag backscattering, which accounted for the contributions at a pseudo-distance $R + \Phi = 2.7, 3.9, 4.9$ and 5.5 Å on the Fourier transform (Figure 4B). All these peaks were successfully fitted using an Fcc silver model with respective average distances of $2.87(2)$ and $2.87(1)$ Å and average coordination numbers of $3.6(1)$ and $3.9(1)$ for the first Ag-Ag coordination sphere, for samples exposed to 10^{-4} M and 10^{-3} M respectively. The other contributions were also fitted using the same model as shown in Figure 4B but are not included for clarity in Table 1. The bond average distance was in very good agreement with the results obtained for the Ag foil (see experimental section) with an Fcc phase. It is also in agreement with distances reported for silver nanoclusters embedded in glass ($2.88(1)$ Å at 15 K) (Dubiel et al., 2005) or synthesized by living alfalfa sprouts (2.88 Å) (Gardea-Torresdey et al., 2003). The low value of the Ag-Ag coordination numbers (respectively $3.6(1)$ and $3.9(1)$, which is not significantly different) compared to the Fcc structure (equal to 12) suggests a deviation from a pure Fcc phase and the presence of silver clusters within the algae, as observed previously using TEM (Leonardo et al., 2014). It is known that small metal clusters have smaller average coordination numbers than bulk structures because the atoms located at the surface of the cluster have less neighbouring atoms, which causes the decrease of the average coordination number. Montejano-Carrizales *et al.* (1997) reported a formula that links the average coordination number of a cluster to its diameter, assuming the cluster is rather small (10-1000 atoms) and spherical. This formula, applied to the present data, indicates an Fcc silver cluster with an average coordination number of about 4 has a diameter of about 1 nm. To introduce the following results, it is noteworthy that an average coordination number of 4 may also be obtained when numerous small clusters of a few silver atoms are present together with some large clusters of about 10 nm.

Beside the Ag-Ag interactions, EXAFS spectra of samples exposed to high silver concentrations showed a small contribution at a pseudo-distance of ca. $R + \Phi = 2$ Å on the Fourier transform. This contribution may be fitted using an additional Ag-S shell at $2.46(1)$ Å and coordination numbers of $0.7(1)$. This bond length is in agreement with values reported by

Gui *et al.* (1996) for silver bound to rabbit liver metallothioneins MT1 (2.45(2) and 2.44(3) Å for Ag₁₂-MT1 and Ag₁₇-MT1, respectively). However this very low coordination number suggests considering this additional contribution with care. First of all, the presence of O neighbours instead of S has been tested and gives a satisfactory agreement as well. Several oxygenated biological ligands have been shown to bind silver (Bovenkamp *et al.*, 2013), and Dubiel *et al.* (2005) fitted visually similar spectra with Ag-O contributions when studying silver speciation in silicate glasses. Second, the interference between a minority of Ag-S and a majority of Ag-Ag backscatters at such low R distance is strongly influenced by the amplitude of the Ag contribution. Nevertheless, attempts to fit the spectra without the low R distance contribution significantly degraded the fit in this region of the spectrum.

One possible explanation is that silver nanoparticles are capped and stabilized by oxygen containing molecules, as described by Yoosaf *et al.* (2007). Given the above data, another possible explanation is that the silver nanoparticles described above coexist with unreduced isolated silver species (silver ions bound to thiols for instance) as observed for the lowest concentrations. This would suggest that the algae accumulate Ag(I) sulfur species (like at 10⁻⁵ M) but reduce Ag⁺ into Ag(0) nanoparticles when the Ag exposure increases. It is likely that these different mechanisms coexist.

The crystallinity of the silver nanoparticles formed inside algae was further investigated using X-Ray diffraction after freeze-drying. The diffractogram of control algae exposed to no silver showed that the spectra baseline is distorted because of the amorphous phases present in the freeze-dried algae and of the Kapton® film. The diffractogram of the sample exposed to 10⁻² M Ag⁺ displayed noticeable peaks at $2\theta = 38.1^\circ$, 44.3° , 64.4° and 77.5° , corresponding to the Fcc silver reference diffraction pattern (planes (111), (200), (220) and (311), respectively), which clearly indicated the existence of Fcc silver nanoparticles inside the algae. The mean size of these crystallites, assessed using the Scherrer equation, was about 10 ± 2 nm. Such mean size is consistent with previous TEM observation of similar samples which highlighted the presence of silver containing clusters whose size ranged from some nm to about 30 nm (Leonardo *et al.*, 2014). However no diffraction peaks were observed in microalgae exposed to 10⁻³ M and 10⁻⁴ M Ag⁺. Were silver crystallites present, they were either too small or too dilute to be detected by XRD. This is compatible with the EXAFS data at 10⁻⁴ M and 10⁻³ M and suggests that larger particles are obtained when

concentration increases. It also demonstrates the Fcc structure of *in situ* synthesized silver nanoparticles by *Coccomyxa actinabiotis*. The synthesis of silver nanoparticles by dead or living biomass, including plant extracts (Peng et al., 2013; Sanchez-Mendieta and Vilchis-Nestor, 2012), bacteria (Kalimuthu et al., 2008) and recently the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Barwal et al., 2011), has been reported.

Silver nanoparticle localization inside microalgae. Nanoparticles localization and size were examined using TEM in microalgae exposed to 10^{-4} M and 10^{-2} M Ag^+ . At 10^{-4} M nanoparticles appeared mainly in the chloroplast and sometimes in mitochondria (Figure 6A). Their size was inhomogeneous, ranging from 4 to 23 nm. The presence of even smaller particles could not be excluded but is difficult to see on the images. The clusters of higher size might correspond to several smaller nanoparticles. The plastid localization agrees with Beattie *et al.* (2011) observations on living plants showing that silver nanoparticles were most abundant in the chloroplasts of *Brassica juncea* exposed to $2 \cdot 10^{-2}$ M Ag^+ . However, in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to 10^{-3} M Ag^+ , nanoparticles were localized in the peripheral cytoplasm and at flagella root (Barwal et al., 2011). The discrepancy between both green microalgae may be due to different stages of nanoparticles formation related to different response thresholds to silver.

When silver intracellular concentration increased, silver nanoparticles appeared in almost all cellular compartments excluding the nucleus, namely in the chloroplast, in the cytosol along the plasma membrane, in mitochondria, on membrane structures such as Golgi apparatus and in vacuoles (Figure 6B). This distribution is consistent with previous observations performed using nano X-ray fluorescence (Leonardo et al., 2014). Concerning the localization on plasma membrane, nanoparticles may either have formed there or may have been fixed to functional groups of the plasma membrane during sample preparation if they were cytosolic and unbound to membranes. Particles seemed larger than those observed at lower silver concentration, particularly in the chloroplast. Their size in the sample exposed to 10^{-2} M Ag^+ ranged from 7 to 32 nm. The somewhat higher size of some clusters may result from the aggregation of crystallites or coalescence of smaller nanoparticles as observed by Gardea-Torresdey *et al.* (2003).

The formation of silver nanoparticles implies the reduction of Ag^+ and the nucleation of the metallic seeds, their growth with the aggregation of these small nuclei and their stabilization by capping molecules (Lukman et al., 2011) like oxygen or sulfur containing molecules. In microalgae, their formation probably relies on different simultaneous mechanisms, several molecules being able to be implied in Ag^+ reduction and nanoparticles stabilization. Various enzymes such as ATP synthase, superoxide dismutase, carbonic anhydrase and ferredoxin-NADP⁺ reductase were shown to be associated with *in vivo* synthesis of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii* (Barwal et al., 2011). Plant extracts containing aldehyde, amino and carboxyl functions (Gardea-Torresdey et al., 2002; Peng et al., 2013) as well as the chemical species oxygen superoxide O_2^- (Jones et al., 2011) were also demonstrated to synthesize silver nanoparticles or assist their synthesis. Moreover, owing to the high reduction potential of Ag^+/Ag of 0.8V, many reducing metabolites such as NADH, NADPH, glutathione or ferredoxin, whose respective redox potential are about -0.32V, -0.32, -0.22 and about -0.43V (Hopkins, 2003), are thermodynamically able to reduce Ag^+ . The initial localization of silver nanoparticles of substantial size in the chloroplast may result from several favorable dispositions. Firstly, this compartment contains high amounts of adequate reducing metabolites such as ferredoxin and NADPH. Secondly, it contains enzymes such as ferredoxin-NADP⁺ reductase, superoxide dismutase, ATP synthase and carbonic anhydrase. Thirdly, it also contains large amounts of thylakoid membranes which promote nanoparticles stabilization. In the nucleus, DNA compaction might have prevented access to interaction sites hence nanoparticles formation.

Nanoparticles formation may be one way to reduce silver toxicity. But this process reveals insufficient or not quick enough to protect the photosystem and prevent lethal effect at 10^{-4} M Ag^+ .

In conclusion, this work highlights the progressive change in processes implemented by *Coccomyxa actinabiotis* to take up and cope with silver when exposed to increasing Ag^+ concentrations. The original simultaneous monitoring of silver *in situ* speciation and localization in relation to toxicity over a large concentration range, namely 10^{-9} M to 10^{-2} M Ag^+ , brought out two mechanisms. One prevails at low concentration, below 10^{-6} M Ag^+ , the other at high concentration, above 10^{-4} M Ag^+ . They are reported here together in living algae for the first time, to our knowledge. At low micromolar concentration, microalgae fixed all

silver initially present in solution, thus totally decontaminating the water. Silver was internalized in the cell and trapped in the cytosol (Leonardo et al., 2014) mainly as unreduced Ag(I) bound by sulfur containing molecules. These might be proteins able to chelate several silver atoms as both two S and one Ag were present in the first coordination shells. This could be part of an efficient detoxification process as microalgal growth and photosynthetic activity actually remained unaffected. When silver external concentration increased, the stronger Ag⁺ intracellular influx overwhelmed cytosolic protection mechanisms. They proved insufficient to stop Ag⁺ in the cytosol and overcome its toxicity. Silver spread throughout the cell, particularly entering the chloroplast where it irreversibly damaged photosystem II, leading to cell death. Most silver was reduced to Ag(0) and aggregated to form crystalline silver nanoparticles of about 10 nm, with a Fcc structure. At 10⁻⁴ M Ag⁺, nanoparticles appeared in particular in the chloroplast, an organelle containing large quantities of membranes, reducing power and enzymes involved in oxidoreductive mechanisms. When silver concentration still increased, nanoparticles continued to form, despite cell death, as described for biomass extracts (Gardea-Torresdey et al., 2002; Peng et al., 2013). They were also detected on the inner face of the plasma membrane, on cytosolic membrane structures and in vacuoles. Moreover, interactions of silver with S or O still occurred at high Ag⁺ concentration. This might correspond to the complexation process by sulfur containing molecules or to new processes such as nanoparticle surface oxidation or capping. Molecular mechanisms of nanoparticles formation need further investigation. Nonetheless, even at 10⁻² M Ag⁺, nanoparticles remained trapped inside microalgae, which constitutes an asset for the bioremediation of contaminated environmental water or effluents.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Transversal Nuclear Toxicology Program of the CEA and the ILL for financial support. XAS experiments were carried out at the ROBL beamline of ESRF, in Grenoble, France. TEM analyses were performed at the Centre Technologique des Microstructures - Plateforme de l'Université Claude Bernard Lyon 1. We thank Annie Rivoire and Christelle Boulé for TEM analyses, Mélanie Auffan for the silver

sulfide XANES spectra, Olivier Proux for advice and Fabrice Rébeillé for manuscript reading.

References

- Barwal, I., Ranjan, P., Kateriya, S., and Yadav, S.C. (2011). Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* 9, 1–12.
- Baumann, H.A., Morrison, L., and Stengel, D.B. (2009). Metal accumulation and toxicity measured by PAM—Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1063–1075.
- Beattie, I.R., and Haverkamp, R.G. (2011). Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal. *Metallomics* 3, 628.
- Benn, T.M., and Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4133–4139.
- Bovenkamp, G.L., Zanzen, U., Krishna, K.S., Hormes, J., and Prange, A. (2013). X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy Study of the Interaction of Silver Ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6385–6390.
- Cardol, P., Bailleul, B., Rappaport, F., Derelle, E., Béal, D., Breyton, C., Bailey, S., Wollman, F.A., Grossman, A., Moreau, H., et al. (2008). An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7881–7886.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.
- Dubiel, M., Yang, X.C., and Brunsch, S. (2005). Investigation of Stress State of Silver Nanoparticles in Silicate Glasses by Means of EXAFS. *Phys. Scr.* 729.
- Eccles, H. (1999). Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Trends Biotechnol.* 17, 462–465.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539.
- Florence, D., and Hartmann, P. (2003). Les rejets radioactifs et chimiques des centrales nucléaires d'EDF (EDF/CAPE Saint-Denis).
- Frueh, A.J. (1958). The Crystallography of Silver Sulfide, Ag₂S. *Z. Für Krist. - Cryst. Mater.* 110, 136–144.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643.
- Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Parsons, J.G., Gamez, G., Herrera, I., and Jose-Yacaman, M. (2002). XAS investigations into the mechanism (s) of Au (III) binding and reduction by alfalfa biomass. *Microchem. J.* 71, 193–204.

- Gardea-Torresdey, J.L., Gomez, E., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Troiani, H., and Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa Sprouts: A Natural Source for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Langmuir* *19*, 1357–1361.
- Gillespie, I.M.M., and Philp, J.C. (2013). Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends Biotechnol.* *31*, 329–332.
- Gui, Z., Green, A.R., Kasrai, M., Bancroft, G.M., and Stillman, M.J. (1996). Sulfur K-Edge EXAFS Studies of Cadmium-, Zinc-, Copper-, and Silver-Rabbit Liver Metallothioneins. *Inorg. Chem.* *35*, 6520–6529.
- Hasnain, S.S., Diakun, G.P., Abrahams, I., Ross, I., Garner, C.D., Bremner, I., and Vasak, M. (1987). EXAFS studies of metallothionein. *Experientia. Suppl.* *52*, 227–236.
- Hiriart-Baer, V., Fortin, C., Lee, D., and Campbell, P. (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.
- Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale (De Boeck Supérieur)*.
- Jones, A.M., Garg, S., He, D., Pham, A.N., and Waite, T.D. (2011). Superoxide-Mediated Formation and Charging of Silver Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* *45*, 1428–1434.
- Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., and Burkhardt, M. (2010). Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* *158*, 2900–2905.
- Kalimuthu, K., Suresh Babu, R., Venkataraman, D., Bilal, M., and Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *65*, 150–153.
- Kittel, C. (2004). *Introduction to Solid State Physics (Wiley)*.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., and Lead, J.R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* *27*, 1825–1851.
- Lee, D.-Y., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2005). Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* *75*, 127–135.
- 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.
- Leung, B.O., Jalilehvand, F., Mah, V., Parvez, M., and Wu, Q. (2013). Silver(I) Complex Formation with Cysteine, Penicillamine, and Glutathione. *Inorg. Chem.* *52*, 4593–4602.

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

Lukman, A.I., Gong, B., Marjo, C.E., Roessner, U., and Harris, A.T. (2011). Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *J. Colloid Interface Sci.* 353, 433–444.

Matz, W., Schell, N., Bernhard, G., Prokert, F., Reich, T., Claußner, J., Oehme, W., Schlenk, R., Dienel, S., Funke, H., et al. (1999). ROBL – a CRG beamline for radiochemistry and materials research at the ESRF. *J. Synchrotron Radiat.* 6, 1076–1085.

Meharg, A.A. (2005). Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. In *Root Physiology: From Gene to Function*, H. Lambers, and T.D. Colmer, eds. (Springer Netherlands), pp. 163–174.

Ménager, M.-T., Garnier-Laplace, J., Goyffon, M., and Collectif (2009). *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine* (Tec & Doc Lavoisier).

Montano, P.A., Zhao, J., Ramanathan, M., Shenoy, G.K., and Schulze, W. (1989). Structure of Ag, Fe and Ge microclusters. *Z. Für Phys. At. Mol. Clust.* 12, 103–105.

Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., and Malcata, F.X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.* 28, 299–311.

Montejano-Carrizales, J.M., Aguilera-Granja, F., and Morán-López, J.L. (1997). Direct Enumeration of the Geometrical Characteristics of Clusters. *Nanostructured Mater.* 8, 269–287.

Nieboer, E., and Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B Chem. Phys.* 1, 3–26.

Parkhill, J.-P., Maillet, G., and Cullen, J.J. (2001). Fluorescence-Based Maximal Quantum Yield for PSII as a Diagnostic of Nutrient Stress. *J. Phycol.* 37, 517–529.

Peng, H., Yang, A., and Xiong, J. (2013). Green, microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium. *Carbohydr. Polym.* 91, 348–355.

Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., and Cañizares-Villanueva, R.O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1–10.

Pillai, S., Behra, R., Nestler, H., Suter, M.J.-F., Sigg, L., and Schirmer, K. (2014). Linking toxicity and adaptive responses across the transcriptome, proteome, and phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to silver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3490–3495.

Purcell, T.W., and Peters, J.J. (1998). Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 539–546.

Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of

antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27, 76–83.

Ratte, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 89–108.

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

Rehr, J.J., and Albers, R.C. (2000). Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure. *Rev. Mod. Phys.* 72, 621–654.

Rivasseau, C., Farhi, E., Atteia, A., Couté, A., Gromova, M., de Gouvion Saint Cyr, D., Boisson, A.-M., Féret, A.-S., Compagnon, E., and Bligny, R. (2013). An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry. *Energy Environ. Sci.* 6, 1230.

Sanchez-Mendieta, V., and Vilchis-Nestor, A.R. (2012). Green Synthesis of Noble Metal (Au, Ag, Pt) Nanoparticles, Assisted by Plant-Extracts. *Noble Met. INTECH* 391–408.

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*, Donald L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 1–82.

Stevenson, L.M., Dickson, H., Klanjscek, T., Keller, A.A., McCauley, E., and Nisbet, R.M. (2013). Environmental Feedbacks and Engineered Nanoparticles: Mitigation of Silver Nanoparticle Toxicity to *Chlamydomonas reinhardtii* by Algal-Produced Organic Compounds. *PLoS ONE* 8, e74456.

Sujak, A. (2005). Interaction between cadmium, zinc and silver-substituted plastocyanin and cytochrome b 6 f complex — heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus. *Acta Physiol. Plant.* 27, 61–69.

Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., and Shin, K.-H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51–71.

Szpunar, J., Lobinski, R., and Prange, A. (2003). Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Appl. Spectrosc.* 57, 102A–112A.

Thomson Reuters GFMS (2013). World Silver Summary.

Yoosaf, K., Ipe, B.I., Suresh, C.H., and Thomas, K.G. (2007). In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *J. Phys. Chem. C* 111, 12839–12847.

(1998). Silver oxides (Ag(x)O(y)) crystal structure, lattice parameters. In *Non-Tetrahedrally Bonded Elements and Binary Compounds I*, O. Madelung, U. Rössler, and M. Schulz, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–3.

Table 1. Best fit parameters from the refinement of the reference Ag foil and algae samples exposed to silver EXAFS spectra.

Sample	Ag-S	Ag-Ag	S_0^2 , Δe_0 , R factor, χ^2_R
Silver foil (room temperature)	None	<i>12 Ag at 2.86(1) Å</i> $\sigma^2 = 0.0099 \text{ Å}^2$	$S_0^2 = 0.9(1)$ $\Delta e_0 = 0.42(17)$ R factor = 0.017 $\chi^2_R = 0.08$
Algae exposed to 10^{-3} M Ag^+ (15 K)	<i>0.7(1) S at 2.46(1) Å</i> $\sigma^2 = 0.0057 \text{ Å}^2$	<i>3.9(1) Ag at 2.87(1) Å</i> $\sigma^2 = 0.0035 \text{ Å}^2$	$S_0^2 = 0.9$ $\Delta e_0 = 2.53(30)$ R factor = 0.030 $\chi^2_R = 0.10$
Algae exposed to 10^{-4} M Ag^+ (15 K)	<i>0.7(1) S at 2.46(1) Å</i> $\sigma^2 = 0.0050 \text{ Å}^2$	<i>3.6(1) Ag at 2.87(2) Å</i> $\sigma^2 = 0.0032 \text{ Å}^2$	$S_0^2 = 0.9$ $\Delta e_0 = 1.73(24)$ R factor = 0.019 $\chi^2_R = 0.19$
Algae exposed to 10^{-5} M Ag^+ (15 K)	<i>2.0(1) S at 2.41(1) Å</i> $\sigma^2 = 0.0048 \text{ Å}^2$	<i>0.9(1) Ag at 2.93(1) Å</i> $\sigma^2 = 0.0059 \text{ Å}^2$	$S_0^2 = 0.7(1)$ $\Delta e_0 = 1.94(32)$ R factor = 0.030 $\chi^2_R = 0.19$

σ^2 is the Debye-Waller factor; S_0^2 is the passive electron reduction factor; Δe_0 (eV) is the energy shift of the experimental spectra with respect to the theoretical energy threshold; R factor is the relative error of the fit and data; and χ^2_R is the reduced χ^2 . Fixed or linked parameters are in italics; uncertainty is given on the last digit in brackets.

Figure. 1. Uptake of silver by the green microalga *C. actinabiotis* as percentage of silver initially in solution (A) and concentration of silver in the algae after exposure, in $\text{g}\cdot\text{g}_{\text{DW}}^{-1}$ (B), versus the initial silver concentration. Microalgae grown in PBR were suspended at $2 \text{ g}_{\text{FW}}\cdot\text{L}^{-1}$ in ultrapure water and exposed to Ag^+ for 2 h at 22°C . Measurements were performed in duplicate or triplicate for each concentration (all shown in the figure). Circles: direct silver quantification in algal pellets; triangles: indirect quantification deduced from silver quantification in supernatants.

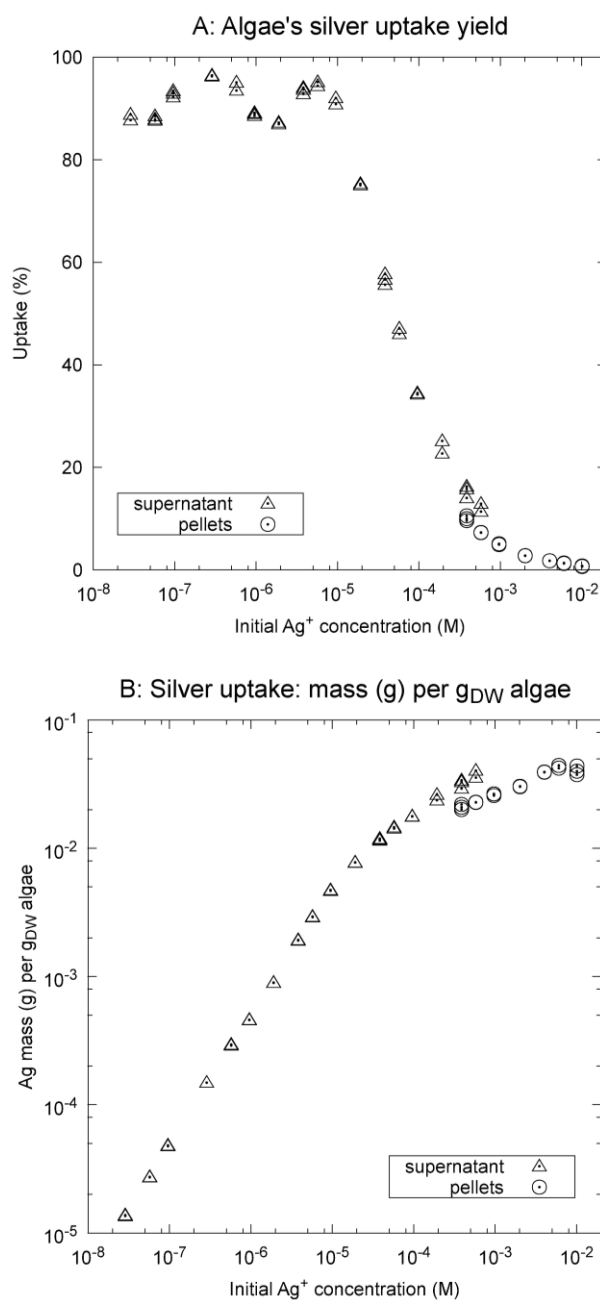


Figure 2. Physiological impact of silver on *C. actinabiotis* exposed to various Ag^+ concentrations for 2 h and recovery thereafter. Change in photosynthetic yield (photochemical yield F_v/F_m of photosystem II) (A) and algal growth (cellular density) (B) as a function of time. Microalgae at 2 g.L^{-1} were exposed to Ag^+ in ultrapure water for 2 h and transferred to a silver-free growth medium, indicated by the “T” arrow on the graphs. The first value at time zero corresponds to the fluorescence ratio and the cellular density just before silver addition, indicated by the “ Ag^+ ” arrow on the graphs. Error bars in density measurements represent the standard deviation of four counts. All measurements were performed at the same time for a given day but data were slightly horizontally shifted to allow reading the error bars.

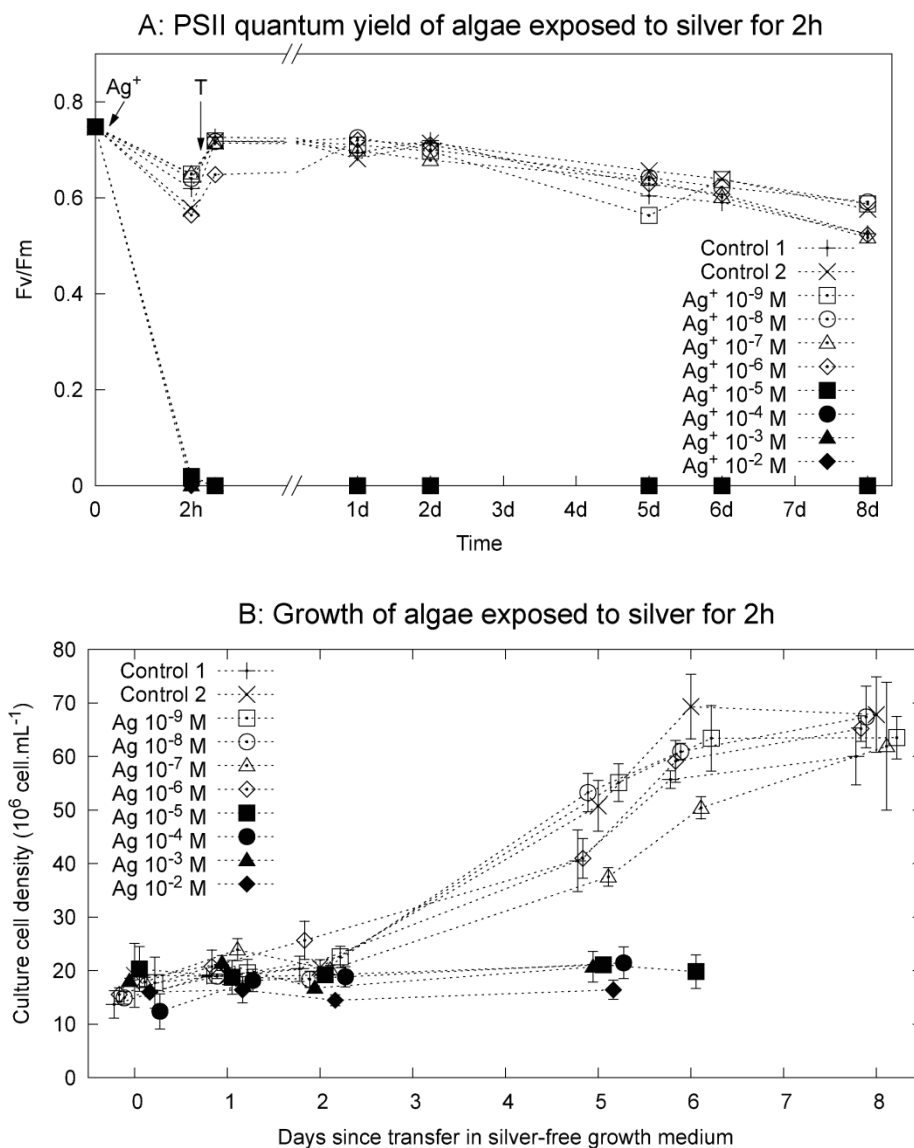


Figure 3. Ag K-edge normalized XANES spectra of algae exposed to 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M Ag^+ for 16 h and to 10^{-3} M Ag^+ for 5 h (solid lines) and of silver reference compounds (Ag_2S for Ag(I) and Ag^0 foil for Ag(0), dotted lines). The spectra have been vertically shifted for clarity.

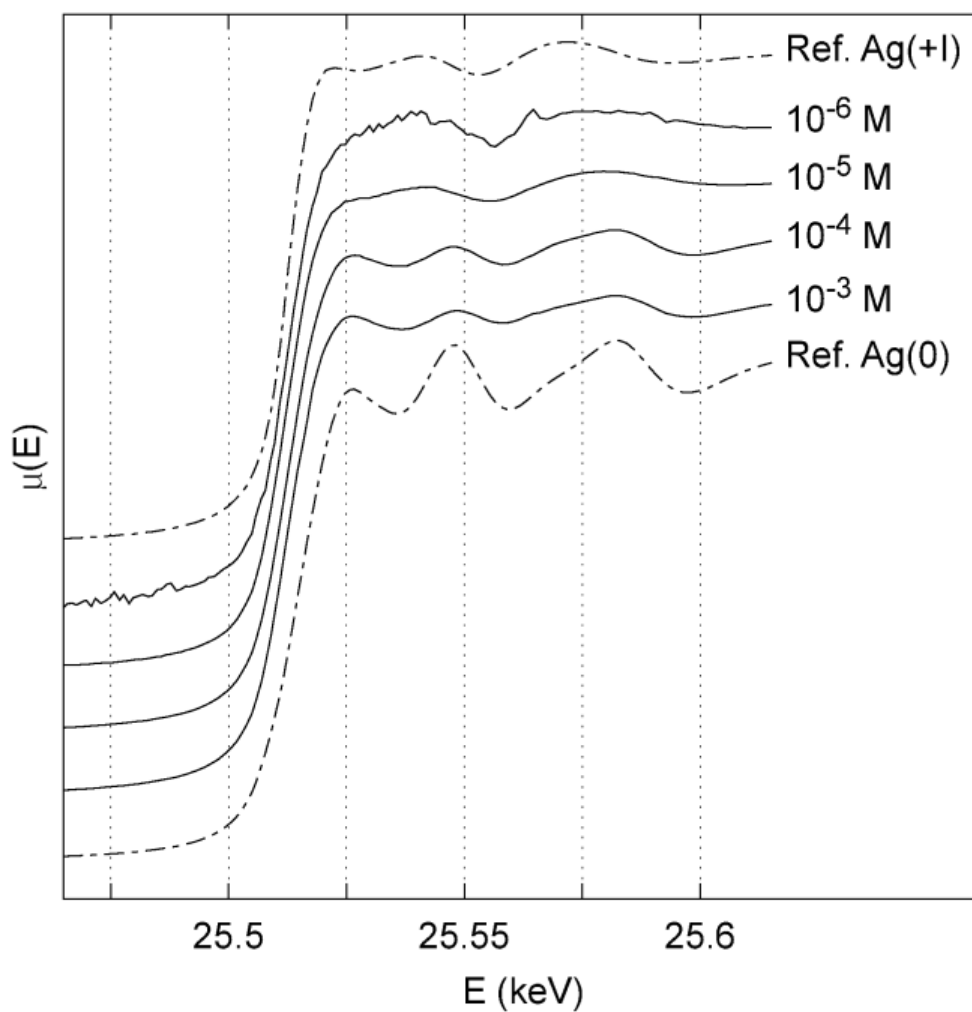


Figure 4. Ag K-edge k^2 -weighted EXAFS spectra (A) and Fourier transforms moduli (B) of algae exposed to 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M Ag^+ for 16 h and to 10^{-3} M Ag^+ for 5 h. Solid line: experimental data; dotted line: best fit. The spectra have been vertically shifted for clarity.

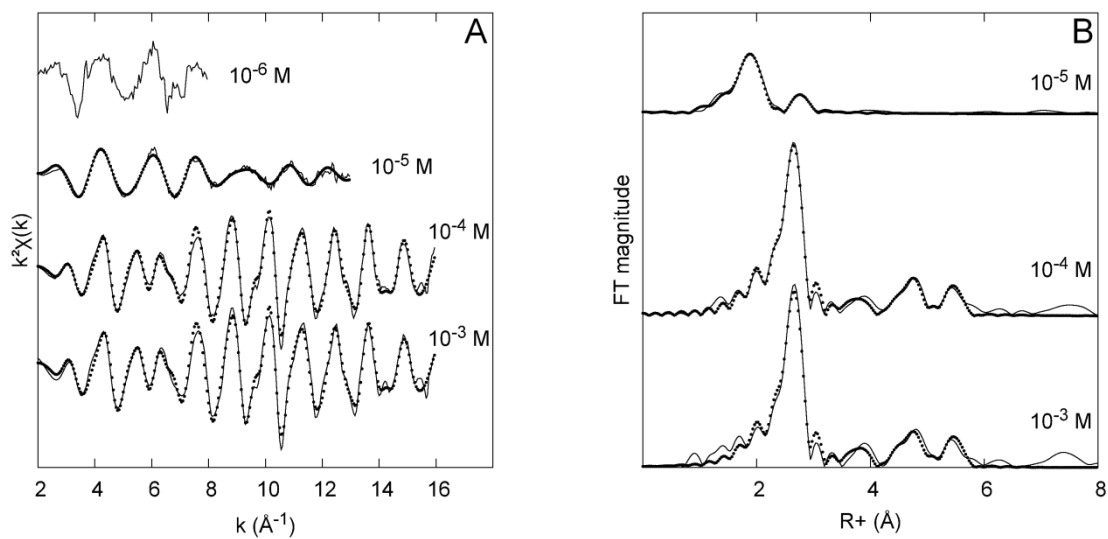


Figure 5. X-ray diffraction patterns of control microalgae (blank) and microalgae exposed to 10^{-2} M Ag^+ for 3 h. Samples were freeze-dried and covered with kapton®. Diffractograms were obtained at $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$. Vertical unit is arbitrary and spectra were vertically shifted for clarity. The position of the diffraction peaks of Face-centered cubic silver crystal obtained from ICDD 00-004-0783 is indicated on the x-axis.

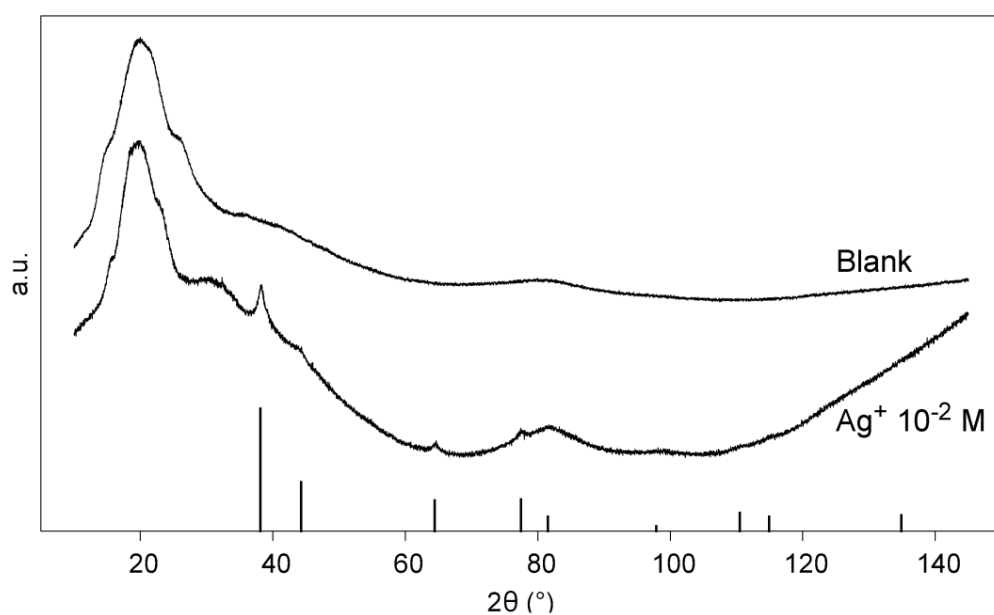
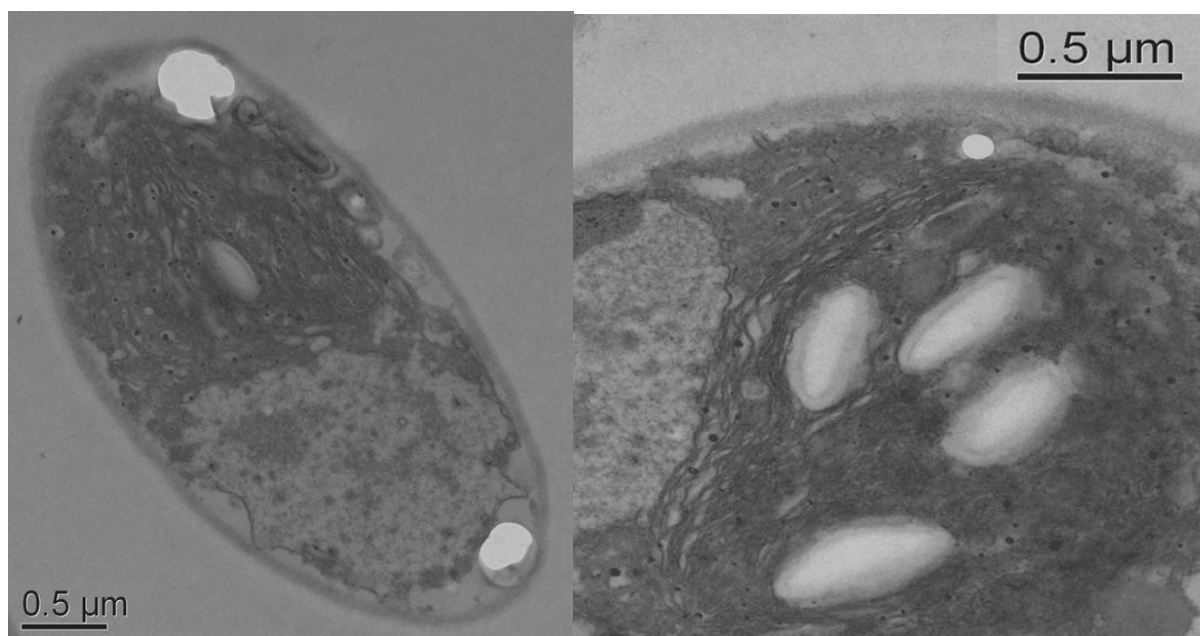
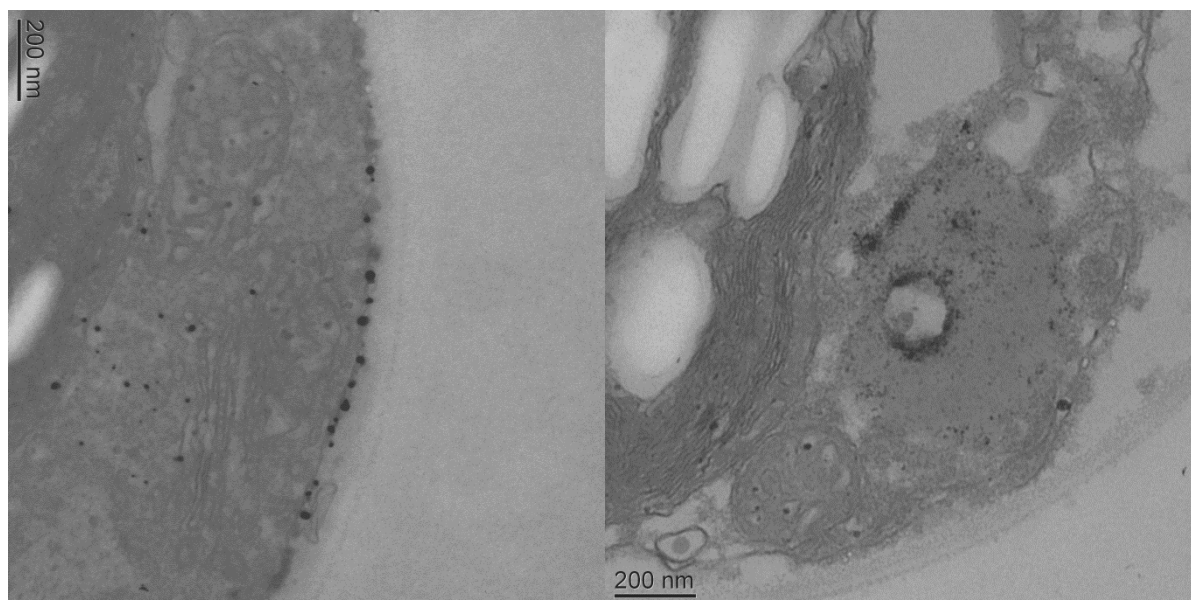


Figure 6. Nanoparticles localization (black spots) in microalgae exposed to 10^{-4} M (A) and 10^{-2} M Ag^+ (B) using TEM.

(A)



(B)



D. Conclusion sur la spéciation de l'argent internalisé dans les algues

L'analyse de la spéciation *in situ* de l'argent dans les microalgues *Coccomyxa actinabiotis* lors de l'exposition à des concentrations croissantes de Ag^+ dans la gamme de concentration de 10^{-6} M à 10^{-3} M d' Ag^+ a mis en évidence deux mécanismes différents développés par l'algue. L'un est prédominant à faible concentration, inférieure à 10^{-5} M d' Ag^+ , l'autre à concentration élevée, supérieure à 10^{-4} M d' Ag^+ .

A faible concentration, l'argent reste majoritairement sous la forme non réduite Ag(I) , d'après l'analyse qualitative des spectres XANES. Cependant, la présence d' Ag(0) minoritaire ne peut pas être exclue, mais son pourcentage serait très difficile à quantifier du fait de la largeur du front du signal XANES. Dans les premières sphères de coordination des atomes d'argent, deux atomes de soufre et un atome d'argent sont présents en moyenne avec des distances Ag-S de 2.41 Å et Ag-Ag de 2.93 Å, d'après les spectres EXAFS. Ces contributions peuvent provenir d'interactions Ag-Ag au sein d'une molécule soufrée chélatante si celle-ci est capable de chélater plusieurs Ag^+ simultanément, des structures similaires étant rapportées dans la littérature pour des complexes $\text{Cd}_2\text{Ag}_{17}$ -métallothionéines (Hasnain et al., 1987). Ou bien il peut s'agir de deux contributions indépendantes correspondant à la chélation d'un Ag^+ par une molécule soufrée, via 2 atomes de soufres, existant simultanément avec des petits clusters d'argent, qui pourraient éventuellement être réduits. La complexation de l'argent à des molécules contenant du soufre est cohérente avec les interactions préférentielles des ions Ag(I) pour les molécules soufrées telles que les cystéines, le glutathion, les phytochélatines ou les métallothionéines en milieu biologique (Bovenkamp et al., 2013; Leung et al., 2013; Nieboer and Richardson, 1980; Szpunar et al., 2003). Il a été montré que la présence d'argent induisait la synthèse de phytochélatines (Gekeler et al., 1988). Quoi qu'il en soit, ces molécules soufrées, qu'on peut supposer cytosoliques étant donnée la localisation cytosolique de l'argent à ces faibles concentrations (voir la localisation de l'argent étudiée par nanofluorescence X au chapitre précédent), pourraient appartenir à des mécanismes généraux de défense contre la toxicité métallique et permettre le confinement de l'argent dans le cytosol.

A forte concentration, l'argent est majoritairement sous la forme réduite Ag(0) , d'après l'analyse qualitative des spectres XANES. La présence d' Ag(I) minoritaire n'est pas exclue, pour la raison mentionnée plus haut.

La modélisation des spectres EXAFS, qui sont fortement dominés par des interactions Ag-Ag, suggère la présence de clusters d'argent de structure cubique faces centrées (CFC) avec des distances Ag-Ag en première sphère de coordination de 2.87 Å. La présence de ces cristallites d'argent de structure CFC est confirmée par l'analyse par diffraction des rayons X (DRX) de microalgues exposées à 10^{-2} M d'Ag⁺. La taille des cristallites déterminée par DRX est de l'ordre de 10 ± 2 nm. Des nanoparticules de cette taille ont un nombre de coordination moyen des atomes d'argent en première sphère de 11,5. Or le nombre de coordination moyen en première sphère de coordination Ag-Ag est de l'ordre de 4, d'après la modélisation des spectres EXAFS, ce qui correspondrait à des nanoparticules de l'ordre de 1 nm. Ce nombre de coordination moyen de 4 pourrait également être obtenu en présence de quelques grosses nanoparticules et de nombreux très petits clusters d'argent, des particules de l'ordre de 1 nm n'étant pas détectées en DRX.

Outre les interactions Ag-Ag, une contribution minoritaire Ag-S ou Ag-O est nécessaire à la bonne modélisation des spectres EXAFS. Il peut s'agir du processus de complexation d'Ag(I) par des ligands soufrés mis en évidence à faible concentration. Il peut également s'agir de molécules contenant des atomes d'oxygènes ou de soufre coiffant en surface les nanoparticules d'argent (auquel cas on aurait Ag(0)), comme cela a été rapporté par Yoosaf *et al.* (2007) pour des molécules oxygénées. Il peut encore s'agir de l'oxydation en surface de ces nanoparticules (en Ag(I)). Il est probable que différents processus coexistent. Pour les distinguer, il serait intéressant de quantifier la proportion d'argent engagé dans les nanoparticules par rapport à la quantité d'argent total incorporé par les microalgues. Toujours est-il qu'à forte concentration, la plupart de l'argent a été réduit en Ag(0) et agrégé pour former des nanoparticules cristallines de structure CFC. La formation de nanoparticules d'argent a été observée en présence de biomasse morte ou vivante comme des extraits de plantes (Peng *et al.*, 2013; Sanchez-Mendieta and Vilchis-Nestor, 2012) et des bactéries (Kalimuthu *et al.*, 2008). Récemment, la synthèse de telles nanoparticules a été montrée chez la microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, mais leur structure n'avait pas été déterminée (Barwal *et al.*, 2011).

II. Spéciation du cobalt internalisé par *C. actinabiotis*

La spéciation du cobalt internalisé par *C. actinabiotis* a également été analysée par spectroscopie d'absorption X. Des algues cultivées en photobioréacteur ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2\text{g}_{\text{MF}}.\text{L}^{-1}$ et exposées dans des erlenmeyers à des concentrations de Co^{2+} allant de 10^{-6} M à 10^{-2} M. L'utilisation d'eau ultra pure est nécessaire au contrôle de la spéciation du cobalt : il est ainsi totalement sous forme d'ion libre Co^{2+} avant sa mise en contact avec les algues, tandis que des complexes Co-EDTA se formeraient si les algues étaient exposées dans leur milieu de culture (cf. Annexe 8). Deux échantillons d'algues ont été préparés pour chacune des concentrations : le premier a été exposé au cobalt durant 24 h, le second durant 3 jours. L'étude des cinétiques d'accumulation du cobalt par *C. actinabiotis* a en effet montré que l'accumulation se déroule en deux temps : à une première phase courte (environ 24 h) durant laquelle l'accumulation est rapide succède une seconde phase plus longue (une dizaine de jours) durant laquelle la quantité de cobalt accumulée varie lentement (cf. Chapitre 1). Nous avons souhaité analyser par SAX des échantillons exposés au cobalt pendant des durées différentes pour évaluer l'environnement chimique du cobalt durant ces deux phases.

Les échantillons ont été analysés sous forme hydratée (le culot pâteux récolté par centrifugation a été plongé dans l'azote liquide) et étaient placés en cryostat d'hélium durant les mesures. Les spectres d'absorption X ont été acquis au seuil K du cobalt, sur la ligne de lumière BM30b de l'ESRF (FAME, *The French absorption spectroscopy beamline in material and environmental sciences*) avec l'aide d'Olivier Proux (CNRS, Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble). L'analyse des spectres a été réalisée en collaboration avec Christophe Den Auwer (Université de Nice-Sophia Antipolis, ICN/PCRE) et Olivier Proux. L'analyse des spectres s'appuie notamment sur des comparaisons avec les résultats publiés par Collins *et al.* (2010).

A. Teneur en cobalt des échantillons

La quantité de cobalt accumulée par les algues a été déterminée par ICP-MS. La teneur en cobalt des échantillons a été calculée à partir de la concentration initiale de cobalt en solution (concentration d'exposition), du pourcentage de cobalt initialement en solution accumulé par les algues et de la masse fraîche de l'échantillon au moment de la récolte. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 9. Ces valeurs exprimées ici sur la

base du poids frais, sont grossièrement équivalentes à celles reportées sur la Figure 13 et exprimées dans cette figure sur la base du poids sec (à 10 g de poids frais correspond, approximativement, 1 g de poids sec).

Echantillon	Concentration d'exposition (M)	% Co accumulé par les algues	Teneur en cobalt ($\mu\text{g Co.g}_{\text{MF}}^{-1}$)
$\text{Co}^{2+} 10^{-2} \text{ M}, 1 \text{ j}$	$9,95.10^{-3}$	0,04%	180,6
$\text{Co}^{2+} 10^{-2} \text{ M}, 3 \text{ j}$	$9,95.10^{-3}$	0,04%	160,5
$\text{Co}^{2+} 10^{-3} \text{ M}, 1 \text{ j}$	$9,97.10^{-4}$	0,33%	139,3
$\text{Co}^{2+} 10^{-3} \text{ M}, 3 \text{ j}$	$9,97.10^{-4}$	0,68%	203,0
$\text{Co}^{2+} 10^{-4} \text{ M}, 1 \text{ j}$	$9,00.10^{-5}$	1,88%	70,0
$\text{Co}^{2+} 10^{-4} \text{ M}, 3 \text{ j}$	$9,07.10^{-5}$	4,28%	102,0
$\text{Co}^{2+} 10^{-5} \text{ M}, 1 \text{ j}$	$9,00.10^{-6}$	15,28%	36,8
$\text{Co}^{2+} 10^{-5} \text{ M}, 3 \text{ j}$	$9,00.10^{-6}$	20,27%	43,5
$\text{Co}^{2+} 10^{-6} \text{ M}, 1 \text{ j}$	$9,13.10^{-7}$	20,44%	5,5
$\text{Co}^{2+} 10^{-6} \text{ M}, 3 \text{ j}$	$9,13.10^{-7}$	10,99%	2,5

Tableau 9 : Teneur en cobalt des échantillons analysés par spectroscopie d'absorption X. Le nom de l'échantillon indique la concentration de Co^{2+} à laquelle les algues sont exposées et la durée de l'exposition (1 ou 3 jours).

B. Effet de la concentration et du temps d'exposition sur la spéciation du cobalt

Les spectres XANES et EXAFS des échantillons exposés à des concentrations de cobalt comprises entre 10^{-5} et 10^{-2} M sont présentés Figure 18. Les échantillons exposés à 10^{-6} M Co^{2+} avaient une teneur en cobalt trop faible pour que des spectres SAX soient acquis (cf. Tableau 9).

Les spectres XANES (Figure 18 A) de tous les échantillons sont quasiment identiques : le degré d'oxydation du cobalt et sa géométrie de coordination sont identiques dans tous les échantillons.

Les spectres EXAFS (Figure 18 B) de tous les échantillons sont également quasiment identiques : les spectres oscillent en phase, avec des amplitudes similaires. L'environnement chimique du cobalt est donc le même pour tous les échantillons. Les variations observées pour l'EXAFS de l'échantillon d'algues exposées au cobalt à 10^{-5} M pendant 1 jour pour les valeurs de k supérieures à 8 sont liées à la faible teneur en cobalt de cet échantillon, qui limite le rapport signal sur bruit, et à la pondération du signal EXAFS par k^3 , qui amplifie fortement

ces variations aux grandes valeurs de k . Malgré ces variations liées à la sensibilité de la mesure, l'EXAFS de cet échantillon est bien comparable aux autres.

La spéciation du cobalt est donc identique dans tous les échantillons que nous avons analysés : aucune différence n'est observée aux concentrations et aux durées d'exposition étudiées (10^{-5} - 10^{-2} M Co^{2+} , 1 ou 3 jours).

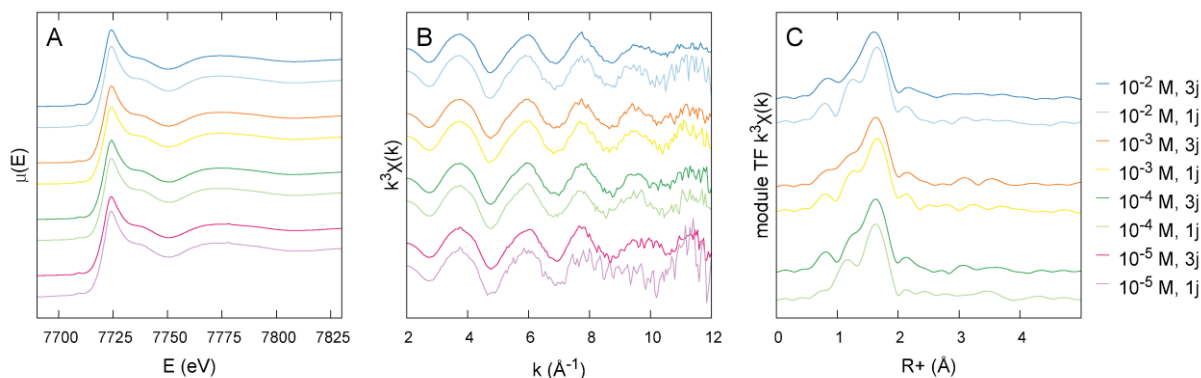


Figure 18 : Spectres XANES normalisés au seuil K du cobalt des échantillons d'algues exposées à des concentrations de Co^{2+} allant de 10^{-2} M à 10^{-5} M durant 1 ou 3 jours (A), spectres EXAFS correspondants pondérés par k^3 (B) et module de la transformée de Fourier des spectres EXAFS des échantillons exposées aux concentrations supérieures ou égales à 10^{-4} M (C).

La représentation du module de la transformée de Fourier de l'EXAFS dégrade une partie de l'information initialement contenue dans l'EXAFS car elle ne tient pas compte du déphasage $\delta(k)$ du photoélectron (cf. formule de l'EXAFS, Annexe 14). Cette représentation permet néanmoins d'évaluer le nombre de sphères de coordination⁸ qui contribuent à l'EXAFS puisqu'elle représente la distribution radiale, au facteur de phase près⁹, des atomes environnant l'atome central. On voit sur la Figure 18-C que la contribution d'une sphère unique de coordination, située à une distance non corrigée de la phase d'environ 1,6 Å, détermine presque entièrement le signal EXAFS. L'ordre local des atomes de cobalt dans nos échantillons est donc limité à une seule sphère de coordination. Les signaux EXAFS des échantillons exposés à 10^{-5} M Co^{2+} sont trop bruités pour que leur transformées de Fourier soient interprétées, elles ne sont donc pas représentées sur la figure.

⁸ Une sphère de coordination désigne en EXAFS un groupe d'atomes situés à une même distance de l'atome central.

⁹ La distance R^+ lue en abscisse de la représentation de la magnitude de la transformée de Fourier ne correspond pas à la distance réelle entre l'atome central et la sphère de coordination : il faut lui additionner la contribution du terme de phase (généralement comprises entre 0,3 et 0,5 Å), qui est calculée à partir d'un modèle structural adapté.

La spéciation du cobalt étant identique dans tous nos échantillons, nous utilisons uniquement le spectre de l'échantillon d'algues exposées pendant 3 jours à 10^{-2} M Co^{2+} dans la suite des analyses, en considérant qu'il est représentatif de tous les échantillons d'algues.

C. Spéciation du cobalt dans l'échantillon d'algues exposées 3 jours à 10^{-2} M Co^{2+}

1. Détermination du degré d'oxydation du cobalt

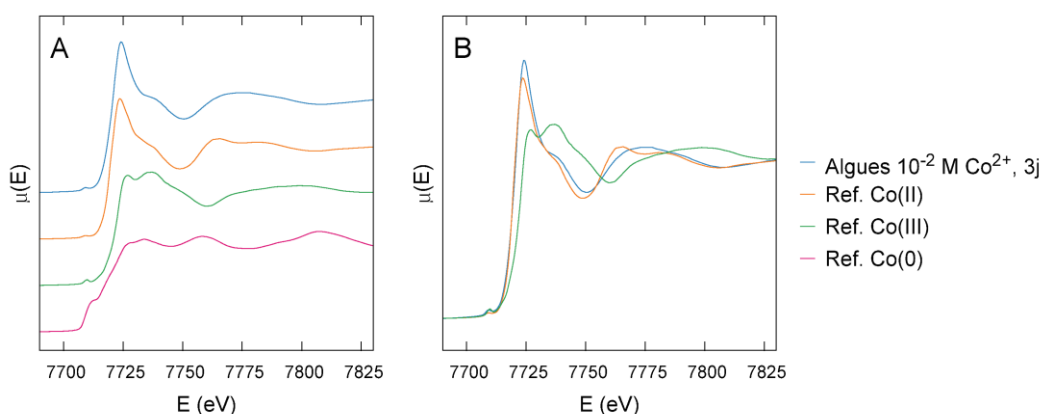


Figure 19 : Comparaison des spectres XANES normalisés au seuil K du cobalt de l'échantillon d'algues exposées à Co^{2+} 10^{-2} M durant 3 jours avec des références. Pour faciliter les comparaisons, les spectres sont décalés en ordonnée (A) ou superposés (B). Références : acétate de cobalt tétrahydrate $\text{Co}^{\text{II}}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pour Co(II), acétylacétonate de cobalt $\text{Co}^{\text{III}}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ pour Co(III) et feuille de cobalt métallique pour Co(0).

Le XANES est caractéristique du degré d'oxydation de l'atome étudié. La comparaison du XANES de l'échantillon d'algues exposées pendant 3 jours à 10^{-2} M Co^{2+} aux XANES de référence du cobalt aux degrés d'oxydation 0, +II et +III montre que le cobalt est au degré d'oxydation (+II) dans l'échantillon d'algues (Figure 19). Contrairement à l'argent, le cobalt n'est donc pas impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction lors de son accumulation par *C. actinabiotis*.

In vivo, l'ion Co^{2+} est généralement chélaté par des ligands oxygénés (fonctions carboxyles), azotés (fonctions amines) ou soufrées (thiols) (cf. chapitre Etat de l'art). Afin de préciser l'environnement chimique des atomes de cobalt internalisés par *C. actinabiotis*, nous avons comparé les spectres d'absorption X de l'échantillon d'algues avec des spectres de référence.

2. Comparaison avec des spectres de références de Co(+II)

Les spectres XANES et EXAFS de notre échantillon et les spectres d'échantillons de références de Co(+II) (acétate, cystéine et nitrate de cobalt) sont représentés sur la Figure 21.

Les XANES de tous les échantillons sont similaires, ce qui confirme que le cobalt est au degré d'oxydation +II dans tous les échantillons (Figure 21 A et B). La forme du XANES reflète également la géométrie de coordination autour de l'atome de cobalt : la présence d'un pré-pic d'intensité modérée à 7709 eV, la forte intensité de la raie d'absorption à 7724 eV et la large bosse centrée autour de 7738 eV sont caractéristiques d'une géométrie de coordination octaédrique (Figure 20) (Bresson et al., 2006; Collins et al., 2010).

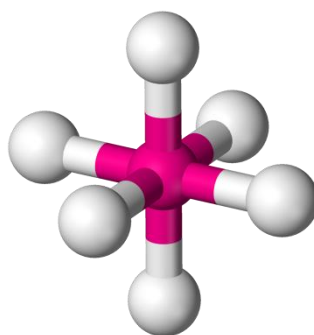


Figure 20 : Atome de cobalt au centre d'un site octaédrique. L'atome de cobalt a 6 premiers voisins.

Le pré-pic de l'échantillon d'algues est un peu plus intense que celui des références (agrandissement Figure 21 C). L'augmentation de l'aire du pré-pic est caractéristique d'une diminution de la symétrie de l'octaèdre de coordination du cobalt (Groot et al., 2009). L'octaèdre de coordination du cobalt de l'échantillon d'algues est donc distordu par rapport aux références, cette distorsion pouvant être de nature géométrique ou chimique (si les six atomes situés aux sommets de l'octaèdre ne sont pas tous de même nature).

Les spectres EXAFS de l'échantillon d'algues et des échantillons de référence (acétate, cystéine et nitrate) sont assez similaires : les oscillations principales sont parfaitement en phase et les amplitudes sont comparables (Figure 21 D et E). La première sphère de coordination du cobalt dans l'échantillon d'algues est donc semblable à celles des échantillons de référence. On observe par ailleurs sur le spectre EXAFS de l'acétate une oscillation secondaire, à plus haute fréquence, superposée à l'oscillation principale (visible par exemple autour de $k = 3,9$ et $6,9 \text{ \AA}^{-1}$). Cette oscillation correspond à la contribution d'une

deuxième sphère de coordination, suffisamment ordonnée dans le cas de l'acétate pour être visible dans l'EXAFS. Les caractéristiques de cette deuxième sphère de coordination ne nous intéressent pas dans le cas présent puisque l'ordre local des atomes de cobalt est limité à la première sphère de coordination dans l'échantillon d'algues.

L'environnement chimique des références d'acétate et de nitrate a été modélisé par Olivier Proux dans Collins *et al.* (2010) : dans les deux cas, la première sphère de coordination du cobalt est constituée de six atomes d'oxygène, situés à des distances moyennes de 2,06 Å pour la référence d'acétate de cobalt et de 2,08 Å pour la référence de nitrate de cobalt (distances données par rapport à l'atome central). L'environnement chimique du complexe de référence cystéine-cobalt n'a pas été modélisé.

On déduit de ces résultats et de la similarité des spectres EXAFS de la Figure 21 que, dans l'échantillon d'algues, l'atome de cobalt est entouré par six atomes d'oxygène et/ou d'azote. L'EXAFS ne permet en effet pas de distinguer les atomes d'oxygène des atomes d'azote car leurs amplitudes de rétrodiffusion $f(k)$ (cf. équation EXAFS Annexe 14) et leurs distances de liaison à d'autres atomes sont très proches (Figure 22). Les interactions cobalt-azote en premier voisin ont été exclues de la modélisation des spectres des références car les ligands sont connus (nitrate et acétate) et ne permettent pas de telles interactions, mais cette hypothèse n'est pas fondée dans le cas de l'échantillon d'algues car celles-ci contiennent des ligands azotés pouvant engendrer des interactions cobalt-azote en premier voisin.

La modélisation des spectres de référence montre en revanche l'absence d'atomes de soufre dans la première sphère de coordination du cobalt des échantillons présentés sur la Figure 21. Le soufre a en effet une amplitude de rétrodiffusion beaucoup plus ample que celles de l'oxygène et de l'azote (Figure 22), donc les spectres des échantillons de référence n'auraient pas pu être modélisés correctement avec six oxygènes s'il y avait du soufre dans la première sphère de coordination du cobalt dans ces échantillons, et on observerait davantage de différences entre les spectres EXAFS s'il était présent dans la première sphère de coordination du cobalt dans les autres échantillons.

En résumé, la comparaison avec différents échantillons de référence (Figure 19 et Figure 21) indique que les atomes de cobalt internalisés par *C. actinabiotis* sont au degré d'oxydation (+II) et que leur sphère de coordination est constituée de six atomes d'oxygène et/ou d'azote formant un octaèdre qui n'est pas parfaitement symétrique (distorsion

géométrique ou chimique). Nous avons testé la validité de ces conclusions en construisant un modèle de l'environnement local du cobalt.

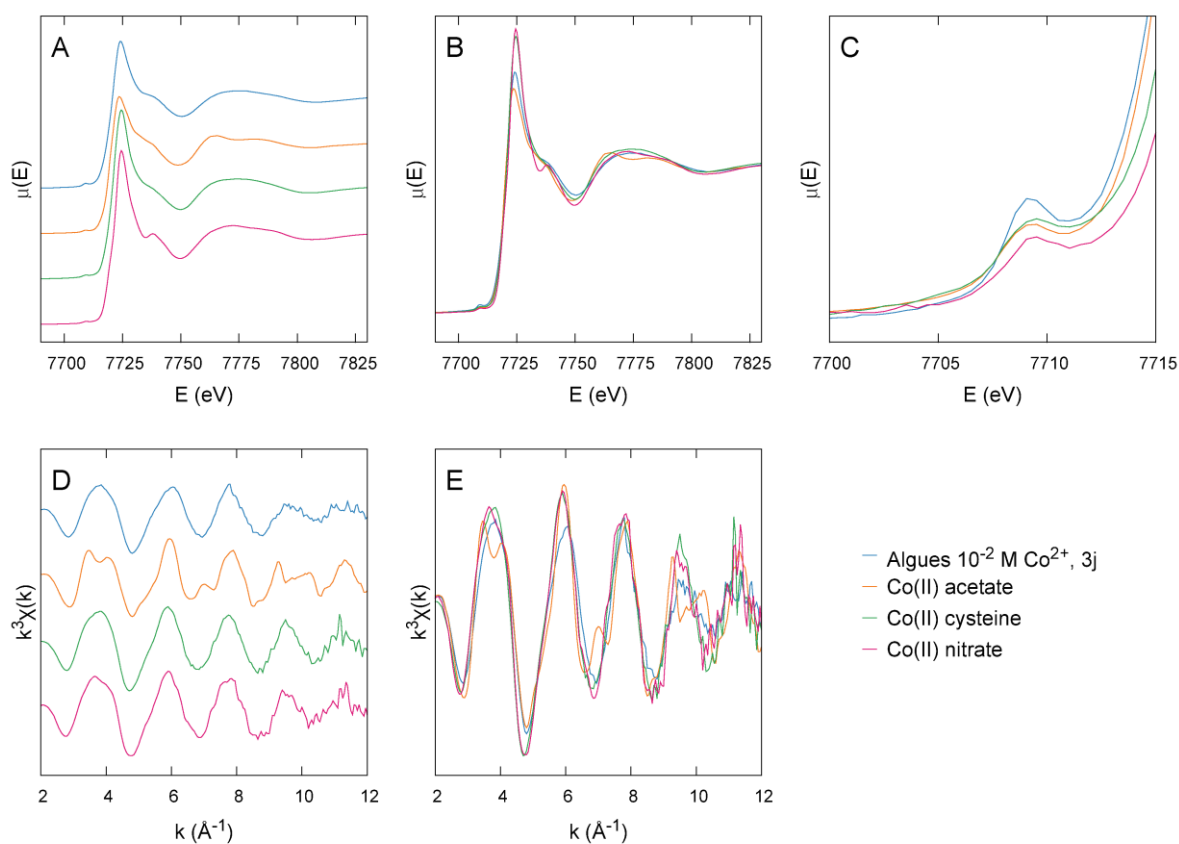


Figure 21 : Comparaison des spectres XANES normalisés et des spectres EXAFS pondérés par k^3 au seuil K du cobalt de l'échantillon d'algues exposées à $\text{Co}^{2+} 10^{-2} \text{ M}$ durant 3 jours avec des références de $\text{Co}(+II)$. Spectres XANES décalés en ordonnée (A) et superposés (B), agrandissement des pré-pics superposés (C) et spectres EXAFS décalés en ordonnée (D) et superposés (E). Références : acétate de cobalt tétrahydrate $\text{Co}^{II}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, complexe $\text{Co}(II)$ -cystéine et nitrate de cobalt hexahydrate $\text{Co}^{II}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

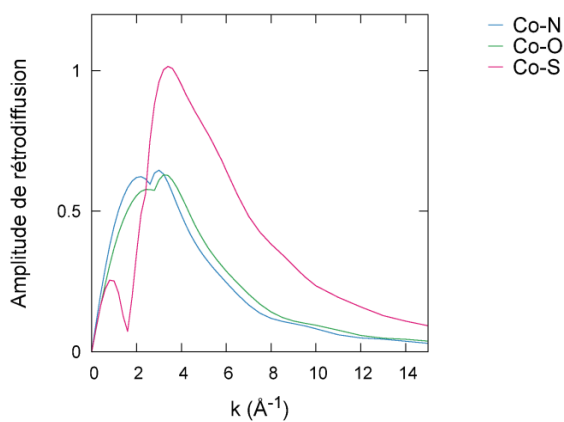


Figure 22 : Amplitudes de rétrodiffusion $f(k)$ des chemins Co-N , Co-O et Co-S , calculées par FEFF 6.0

3. Modélisation de l'environnement chimique du cobalt

Sur la base des conclusions précédentes, nous avons modélisé la première sphère de coordination des atomes de cobalt par six atomes d'oxygène situés à égale distance (notée R) de l'atome central. Les paramètres de ce modèle ont été affinés en ajustant le spectre EXAFS simulé du modèle au spectre de l'échantillon, pour des valeurs de R comprises entre 1 et 3 Å (l'ajustement est ainsi limité à la première sphère de coordination).

Les paramètres ajustés du modèle sont présentés dans Tableau 10 et les spectres correspondants sont représentés sur la Figure 23. Le spectre simulé du modèle structural est fidèle au spectre mesuré de l'échantillon d'algues. Ces résultats confirment que la première sphère de coordination du cobalt est constituée de six atomes d'oxygène et/ou d'azote, situés à 2,08 Å de l'atome central en moyenne. Cette distance est en accord avec les valeurs typiquement rapportées dans la littérature pour les distances cobalt-oxygène : Collins *et al.* (2010) rapportent par exemple des distances comprises entre 2,06 et 2,08 Å et Bresson *et al.* (2006) des distances de 2,09 Å.

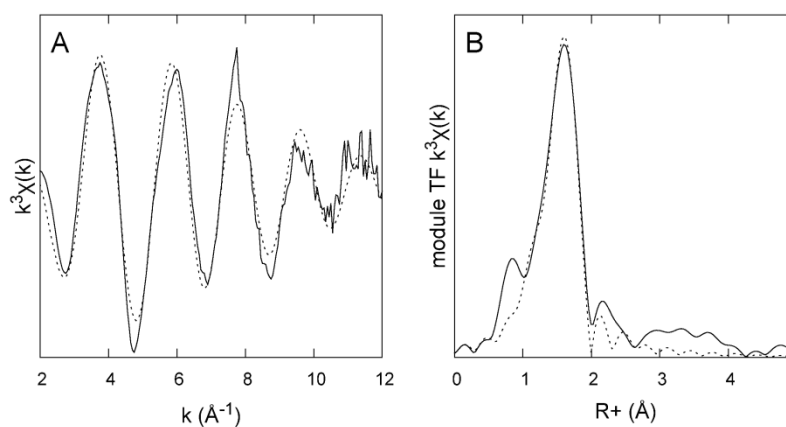


Figure 23 : Spectre EXAFS au seuil K du cobalt pondéré par k^3 (A) et module de la transformée de Fourier (B). Les lignes continues sont les spectres mesurés de l'échantillon d'algues exposées à des concentrations de Co^{2+} de 10^{-2} M durant 3 jours et les lignes pointillées sont les spectres simulés à partir du modèle structural (atome de cobalt entouré de six atomes d'oxygène).

Echantillon	N	R (Å)	σ^2 (Å ²)	ΔE (eV)	Facteur R
Algues exposées à Co^{2+} 10^{-2} M durant 3 j	6 O	$2,08 \pm 0,01$	$0,007 \pm 0,001$	-3,72	0,02

Tableau 10 : Paramètres d'ajustement du modèle d'environnement structural du cobalt dans l'échantillon d'algues exposées à Co^{2+} 10^{-2} M durant 3 jours. N : nombre d'atomes (paramètre fixé), R : distance à l'atome central, σ^2 : facteur de Debye-Waller, ΔE : décalage en énergie, facteur R : résiduel entre la simulation et l'expérience

4. Comparaison de la spéciation du cobalt chez *C. actinabiotis* et chez des plantes supérieures

La spéciation du cobalt accumulé par des plants de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) exposés durant 20 jours à 20 μM de cobalt a été étudiée par Collins *et al.* (2010). La spéciation du cobalt dans les racines et les feuilles de chacune des plantes a été analysée par spectroscopie d'absorption X. Les mesures ont été réalisées en cryostat. Une partie des spectres XANES et EXAFS publiés par Collins *et al.* et les spectres acquis sur l'échantillon d'algues exposées durant 3 jours à 10^{-2} M Co^{2+} sont représentés Figure 24.

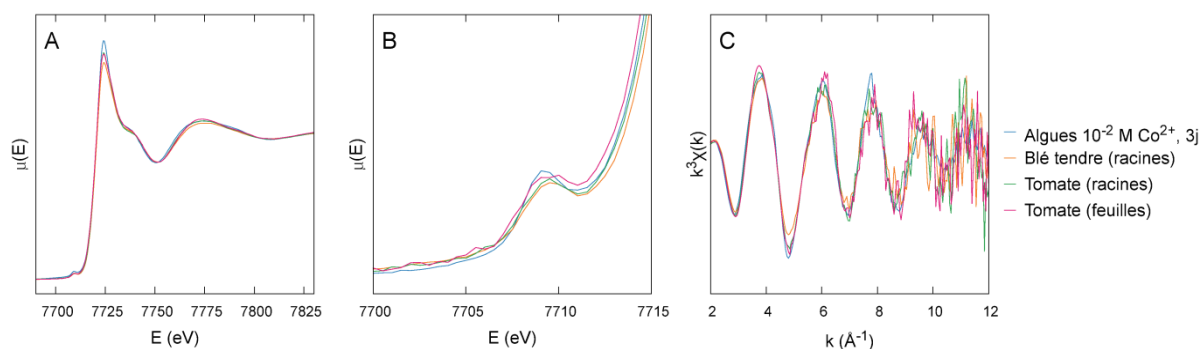


Figure 24 : Comparaison des spectres XANES normalisés et des spectres EXAFS pondérés par k^3 au seuil K du cobalt de l'échantillon d'algues exposées à Co^{2+} 10^{-2} M durant 3 jours avec les spectres mesurés sur des racines de blé tendre, des racines de tomate et des feuilles de tomate exposés au cobalt. Spectres XANES (A), agrandissement des pré-pics (B) et spectres EXAFS (C) superposés.

On constate que les spectres de l'échantillon d'algues sont très similaires aux spectres du cobalt accumulé par les racines de blé tendre, les racines de tomate et les feuilles de tomate (le spectre des feuilles de blé tendre, que nous n'avons pas représenté, est en revanche un peu différent). Les variations d'amplitude entre les spectres sont trop faibles pour être interprétées.

Le cobalt peut donc avoir une spéciation similaire chez *C. actinabiotis* et chez certaines plantes supérieures. Nous avons vu que l'information que l'on peut déduire des spectres acquis sur ces échantillons est toutefois limitée à la première sphère de coordination

des atomes de cobalt. La similarité entre les spectres des algues et des plantes supérieures n'indique donc pas nécessairement que le cobalt est chélaté dans les deux cas par les mêmes ligands, mais qu'il est chélaté par des ligands portant des fonctions chimiques similaires.

D. Conclusion sur la spéciation du cobalt incorporé par *C. actinabiotis*

L'analyse par spectroscopie d'absorption X du cobalt internalisé par *C. actinabiotis* a montré que la spéciation du métal dans l'algue est indépendante de la concentration et de la durée d'exposition, pour des concentrations d'expositions comprises entre 10^{-5} et 10^{-2} M Co^{2+} et des durées d'exposition de un et trois jours.

Le cobalt internalisé par les algues a un degré d'oxydation formel de (+II), comme le cobalt initialement introduit en solution. Les atomes de cobalt ne sont pas impliqués dans un processus d'oxydo-réduction. Les spectres EXAFS montrent que l'ordre local des atomes de cobalt est quasiment limité à la première sphère de coordination dans les algues. La comparaison avec des spectres de référence et la modélisation de la structure locale des atomes ont permis de déterminer les propriétés de cette sphère de coordination : c'est un octaèdre dont la symétrie est imparfaite, constitué de six atomes d'oxygène et/ou d'azote situés à environ 2,08 Å de l'atome central en moyenne. Une spéciation similaire a été observée pour des atomes de cobalt accumulés par des plantes supérieures. Le cobalt est par exemple bien engagé par six liaisons dans la structure de la vitamine B₁₂ : quatre avec des azotes constitutifs du noyau tétrapyrrole modifié, une avec un atome d'azote porté par une chaîne latérale du noyau, et une sixième avec un groupe hydroxyle, méthyle, cyanure ou désoxyadénosyle (Figure 25). Dans les trois derniers cas, le sixième voisin du cobalt n'est pas un atome d'azote ou d'oxygène mais de carbone. Compte tenu des faibles concentrations de vitamine B₁₂ généralement présentes dans les cellules, le cobalt séquestré dans les cellules au cours de nos expérimentations est probablement associé à d'autres entités chimiques que la cobalamine.

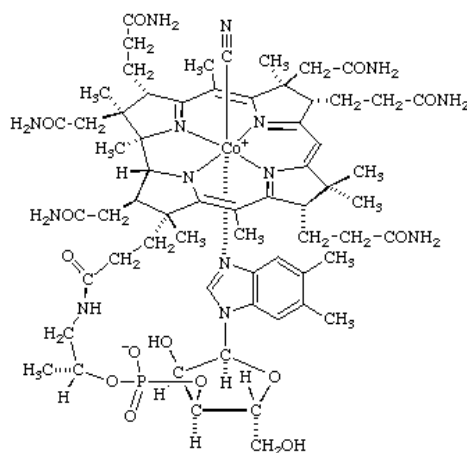


Figure 25 : Représentation de la vitamine B₁₂ (cyanocobalamine). On remarque l'environnement octaédrique de l'atome de cobalt

De nombreux ligands présents dans les algues portent des fonctions oxygénées (notamment les acides carboxyliques) ou azotées (telles que les imidazoles, les tétrapyrroles ou amines) et peuvent être impliqués dans la chélation du cobalt *in vivo* (Le Guen and Ansoborlo, 2004; Morgan and Parker, 1952; Palit et al., 1994; Szpunar et al., 2003). L'identification exacte des ligands responsables de la chélation du cobalt chez *C. actinabiotis* n'est pas connue et reste donc à déterminer. Il serait notamment intéressant de savoir quels types de composés (protéines, sucres, acides organiques) sont les plus impliqués. Pour cela, des expériences visant à extraire sans les dénaturer les protéines ou les sucres, suivies d'étapes de purification sur des colonnes de type exclusion stérique, et enfin un dosage du métal dans chacune des différentes fractions, pourraient être envisagées dans une première étape. Il est par ailleurs possible que la chélation des ions cobalt ne présente aucune spécificité, et qu'au sein d'une même cellule différents atomes de cobalt soient chélatés par des ligands de nature totalement différente.

Chapitre 4 : Impact biologique de l'argent et du cobalt sur *C. actinabiotis*

Au cours des chapitres de résultats précédents, nous avons montré que l'algue *C. actinabiotis* peut accumuler des quantités importantes d'argent et de cobalt présents dans son environnement. Puis nous avons vu que ces éléments s'accumulent dans des territoires différents : l'argent aux concentrations les plus faibles est plutôt localisé dans le cytosol, tandis qu'aux fortes concentrations il se répartit de façon plus homogène et sa présence est détectée dans tous les territoires cellulaires ; le cobalt est présent dans tous les compartiments cellulaires à l'exception du chloroplaste. Nous avons ensuite montré que, lorsque les algues sont exposées à de faibles concentrations d'argent, le métal est essentiellement (mais peut-être pas uniquement) présent au sein de la cellule au degré d'oxydation (+I) et qu'il est probablement lié à deux atomes de soufre ; tandis qu'aux fortes concentrations il est essentiellement réduit en Ag(0) et forme des nanoparticules cristallines de type cubique face centrée. Le cobalt est toujours présent au degré d'oxydation (+II), lié à six atomes d'oxygène et/ou d'azote. Dans ce chapitre, nous allons tenter d'estimer l'impact de ces métaux sur la physiologie et le métabolisme de l'algue.

I. Croissance et activité photosynthétique des algues exposées aux métaux

Le taux de croissance des cultures d'algues est un paramètre facilement observable qui reflète l'état physiologique global des cultures. La toxicité métallique entraîne généralement une inhibition de la croissance des algues, ce paramètre est donc couramment suivi dans le cadre d'études visant à quantifier l'impact physiologique des métaux (Hiriart-Baer et al., 2006; Macfie et al., 1994).

L'activité photosynthétique des algues est également un bon indicateur de leur état physiologique. C'est un paramètre particulièrement important dans le cas des algues cultivées en conditions autotrophes, puisqu'alors leur développement repose essentiellement sur la photosynthèse. Le photosystème est très sensible à différentes formes de stress (stress nutritif, herbicides, etc.), en particulier à la toxicité métallique (Parkhill et al., 2001; Suresh Kumar et al., 2014). Son activité peut être évaluée *in vivo* et sans perturber le développement des cultures en mesurant la fluorescence de la chlorophylle a d'algues soumises à différents stimuli lumineux. Le rendement photochimique maximal F_v/F_m mesure l'efficacité intrinsèque (ou maximale) du photosystème II (PSII), c'est-à-dire l'efficacité quantique qu'aurait le PSII si tous ses centres étaient ouverts (Baker, 2008; Maxwell and Johnson,

2000). Il est couramment utilisé pour évaluer l'impact toxique des métaux sur les algues (Baumann et al., 2009; Pillai et al., 2014; Plekhanov and Chemeris, 2003). C'est un rapport dont la valeur est comprise entre 0 et 1. Sa valeur est généralement de 0,6-0,7 pour des cultures d'algues dont l'état physiologique est bon (Butler and Kitajima, 1975), mais elle varie selon les espèces (Suresh Kumar et al., 2014). La valeur du Fv/Fm diminue, parfois jusqu'à atteindre des valeurs nulles, lorsque l'appareil photosynthétique est endommagé.

Nous présentons dans cette section des résultats du suivi de la croissance et de l'activité photosynthétique de culture de *C. actinabiotis* exposées à l'argent et au cobalt.

A. Argent

Des algues cultivées en photobioréacteur ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2\text{g}_{\text{MF}}\cdot\text{L}^{-1}$ et exposées dans des erlenmeyers à des concentrations d' Ag^+ allant de 10^{-9} M à 10^{-2} M durant 2 h ou 24 h. Les algues ont ensuite été transférées dans du milieu de culture (BBM dilué deux fois) ne contenant pas d'argent. Deux cultures témoins ont également été suivies : ces cultures ont été transférées dans de l'eau ultra pure durant les expositions à l'argent, puis dans du milieu de culture.

Le suivi de la croissance et du rendement photochimique maximal du photosystème II des cultures permet de distinguer deux groupes d'échantillons : ceux exposés à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-6} M, et ceux exposés à des concentrations supérieures ou égales à 10^{-5} M.

Les échantillons ont un Fv/Fm de 0,75 au début de l'expérimentation, juste avant l'ajout de l'argent dans les erlenmeyers. Le Fv/Fm des échantillons exposés à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-6} M d' Ag^+ décroît légèrement lors de l'exposition à l'argent, jusqu'à des valeurs comprises entre 0,57 et 0,65 après 2 h d'exposition (Figure 26 A)), et entre 0,46 et 0,56 après 24 h (Figure 27 A). Une décroissance similaire du Fv/Fm est observée sur les échantillons témoins, il est probable qu'elle soit due à la carence nutritive ou au stress osmotique induits par la mise en suspension des algues dans l'eau ultra pure (Parkhill et al., 2001). Le Fv/Fm des échantillons exposés à des concentrations supérieures ou égales à 10^{-5} M chute en revanche très rapidement et a une valeur nulle dès 2 h après le début de l'exposition.

Le transfert des algues exposés durant 2 h ou 24 h à de faibles concentrations d'argent

($\leq 10^{-6}$ M) et des témoins dans du milieu de culture engendre une augmentation immédiate du Fv/Fm d'environ 0,10. Le Fv/Fm décroît ensuite lentement durant 7 à 8 jours, jusqu'à des valeurs comprises entre 0,50 et 0,60. Le suivi de la densité cellulaire des cultures montre que la croissance des algues exposées aux faibles concentrations d'argent durant 2 h est similaire à celle des témoins (Figure 26 B). La lente diminution du Fv/Fm durant 8 jours est corrélée à la croissance des algues jusqu'à un plateau, elle pourrait donc correspondre à l'effet d'une carence nutritive croissante. Les échantillons exposés durant 24 h à de faibles concentrations d'argent et les témoins croissent lentement après leur transfert dans du milieu de culture (Figure 27 B). Leur croissance est faible et irrégulière, voire retardée par rapport à celle des échantillons exposés durant 2 h, y compris pour les échantillons témoins. L'incubation durant 24 h dans de l'eau ultra pure explique certainement ces différences.

Les algues exposées à de fortes concentrations d'argent ($\geq 10^{-5}$ M) pendant 2 h ou 24 h ont une réponse physiologique radicalement différente : leur transfert dans du milieu de culture n'engendre aucune amélioration de leur Fv/Fm, qui reste nul (Figure 26 A et Figure 27 A), et la densité cellulaire des cultures reste constante (Figure 26 B et Figure 27 B). Au vu de ces paramètres physiologique, on peut considérer que les cultures exposées aux fortes concentrations d'argent durant 2 h ou plus sont « mortes ».

Ces observations suggèrent que l'exposition de *C. actinabiotis* à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-6} M Ag^+ durant 2 h à 24 h affecte peu ou pas l'appareil photosynthétique de l'algue et son taux croissance, tandis que l'exposition à des concentrations supérieures ou égales à 10^{-5} M est toxique et affecte les paramètres physiologiques suivis en moins de 2 h et endommage l'appareil photosynthétique de l'algue de façon irréversible.

Ces observations nous permettent également d'évaluer la concentration efficace médiane (CE_{50}) de l'impact toxique des ions Ag^+ sur *C. actinabiotis* : dans les conditions de l'expérimentation, la CE_{50} est comprise entre 1 et 10 μM . Elle est supérieure aux CE_{50} rapportées dans la littérature pour les micro-algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, qui sont comprises entre 10 et 200 nM Ag^+ (voir Tableau 3, chapitre Etat de l'art). La tolérance de *C. actinabiotis* à Ag^+ est donc supérieure à celle d'autres micro-algues vertes.

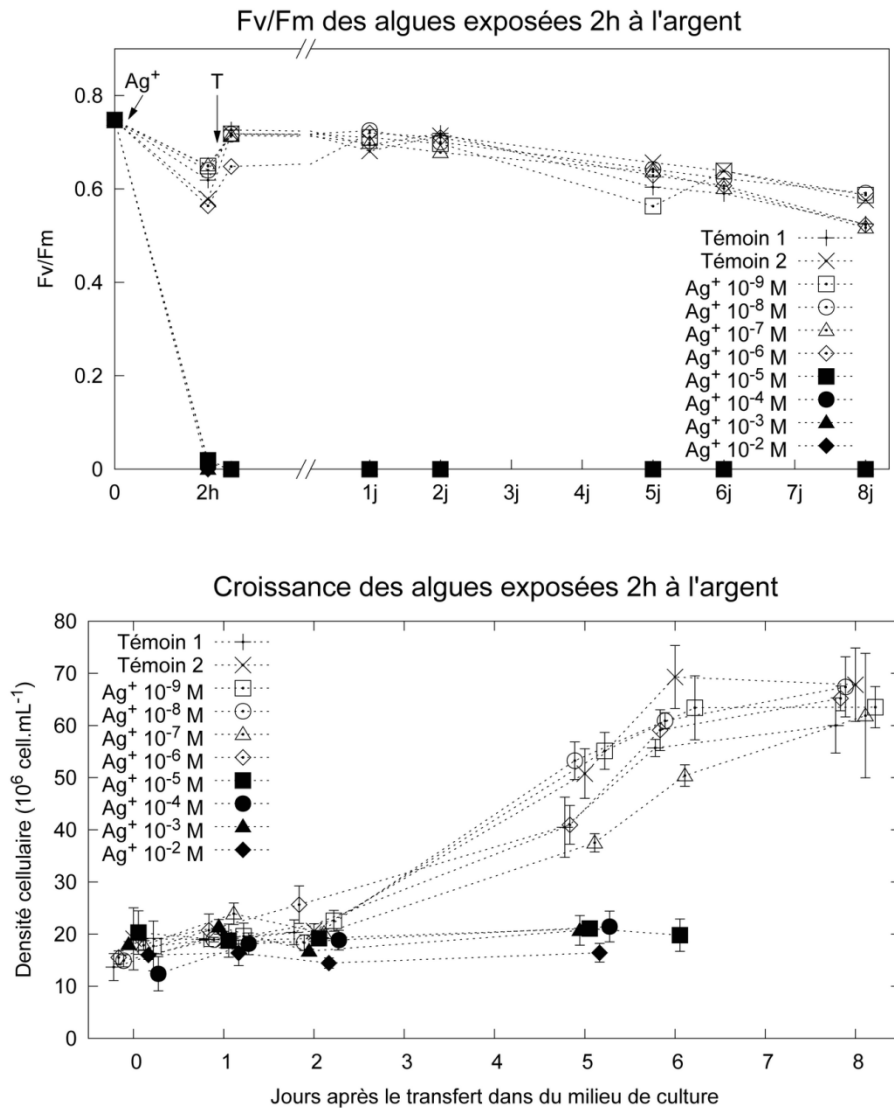


Figure 26 : Impact physiologique de l'argent sur *C. actinabiotis* exposée à des concentrations d'Ag²⁺ comprises entre 10⁻⁹ et 10⁻² M pendant 2 h.

Haut : Variation du paramètre Fv/Fm ; après 2 h d'exposition, les algues sont transférées (T) dans un milieu de culture sans argent et l'évolution du paramètre Fv/Fm est mesurée pendant les 8 jours suivant afin de suivre la récupération.

Bas : Evolution de la croissance après le transfert dans le milieu de culture sans argent.

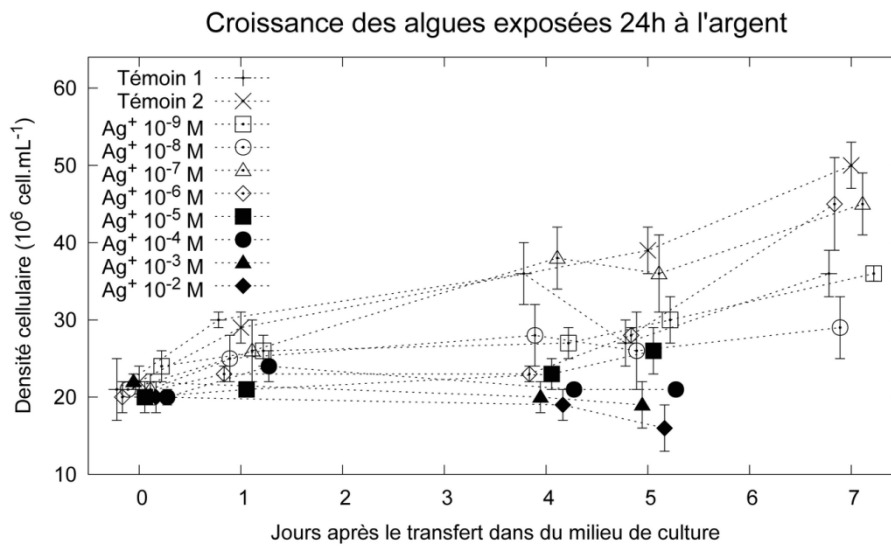
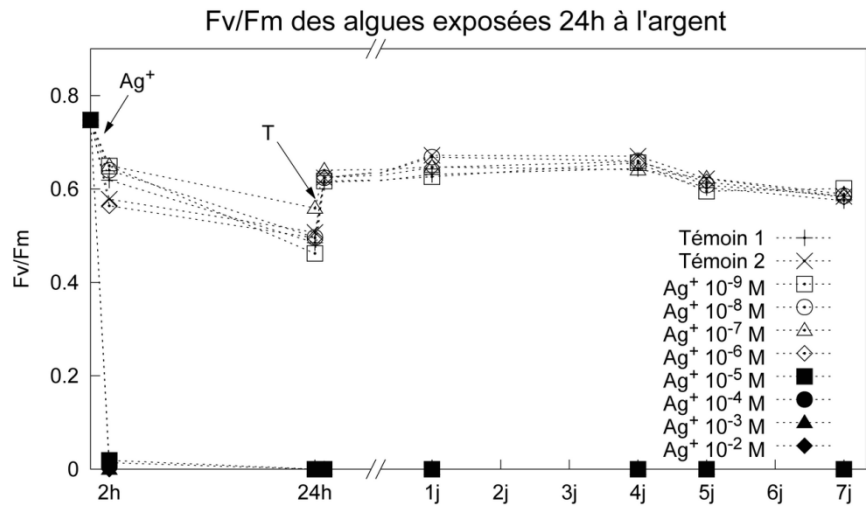


Figure 27 : Impact physiologique de l'argent sur *C. actinabiotis* exposée à des concentrations d' Ag^{2+} comprises entre 10^{-9} et 10^{-2} M pendant 24 h.

Haut : Variation du paramètre Fv/Fm ; après 24 h d'exposition, les algues sont transférées (T) dans un milieu de culture sans argent et l'évolution du paramètre Fv/Fm est mesurée pendant les 7 jours suivant afin de suivre la récupération.

Bas : Evolution de la croissance après le transfert dans le milieu de culture sans argent.

B. Cobalt

L'effet physiologique des ions Co^{2+} sur *C. actinabiotis* a été évalué lors de l'étude des cinétiques d'accumulation du cobalt, présentée dans le chapitre 1. Des algues cultivées en photobioréacteur ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2\text{g}_{\text{MF}}\cdot\text{L}^{-1}$ et exposées dans des erlenmeyers à des concentrations de Co^{2+} allant de 10^{-7} M à 10^{-2} M. La croissance et le Fv/Fm de ces cultures et de deux cultures témoins (algues dans l'eau ultra pure) ont été suivies durant 7 à 11 jours. Les observations ont été répétées trois fois, sur des échantillons biologiques distincts.

La densité cellulaire de toutes les cultures, témoins compris, est globalement constante durant l'expérimentation (Figure 28). L'absence de croissance, puisqu'elle concerne également les échantillons témoins, est avant tout l'effet de la carence nutritive due à la mise en suspension des algues dans de l'eau ultra pure. Ces observations ne renseignent donc pas sur l'effet physiologique des ions Co^{2+} sur les algues.

Le suivi du Fv/Fm indique que l'activité photosynthétique des algues est progressivement diminuée au cours du temps et à mesure que la concentration en Co^{2+} dans le milieu augmente (Figure 29). Quelle que soit la concentration de cobalt, le Fv/Fm est peu impacté après 3 h d'exposition, sa diminution ne devient visible aux fortes concentrations qu'à partir de 24 h. On peut distinguer trois groupes de concentrations, en tenant compte des trois répétitions de l'expérimentation :

- Les algues témoins et des algues exposées à 10^{-7} M, dont le Fv/Fm diminue lentement, d'environ 15% en 9 à 11 jours
- Les algues exposées à des concentrations de Co^{2+} comprises entre 10^{-4} M et 10^{-2} M ont un Fv/Fm quasiment nul après 11 jours d'exposition
- Les algues exposées à 10^{-6} M et 10^{-5} M présentent un comportement intermédiaire : la diminution de leur Fv/Fm est variable, elle est comprise entre 20 et 75% entre 9 et 11 jours, selon les répétitions

Le cobalt n'a donc pas d'impact sur le photosystème de *C. actinabiotis* lorsque les algues sont exposées à 10^{-7} M Co^{2+} , y compris sur des temps longs. Des concentrations intermédiaires (10^{-5} M et 10^{-6} M) perturbent modérément le photosystème, tandis que des concentrations supérieures ou égales à 10^{-4} M inhibent fortement son fonctionnement après 9 jours d'exposition.

La CE₅₀ de la toxicité des ions Co²⁺ sur *C. actinabiotis* est comprise entre 1 et 100 µM pour des temps d'exposition compris entre 3 et 9 jours. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature pour *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella vulgaris* pour des temps d'exposition de 4 à 5 jours (voir Tableau 6, chapitre Etat de l'art).

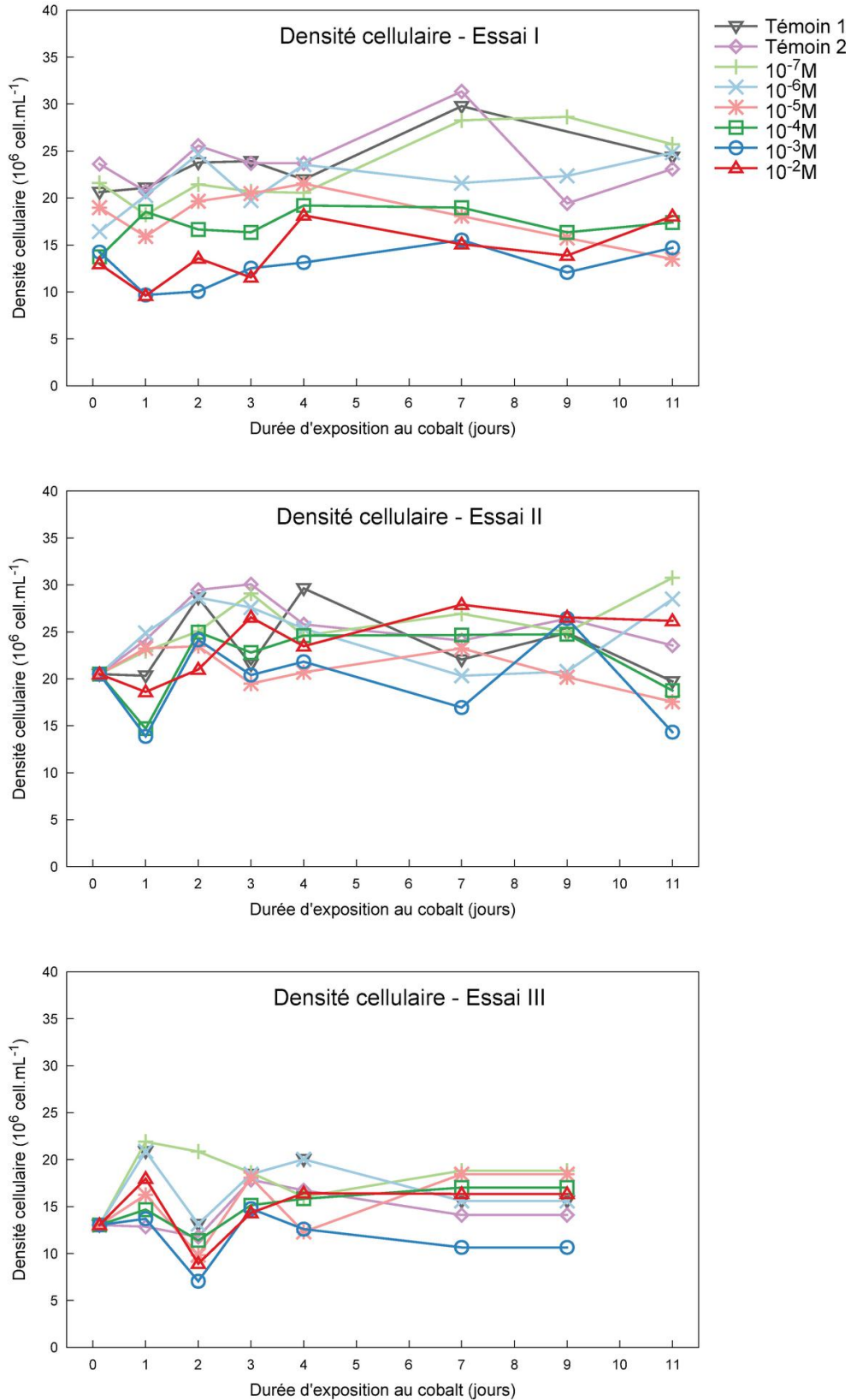


Figure 28 : Evolution de la densité cellulaire de cultures d'algues *C. actinabiotis* exposées à des concentrations de cobalt comprises entre 10⁻⁷ et 10⁻² M.

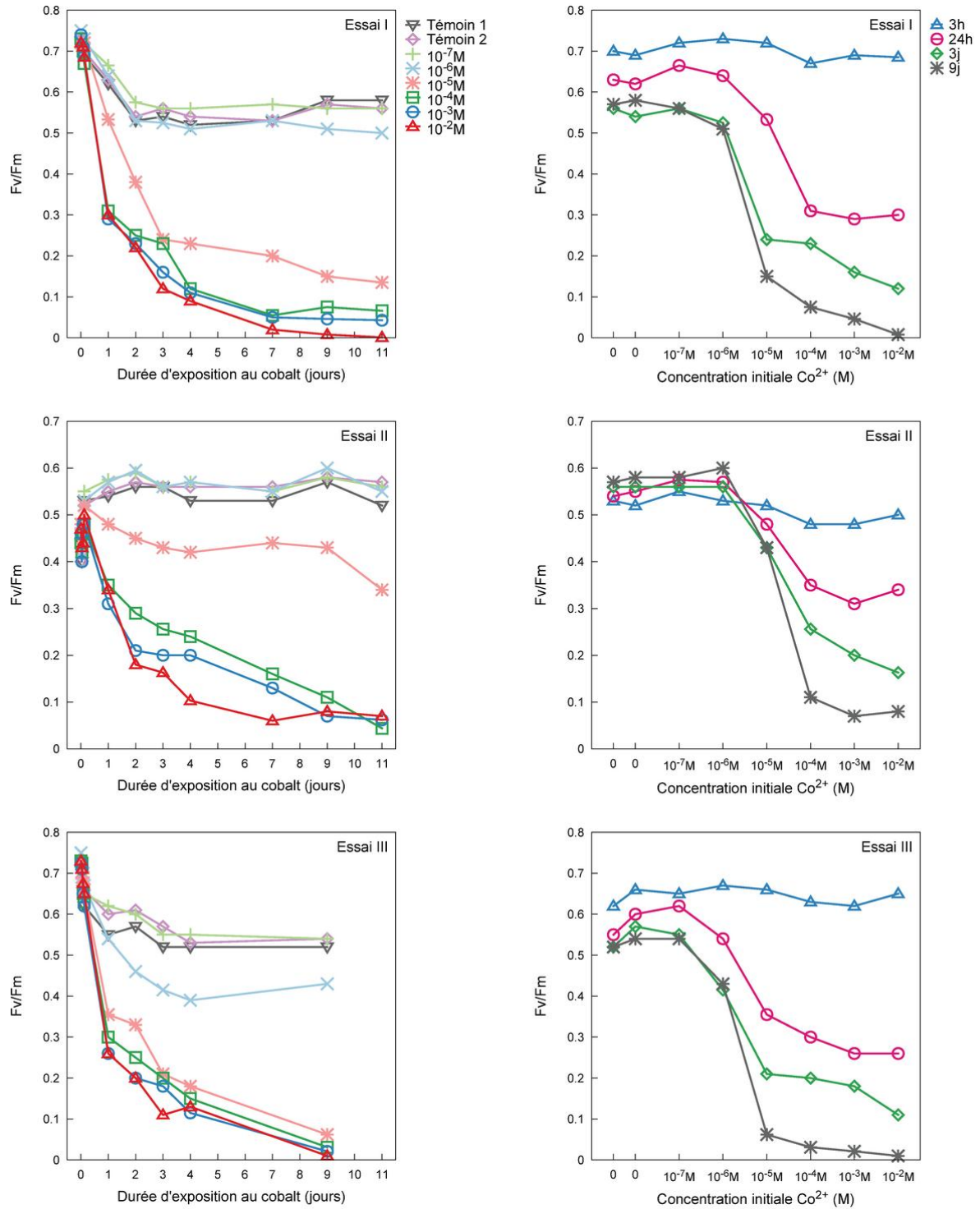


Figure 29 : Rendement photosynthétique (Fv/Fm) de cultures d'algues *C. actinabiotis* exposées à des concentrations de cobalt comprises entre 10⁻⁷ et 10⁻² M.

II. Analyses métaboliques

Le suivi de paramètres physiologiques permet de quantifier l'effet toxique des métaux sur les organismes, mais il ne permet pas d'étudier les voies métaboliques affectées par les métaux ou la réponse adaptative mise en œuvre par les algues face au stress induit. C'est pourquoi nous avons examiné la réponse métabolique de *C. actinabiotis* lors d'expositions à l'argent au cobalt. Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques : le métabolome hydrophile des algues a été analysé par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), tandis que certains composés du métabolome hydrophobe ont été analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, pour *high-performance liquid chromatography*).

Des algues cultivées en photobioréacteur ont été récoltées en phase de croissance, mises en solution dans l'eau ultra pure à une concentration massique de $2\text{g}_{\text{MF}}\cdot\text{L}^{-1}$ et exposées dans des erlenmeyers aux métaux. Les algues exposées à l'argent ont été exposées à des concentrations d' Ag^+ allant de 10^{-7} M à 10^{-2} M durant 2 h ; les algues exposées au cobalt ont été exposées à des concentrations de Co^{2+} allant de 10^{-7} M à 10^{-2} M durant 24 h. Pour les deux métaux, les expositions à 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M ont été répétées trois fois, sur des échantillons biologiques distincts. Deux échantillons témoins ont également été analysés pour chaque série de mesures : un échantillon directement issu de la culture en photobioréacteur dont sont issues les algues utilisées pour la série de mesure, noté *BBM* ; et un échantillon d'algues mises en suspension dans de l'eau ultra pure durant 2 h lors des expositions à l'argent et 24 h lors des expositions au cobalt, respectivement notés *H₂O 2h* et *H₂O 24h*.

Après avoir été exposés aux métaux, les échantillons ont été séparés en deux fractions :

- Les métabolites hydrophiles ont été extraits de la première fraction par une extraction à l'acide perchlorique et analysés par RMN ^1H
- Les métabolites hydrophobes ont été extraits de la seconde fraction par une extraction méthanol/chloroforme et analysés par HPLC

Les analyses RMN ^1H ont été réalisées avec l'aide de Anne-Marie Boisson (CEA Grenoble, DSV/IRTSV/PCV) et Marina Gromova (CEA Grenoble, DSM/INAC/SCIB/LRM), et les analyses HPLC avec l'aide de Marcel Kuntz (CEA Grenoble, DSV/IRTSV/PCV). Nous présentons ici les résultats de ces analyses.

A. Métabolome hydrophile analysé par RMN

L'analyse par RMN ^1H permet d'établir le profil métabolique d'un organisme vivant à un instant donné, sans séparation préalable des différents métabolites. Les métabolites présents dans l'échantillon peuvent ensuite être identifiés d'après la forme des pics (démultiplication et hauteurs relatives) et leur déplacement chimique δ . L'analyse RMN ^1H est également quantitative, l'aire des pics étant proportionnelle au nombre de protons qui résonnent au déplacement chimique considéré. Cette méthode ne prétend pas mesurer l'intégralité des composés solubles hydrophiles des algues (la RMN est une méthode d'analyse assez peu sensible) mais permet de visualiser les métabolites les plus abondants.

L'analyse des témoins *BBM*, *H₂O 2h* et *H₂O 24h* a permis d'identifier les principaux métabolites présents chez *C. actinabiotis* (Figure 30). Les pics ont été identifiés par comparaison avec les données publiées par Gromova *et al.* (2010) pour *Arabidopsis thaliana* (Tableau 11).

Métabolite ou composé chimique	δ (ppm)
Leucine (Leu)	0,96 ; 0,97
Isoleucine (Ile)	1,01
Valine (Val)	1,05
Lactate	1,33
Alanine (Ala)	1,48
Acétate	1,92
Acide glutamique (Glu)	2,06 ; 2,35
Glutamine (Gln)	2,13 ; 2,46
EDTA	3,2
Choline	3,21
HDO	4,75
Sucrose	5,42
Maléate	6,01
Formate	8,46

Tableau 11 : Identification des pics présents sur les spectres RMN

Le métabolome de *C. actinabiotis* est fortement dominé par la présence de polyols, dont le ribitol ($\delta = 3,6-3,9$). Dans le cas de culture en mode PBR (comme dans les expériences présentées ici) et au contraire de cellules cultivées en mode ballon, le ribitol peut quelquefois

s'accumuler de façon importante. Le ribitol est le principal pentol (pentose alcool, de formule $C_5H_{12}O_5$) présent chez les plantes supérieures et les algues, et c'est chez certaines espèces le principal produit de la photosynthèse (Stamford, 2001). Les polyols sont des métabolites principalement présents chez les organismes qui colonisent des environnements extrêmes, ils semblent exercer plusieurs fonctions protectives dans des conditions de stress (Gustavs et al., 2011). Leur présence a par exemple été observée chez des micro-algues vertes de la classe des *Trebouxiophyceae* résistantes au stress osmotique et à la sécheresse, capables de se développer dans des environnements non-aquatiques (par exemple sous forme de biofilms sur l'écorce des arbres ou sur des bâtiments) (Gustavs et al., 2010, 2011). Chez ces algues, la synthèse et l'accumulation de polyols, et notamment de ribitol, est induite par un stress osmotique (Gustavs et al., 2010). L'influence des conditions de culture (PBR ou ballon) sur l'accumulation de ribitol, même en absence de stress métallique, est difficile à expliquer et nécessite de plus amples investigations.

Les spectres des témoins *BBM* et des témoins H_2O correspondants sont très similaires (Figure 30), la mise en suspension des algues dans de l'eau ultra pure ne modifie donc pas significativement les métabolites les plus facilement observables par RMN : l'observation d'éventuelles variations de ces métabolites sera due à la présence des métaux.

Les spectres des témoins *BBM* des différentes séries d'expositions réalisées sont également très similaires, ce qui indique une bonne stabilité des cultures d'algues dans les conditions expérimentales utilisées.

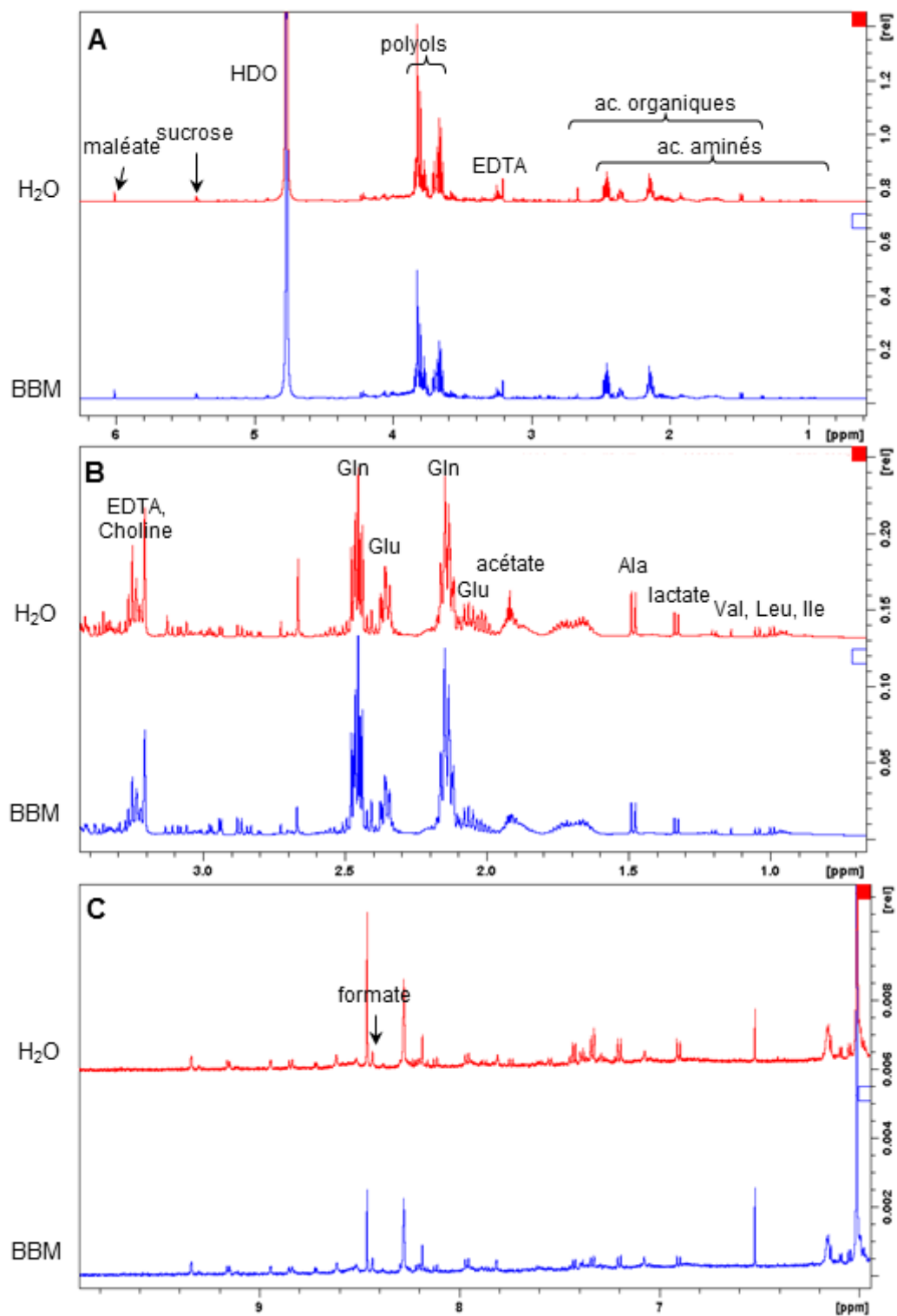


Figure 30 : Spectres RMN du proton d'extraits d'algues *C. actinabiotis* placées pendant 24h soit dans du milieu de culture (BBM) soit dans de l'eau pure (H₂O). A : spectres montrant les déplacements chimiques dans la région 0.6 à 6.2 ppm. B : élargissement de la partie 0.7 à 3.4 ppm détaillant la zone des acides aminés et des acides organiques. C : élargissement de la zone 6 à 9.8 ppm ; cette zone ne comporte que des pics de faible intensité. Tous les signaux n'ont pu être attribués. L'identification des raies indiquée sur ces figures a été établie d'après Gromova et Roby (2010)

1. Effet de l'argent

Les spectres RMN ^1H d'une série d'échantillons exposés à des concentrations d' Ag^+ allant de 10^{-7} M à 10^{-2} M durant 2 h et le témoin H_2O 2h correspondant sont présentés (Figure 31). Cette série est représentative des résultats obtenus pour les trois répétitions de l'expérimentation.

Le spectre des algues exposées à 10^{-7} M Ag^+ est similaire à celui de l'échantillon témoin, le métabolome hydrophile de l'algue n'est pas du tout affecté. Les échantillons exposés à 10^{-6} M Ag^+ sont identiques au témoin ou contiennent un peu moins de métabolites hydrophiles en fonction des répétitions, puis on observe une très nette chute de l'ensemble des métabolites entre 10^{-6} et 10^{-5} M (Figure 31-A). Les algues sont très largement vidées de leurs acides aminés pour des concentrations d'exposition supérieures ou égales à 10^{-5} M (Figure 31-B, $\delta = 1-3$ ppm). Nous avons vu qu'à ces concentrations les paramètres physiologiques mesurés suggèrent la mort des algues, il est possible que les cellules deviennent de ce fait perméables et se vident en grande partie dans le milieu extérieur, ce qui expliquerait la disparition des acides aminés du contenu cellulaire.

Le massif des polyols (et des oses) s'effondre à ces mêmes concentrations, mais il conserve néanmoins un niveau minimal non nul (Figure 31-C, $\delta = 3,4-4,3$ ppm), ce qui pourrait suggérer que les cellules ne se vident pas entièrement. En effet, l'observation en microscopie optique des algues exposées à de fortes concentrations d'argent indique qu'elles conservent leur forme générale après l'exposition au métal, quand bien même leurs paramètres physiologiques sont nuls, et ce pendant plusieurs jours. Alternativement, le signal observé aux fortes concentrations pourrait être celui des composés constitutifs de la structure (paroi) cellulaire.

On note l'apparition d'un pic sur la Figure 31-B à $\delta = 2,64$ pour l'échantillon exposé à 10^{-5} M Ag^+ . Ce pic n'apparaît pas dans le spectre des deux autres échantillons exposés à cette concentration et il n'a pas été identifié. On note aussi l'apparition d'un pic à 4.84, observable dans toutes nos expériences et quelles que soient les conditions de culture. La nature de ce composé est actuellement en cours d'identification.

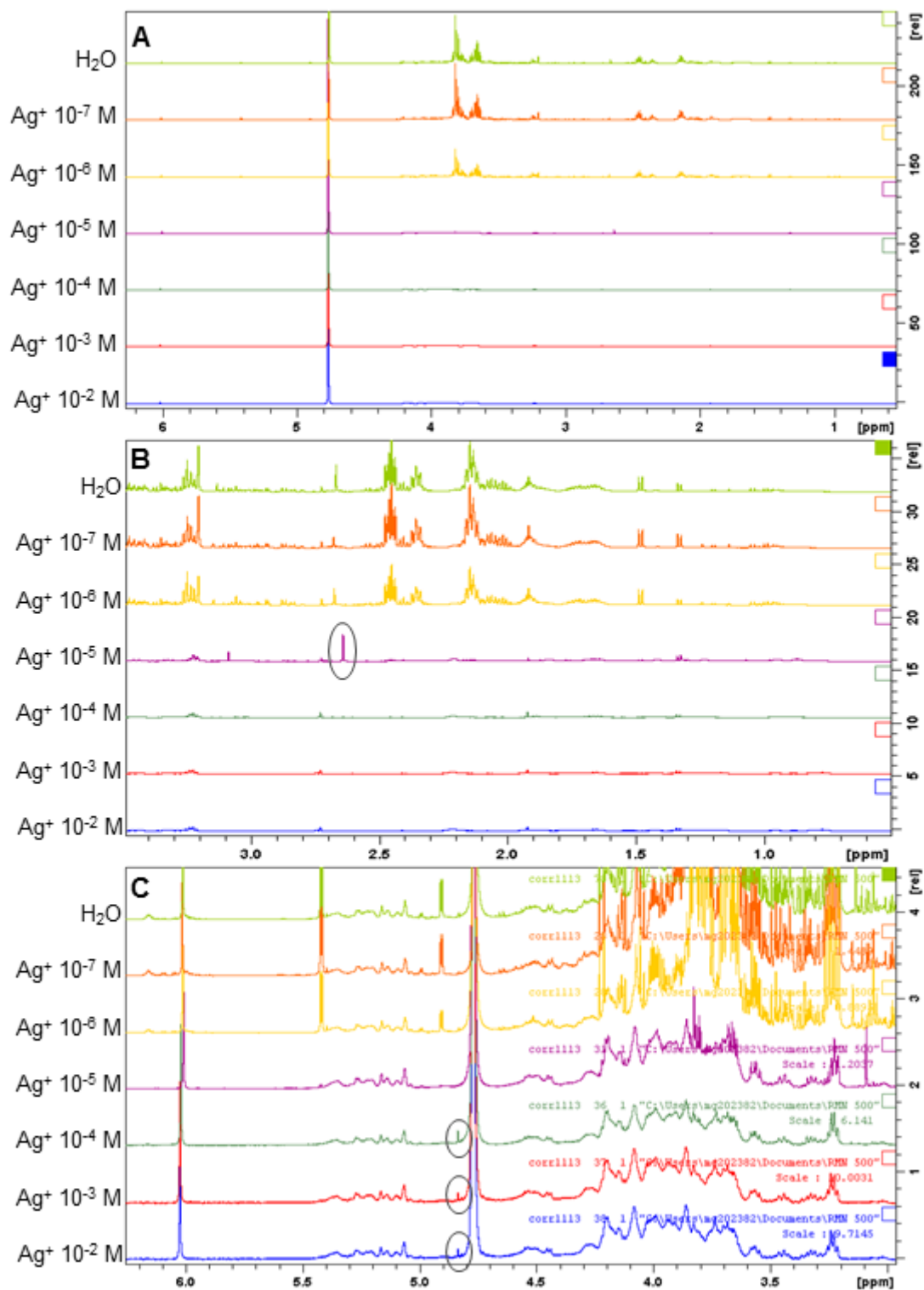


Figure 31 : Spectres RMN du proton d'extraits d'algues *C. actinobiotis* exposées à différentes concentrations d'argent. Les concentrations d'argent, de 10^{-7} à 10^{-2} M, sont indiquées pour chaque spectre sur le côté gauche des figures. Le témoin (pas d'exposition à l'argent) est H_2O . A : spectres montrant les déplacements chimiques dans la région 0.6 à 6.2 ppm. B : élargissement de la partie 0.7 à 3.4 ppm détaillant la zone des acides aminés et des acides organiques. C : élargissement de la partie 3 à 6.2 ppm détaillant la zone des acides polyols. Les nouveaux pics qui apparaissent suite au traitement sont entourés.

2. Effet du cobalt

Les spectres RMN ^1H d'une série d'échantillons exposés à des concentrations de Co^{2+} allant de 10^{-7} M à 10^{-2} M durant 24 h et les témoins *BBM* et *H₂O 24h* correspondants sont présentés (Figure 32). Cette série est représentative des résultats obtenus pour les trois répétitions de l'expérimentation.

Les spectres des échantillons exposés au cobalt sont globalement similaires au spectre de l'échantillon témoin pour l'ensemble des concentrations étudiées, le métabolome hydrophile de l'algue est très stable malgré l'exposition au cobalt. Quelques variations, observées sur plusieurs séries de mesures, apparaissent toutefois aux fortes concentrations d'exposition :

- Les algues exposées à 10^{-4} M Co^{2+} accumulent davantage de formate ($\delta = 8,46$ ppm) que les algues témoins ou les algues exposées à d'autres concentrations de cobalt. L'origine métabolique du formate n'a jamais été très claire, même chez les plantes supérieures. Il pourrait provenir d'un clivage non enzymatique du glyoxylate, un intermédiaire produit au cours de réactions oxydatives dans le peroxyosome (au cours de la photorespiration, par exemple, ou cours de gluconéogénèse, c'est-à-dire la conversion des acides gras en sucres). Il peut provenir aussi de l'oxydation du méthanol. Des quantités importantes de méthanol peuvent en effet être produites lors de la dégradation des pectines, constituants de la paroi cellulaire (Igamberdiev et al., 1999).
- L'exposition des algues à des concentrations de Co^{2+} supérieures ou égales à 10^{-4} M engendre également une nette augmentation d'un pic à $\delta = 1,15$ ppm, non identifié pour le moment. Ce pic est présent dans les spectres des algues témoins et des algues exposées à de plus faibles concentrations de cobalt ; sa taille varie légèrement en fonction des échantillons, mais il est sensiblement plus grand à partir de 10^{-4} M Co^{2+} . Il pourrait s'agir d'un marqueur de stress ou d'un métabolite impliqué dans la détoxification du cobalt.

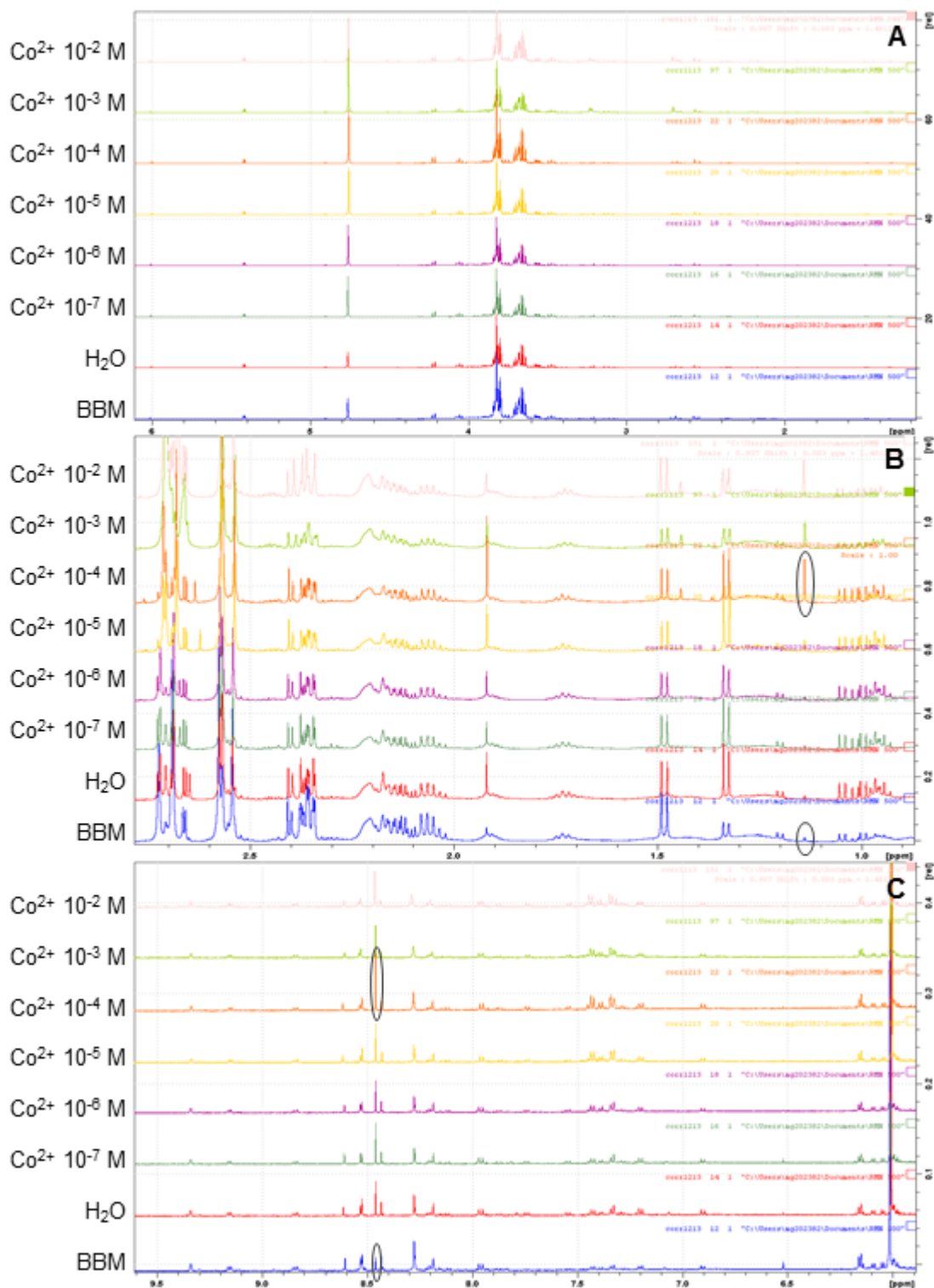


Figure 32 : Spectres RMN du proton d'extraits d'algues *C. actinabiotis* exposées à différentes concentrations de cobalt. Les concentrations de cobalt, de 10^{-7} à 10^{-2} M, sont indiquées pour chaque spectre à gauche des figures. Les témoins (pas d'exposition au cobalt) sont BBM et H₂O. A : spectres montrant les déplacements chimiques dans la région 0.6 à 6.2 ppm. B : élargissement de la partie 0.9 à 2.7 ppm détaillant la zone des acides aminés et des acides organiques. C : élargissement de la partie 6 à 9.5 ppm montrant l'accumulation possible de formate, surtout à la concentration 10^{-4} M. Les pics présentant des changements significatifs suite au traitement sont entourés.

B. Analyse des pigments et des tocophérols par HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique d'analyse qui permet d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange par séparation. Nous avons étudié certains éléments du métabolome hydrophobe des échantillons précédemment décrits par cette technique. L'appareil HPLC utilisé pour ces analyses est équipé deux détecteurs : un détecteur à absorption UV-visible pour les pigments, et un détecteur de fluorescence pour les tocophérols.

Les composés analysés par le détecteur à absorption sont identifiés à partir de leur temps de rétention et de leur spectre UV-visible. Le spectre d'absorption à 450 nm d'un échantillon témoin *BBM* d'algues *C. actinabiotis* et les spectres UV-visibles qui ont permis l'identification des principaux pigments qui le composent sont présentés sur la Figure 33.

Les tocophérols sont quant à eux détectés par leur émission de fluorescence, et identifiés en fonction de leur temps de rétention : dans les conditions de l'expérience, le γ -tocophérol et l' α -tocophérol ont des temps de rétention respectifs d'environ 8,7 et 11,7 minutes.

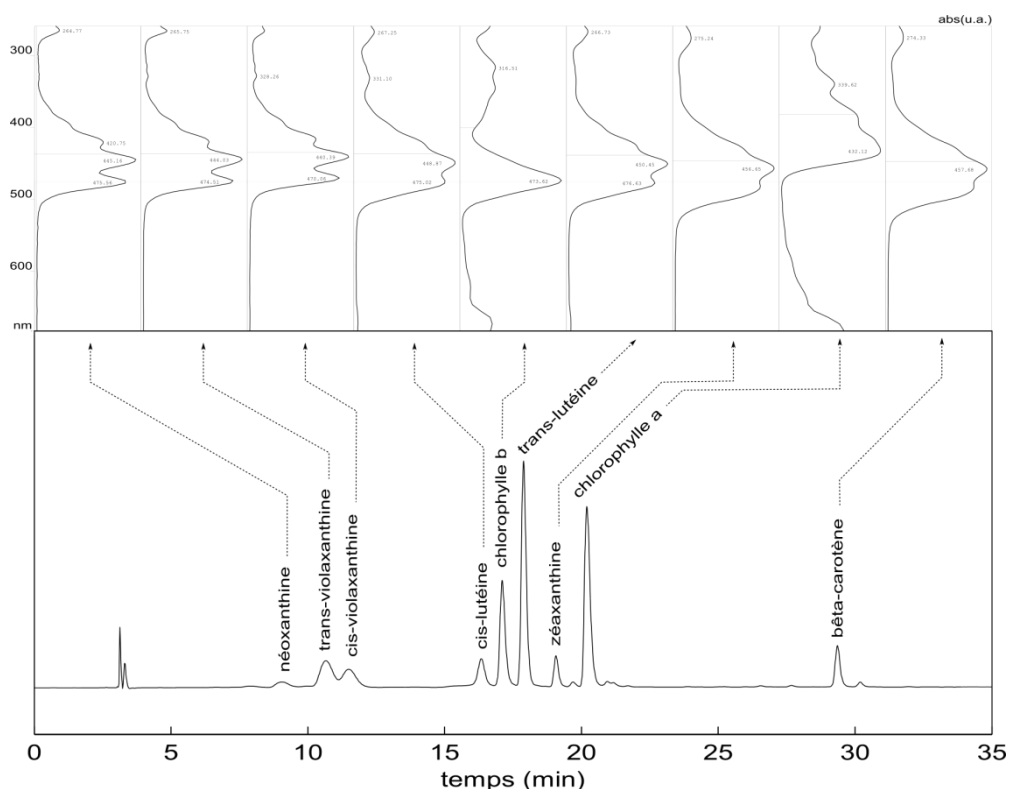


Figure 33: Séparation par chromatographie HPLC et spectres d'absorption associés aux différents pics d'un mélange de pigments témoins.

L'analyse des différents témoins *BBM* montre une très grande reproductibilité des chromatogrammes HPLC, et la comparaison avec les témoins *H₂O* montre que la mise en suspension des algues dans de l'eau ultra pure durant 2 h ou 24 h n'engendre pas de variations observables de la quantité de pigments et de tocophérols des algues.

1. Effet de l'argent

Les spectres HPLC d'une série d'échantillons exposés à des concentrations d'Ag⁺ allant de 10⁻⁷ M à 10⁻² M durant 2 h et le témoin *H₂O 2h* correspondant sont présentés sur la Figure 34. Cette série est représentative des résultats obtenus pour les trois répétitions de l'expérimentation. La figure se décompose en deux parties : Les pics détectés par absorption sont présentés sur la gauche, et les pics détectés par fluorescence sur la droite. Les chromatogrammes d'absorption sont présentés dans leur intégralité, tandis que seule la portion de spectre où apparaissent les tocophérols est présentée pour la fluorescence.

Les chromatogrammes des échantillons exposés à 10⁻⁷ M Ag⁺ sont similaires à ceux des témoins. Les échantillons exposés à 10⁻⁶ M Ag⁺ sont légèrement modifiés : ils contiennent notamment un peu moins de chlorophylle-a, de β-carotène et d'α-tocophérol que les témoins. On observe pour les échantillons exposés à des concentrations d'argent supérieures une diminution de l'ensemble des pigments, la chlorophylle-a, le β-carotène et d'α-tocophérol étant particulièrement affectés. Des pics correspondant aux produits de dégradation de la chlorophylle apparaissent avec des temps de rétention compris entre 25 et 30 minutes pour les échantillons exposés à des concentrations supérieures ou égales à 10⁻⁴ M Ag⁺.

L'argent provoque un stress oxydant qui mobilise certaines molécules antioxydantes et induit, de manière directe ou indirecte, la destruction d'une partie des centres photochimiques (chute de la chlorophylle-a). La disparition de cet élément clé de la photosynthèse explique la diminution du Fv/Fm observée au niveau physiologique. La dégradation accélérée des pigments et leur renouvellement inadéquat laisse supposer que les voies de biosynthèse sont diminuées. La dégradation des molécules antioxydantes telles que les tocophérols qui protègent normalement l'intégrité des membranes lipidiques favorise peut-être une augmentation de la perméabilité des cellules, hypothèse évoquée lors de la discussion des résultats de RMN.

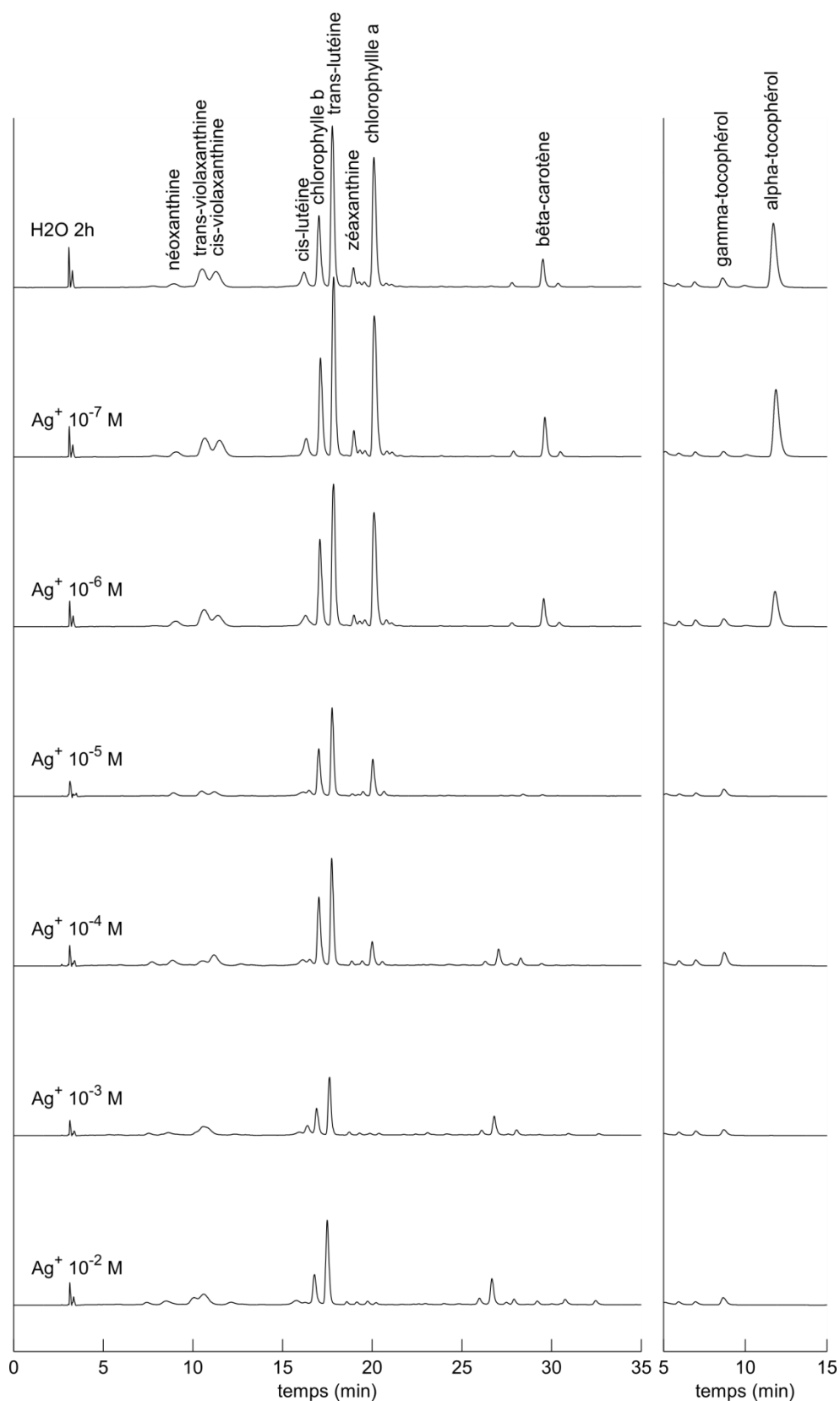


Figure 34 : Mesure des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et de l'α-tocophérol par chromatographie HPLC chez des algues *C. actinabiotis* exposées à des concentrations d'argent comprises entre 10⁻⁷ et 10⁻² M.

2. *Effet du cobalt*

Les spectres HPLC d'une série d'échantillons exposés à des concentrations de Co^{2+} allant de 10^{-7} M à 10^{-2} M durant 24 h et le témoin H_2O 24h correspondant sont présentés sur la Figure 35. Cette série est représentative des résultats obtenus pour les trois répétitions de l'expérimentation.

Les concentrations de cobalt étudiées ont peu d'impact sur les composés hydrophobes analysés par HPLC : on retrouve les mêmes quantités de pigments et tocophérols dans tous les échantillons. Les pigments analysés sont localisés dans le chloroplaste des cellules, or l'étude de la distribution subcellulaire du cobalt assimilé par les algues a montré qu'il est principalement confiné en dehors du chloroplaste. Dans ces conditions, il est possible que ces composés soient protégés d'une action directe du métal.

On observe sur les spectres des échantillons exposés à 10^{-3} et 10^{-4} M une augmentation de l'aire des pics pour l'ensemble des pigments, mais elle est probablement liée à un problème de mesure (mauvaise estimation de la quantité de matériel injectée dans le système HPLC) plutôt qu'à une réelle variation de concentration cellulaire. Il est notamment peu probable que l'ensemble des aires des pics mesurés varient d'un même coefficient sous l'effet du cobalt.

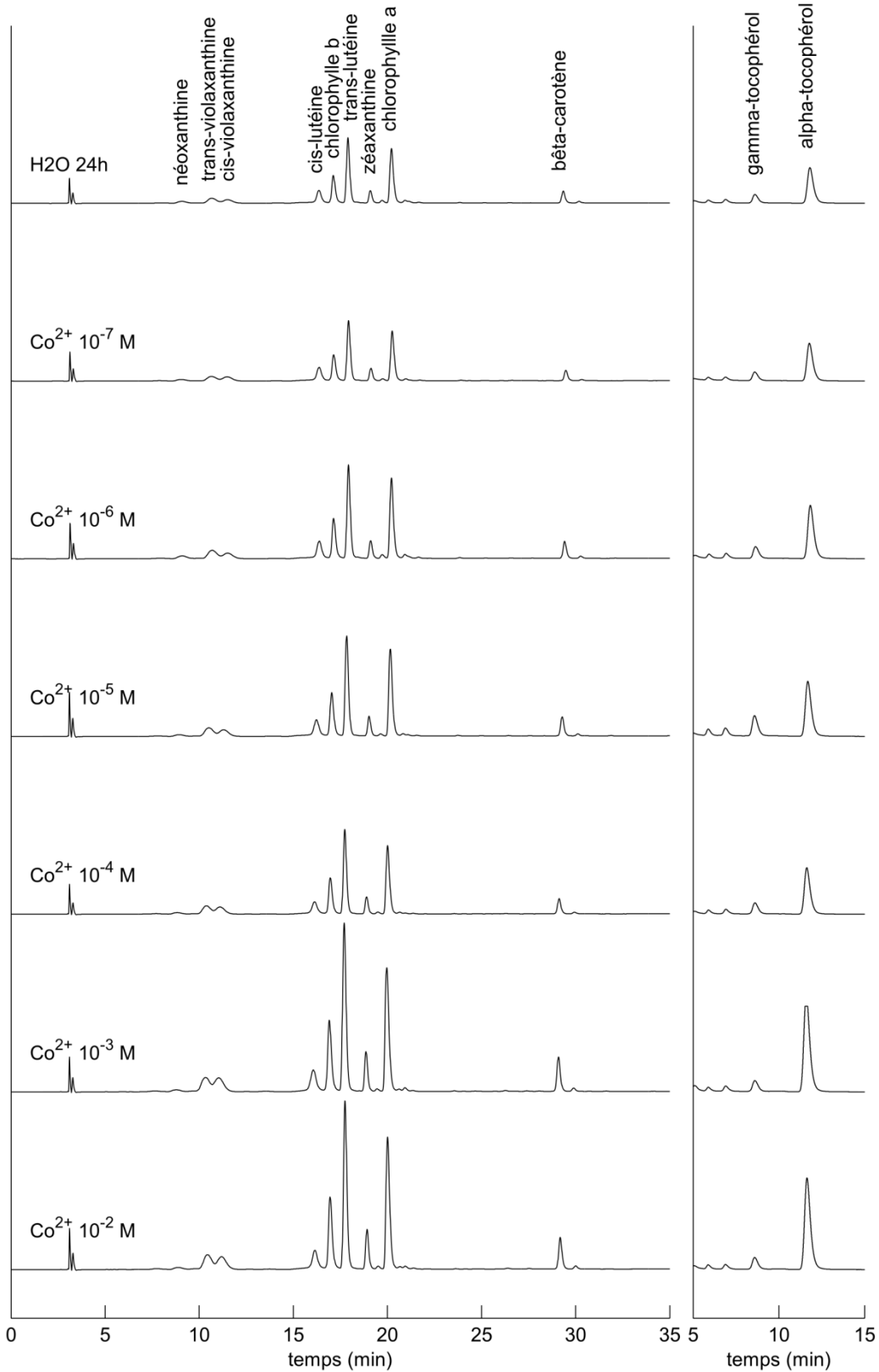


Figure 35 : Mesure des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et de l' α -tocophérol par chromatographie HPLC chez des algues *C. actinabiotis* exposées à des concentrations de cobalt comprises entre 10^{-7} et 10^{-2} M.

III. Discussion

L'ensemble des observations physiologiques et métaboliques montrent que l'argent et le cobalt ont des effets très différents sur *C. actinabiotis*.

On observe un effet de seuil dans le cas de l'argent. La physiologie et le métabolisme de *C. actinabiotis* ne sont *a priori* pas impactés par des expositions à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-6} M Ag^+ . A ces concentrations d'exposition les algues accumulent pourtant presque tout l'argent initialement présent en solution (cf chapitre 1 des Résultats), et on peut donc supposer que des mécanismes de détoxification efficaces sont en place. Ces mécanismes pourraient reposer sur la chélation des ions Ag^+ par des ligands soufrés et/ou des mécanismes de réduction (cf chapitre 3 des Résultats). Aussi, ces ligands permettent peut-être de piéger l'argent assimilé dans des espaces délimités, protégeant ainsi les organites de l'algue et notamment son appareil photosynthétique des effets oxydants du métal, ou d'autres effets tel qu'une substitution du Cu^+ par Ag^+ .

Les échantillons exposés à des concentrations supérieures ou égales à 10^{-5} M sont en revanche fortement et irréversiblement impactés : les algues ne croissent plus, leurs pigments sont dégradés, leur appareil photosynthétique est détérioré, et les cellules se vident de la quasi-totalité de leurs métabolites. Les effets toxiques observés à ces concentrations apparaissent en moins de 2 h. Les mécanismes de détoxification à l'œuvre aux faibles concentrations sont peut-être surchargés, ils ne permettent plus la protection et le renouvellement adéquat des métabolites et des antioxydants de la cellule. Il est possible que ce débordement des mécanismes de détoxification soit à l'origine de la dissémination de l'argent dans la plupart des compartiments subcellulaires dont le chloroplaste (cf. chapitre 2 des Résultats), de la dégradation des pigments localisés dans cet organite, et, in fine, de l'effondrement de l'activité photosynthétique qui entraîne à son tour la disparition des activités métaboliques et la mort cellulaire.

Les effets biologiques du cobalt sont beaucoup plus progressifs que ceux de l'argent. L'exposition de *C. actinabiotis* durant 24 h à des concentrations même importantes de cobalt a peu d'effet sur sa physiologie et son métabolisme. Les pigments et l'appareil photosynthétique de l'algue sont peu ou pas affectés, comme le suggère la circonscription du cobalt en dehors du chloroplaste (cf chapitre 2 des Résultats). Nos expériences de RMN indiquent que certains métabolites s'accumulent en présence de cobalt à des concentrations

supérieures ou égales à 10^{-4} M et pourraient donc être impliqués dans la détoxification du cobalt. Toutefois, ils ne modifient pas la spéciation du cobalt qui reste inchangé dans les cellules (cf. chapitre 3 des Résultats). *C. actinabiotis* ne semble pas non plus être en mesure de mettre en œuvre un mécanisme de détoxification du cobalt efficace aux fortes concentrations, puisque dès 24h, et a fortiori lors d'exposition prolongée des algues à des concentrations supérieures à 10^{-6} - 10^{-5} M, Co^{2+} entraîne une diminution lente et continue de l'activité photosynthétique. Il est intéressant de noter que dans ce cas, et contrairement à ce que l'on observe en présence d'argent, cette diminution n'est pas associée à celle des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes) ni des tocophérols. Bien que le cobalt ne s'accumule pas massivement dans les plastes, il est toutefois possible que les systèmes photosynthétiques soient directement inhibés par du cobalt dont la présence en faible quantité dans le chloroplaste ne serait pas détectable par imagerie. D'autres expériences (fractionnement cellulaire et purification d'organites) doivent être envisagées pour étayer cette hypothèse.

Une étude de l'effet de l'argent et du cobalt sur le protéome de *C. actinabiotis*, dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'étude de l'impact métabolique, a été initiée afin de déterminer les protéines impliquées dans la réponse au stress et d'éventuels mécanismes de détoxification, en partenariat avec Jean Armengaud et Béatrice Alonso (CEA Marcoule, DSV/IBEB/SBTN/LBSP). Les fonctions des protéines dont l'expression est modifiée lors de l'exposition aux métaux n'ont pas encore été identifiées, mais elles pourraient permettre de compléter et préciser les résultats que nous avons présentés.

Discussion générale et perspectives

L'argent et le cobalt sont deux métaux polluants présents dans les effluents des activités industrielles. Ce sont notamment les principaux radionucléides émetteurs gamma présents dans les effluents liquides des réacteurs du parc électronucléaire français. Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié l'incorporation, la distribution intracellulaire, la spéciation et l'effet toxique de ces deux métaux chez *C. actinabiotis*, une micro-algue verte hyper radiotolérante et accumulatrice de métaux. Ces deux métaux ont un comportement intracellulaire et une toxicité très différents. Les principaux résultats et les questions sous-jacentes sont discutés ci-après.

Incorporation. L'argent et le cobalt sont apportés en solution sous la forme Ag^+ et Co^{2+} . Pour les deux métaux, les cinétiques d'accumulation observées se décomposent en deux phases : la quantité de métal accumulé par les algues augmente rapidement dans un premier temps, puis elle augmente plus lentement ou est stationnaire lors de la deuxième. Les mécanismes impliqués dans l'accumulation des deux métaux semblent toutefois être différents.

Les algues fixent la totalité de l'argent en solution lorsqu'elles sont exposées à des solutions faiblement concentrées. S'agit-il d'une fixation non spécifique sur la paroi des algues ou d'un transport actif utilisant, par exemple, des transporteurs de métaux initialement présents sur le plasmalemme de l'algue ? Le premier processus, s'il existe, constitue un phénomène transitoire puisque nous avons observé par la suite que l'argent accumulé par les algues est internalisé et se trouve dans le cytosol. Le mécanisme d'accumulation pourrait par exemple consister en une fixation rapide sur la paroi suivie d'une diffusion lente au travers du plasmalemme. Des expérimentations quantifiant l'accumulation de l'argent par les algues lorsqu'il est en compétition avec d'autres métaux (par exemple le cuivre, dont les transporteurs pourraient également transporter l'argent) ou en présence d'un inhibiteur de la photosynthèse (par exemple le DCMU¹⁰) et des expérimentations menées sur des mutants pour lesquels le transport de certains métaux sont affectés, comme il en existe chez les plantes supérieures et d'autres espèces de micro-algues, permettraient de tester la validité de l'hypothèse d'un transport actif de l'argent dans la cellule et de mieux comprendre le type de

¹⁰ 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée

transporteurs impliqués.

Lorsque les algues sont exposées à des solutions d'argent plus fortement concentrées, la vitesse d'accumulation et la quantité d'argent accumulé par les cellules durant la seconde phase (après la phase initiale d'accumulation rapide) sont d'autant plus importantes que la concentration dans le milieu extérieur est élevée. L'internalisation de l'argent est positivement corrélée avec le gradient de concentration, ce qui suggère une diffusion passive du métal à travers les structures externes de la cellule.

Des mécanismes de rejet de l'argent internalisé, utilisant les transporteurs du cuivre, pourraient être mis en œuvre par *Chlamydomonas reinhardtii* (Pillai et al., 2014). De tels mécanismes, s'ils sont à l'œuvre chez *C. actinabiotis*, pourraient être observés en exposant les algues à des concentrations d'argent sub-létales afin qu'elles internalisent le métal puis en étudiant l'évolution au cours du temps de la concentration intracellulaire d'argent des algues lorsqu'elles sont remises en suspension dans un milieu de culture ne contenant pas d'argent.

La vitesse d'incorporation initiale du cobalt est beaucoup plus lente que celle de l'argent (au moins 100 fois plus lente, probablement plus). Aux faibles concentrations d'exposition, les algues accumulent une quantité de cobalt proportionnelle à la quantité de cobalt initialement en solution. Aux fortes concentrations d'exposition, en revanche, on observe une saturation de la quantité de cobalt accumulé : la teneur en cobalt par gramme d'algues atteint une valeur limite. On observe même, pour la concentration d'exposition au cobalt la plus élevée que nous avons étudiée, un rejet de cobalt des algues vers le milieu extérieur après 24 h d'exposition. Cette diminution de la teneur intracellulaire en cobalt ne peut être due au fait que les cellules meurent et se vident de leur contenu puisque les concentrations en métabolites solubles restent par ailleurs largement inchangées. On peut supposer que, dans les conditions expérimentales choisies, l'internalisation du cobalt est principalement due à des mécanismes de transport passif et qu'aux fortes concentrations, lorsque la teneur en cobalt des algues atteint une valeur de l'ordre de $4 \text{ mg}_{\text{Co}}.\text{g}_{\text{MS}}$, la cellule réagit et met en œuvre un mécanisme d'expulsion pour limiter la toxicité du cobalt. Des mécanismes de transport actif, utilisant des transporteurs de métaux divalents tels que les HMA ou les NRAMP (des gènes codant pour ces transporteurs ont par exemple été identifiés dans le génome de *Chlamydomonas reinhardtii* (Hanikenne et al., 2005)), pourraient également favoriser l'internalisation du cobalt. Le mécanisme d'expulsion du cobalt pourrait quant à lui impliquer des transporteurs favorisant l'efflux de cations divalents tels que les

Cation Diffusion Facilitators (également identifiés dans le génome de *Chlamydomonas reinhardtii* (Hanikenne et al., 2005)) ou encore l'expulsion des chélats par exocytose. Comme pour l'argent, l'étude de l'évolution temporelle de la concentration intracellulaire du cobalt chez des algues exposées au cobalt et remises en suspension dans un milieu de culture « propre » pourraient permettre d'observer et de caractériser l'excrétion du métal par *C. actinabiotis*.

Distribution intracellulaire. Nous avons déterminé la distribution intracellulaire du cobalt et de l'argent grâce à une méthode basée sur la fluorescence des rayons X. Cette méthode d'imagerie est spécifique de l'élément étudié, elle respecte l'intégrité de la cellule, permet de quantifier les éléments analysés avec une bonne sensibilité et offre une bonne résolution spatiale, bien que la résolution spatiale soit moins bonne que celle d'autres méthodes d'imagerie telles que la microscopie électronique ou confocale. Nous avons observé de grandes différences dans la distribution intracellulaire de l'argent et du cobalt.

Lorsque les algues sont exposées à de faibles concentrations d'argent, le métal s'accumule essentiellement dans le cytosol : il n'est observé ni dans les vacuoles, ni dans les noyaux, ni dans les chloroplastes. La résolution spatiale de la méthode ne nous permet pas de dire s'il est présent ou non dans les mitochondries. On peut supposer que, dans ces conditions, l'argent est immédiatement chélaté et piégé lorsqu'il pénètre la cellule, limitant ainsi sa diffusion vers d'autres territoires cellulaires. Lorsque la concentration d'argent en solution augmente, le métal envahit toute la cellule, à l'exception du noyau, et des agrégats d'argent sont visibles dans les différents compartiments où il est séquestré. La raison pour laquelle le noyau reste à l'écart de ce processus n'est pas comprise ; l'absence de sites réducteurs accessibles du fait de la compaction de l'ADN pourrait en être une des causes. La concentration à partir de laquelle l'argent n'est plus présent seulement dans le cytosol mais envahit tous les compartiments cellulaires et en particulier le chloroplaste pourrait être évaluée plus finement. La présence d'agrégats d'argent dans le chloroplaste, observée par microscopie électronique en transmission à partir d'une exposition à 10^{-4} M Ag^+ , est en effet associée à des altérations profondes du métabolisme cellulaire.

Le cobalt s'accumule dans toute la cellule à l'exception du chloroplaste, ceci quelle que soit la concentration de cobalt à laquelle les cellules sont exposées. L'exclusion du

compartiment plastidial est surprenante et n'est pour le moment pas expliquée. La présence d'une double membrane limiterait-elle la diffusion du métal vers le stroma ? Dans ce cas, le cobalt pénètre-t-il néanmoins dans la mitochondrie ? Il serait intéressant d'étudier la distribution du cobalt chez d'autres espèces de micro-algues par la même méthode de nano-fluorescence des rayons X pour voir si l'on retrouve cette exclusion en dehors du chloroplaste.

Notons que l'absence de signal associé au chloroplaste lors de l'analyse des algues par nano-fluorescence de rayons X ne signifie pas que le cobalt est totalement absent de ce compartiment : d'une part, la méthode n'est pas assez sensible pour sonder la distribution d'éléments faiblement concentrés ; d'autre part, l'analyse des distributions élémentaire en projection planaire, et non en trois dimensions, rend difficile l'estimation de la concentration des éléments dans les compartiments où ils sont peu concentrés, notamment lorsqu'ils sont « superposés » avec d'autres compartiments où leur concentration est plus importante. Nous avons ainsi observé que l'activité photosynthétique des cellules est altérée lorsqu'elles sont exposées à de fortes concentrations de cobalt, sans qu'il nous soit possible de déterminer s'il s'agit d'une action directe ou indirecte du cobalt sur le chloroplaste. Des expérimentations de purification des organites de *C. actinabiotis*, en particulier de son chloroplaste, permettraient de quantifier avec une meilleure sensibilité la teneur en cobalt du chloroplaste en fonction de la concentration en cobalt à laquelle les algues sont exposées. Ces expérimentations supposent de développer un protocole de fractionnement adapté à *C. actinabiotis* ; ce protocole pourrait notamment reposer sur la mise en œuvre de contraintes mécaniques (par exemple avec une presse de French) et/ou d'une digestion enzymatique qui déchirerait la paroi de la cellule sans détériorer ses organites.

Spéciation. Nous avons ensuite cherché à déterminer le degré d'oxydation et l'environnement chimique de l'argent et du cobalt accumulés par la cellule, leur spéciation intracellulaire étant un facteur important de la toxicité des métaux. Pour ce faire, nous avons notamment mis en œuvre des mesures de spectroscopie d'absorption X (XANES et EXAFS). Une fois encore, de grandes différences entre argent et cobalt sont apparues.

Lorsque les algues sont exposées à de faibles concentrations d'argent, inférieures ou égales à 10^{-5} M, le métal accumulé par les algues est essentiellement au degré d'oxydation (+I), bien que la présence minoritaire de la forme réduite Ag(0) ne puisse être exclue. Sous

cette forme oxydée Ag(+I), le métal est coordonné avec des atomes de soufre. Ces atomes sont probablement ceux de cystéines appartenant à des molécules de glutathion, des phytochélatines, des métallothionéines ou d'autres protéines. La nature des ligands pourrait être précisée, si les complexes sont suffisamment stables, par la mise en œuvre d'expérimentations visant à extraire les ligands liés à l'argent sans les dénaturer, les purifier sur des colonnes d'exclusion stérique, identifier les fractions auxquelles ils appartiennent par dosage de l'argent et identifier la nature des ligands par spectrométrie de masse. Il semble que, aux faibles concentrations d'exposition, ces ligands limitent la toxicité de l'argent pour la cellule en le piégeant dans le cytosol.

L'argent accumulé par les algues lorsqu'elles sont exposées à de fortes concentrations, supérieures à 10^{-5} M, est essentiellement réduit en Ag(0) et forme des clusters cristallins de structure cubique faces centrées et de taille nanométrique. Ces nanoparticules pourraient être oxydées en surface ou recouvertes de molécules contenant des atomes d'oxygène ou de soufre. Elles pourraient également coexister avec des atomes d'argent non réduits et chélatés par des ligands soufrés, comme aux faibles concentrations. Il est probable que différents processus coexistent.

La réduction de l'argent ionique en Ag(0) semble débiter lorsque la concentration en argent dépasse les capacités de gestion de la cellule, aussi peut-on se demander s'il s'agit ou non d'un processus de détoxification. Il serait intéressant de quantifier les proportions d'argent sous forme oxydée Ag(+I) et sous forme réduite Ag(0) aux faibles et aux fortes concentrations, ainsi que la proportion d'argent engagé dans des nanoparticules par rapport à la quantité totale d'argent incorporé dans les micro-algues. On pourrait ainsi déterminer précisément le seuil à partir duquel la réduction de l'argent est à l'œuvre : débute-t-elle lorsque la cellule gère encore l'influx d'argent ou seulement à partir du moment où les processus permettant de confiner l'argent dans le cytosol et de limiter sa toxicité sont débordés ?

L'observation de la réduction de l'argent pose également la question de l'origine du pouvoir réducteur nécessaire à cette transformation. *A priori*, dans une cellule photosynthétique, le pouvoir réducteur est majoritairement produit dans le chloroplaste par la chaîne de transfert d'électrons présente dans les membranes photosynthétiques. Toutefois, nous avons observé que l'activité photosynthétique, et d'une manière générale l'ensemble du métabolisme, est fortement dégradée (voire nulle) lorsque les algues sont exposées à 10^{-5} M

d'argent, or nous n'observons pas encore de réduction de l'argent à cette concentration. Cette observation n'étaye pas l'hypothèse selon laquelle la réduction de l'argent permettrait la détoxification de la cellule. Le décalage entre l'effondrement de l'activité métabolique et la réduction de l'argent au sein des cellules nous paraît difficilement explicable. L'utilisation, du fait de contraintes indépendantes de notre volonté, d'algues cultivées dans différentes conditions pour réaliser les expérimentations dont nous rapprochons ici les résultats pourrait en être l'une des causes. Il faudrait sans doute déterminer plus précisément la zone de concentration à partir de laquelle les effets toxiques de l'argent apparaissent pour mieux comprendre la réponse biologique et les mécanismes de détoxification (réduction ou non) mis en place par la cellule.

Le pouvoir réducteur des organismes photosynthétiques étant majoritairement produit par la photosynthèse, le rôle de la lumière dans la réduction de l'argent pourrait être évalué. Des expérimentations pourraient par exemple être menées sur des algues placées à l'obscurité ou en présence d'un inhibiteur de la photosynthèse tel que le DCMU, afin de supprimer l'apport de pouvoir réducteur d'origine photosynthétique. Alternativement, on peut supposer que la réduction de l'argent ionique se produit au sein des cellules mortes, la matrice de ces cellules restant, au moins pendant un certain temps, suffisamment réductrice pour permettre ces réactions. Du fait du potentiel redox élevé du couple $\text{Ag}^+/\text{Ag}(0)$, il est possible que des molécules telles que des métabolites antioxydants ou des composés contenant des fonctions hydroxyles ou aldéhydes, soient impliqués dans la réduction du cation. Le pool de ces molécules peut être suffisant pour réduire la quasi-totalité de l'argent intracellulaire après la mort des algues. Des expérimentations visant à incuber un extrait cellulaire (biomasse morte) fraîchement préparé en présence d' Ag^+ et des expérimentations de réduction menées *in vitro* avec certaines de ces molécules pourraient apporter des éléments de réponse à ces questions.

Le cobalt accumulé par les algues est exclusivement présent au degré d'oxydation (+II). Contrairement à l'argent, l'état redox du cobalt n'est pas modifié par l'algue et la concentration d'exposition n'a pas d'effet sur sa spéciation intracellulaire. Dans l'algue, le cobalt est engagé par six liaisons avec des atomes d'azote ou d'oxygène. La nature des molécules responsables de la chélation du cobalt reste à être précisée. Ces ligands pourraient porter les mêmes fonctions chimiques que les ligands responsables de la chélation du cobalt chez les plantes supérieures. Le même type d'expérimentations que pour l'argent pourrait être mené pour déterminer quels sont les ligands impliqués dans la chélation du cobalt chez la

micro-algue.

Impact sur la physiologie et le métabolisme des algues. L'impact de l'argent et du cobalt sur la physiologie des algues a été estimé au travers de mesures de croissance et d'activité photosynthétique. L'impact sur le métabolisme a été estimé par des approches de RMN du proton afin d'avoir un aperçu global sur le métabolisme, même si cette méthode est relativement peu sensible, et, d'une manière plus ciblée, par la mesure des pigments photosynthétiques. Les impacts de ces deux métaux sur la biologie des algues sont, encore une fois, radicalement différents.

Lorsque les algues sont exposées à de faibles concentrations d'argent, jusqu'à 10^{-6} M, nous n'observons aucun effet, ni sur la croissance, ni sur l'activité photosynthétique, ni sur les profils métaboliques. Bien qu'à cette concentration Ag^+ soit présent dans le cytosol, il n'est pas toxique pour les cellules, la chélation par des molécules soufrées le détoxifie.

L'impact biologique de l'argent est en revanche très important pour les concentrations d'exposition supérieures ou égales à 10^{-5} M, que les algues soient exposées durant 2 h ou 24 h : la croissance cellulaire est bloquée et ne peut être relancée même après avoir renouvelé le milieu de culture par du milieu sans argent. De même, l'activité photosynthétique s'est effondrée ainsi que le contenu en métabolites, que ces derniers soient hydrophiles ou hydrophobes (pigments chloroplastiques). Il est d'ailleurs remarquable que la chlorophylle a soit notablement plus impactée que la chlorophylle b ; nous n'avons pas d'explication à cette observation. A ces concentrations d'argent, les mécanismes de détoxification de la cellule ne permettent plus de lutter efficacement contre la toxicité du métal et les dommages engendrés sont irréversibles. La toxicité de l'argent apparaît clairement entre 10^{-6} et 10^{-5} M, soit à une concentration où les cellules fixent encore la totalité de l'argent présent dans le milieu. Les algues ont un contenu en métabolites très fortement diminué lorsqu'elles sont exposées à une concentration d'argent égale à 10^{-5} M, on peut se demander quels sont ceux encore présents dans la cellule qui permettent la fixation de l'intégralité de l'argent initialement dans le milieu extérieur. Nos analyses globales en RMN du proton n'ont malheureusement pointé aucun candidat possible. A 10^{-5} M, l'argent intracellulaire est encore principalement sous forme d' $\text{Ag}(+I)$. Sa toxicité peut s'exercer par le biais de réactions d'oxydation et de production de ROS (voir chapitre Etat de l'art). En particulier, des peroxydations d'acides gras pourraient

fragiliser et perméabiliser les membranes, occasionnant des « fuites » de métabolites vers le milieu extérieur. A terme, cela pourrait siphonner l'intégralité du métabolisme et conduire à la mort des cellules.

L'effet d'une accumulation de cobalt sur la biologie des cellules est nettement plus progressif que celui de l'argent. Contrairement à l'argent, nous n'observons pas de « vidange » des métabolites aux fortes concentrations de métal. L'étude de la réponse métabolique de la micro-algue au cours du temps plutôt qu'en fonction de la concentration en cobalt pourrait peut-être révéler la mise en place de différents mécanismes au cours du temps. L'impact physiologique le plus remarquable est la dégradation progressive de l'appareil photosynthétique pour les concentrations en cobalt supérieures ou égales à 10^{-5} M, d'autant plus important que le temps d'exposition est prolongé. Nos expériences ne permettent pas de déterminer s'il s'agit d'une action directe ou indirecte du métal sur l'appareil photosynthétique, mais le fait que nous n'ayons pas vu d'accumulation évidente de cobalt dans les chloroplastes suggère plutôt une action indirecte. Celle-ci pourrait se faire au travers de la perturbation de l'homéostasie d'autres métaux, tels que le fer ou le cuivre, indispensables au fonctionnement de la machinerie photosynthétique, ou par la substitution du Mn^{2+} par du Co^{2+} .

Autres perspectives. Au niveau fondamental, les perspectives pour les prochaines années sont d'identifier les mécanismes moléculaires du transport, de la détoxification et du stockage de métaux opérés par cet organisme. Cela sera mené par une approche intégrative au niveau transcriptomique, protéomique, métabolomique et physiologique. La résistance de *C. actinabiotis* pourrait être due à un groupe de gènes spécifiques, à la régulation de l'expression d'un groupe de gènes (transporteur vacuolaire, antioxydant), à l'activation d'une voie métabolique particulière conduisant à l'accumulation d'un métabolite permettant à l'organisme d'accroître sa résistance, ou plus probablement à une juxtaposition de plusieurs mécanismes actifs et passifs.

Une approche plus ciblée sur des voies qui pourraient être impliquées dans la résistance à la toxicité métallique pourra aussi être menée, à savoir :

- Les transporteurs potentiels de Ag^+ et Co^{2+} et leur expression (chez les plantes hyperaccumulatrices de Zn^{2+} et Cd^{2+} , l'hyperaccumulation est liée à la forte expression de quelques transporteurs et à des duplications de gènes)
- Les mécanismes d'accumulation et de détoxification : enzymes impliquées dans la détoxification cellulaire et la protection contre les dommages oxydatifs telles des glutathion S-transférases dont la présence a été montrée chez une espèce de *Coccomyxa*, la superoxyde dismutase ou la catalase ; synthèse de ligands ; implication de certains métabolites comme l'histidine, le glutathion et les phytochélatines comme cela a été mentionné plus haut

Ce travail devrait déboucher sur de nouvelles connaissances fondamentales et ouvrir la voie à une ingénierie rationnelle de cette algue, qui devrait permettre de renforcer encore ses propriétés originales, ou d'autres organismes (par exemple de plantes à forte biomasse) en vue de leur utilisation dans des procédés d'épuration industriels et de phyto-remédiation.

Au niveau appliqué encore, l'évolution des usages et en particulier l'utilisation croissante d'argent sous forme nanoparticulaire comme agent antibactérien a fait apparaître un nouveau besoin de synthèse de nanoparticules d'argent de taille contrôlée. La chimie « verte » constitue une alternative de choix en termes de coût et de qualité pour la production de nanoparticules. La production biologique de nanoparticules d'argent par cette micro-algue peut être intéressante si la taille et la structure peuvent en être contrôlées en fonction des conditions d'exposition aux solutions d'argent.

Annexes

Annexe 1 Classification périodique des éléments et répartition par séries chimiques

Groupe	1		2		3-10										11-12		13-14		15-16		17		18			
	IA	IIA	IIIB	IVB	VB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIB	VIB	IB	IIIB	IIIA	IIIA	VA	VIA	VIA	VIA	VIA				
Période	1	Hypocoxyde 1 H 1,00794																						Hélium 2 He 4,002602		
	2	Lithium 3 Li 6,941		Béryllium 4 Be 9,012182																				Bore 5 B 10,811		
3	Sodium 11 Na 22,989768		Magnésium 12 Mg 24,3050																						Aluminium 13 Al 26,9815386	
4	Potassium 19 K 39,0983		Calcium 20 Ca 40,078																						Silicium 14 Si 28,0855	
5	Rubidium 37 Rb 85,4678		Strontium 38 Sr 87,62																						Phosphore 15 P 30,973762	
6	Césium 55 Cs 132,9054519		Baryum 56 Ba 137,327																						Sulfure 16 S 32,066	
7	Francium 87 Fr [223,01823]		Radium 88 Ra [226,0254]																						Chlore 17 Cl 35,453	
			Actinides 89-103																						Argon 18 Ar 39,948	
			Lanthanides 57-71																						Krypton 36 Kr 83,80	
			Actinides 89-103																						Rubidium 37 Rb 85,4678	
			Lanthanides 57-71																						Strontium 38 Sr 87,62	
			Actinides 89-103																						Potassium 19 K 39,0983	
			Lanthanides 57-71																						Calcium 20 Ca 40,078	
			Actinides 89-103																						Sodium 11 Na 22,989768	
			Lanthanides 57-71																						Lithium 3 Li 6,941	
			Actinides 89-103																						Hélium 2 He 4,002602	

- métaux alcalins
- alcalino-terreux
- lanthanides
- actinides
- métaux de transition
- métaux pauvres
- métalloïdes
- non-métaux
- halogènes
- gaz nobles
- primordial
- identification de radionucléides
- synthétiques

Annexe 2 Occurrence des phytochélatines et des métallothionéines chez les algues

Table 12.2. A tentative list of algae showing occurrence of MT/PC. (Data from Rauser 1990; De Filippis and Pallaghy 1994; Ahner et al. 1995a,b; Rijstenbil and Wijnholds 1996; Mallick and Rai 1998; Rijstenbil et al. 1998a,b; Satoh et al. 1999)

Division	Species	Peptide	Structure
Chlorophyta	<i>Chlorella fusca</i>	PC	p ps
	<i>Chlorella ellipsoïda</i>	PC	p
	<i>Scenedesmus acutiformis</i>	PC	p
	<i>S. quadricauda</i>	PC	p
	<i>Enteromorpha</i>	PC	p
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PC	p ps
	<i>Monoraphidium minutum</i>	PC	p
	<i>Stichococcus bacillaris</i>	PC	p
	<i>Dunaliella bioculata</i>	PC	p
	<i>D. tertiolecta</i>	PC	p
Prasinophyta	<i>Tetraselmis tetrathele</i>	PC	p
	<i>T. maculata</i>	PC	p
Euglenophyta	<i>Euglena gracilis</i>	PC	p ps
Bacillariophyta	<i>Fragilaria crotonensis</i>	PC	p
	<i>Navicula pelliculosa</i>	PC	p
	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	PC	p
	<i>T. pseudonana</i>	PC	p
	<i>T. oceanica</i>	PC	p
	<i>Ditylum brightwellii</i>	PC	p
Chrysophyta	<i>Ochromonas danica</i>	PC	P
Phaeophyta	<i>Sargassum muticum</i>	PC	P
	<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	PC	P
Xanthophyta	<i>Bumilleriopsis filiformis</i>	PC	P
	<i>Vaucheria compacta</i>	PC	P
	<i>V. debaryana</i>	PC	P
Rhodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>	PC	
Prymnesiophyta	<i>Pleurochrysis carterae</i>	PC	
	<i>Emiliana huxleyi</i>	PC	
	<i>Pavlova lutheri</i>	PC	
Dinoflagellate	<i>Heterocapsa pygmaea</i>	PC	
Cyanophyta	<i>Synechococcus TX 20</i>	MT II	p ps
	<i>Anacystis nidulans</i>	MT II	p ps
	<i>Anabaena doliolum</i>	PC*	
	<i>Synechococcus PCC 7942</i>	MT II	p ps

p= primary. s= secondary. * Not characterised.

D'après Gaur et Rai (2001)

Annexe 3 Mécanismes de toxicité des ions Ag^+ et réponse adaptative chez *Chlamydomonas reinhardtii*

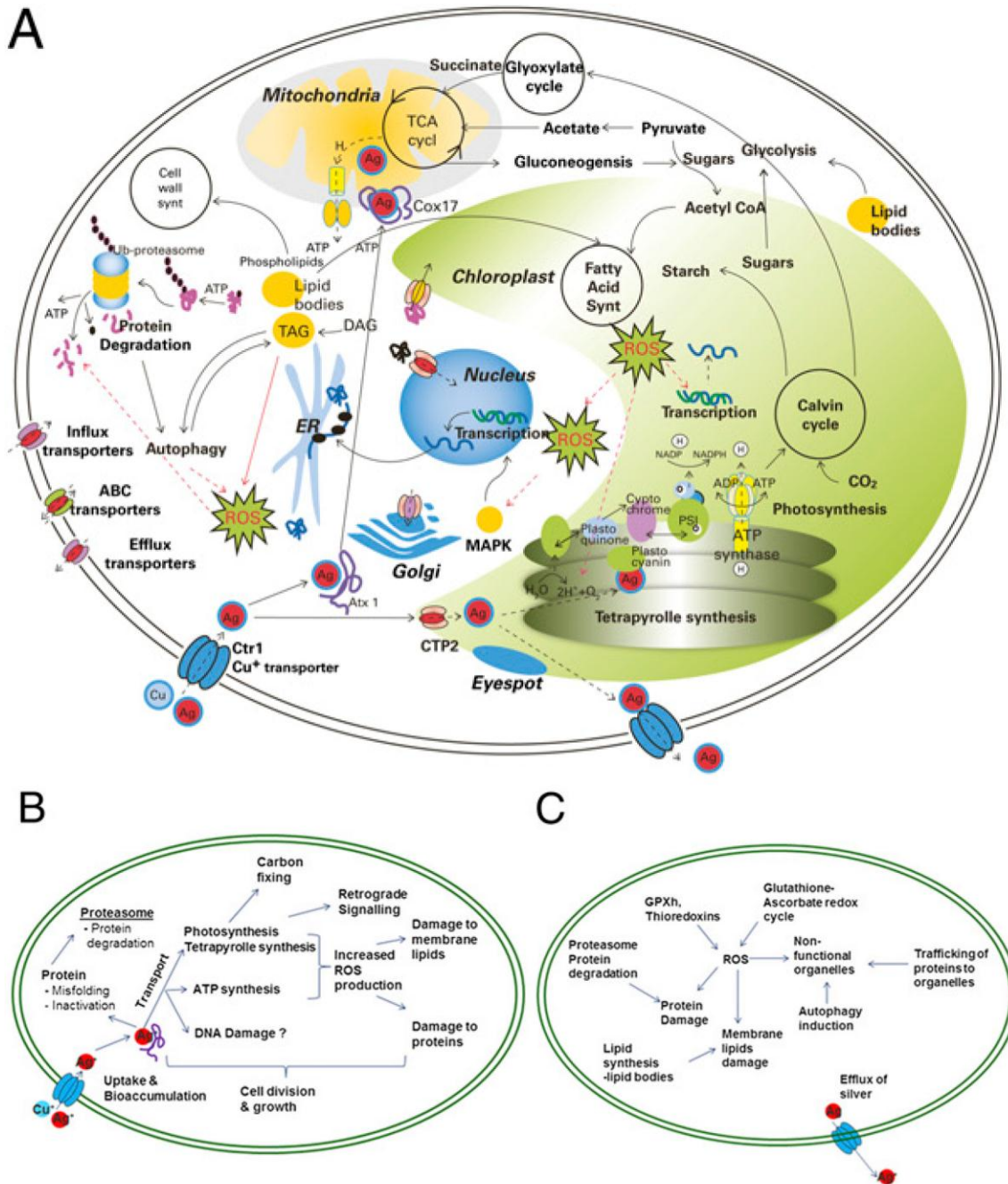


Figure 36 : The toxicity and adaptive response pathways, as derived from linking transcriptome and proteome responses to physiological effects. (A) Schematic representation of biological pathways in *C. reinhardtii* affected by Ag^+ . (B) Schematic representation of the toxicity pathway. (C) Schematic representation of the adaptive-response pathway.

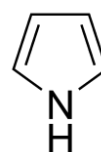
D'après Pillai *et al.* (2014)

Atx1, Cox17: molécules chaperones du cuivre

Annexe 4 Ligands azotés impliqués dans la chélation du cobalt chez les plantes et les algues

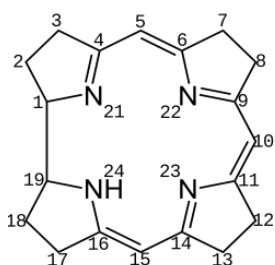


Imidazole

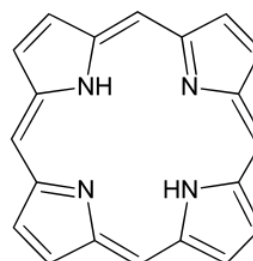


Pyrrole

Les tétrapyrroles sont des composés comportant quatre cycles pyrroles, tels que les corrinoïdes et les porphyrines :



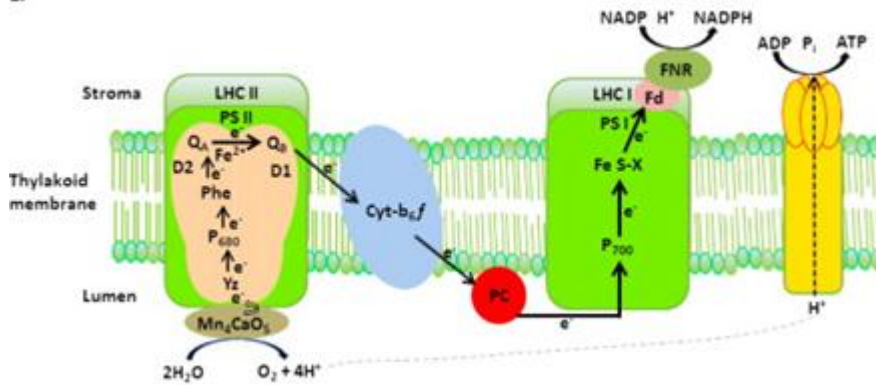
Corrinoïde



Porphyrine

Annexe 5 Description de la chaîne réactionnelle du photosystème II

a



Schematic representation of the light reactions of photosynthesis in algae.

The four protein complexes (represented from left to right): photosystem II (PSII), cytochromes B6/F (Cyt- b_6/f), photosystem I (PSI), and ATP synthase. The continuous black arrows indicate linear electron transport. The following processes within the photosystem II are schematically depicted: the light harvesting complex II (LHC II), phaeophytin (Phe), the primary electron acceptor quinone Q_A and a bound secondary electron acceptor quinone Q_B . The plastocyanin (PC) is an electron transporter between Cyt- b_6/f and P700 of PSI. The terminal electron acceptor downstream of PSI is a ferredoxin (Fd) which with the ferredoxin-NADP reductase (FNR) reduces NADP to NADPH. ATP synthase that generates ATP from ADP+ P_i using chemiosmotic energy from the proton (H^+) gradient created by splitting water and the translocation of protons.

D'après Suresh Kumar *et al.* (2014).

Annexe 6 Composition du milieu de culture des algues

La composition du milieu BBM (Bold modified basal freshwater nutrient solution) fourni par Sigma-Aldrich est la suivante (Sigma-Aldrich) :

Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution (Sigma)				Par ions/complexe	
Ref. B5282				ion/complexe	mol/L
Espèce	MM (g/mol)	mg/L	mol/L		
NaNO ₃	84,994	250	2,94E-03	Na+	3,37E-03
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,0136	25	1,70E-04	NO ₃ ⁻	2,94E-03
MgSO ₄ .7H ₂ O	138,3818	75	5,42E-04	Ca ²⁺	1,70E-04
K ₂ HPO ₄	174,1739	75	4,31E-04	Cl ⁻	7,79E-04
KH ₂ PO ₄	136,0838	175	1,29E-03	Mg ²⁺	5,42E-04
NaCl	58,443	25	4,28E-04	SO ₄ ²⁻	6,08E-04
FeSO ₄ .7H ₂ O	169,9238	4,98	2,93E-05	K+	2,70E-03
H ₂ SO ₄	98,0778	-	-	HPO ₄ ²⁻	4,31E-04
H ₃ BO ₃	61,8317	11,42	1,85E-04	H ₂ PO ₄ ⁻	1,29E-03
EDTA (free acid)	292,2426	50	1,71E-04	Fe ²⁺	2,93E-05
KOH	56,1049	31	5,53E-04	H ₃ BO ₃ .H ₂ O	1,85E-04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,5556	8,82	3,07E-05	EDTA	1,71E-04
MnCl ₂ .4H ₂ O	251,9476	1,44	5,72E-06	OH ⁻	5,53E-04
MoO ₃	143,937	0,71	4,93E-06	Zn ²⁺	3,07E-05
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,682	1,57	6,29E-06	Mn ²⁺	5,72E-06
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	291,0298	0,49	1,68E-06	MoO ₃ .H ₂ O	4,93E-06
NiCl ₂ .6H ₂ O	237,6882	0,003	1,262E-08	Cu ²⁺	6,29E-06
KI	166,0025	0,003	1,807E-08	Co ²⁺	1,68E-06
Na ₂ SeO ₃	172,937	0,002	1,156E-08	Ni ²⁺	1,26E-08
SnCl ₄	260,522	0,001	3,838E-09	I ⁻	1,81E-08
VO ₄ .3H ₂ O	217,0474	0,0022	1,014E-08	SeO ₃ ²⁻	1,16E-08
pH=6,6				Sn ⁴⁺	3,84E-09
				VO ₂ ⁺	1,01E-08

Annexe 7 Méthode de comptage automatisée

I. Principe

La méthode de comptage automatisé permet de déterminer la densité cellulaire d'un échantillon à partir de photos prises au microscope d'une goutte d'échantillon déposée sur une cellule de Malassez.

On utilise pour dénombrer les cellules :

- Le logiciel de traitement d'image *ImageJ* (Schneider et al., 2012)
- Le greffon *Droplet* pour *ImageJ*, qui permet d'appliquer une macro à une image par simple glissé-déposé (ce qui facilite l'utilisation de la macro) (Mutterer and Rasband, 2009)
- Une macro, dont le code est reproduit ci-dessous, que nous avons écrite pour dénombrer les cellules de *C. actinabiotis* sur une image

Le traitement appliqué aux images est représenté sur la Figure 37. Les résultats des comptages sont automatiquement compilés dans un fichier texte, un exemple de fichier texte obtenu est présenté ci-dessous (Tableau 12).

```
TL ; 20130725
Ag2_2h ; 7.3 ; 9.7 ; 7.1 ; 8.7
Ag3_2h ; 10.2 ; 11.6 ; 10.1 ; 10.9
Ag4_2h ; 8.9 ; 10.1 ; 9.6 ; 7.7
Ag5_2h ; 10.3 ; 10.3 ; 9.9 ; 7.0
Ag6_2h ; 9.5 ; 9.5 ; 9.8 ; 12.7
Ag7_2h ; 12.0 ; 10.8 ; 13.3 ; 11.7
Ag8_2h ; 9.6 ; 9.4 ; 9.2 ; 9.7
Ag9_2h ; 10.5 ; 9.0 ; 8.5 ; 11.2
T01_2h ; 9.5 ; 9.5 ; 9.6 ; 9.4
T02_2h ; 10.6 ; 9.2 ; 8.8 ; 9.3
```

Tableau 12 : Exemple de fichier texte retourné par la macro de comptage automatisé. La première ligne renseigne sur l'opérateur et la date du comptage. Les lignes suivantes indiquent l'identifiant de la culture suivi des densités mesurées sur les différentes photographies, en millions de cellules par millilitre.

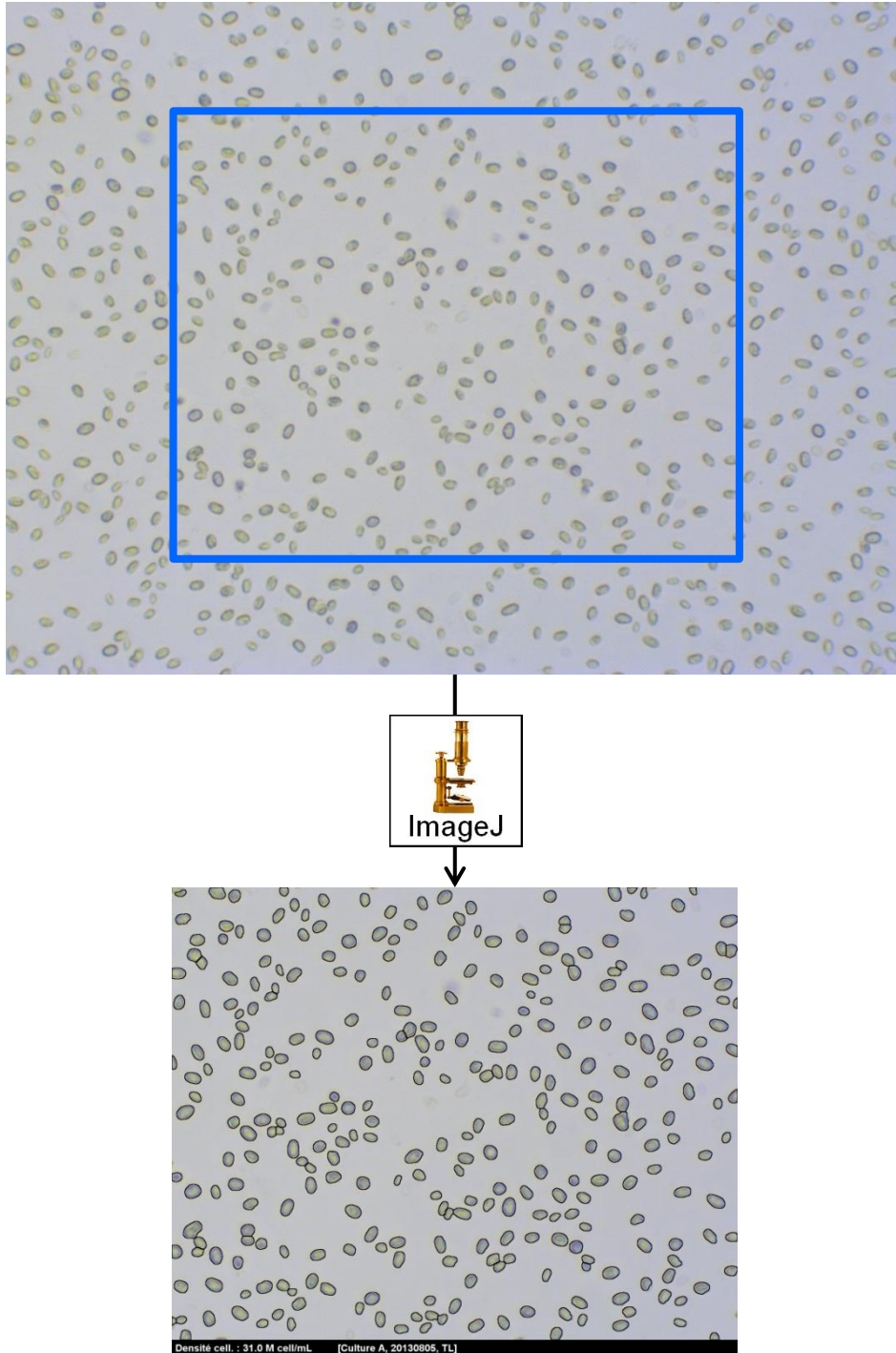


Figure 37 : Illustration du traitement appliqué aux images pour dénombrer les cellules de *C. actinabiotis*. Photo initialement prise au microscope (haut) et image après traitement (bas). La zone encadrée en bleu sur l'image du haut a une aire égale à celle des zones de comptage sur la cellule de Malassez. Sur l'image du bas, les objets comptabilisés comme étant des cellules d'algues sont entourés d'un trait noir.

II. Code de la macro ImageJ

```
/* Comptage automatique de d'algues Coccomyxa A
Prendre les photos avec l'objectif 10x, sur cellules de Malassez aluminisées, en
fond clair, en dehors des carreaux de la cellule de Malassez et les sauver au
format .jpg ou .tiff
Glisser-déposer un lot de photos dans la fenêtre Droplet et renseigner les
informations pour chaque photo
L'image finale et les résultats sont sauvegardés si les options sont cochées.
Thomas LEONARDO, 20/02/2013
*/

// Déclaration des variables globales
var date = 19690721;
var culture = "";
var dilutionFactor = 1;
opérateurs = newArray("AMB", "DG", "DP", "LD", "SB", "TL", "Autre");
var opérateur = "AMB";
var saveCount = true;
var saveOutput = true;
var saveInput = true;

// Infos pour chaque photo
initializeSettings();
getSettings();
saveSettings();

savePath="A\\Renseigner\\";
saveResultsFile=savePath+date+"_resultats.txt";

// Pour chaque photo, on lance la fonction de comptage automatique
file=getArgument();
open(file);
autoCount();

function autoCount() {
// Fonction de comptage automatique

title=getTitle();

// Sauvegarde image initiale si option cochée
if (saveInput == true) {
run("Duplicate...", "title=SaveInput");
selectWindow("SaveInput");
picSaveFilePath = savePath+date+" "+culture+"_input_"+title+".jpg";
run("Save", "save="+picSaveFilePath);
close();
}

/* Rognage de la photo aux dimensions d'une zone de comptage de la cellule de
Malassez (hypothèse : photo prise au 10x) et mise à l'échelle de la photo en µm
(hypothèse : photo prise au 10x) */
makeRectangle(480, 320, 1600, 1280);
run("Crop");
run("Set Scale...", "distance=1 known=0.15625 pixel=1 unit=µm global");
run("Duplicate...", "title=Process...");
run("Duplicate...", "title="+title+"_merge");

// Application des algorithmes de traitement d'image
selectWindow("Process...");
run("8-bit");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
run("Unsharp Mask...", "radius=50 mask=0.60");
```

```

run("Subtract Background...", "rolling=30 light disable");
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
call("ij.plugin.filter.ParticleAnalyzer.setLineWidth", 2);
run("Analyze Particles...", "size=5-Infinity circularity=0.50-1.00 show=[Bare
Outlines] clear display");

/* Superposition de l'image initiale et des contours des objets comptabilisés,
fermeture des fenêtres temporaires */
selectWindow("Drawing of Process...");
run("Copy");
selectWindow(title+"_merge");
setPasteMode("Transparent-white");
run("Paste");
selectWindow("Drawing of Process...");
close();
selectWindow("Process...");
close();
selectWindow(title);
close();
countResult = d2s(nResults/10,1);
selectWindow("Results");
run("Close");

// Ajout des infos au bas de l'image finale
selectWindow(title+"_merge");
run("Canvas Size...", "width=1600 height=1320 position=Top-Left zero");
setForegroundColor(255, 255, 255);
setFont("SansSerif", 28, "bold antialiased");
drawString("Densité cell. : " + countResult + " M cell/mL           [Culture
"+culture+", "+date+", "+opérateur+"]", 10, 1320);

// Sauvegarde image finale si option cochée
if (saveOutput == true) {
    picSaveFilePath = savePath+date+"_"+culture+"_output_"+title+".jpg";
    run("Save", "save="+picSaveFilePath);
}

// Sauvegarde des résultats dans un fichier texte si option cochée
if (saveCount == true) {
    if (getBoolean ("Save this count?")) {
        saveDataAsTxt(countResult);
    }
}
}

function getDate() {
// fonction pour récupérer la date sous forme de string, format YYYYMMDD
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second, msec);
month = month+1;
dateString = ""+year;
if (month<10) {dateString = dateString+"0";}
dateString = dateString+month;
if (dayOfMonth<10) {dateString = dateString+"0";}
dateString = dateString+dayOfMonth;
return dateString;
}

function initializeSettings(){
date = call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoALastDate", 19690721);
culture = call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoACulture", "");
opérateur = call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoAOperateur", "AMB");
dilutionFactor = call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoADilutionFactor", 1);
saveCount= call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoASaveCount", true);
saveOutput= call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoASaveOutput", true);
}

```

```

    saveInput= call("ij.Prefs.get", "tl.autoCountCoccoASaveInput", true);
}

function getSettings() {
    Dialog.create("Infos");
    Dialog.addString("Date :", date);
    Dialog.addString("Culture :", culture);
    Dialog.addString("Facteur de dilution:", dilutionFactor);
    Dialog.addChoice("Opérateur :", operateurs, operateur);
    Dialog.addCheckbox("Enregistrer le résultat du comptage dans un fichier texte",
saveCount);
    Dialog.addCheckbox("Enregistrer l'image finale", saveOutput);
    Dialog.addCheckbox("Enregistrer l'image source", saveInput);
    Dialog.show();
    date = Dialog.getString();
    culture = Dialog.getString();
    dilutionFactor = Dialog.getString();
    operateur = Dialog.getChoice();
    saveCount = Dialog.getCheckbox();
    saveOutput = Dialog.getCheckbox();
    saveInput = Dialog.getCheckbox();
}

function saveSettings(){
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoALastDate", date);
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoACulture", culture);
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoAOperateur", operateur);
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoADilutionFactor", dilutionFactor);
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoASaveCount", saveCount);
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoASaveOutput", saveOutput);
    call("ij.Prefs.set", "tl.autoCountCoccoASaveInput", saveInput);
}

function saveDataAsTxt(countResult){
    dataString="";
    if (File.exists(saveResultsFile)) {
        dataString = File.openAsString(saveResultsFile);
        dataString = substring(dataString, 0, lengthOf(dataString)-1); // pour
supprimer le dernier retour chariot
        lines = split(dataString, "\n");
        lastLine = lines[lengthOf(lines)-1];
        if (startsWith(lastLine, date + "\t" + culture + "\t" + dilutionFactor)) {
            dataString = dataString + "\t" + countResult;
        } else {
            dataString = dataString + "\n" + date + "\t" + culture + "\t" +
dilutionFactor + "\t" + countResult;
        }
    } else {
        dataString= "Date \t Culture \t Facteur dil \t Comptages \n" + date + "\t" +
culture + "\t" + dilutionFactor+ "\t" + countResult;
    }
    f = File.open(saveResultsFile);
    print(f, dataString);
}
}

```

III. Validation de la méthode de comptage automatisée

La validation de la méthode de comptage automatisé a été réalisée par Stéphanie Bellego lors de son stage de master 2. Cette validation consiste à vérifier que l'estimation de la densité cellulaire obtenue par la méthode automatisée est au moins aussi bonne que celle

obtenue par la méthode manuelle préalablement utilisée. Notons que dans les deux cas, la densité cellulaire moyenne des cultures est *estimée*, la vraie valeur n'est pas connue.

A. Comparaison des résultats obtenus par comptage manuel et par comptage automatisé

Plusieurs cultures ont été suivies pendant plusieurs jours et leur densité cellulaire a été évaluée par les deux méthodes de comptage. La Figure 38 présente les résultats obtenus.

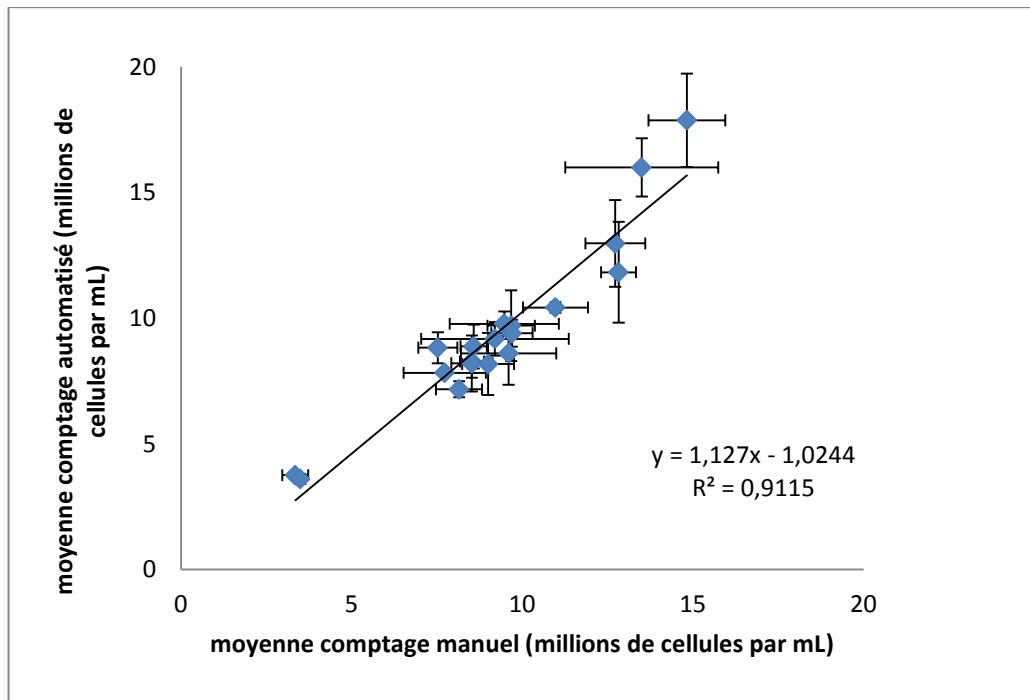


Figure 38 : Comparaison des densités cellulaires estimées par comptage manuel et par comptage automatisé. Les coordonnées des points indiquent la valeur moyenne sur quatre comptages, les barres d'erreur ont une amplitude de deux fois l'écart-type.

Les résultats obtenus par les deux méthodes de comptage diffèrent légèrement, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences :

1. Le nombre de cellules d'algues sur les photos est mal estimé lors de l'analyse des images avec ImageJ.
2. Certaines cellules visibles au microscope sont peu ou pas visibles sur les photographies parce qu'elles ne sont pas dans le plan focal
3. La densité cellulaire n'est pas la même sur le quadrillage (où les algues sont comptées manuellement) et en dehors (où elles sont comptés automatiquement)

4. Les différences observées sont simplement le reflet de la fluctuation liée à l'échantillonnage : il est normal lorsqu'on compte les algues sur N zones distinctes d'obtenir N résultats légèrement différents

B. Qualité de l'estimation du nombre de cellules sur les photographies

La validité de la première hypothèse est testée en estimant automatiquement et manuellement le nombre de cellules d'algues visibles sur plusieurs photographies et en comparant les résultats obtenus. Les résultats sont présentés sur la Figure 39.

Les deux méthodes donnent des résultats très similaires, la macro développée pour ImageJ estime correctement le nombre de cellules de *C. actinabiotis* présentes sur une photographie. La première hypothèse n'est donc pas valide.

C. Comparaison du nombre de cellules visibles au microscope et sur les photographies

La deuxième hypothèse est évaluée en estimant le nombre de cellules manuellement par observation au microscope et automatiquement sur des photographies des mêmes zones de la cellule de Malassez. Les résultats sont présentés sur la Figure 40.

Les résultats obtenus par les deux méthodes sont très similaires, toutes les cellules vues observées par un opérateur au microscope sont visibles sur les photographies, ce qui invalide la deuxième hypothèse.

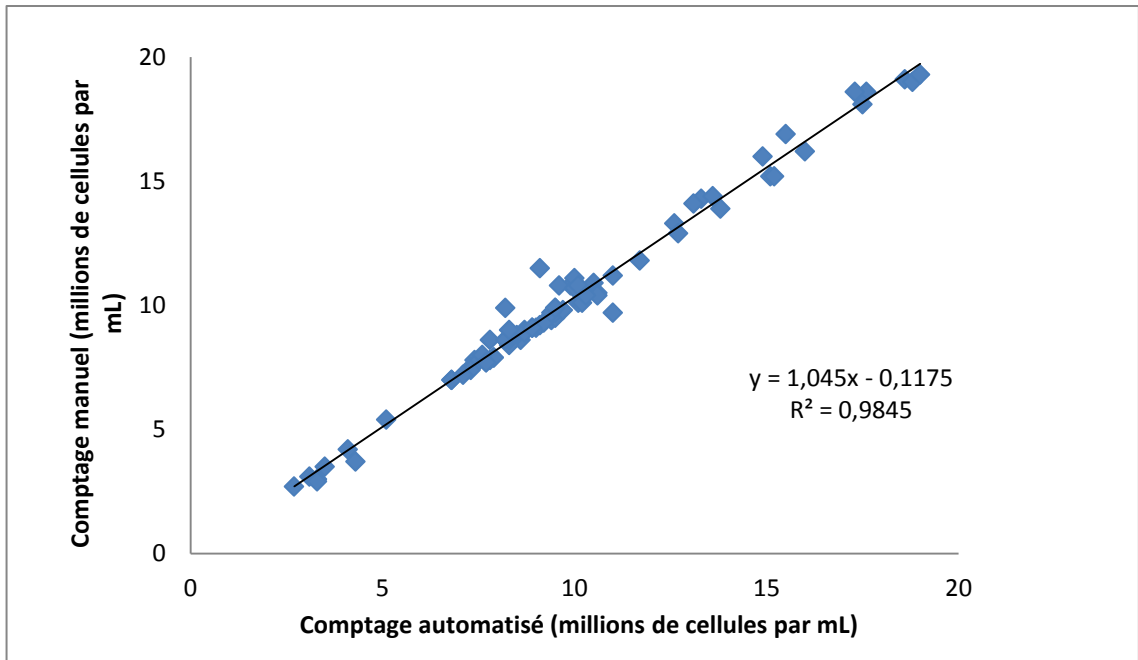


Figure 39 : Dénombrement des cellules visibles sur des photographies : comparaison des résultats obtenus par comptage manuel et par comptage automatisé. Chaque point correspond à une photographie.

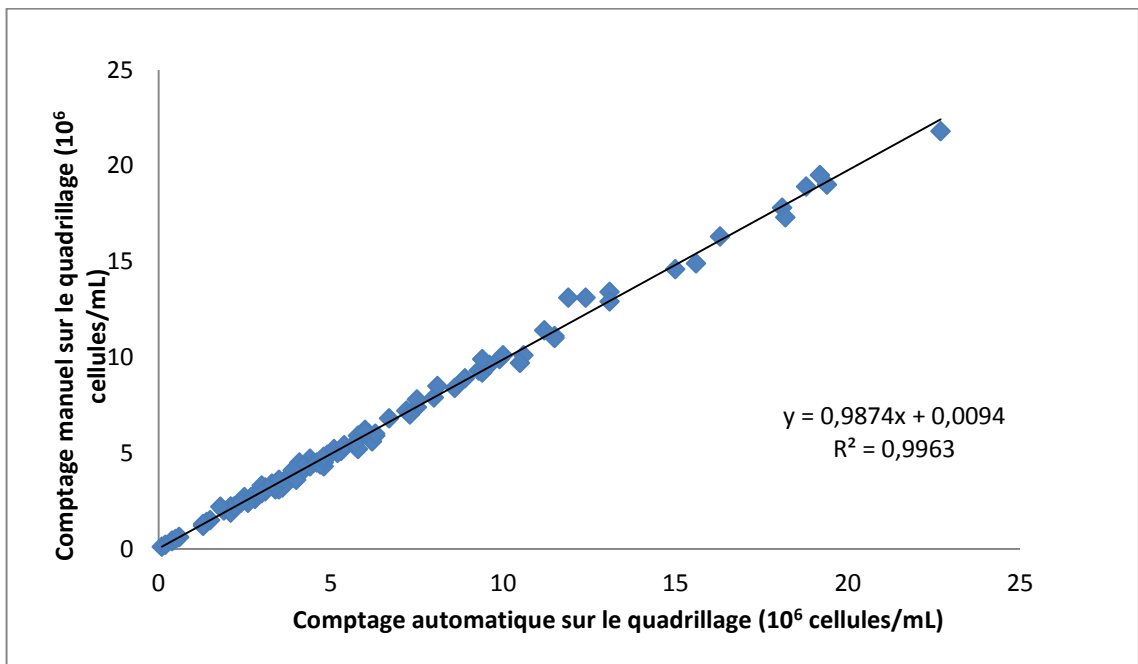


Figure 40 : Comparaison des résultats obtenus pour une même zone par comptage manuel au microscope et par comptage automatisé à partir d'une photographie. Chaque point correspond à une photographie.

D. Les différences de dénombrement entre les deux méthodes de comptage ne sont pas statistiquement significatives

Les résultats précédents indiquent que le comptage automatisé n'introduit pas de biais lors de l'estimation de la densité cellulaire d'une zone donnée. Soit les différences observées par rapport aux résultats obtenus par comptage manuel indiquent une répartition inhomogène sur et en dehors du quadrillage des cellules de Malassez, soit elles reflètent la fluctuation liée à l'échantillonnage.

Un test d'analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs a été réalisé pour tester cette hypothèse. Le test ANOVA est un test statistique qui permet de déterminer si plusieurs échantillons sont issus ou non d'une même population.

10 échantillons d'algues indépendants ont été analysés. Pour chaque échantillon, 10 comptages manuels sur le quadrillage et 10 comptages automatisés en dehors du quadrillage de la cellule de Malassez ont été effectués (Figure 41). Chaque comptage (*compt*) a deux attributs : l'échantillon auquel il se rattache (attribut *sample*, compris entre 1 et 10) et la méthode de comptage utilisée (attribut *meth*, la méthode est manuelle ou automatisée).

Les attributs *sample* et *meth* sont les deux facteurs de l'ANOVA. Le test indique ainsi

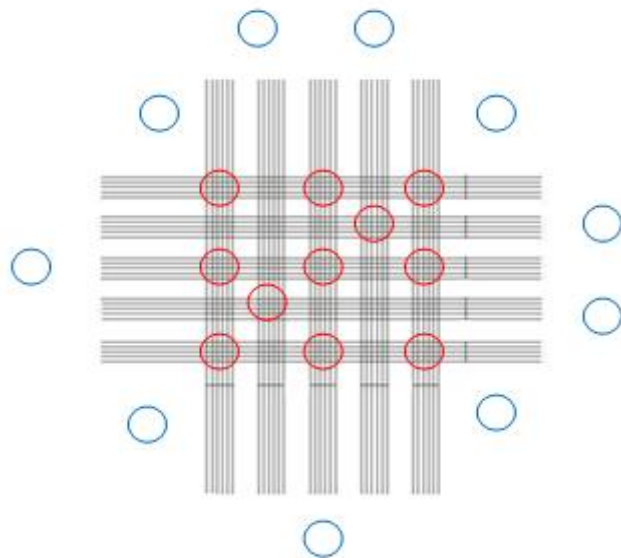


Figure 41 : Zones des comptages manuels (cercles rouges) et automatisés (cercles bleus) sur la cellule de Malassez

si l'influence de chacun de ces facteurs sur le résultat (le nombre cellules comptées) est significative. L'analyse statistique a été menée avec le logiciel R. Olivier Bastien (INRA, CEA/DSV/PCV) nous a conseillé quant au choix du test à appliquer et nous à aider à le mettre en œuvre.

Les résultats du test ANOVA à deux facteurs sont présentés ci-dessous :

```
> anova(lm(compt~sample+meth))
Analysis of Variance Table Response: compt
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
sample  1  25034   25034.1   70.3132 9.586e-15 ***
meth    1    662    662.5    1.8607  0.1741
Residuals 197  70139   356.0
```

La p-value de l'attribut *sample* est de $9,586.10^{-15}$, cette probabilité est inférieure au risque α de 0,05. L'hypothèse nulle est donc rejetée, ce qui signifie que le facteur échantillon a un effet significatif sur le comptage : la densité cellulaire d'échantillons distincts est statistiquement différente, ce qui n'est pas surprenant.

La p-value de l'attribut *meth* a en revanche une valeur de 0,1741, supérieure au risque α . Il n'y a pas de différence statistique entre les densités cellulaires estimées par les méthodes manuelle et automatisée sur le quadrillage de la cellule de Malassez ou en dehors.

L'estimation de la densité cellulaire des échantillons obtenue par comptage automatisé est donc comparable à la densité mesurée manuellement.

IV. Critères de prise de vue et limitations

Les performances de la méthode de comptage automatisé sont évidemment liées à la qualité des photographies. Deux critères principaux doivent être respectés lors de la prise de vue pour que le dénombrement automatique soit correct :

- La mise au point du microscope doit être ajustée de telle sorte que la couleur de chaque algue soit aussi homogène que possible (cf. Figure 37). Ce critère prime sur la netteté des images, qui importe peu dans ce cas.
- Les algues ne doivent pas former d'amas, ceux-ci n'étant pas dénombrés correctement

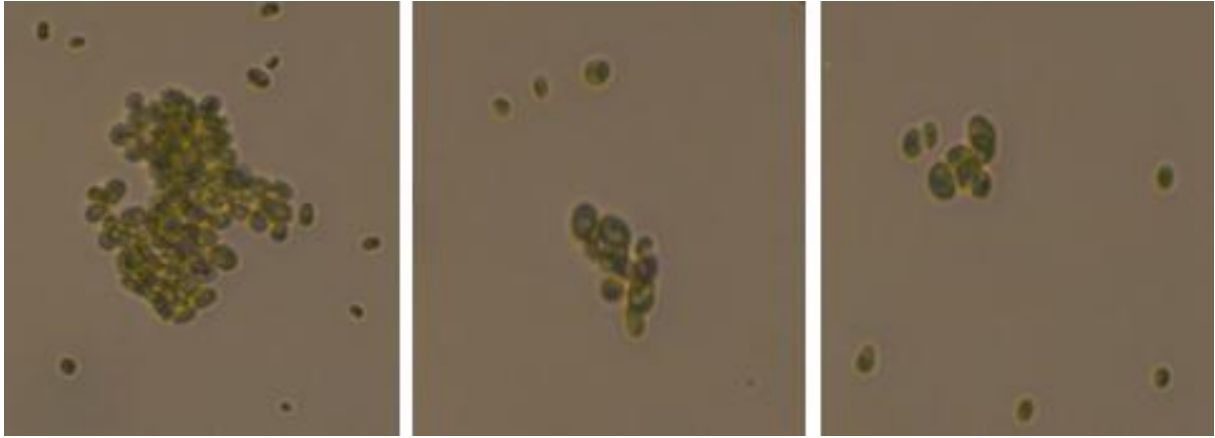


Figure 42 : Exemple d'amas d'algues. Le nombre d'algues dans ces amas est mal évalué par le traitement automatisé

Annexe 8 Spéciation de l'argent et du cobalt dans le milieu de culture BBM

La spéciation théorique de l'argent et du cobalt dans le milieu BBM dilué deux et dix fois a été étudiée par Eric Ansoberlo (CEA/DEN/DRCP/CETAMA) avec le logiciel CHESS (Van der Lee, 1993), à partir de la composition du BBM présentée en ANNEXE 4. Les espèces majoritaires de l'argent et du cobalt attendues en fonction de la concentration initiale de métal et du pH sont présentées sur la Figure 43 et la Figure 44. Les résultats pour des pH compris entre 5 et 7 sont synthétisés dans le Tableau 13 pour l'argent et dans le Tableau 14 pour le cobalt. Le pH du BBM et celui des cultures d'algues est généralement compris dans cette gamme.

Concentration en argent	Spéciation dans le BBM dilué 2 fois	Spéciation dans le BBM dilué 10 fois
[Ag] = 10 ⁻⁸ M	60% Ag ⁺ 40% AgCl traces Ag-EDTA	85% Ag ⁺ 15% AgCl traces Ag-EDTA
[Ag] = 10 ⁻⁶ M	60% Ag ⁺ 40% AgCl traces Ag-EDTA	85% Ag ⁺ 15% AgCl traces Ag-EDTA
[Ag] = 10 ⁻⁴ M	60% Ag ⁺ 40% AgCl traces Ag-EDTA	85% Ag ⁺ 15% AgCl traces Ag-EDTA
[Ag] = 10 ⁻² M	95% Ag ⁺ 5% AgCl	100% Ag ⁺

Tableau 13 : Espèces majoritaires de l'argent dans le milieu de culture BBM dilué 2 ou 10 fois additionné de 10⁻⁸ à 10⁻² M d'argent, pour un pH compris entre 5 et 7 (pourcentages approximatifs)

Concentration en cobalt	Spéciation dans le BBM dilué 2 fois	Spéciation dans le BBM dilué 10 fois
[Co] = 10 ⁻⁸ M	100% Co-EDTA	100% Co-EDTA
[Co] = 10 ⁻⁶ M	100% Co-EDTA	100% Co-EDTA
[Co] = 10 ⁻⁴ M	80% Co-EDTA 20% Co ²⁺	80% Co ²⁺ 20% Co-EDTA
[Co] = 10 ⁻² M	95% Co ²⁺ traces Co-phosphate	100% Co ²⁺

Tableau 14 : Espèces majoritaires du cobalt dans le milieu de culture BBM dilué 2 ou 10 fois additionné de 10⁻⁸ à 10⁻² M de cobalt, pour un pH compris entre 5 et 7 (pourcentages approximatifs)

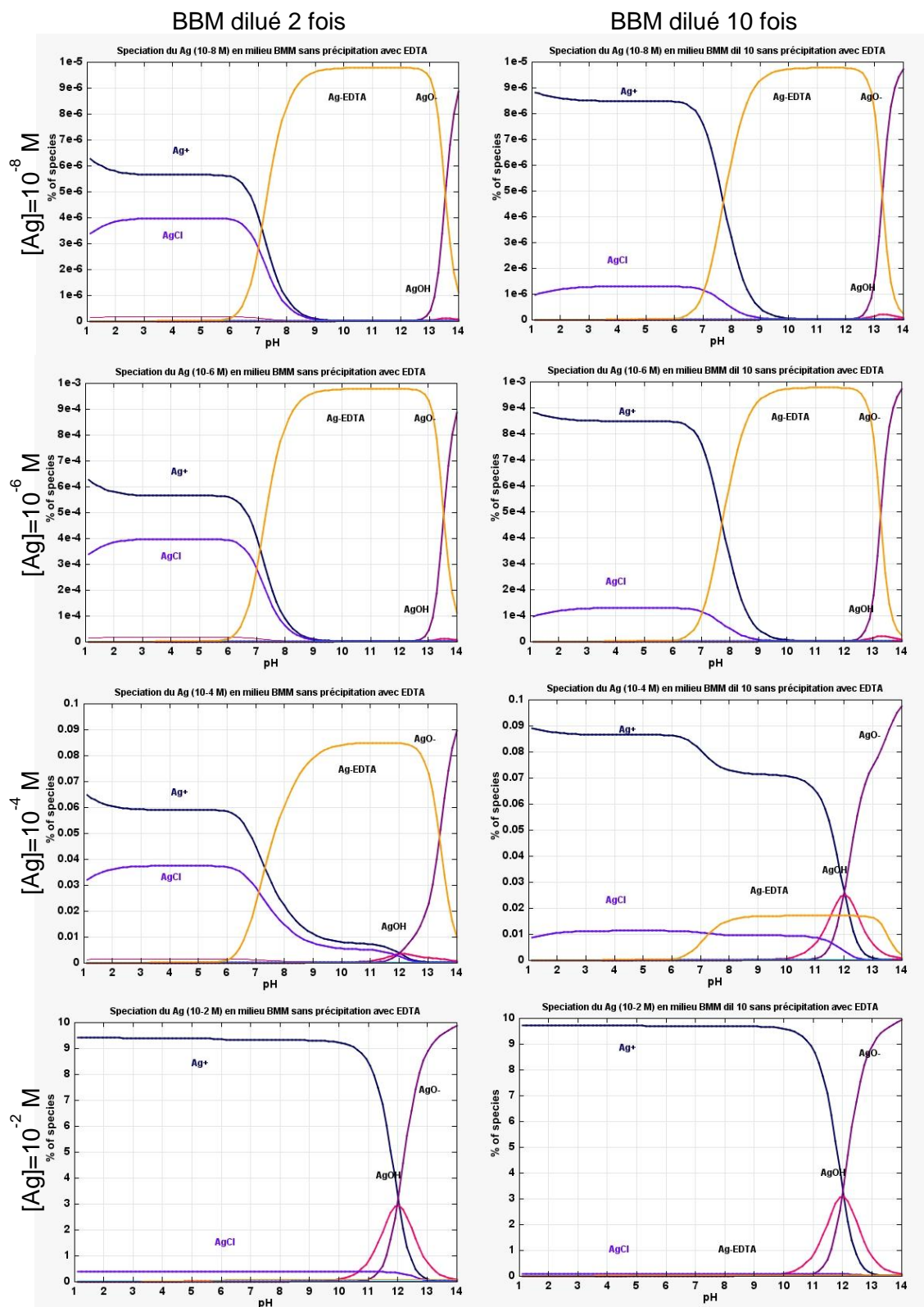


Figure 43 : Spéciation théorique de l'argent dans le milieu de culture BBM dilué 2 ou 10 fois additionné de 10^{-8} à 10^{-2} M d'argent

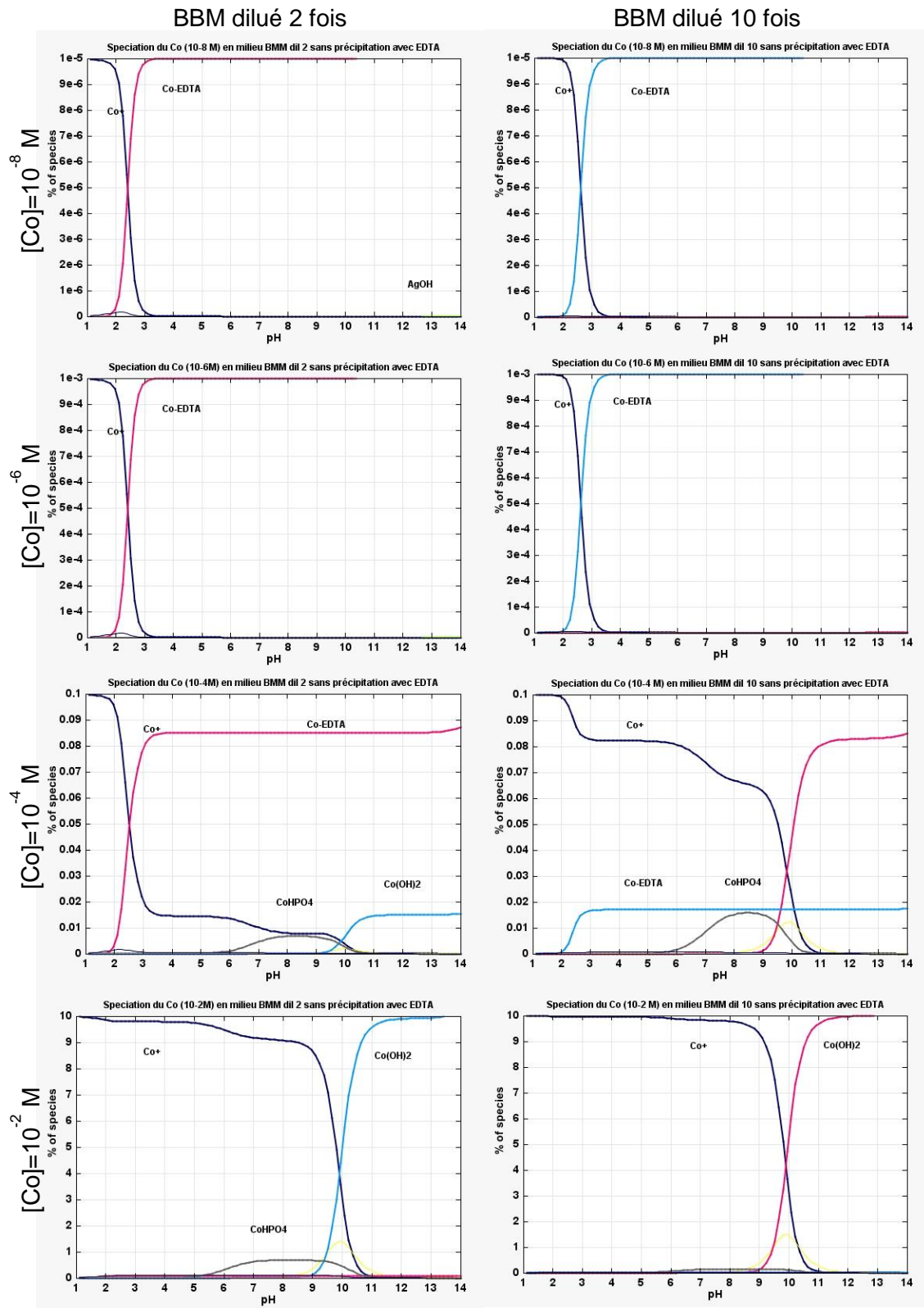


Figure 44 : Spéciation théorique du cobalt dans le milieu de culture BBM dilué 2 ou 10 fois additionné de 10^{-8} à 10^{-2} M de cobalt

Annexe 9 Principe de la quantification par ICP-MS et précautions d'emploi

L'appareil utilisé pour nos mesures est un HP 4500 ICP MS System, représenté schématiquement ci-dessous :

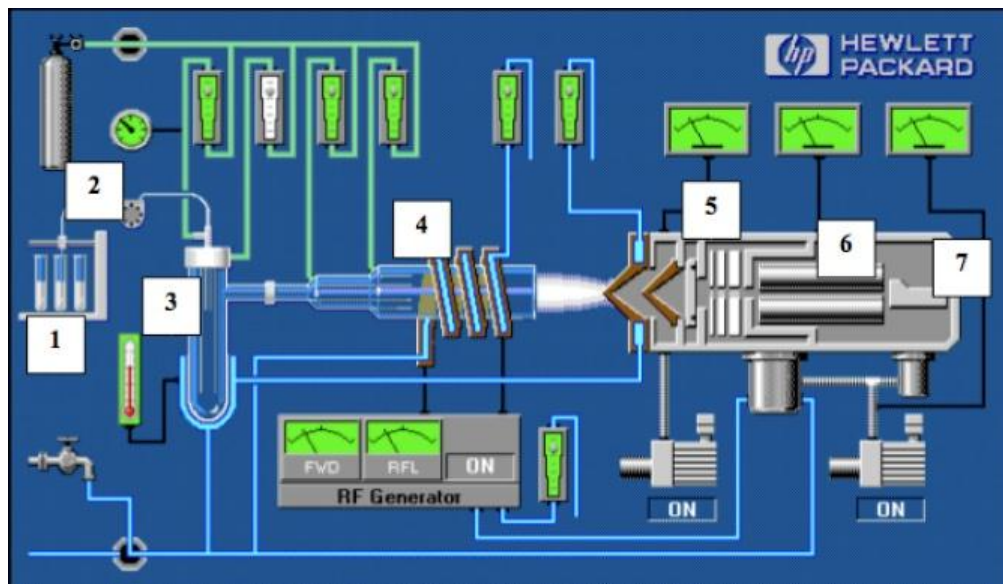


Figure 45: Schéma de fonctionnement de l'ICP-MS

L'échantillon est mis en solution acide dans HNO_3 1% (v/v). Un passeur automatique d'échantillon (Figure 45, 1) couplé à une pompe péristaltique (2) introduit la solution dans une chambre de vaporisation où le nébuliseur (3) la transforme en un aérosol liquide composé de microgouttelettes avec de l'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans une torche à plasma d'argon (4) ($15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) à très haute température (entre 6000 et 10000 °C) qui permet de vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. Un système de vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions chargés positivement (5) et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre de masse (6) transmet seulement les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Seuls les ions ayant le rapport m/z (masse/charge) désiré sont transmis au détecteur. La partie détection (7) s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes, collecteur équipé d'un préamplificateur. Le signal se traduit en nombre de coups. Le tracé de courbes de calibration pour chaque isotope considéré permet de quantifier la concentration des solutions analysées d'après le nombre de coups comptés.

Annexe 10 Protocole d'extraction à l'acide perchlorique pour analyse par RMN ¹H

I. Première étape

- Dans un bac, refroidir le matériel dans l'azote liquide :
 - Mortier et pilon de grande taille
 - Spatule métallique (pour gratter les parois du tube conique et du mortier)
 - Pince-ciseaux (pour maintenir les tubes SS-34)
- Refroidir la solution d'acide perchlorique dans la glace
- Déposer le culot d'algues congelé préalablement pesé dans le mortier
- Dans le mortier, ajouter le maléate (témoin de concentration interne pour l'analyse RMN du proton) et laisser geler. On ajoute 1 µmol de maléate par gramme de masse fraîche d'échantillon, soit 20 µL d'une solution de maléate à 5 mM pour 100 mg de masse fraîche. La masse fraîche de l'échantillon est égale à la somme de la masse fraîche du culot d'algues préalablement pesée et de la masse d'eau ajoutée. L'ajout de maléate est fait rapidement, sous forme de gouttelettes.
- Ajouter l'acide perchlorique préalablement refroidi dans le mortier et laisser geler. On ajoute 10 µL d'une solution à 35% pour 100 mg de masse fraîche (la solution à 35% est à 5,8 M). L'acide perchlorique précipite les protéines et donc les enzymes susceptibles de dégrader les métabolites.
- Broyer le mélange masse fraîche + maléate + acide perchlorique en une poudre très fine, ayant la même consistance que de la farine.
- Transférer la poudre dans un tube à centrifuger SS-34.
- Ajouter dans le tube 2,5 à 5 mL d'acide perchlorique à 7% pour avoir un meilleur rendement d'extraction, mélanger rapidement et plonger le tube dans l'azote liquide.
- Lorsque le mélange est congelé, sortir le tube de l'azote liquide et laisser décongeler partiellement (jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de givre sur la paroi du tube) à température ambiante. Attention à ne pas trop décongeler.
- Lorsqu'il n'y a plus de givre sur la paroi du tube, mélanger et centrifuger : rotor *Beckman-Coulter JA-20*, 14000 rpm (15400 g), 10 minutes, 4°C.
- Verser le contenu du tube dans un bécher placé dans un bac rempli de glace et ajouter immédiatement pour quelques gouttes de KHCO₃ saturé ou quelques gouttes de K₂CO₃

2 M (2-3 gouttes) pour casser l'acidité. Une sorte de mousse se forme et on obtient un précipité de perchlorate de potassium insoluble.

- Ajuster le pH de l'échantillon à pH = 5 avec des solutions de K_2CO_3 et HCl 1 ou 2 M. Les grosses protéines insolubles précipitent, les petits métabolites solubles restent dans le surnageant
- Transférer l'échantillon dans un tube SS-34 et centrifuger à nouveau (mêmes paramètres)
- Verser le surnageant dans un tube conique de 50 mL, congeler dans l'azote liquide et lyophiliser. L'échantillon congelé peut être stocké à $-80^\circ C$ avant la lyophilisation.

II. Deuxième étape : après la première lyophilisation

- Reprendre la poudre dans 600 μ l D_2O
- Ajouter 5 μ l de NaN_3 à 1 M et 32,5 μ L de tampon phosphate à 1 M (soit 50 mM de tampon phosphate, préparé avec 0,5 M KH_2PO_4 + 0,5 M K_2HPO_4 dans 10 mL D_2O)
- Centrifuger (5000 rpm, 5 minutes, $4^\circ C$)
- Ajuster le pD à 7.00 ± 0.05 avec DCl et NaOD (rincer préalablement l'électrode pH avec D_2O), centrifuger si nécessaire.
- Les surnageants sont transférées dans des petits ballons à rodage mâle, sortis de l'étuve à $60^\circ C$ et immédiatement recouverts de parafilm, puis elles sont lyophilisées.

III. Troisième étape : après la deuxième lyophilisation

- Reprendre la poudre obtenue dans 650 μ l de D_2O provenant d'une ampoule scellée et introduire la solution dans les tubes RMN lavés et séchés à l'air comprimé et conservés à l'étuve à $60^\circ C$ (pour éviter toute trace d'eau)
 - Ajouter 1 mM d'acide triméthylsilylpropanoïque (TMSP) 1 mM, soit 13 μ L à partir d'une solution à 50 mM (le déplacement du TMSP sert de référence pour l'analyse des spectres et sa concentration permet de déterminer les quantités absolues de métabolites)
- Les tubes sont conservés à $4^\circ C$ jusqu'à l'analyse

Annexe 11 Protocole d'extraction méthanol/chloroforme pour analyse par HPLC

- Dans un bac, refroidir le matériel dans l'azote liquide :
 - Mortier et pilon de grande taille
 - Spatule métallique (pour gratter les parois du tube conique et du mortier)
 - Pince-ciseaux (pour maintenir les tubes SS-34)
- Déposer le culot d'algues congelé préalablement pesé dans le mortier et broyer en une poudre très fine, ayant la même consistance que de la farine.
- Transférer la poudre congelée dans un tube en verre (Corex) refroidi à l'azote liquide. Vérifier qu'il n'y a pas de liquide au fond du tube avant le transfert.
- Sortir le tube de l'azote liquide et ajouter immédiatement 1 volume de chloroforme et 3 volumes de méthanol. Un glaçon se forme.

Le volume de référence est la somme des volumes du culot d'algues et de l'eau distillée ajoutée avant la congélation (500 μ L). Par exemple : 500 mg de masse fraîche d'algues + 500 μ L eau distillée + 1 mL chloroforme + 3 mL méthanol.
- Mélanger le glaçon avec une spatule jusqu'à obtenir un mélange homogène (attention : cette étape doit être réalisée rapidement, afin d'homogénéiser le mélange avant que sa température ne remonte au-dessus de 0°C)
- Boucher les tubes avec du papier aluminium et laisser 10 minutes à température ambiante et vortexer de temps en temps. Le mélange reste miscible, il n'y a pas de séparation de phase.
- Casser la miscibilité en ajoutant 1 volume de chloroforme et 1 volume d'eau distillée
Exemple : pour l'échantillon précédent, ajouter 1 ml de chloroforme et 1 ml d'eau distillée
- Boucher les tubes avec du papier aluminium et vortexer
- Centrifuger : rotor *Beckman-Coulter JA-20*, 10000 rpm (7840 g), 10 minutes, 4°C (utiliser les adaptateurs Corning bleus pour placer les tubes Corex dans le rotor).
- On obtient 2 phases, séparées par une « peau » : la phase inférieure, hydrophobe (chloroforme) et verte et la phase supérieure hydrophile (eau-méthanol) est incolore.
- Prélever la phase inférieure avec une pipette Pasteur, sans prendre la peau qui sépare les deux phases, et la transférer dans un tube conique de 50 mL.

(A ce stade, on peut chasser l'air du tube conique avec de l'argon et conserver l'échantillon 48 h à -20°C et à l'abri de la lumière, pour éviter la dégradation des pigments, avant l'étape suivante).

- Evaporer le chloroforme au Speedvac
- Chasser l'air du tube conique avec de l'argon et les conserver à l'abri de la lumière et à -20°C. L'échantillon peut être conservé ainsi plusieurs jours
- Juste avant l'analyse par HPLC, reprendre l'échantillon dans 100-200 µL de diméthylformamide (DMF) sous flux d'argon et à l'abri de la lumière. Placer l'échantillon dans un microtube de 1,5 mL muni d'un filtre à centrifuger et centrifuger
- Diluer le filtrat avec du DMF si nécessaire, transférer 85 µL dans un contenant pour l'analyse par HPLC et analyser l'échantillon

Annexe 12 Fluorescence X et cartographie élémentaire : principe de fonctionnement

A. Fluorescence X

Les électrons d'un atome sont répartis sur différentes couches électroniques d'énergie quantifiée. Ces couches sont désignées par ordre alphabétique, à partir de la lettre K. La couche K est la plus interne et donc la plus liée au noyau. A partir de la couche L, on dénombre des sous-couches L_i qui diffèrent par leur moment cinétique orbital. Les énergies des couches et des sous-couches sont caractéristiques d'un élément chimique, c'est sur cette propriété que repose l'analyse élémentaire par fluorescence X.

Lorsqu'un atome est irradié par des rayons X d'énergie supérieure à son potentiel d'ionisation (la source primaire), un électron peut être émis depuis une couche électronique interne vers le continuum (où l'électron n'est plus lié à l'atome) : c'est l'effet photoélectrique. L'atome se trouve alors dans un état excité et sa structure électronique est instable du fait de la vacance électronique créée dans la couche interne (Figure 46).

La désexcitation se fait par transition électronique : un électron d'un niveau énergétique plus élevé vient occuper la vacance. Cette transition électronique s'accompagne de l'émission d'un photon X dont l'énergie est égale à la différence d'énergie entre ses niveaux de départ et d'arrivée. Deux cas de figure sont alors possibles :

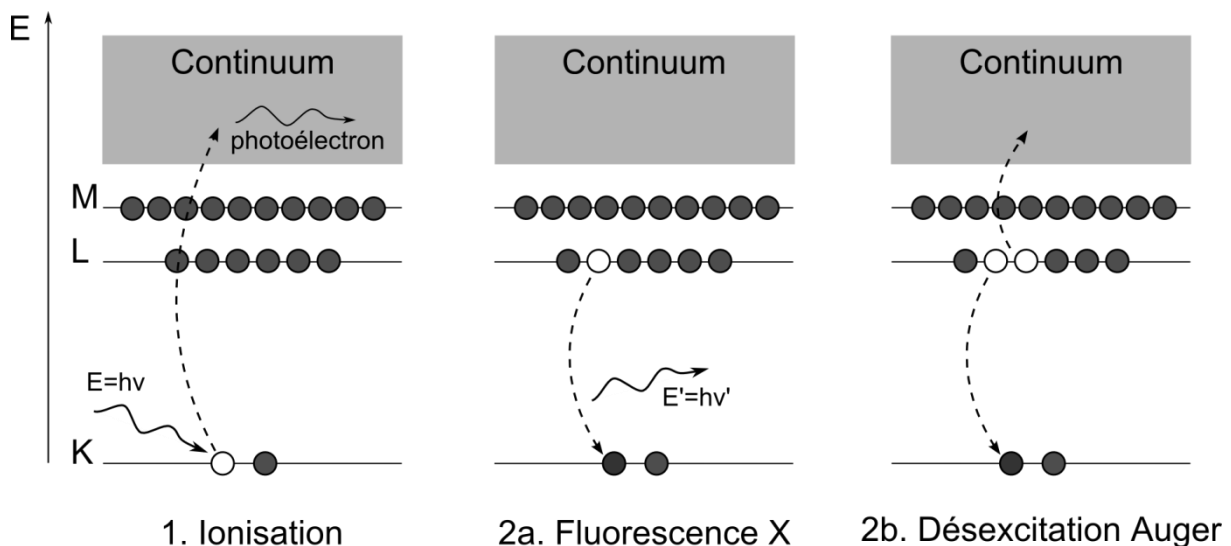


Figure 46 : Ionisation des couches internes d'un atome par effet photoélectrique (1) et désexcitation de l'atome par fluorescence X (2a) ou par effet Auger (2b)

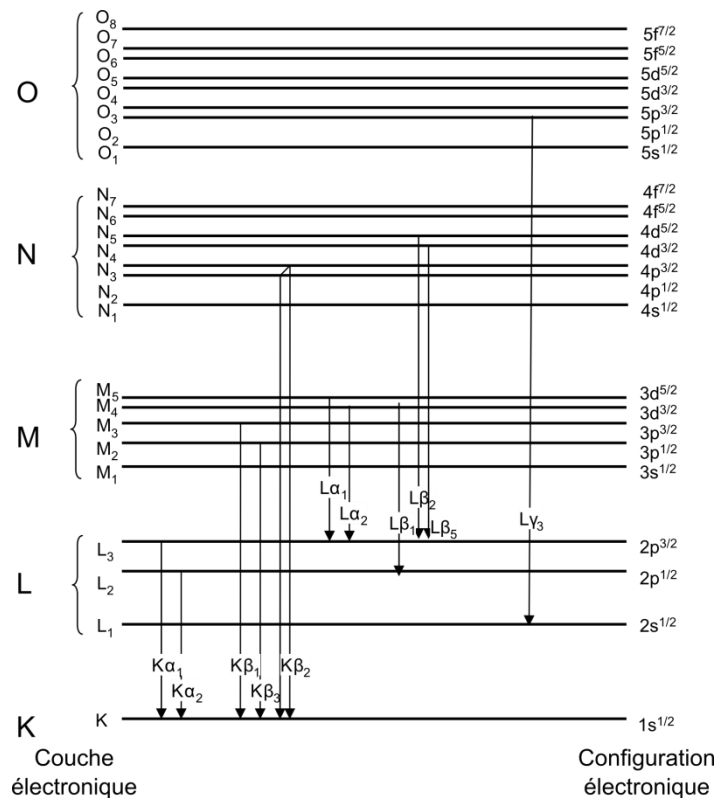


Figure 47 : Convention de nommage des transitions à l'origine des photons de fluorescence X d'après la notation de Siegbahn. D'après (Muller 2006).

- Le photon peut sortir de l'atome : c'est le phénomène de fluorescence X (désexcitation radiative de l'atome, phénomène prédominant pour les énergies supérieures à 2 keV)
- Ou il peut être absorbé par un électron qui est éjecté de l'atome, c'est l'effet Auger (désexcitation non radiative, prédominante aux faibles énergies)

Les photons de fluorescence X sont désignés d'après les transitions électroniques dont ils résultent. La principale notation utilisée en spectroscopie est la notation de Siegbahn : les transitions sont notées sous la forme « $K\alpha_1$ », où la lettre latine désigne la couche inférieure de la transition, la lettre grecque le nombre de couches de la transition (α pour une couche d'écart, β pour deux ou trois couches d'écart) et le chiffre est lié à la probabilité que la transition se fasse (les transitions notées 1 sont plus courantes que les 2, et ainsi de suite) (Figure 47). Cette notation ne repose toutefois pas sur des règles systématiques (les transitions $K\beta_1$ et $K\beta_3$ désignent par exemple une transition $M \rightarrow K$, tandis que $K\beta_2$ désigne une transition $N \rightarrow K$), l'UICPA recommande donc une convention alternative de la forme « sous-couche basse – sous-couche haute » (la transition $K\beta_1$ est par exemple notée $K-M_2$).

Un spectre de fluorescence X représente le nombre de photons de fluorescence émis par un échantillon irradié par une source primaire en fonction de l'énergie de ces photons de fluorescence (Figure 48). Il s'analyse en deux temps :

- L'énergie des photons de fluorescence est caractéristique de l'atome qui l'émet et de la transition énergétique dont il résulte. La première étape de l'analyse consiste à identifier les atomes émetteurs en fonction de l'énergie des photons.
- La seconde étape consiste à quantifier le nombre de photons qui constituent les raies. Chaque élément chimique et chaque transition ont un rendement de fluorescence spécifique et connu, on peut donc déterminer pour chaque raie un facteur donnant la concentration de l'atome émetteur dans l'échantillon en fonction du nombre de photons reçus. Ces facteurs de conversion dépendent également d'autres paramètres que la nature des atomes (nature de l'échantillon, montage de la ligne de mesure, etc.), on utilise des échantillons de référence pour calibrer la quantification.

L'acquisition et l'analyse du spectre de fluorescence X d'un échantillon permettent ainsi de déterminer et de quantifier les éléments chimiques qui le composent.

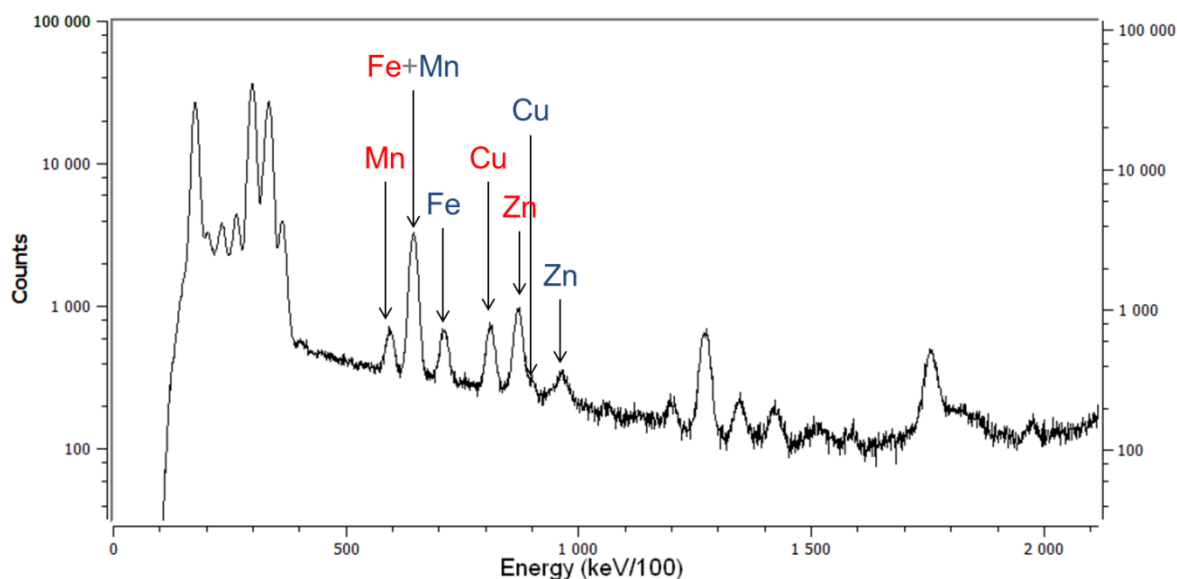


Figure 48 : Spectre de fluorescence X d'un échantillon d'algues. L'identification de certaines raies est indiquée, les transitions $K\alpha$ sont en rouge, les $K\beta$ en bleu.

B. Cartographie élémentaire par fluorescence X

La cartographie élémentaire par fluorescence X repose sur l'utilisation d'une source d'ionisation primaire dont la résolution spatiale est importante. Dans notre cas, la source primaire était le faisceau X d'une ligne synchrotron focalisé sur une zone de circulaire de

80 nm (largeur à mi-hauteur de l'intensité énergétique du faisceau). Cette forte résolution spatiale permet de parcourir l'échantillon par pas de 100 nm et d'enregistrer un spectre à chaque point. Environ 2800 spectres sont ainsi acquis pour un échantillon de 4 μm par 7 μm .

Chaque spectre est analysé individuellement et permet de connaître les éléments présents et leur concentration en chacun des points analysés. A partir de ces résultats, on reconstitue des cartographies de distributions des éléments observés (Figure 49).

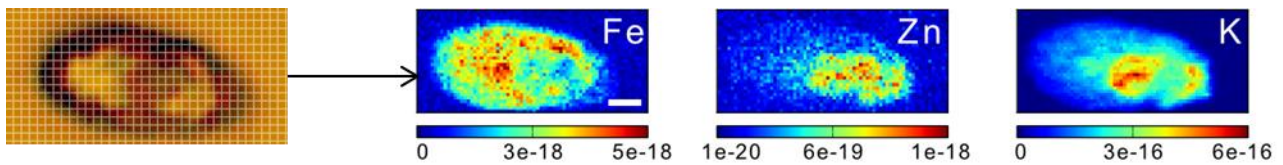


Figure 49 : Exemple de cartographie de la distribution du fer, du zinc et du potassium dans une algue. Les barres colorimétriques indiquent la concentration de l'élément en $\text{g}\cdot\text{pixel}^{-1}$. Chaque pixel mesure 100x100 nm et correspond à l'acquisition d'un spectre de fluorescence X. La barre blanche sur la carte de distribution du fer représente 1 μm .

Annexe 13 Méthodologie pour l'analyse des spectres XRF et l'exploitation des résultats

I. Paramètres d'ajustement des spectres

Les spectres XRF acquis sur ID22 ont été analysés à l'aide du logiciel PyMCA (version 4.4.1). PyMCA permet d'identifier les raies d'un spectre et de quantifier leur intensité, en tenant compte de nombreux facteurs correctifs (Solé et al., 2007). Nous avons optimisé les paramètres d'ajustement en les configurant manuellement pour certains spectres, puis l'ensemble des spectres ont été ajustés par lot (« batch fitting ») avec les paramètres sélectionnés.

Le contenu d'un fichier de paramétrage est reproduit ci-dessous (fichier .cfg, qui peut être importé par PyMCA). Un tel fichier a été créé pour chaque algue analysée. Quatre lignes ont été mises en surbrillance :

- *Layer0 = 0, Water, 1.0, 0.0005* et *Matrix = 1, Water, 1.0, 0.0005, 90.0, 15.0, 0, 105.0* : La matrice des échantillons analysés doit être renseignée dans le fichier de configuration pour que PyMCA retourne les résultats de quantification sous forme de concentration massique. La composition de la matrice est également utilisée pour évaluer l'atténuation du faisceau. Ne connaissant pas les caractéristiques exactes de la matrice de nos échantillons, nous l'avons modélisé par une couche d'eau, de densité 1, et d'épaisseur 5 μm . L'erreur introduite par cette approximation est par la suite corrigée dans un autre calcul (cf. section suivante).
- *flux = 2.4625e+11* : Moyenne du flux de photons reçus par une algue au cours de l'acquisition des spectres, en $\text{photons}\cdot\text{s}^{-1}$. Le fichier de configuration est adapté pour chaque algue avec la valeur moyenne mesurée durant l'acquisition.
- *time = 1* : Temps de collecte d'un spectre, en secondes. Nous avons choisi des temps compris entre 500 ms et 1 s (pour chaque acquisition, donc pour chaque pixel) durant la collecte des spectres (l'augmentation du temps de collecte permet d'améliorer le rapport signal sur bruit, sa diminution limite la saturation des détecteurs). Pour chaque algue, le temps utilisé est indiqué dans le fichier de configuration.

```
[attenuators]
kapton = 0, Kapton, 1.42, 0.00762, 1.0
atmosphere = 1, Air, 0.0012048, 1.8, 1.0
Matrix = 1, Water, 1.0, 0.0005, 90.0, 15.0, 0, 105.0
deadlayer = 1, Si1, 2.33, 0.00015, 1.0
BeamFilter1 = 0, -, 0.0, 0.0, 1.0
BeamFilter0 = 0, Air, 0.0012048, 1.0, 1.0
absorber = 0, -, 0.0, 0.0, 1.0
window = 1, Be1, 1.848, 0.0025, 1.0
contact = 0, Au1, 19.37, 1e-06, 1.0
```



```

[materials.Gold]
Comment = Gold
CompoundFraction = 1.0
Thickness = 1e-06
Density = 19.37
CompoundList = Au

[materials.SiN]
Thickness = 5e-05
Density = 3.185
Comment = Si3N4 window, 500 nm thick
CompoundFraction = 0.6006, 0.3994
CompoundList = Si, N

[materials.Water]
Comment = Water density=1.0 g/cm3
CompoundFraction = 1.0
Thickness = 0.00769
Density = 1.0
CompoundList = H2O1

[materials.Goethite]
Comment = Mineral FeO(OH) density from 3.3 to 4.3 density=4.3 g/cm3
CompoundFraction = 1.0
Thickness = 0.1
Density = 4.3
CompoundList = Fe1O2H1

[materials.test]
Comment = New Material
Thickness = 0.02
Density = 1.0
CompoundFraction = 0.966, 0.00016, 0.00278, 0.011, 0.00994, 0.00242, 0.00785
CompoundList = Water, Cu, Cl, P, K, Na, S

[materials.Air]
Comment = Dry Air (Near sea level) density=0.001204790 g/cm3
Thickness = 1.0
Density = 0.0012048
CompoundFraction = 0.000124, 0.75527, 0.23178, 0.012827, 3.2e-06
CompoundList = Cl, N1, O1, Ar1, Kr1

[materials.epon]
Comment = EPON
CompoundFraction = 1.0
Thickness = 0.0005
Density = 1.19
CompoundList = C21H25Cl1O5

[materials.bovine liver]
Comment = New Material
Thickness = 0.00769
Density = 1.0
CompoundFraction = 0.14, 0.51, 0.106, 0.21, 0.00785, 0.00242, 0.011, 0.00278,
0.00994
CompoundList = H1, C1, N1, O1, S1, Na1, P1, Cl1, K1

[materials.Mylar]
Comment = Mylar (Polyethylene Terephthalate) density=1.40 g/cm3
Density = 1.4
CompoundFraction = 0.041959, 0.625017, 0.333025
CompoundList = H1, C1, O1

[concentrations]
usemultilayersecondary = 0

```

```
reference = Auto
area = 3.14
flux = 2.4625e+11
time = 1
useattenuators = 1
usematrix = 0
mmolarflag = 0
distance = 7.83

[detector]
noise = 0.154742
fixednoise = 1
fixedgain = 1
deltafano = 0.114
fixedfano = 1
sum = 0.0
deltasum = 1e-08
fano = 0.176599
fixedsum = 0
fixedzero = 1
zero = 0.00102288
deltazero = 0.1
deltanoise = 0.05
deltagain = 0.001
detele = Si
nthreshold = 4
gain = 0.00994315

[peakshape]
lt_arearatio = 0.0
fixedlt_arearatio = 1
fixedeta_factor = 0
st_arearatio = 0.0
deltalt_arearatio = 0.015
deltaeta_factor = 0.02
deltalt_sloperatio = 7.0
deltastep_heightratio = 0.0008
st_sloperatio = 0.05
lt_sloperatio = 10.0
fixedlt_sloperatio = 1
deltast_arearatio = 0.03
eta_factor = 0.02
fixedst_sloperatio = 1
fixedst_arearatio = 1
deltast_sloperatio = 0.49
step_heightratio = 0.00043
fixedstep_heightratio = 1
```

II. XRF : Conversion des résultats retournés par PyMCA et tracé des cartographies

A. Intérêt d'une conversion des résultats

Lors de l'analyse quantitative des spectres XRF, PyMCA peut retourner les résultats dans deux unités, pour chacun des éléments ajustés :

- En « nombre de coups », c'est-à-dire en nombre de photons de fluorescence détectés ayant contribué aux raies de cet élément. Cette unité présente un inconvénient : chaque élément (et chacune des raies de fluorescence d'un élément) a un rendement de fluorescence propre, la mesure du nombre de coups ne permet donc pas de comparer quantitativement les différents éléments d'un échantillon. Si l'on mesure 1000 coups issus d'atomes de fer, et 1000 autres issus d'atomes de zinc par exemple, cela ne signifie pas qu'il y a autant d'atomes de fer que d'atomes de zinc dans la zone analysée.
- Afin de pallier cet inconvénient, PyMCA peut également retourner les résultats sous forme fraction massique : pour chaque élément, le nombre de coups est converti en masse de l'élément (cette conversion tient notamment compte des différents rendements de fluorescence évoqués ci-dessus), puis divisé par la masse totale de la zone analysée.

La fraction massique calculée par PyMCA présente l'avantage de permettre une comparaison quantitative entre différents éléments, mais elle n'est pas dépourvue d'inconvénients :

- Elle suppose de renseigner les caractéristiques (composition, épaisseur) de la matrice de l'échantillon en chacune des zones analysées. Ne connaissant pas ces caractéristiques, nous avons dû faire une approximation (matrice = couche d'eau d'épaisseur 5 μm sur toute la surface de l'échantillon)
- Une approximation importante est faite lors du calcul de la masse totale de la zone analysée. La masse totale devrait être calculée par la formule :

$$masse_{totale} = masse_{matrice} + \sum_{\text{éléments quantifiés}} masse_{\text{élément}}$$

L'approximation suivante est utilisée dans PyMCA :

$$masse_{totale} \approx masse_{matrice}$$

Cette approximation est raisonnable pour des échantillons où la masse de la matrice est importante devant celle des éléments analysés, mais elle pose problème

dans notre cas et donne des résultats aberrants (somme des fractions massique supérieure à l'unité).

Pour la présentation de nos résultats, nous avons souhaité conserver une unité massique, afin de pouvoir comparer quantitativement différents éléments, tout en nous affranchissant des approximations faites lors du calcul de la fraction massique par PyMCA.

B. Mise en œuvre

Pour cela, nous avons simplement calculé la masse d'un élément à partir de sa fraction massique, en utilisant les mêmes approximations que celles faites par PyMCA, de telle sorte qu'elles se neutralisent :

$$masse_{\text{élément}} = \text{fraction massique}_{\text{élément}} \times masse_{\text{matrice}}$$

On obtient ainsi la masse des éléments dans la zone analysée. La projection de cette zone sur les cartographies finales correspond à un pixel. La masse de la matrice est calculée d'après les dimensions de la zone analysée et la densité renseignée pour la matrice :

$$masse_{\text{matrice}} = V_{\text{matrice}} \times \text{densité}$$

Avec :

- $V_{\text{matrice}} = 0,1 \mu\text{m} * 0,1 \mu\text{m} * 5.10^{-4} \text{cm} = 5.10^{-14} \text{cm}$
- $\text{Densité} = 1 \text{g.cm}^{-3}$
- Soit $masse_{\text{matrice}} = 5.10^{-14} \text{g.pixel}^{-1}$

A notre connaissance, PyMCA ne permet pas de retourner le résultat directement sous cette forme, le passage par le calcul d'une fraction massique approximée est obligatoire. Nous avons utilisé le script Python reproduit ci-dessous pour convertir les fractions massiques retournées par PyMCA en masses par pixel et pour tracer les cartographies correspondantes :

```
# This Python file uses the following encoding: utf-8
# Author: Thomas LEONARDO
# Python 2.7.2

import os
import glob
from pylab import *
from math import floor, ceil, sqrt
import EdfFile
from matplotlib.colors import LogNorm

# functions
def splt_dim (nb):
    "defines optimal subplot configuration: number of vertical and horizontal
    images"
```

```

    if nb > 0 :
        return (int(floor(sqrt(nb))),
int(ceil(float(nb)/(floor(sqrt(nb))))))
    else :
        return (1, 1)

def im_orientation (data) :
    "defines the images orientation (for colorbar optimal positioning)"
    if data.GetStaticHeader(0)['Dim_1'] > data.GetStaticHeader(0)['Dim_2'] :
        return 'horizontal'
    else :
        return 'vertical'

def alga_mass_plot ((sample, alga, elements_list, datapath, output_folder)):
    "converts and plots PyMCA output data: plot all the elemental maps of
a given alga"

    fList=[] # list containing (['file'], 'element') tuples
    for elt in elements_list:
        fList.append(((glob.glob(os.path.join(datapath, sample, 'IMAGES',
'*_'+alga[0]+'_*'+elt+'_mass_fraction.edf'))), elt))

    (sp_l, sp_r) = spl_t_dim (len(fList)) # get subplot dimensions

    # matrix mass per px, in grams = matrix volume * matrix density
    # = (.1 um * .1 um * 5e-4 cm) * 1 g.cm-3
    matrixMass = 5e-14
    mass = [] # maps in grams per pixel
    sp_title = [] # subplot titles
    cbar_orientation = [] # colorbar orientations

    clf()
    for dataFile, element in fList : # for each element...
        # ...load data (PyMCA output)
        eltAtomicWeight = atomicWeight[element]
        data = EdfFile.EdfFile (dataFile[0])
        dataTitle = data.GetHeader(0)['Title']
        eltMassFraction = data.GetData(0) # mass fraction
        # ...convert mass fraction per pixel to grams per pixel
        # approximation used: totalMass = matrixMass (as used in PyMCA)
        eltMass = eltMassFraction * matrixMass
        # ...append data for latter plot
        mass.append(eltMass)
        sp_title.append(dataTitle.replace(" mass fraction", ""))
        cbar_orientation.append(im_orientation(data))

    # plot elemental maps, in grams per pixel
    for index, im_i in enumerate(mass):
        subplot(sp_l, sp_r, index+1)
        imshow(im_i, norm=Normalize(), interpolation='none')
        text( shape(im_i)[1]-2, 2, sp_title[index][:-2], va = 'top', ha
='right', fontsize=26, color='white', fontweight='bold')
        xticks([])
        yticks([])
        cb = colorbar(format='%.0e', pad=0.05, orientation =
cbar_orientation[index], ticks = linspace (im_i.min(), im_i.max(),3))
        for t in cb.ax.get_yticklabels():
            t.set_fontsize(16)
        for t in cb.ax.get_xticklabels():
            t.set_fontsize(16)

        suptitle ( sample+' | alga '+ alga[0].upper() + alga[1] + ' | mass (g per
px)', fontsize=20)
        save_fname = os.path.join(datapath, output_folder,
sample+'_'+alga+'_mass.pdf')
        savefig (save_fname, dpi=96)

```

```
# main
alga_mass_plot ((sample, alga, elements_list, datapath, output_folder))
```

III. XRF : Analyse des résultats par analyse en composantes principales (ACP) et classification ascendante hiérarchique (CAH)

A. Prétraitements appliqués avant l'analyse par composante principales

L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) permettent d'évaluer objectivement la colocalisation (le recouvrement spatial) des éléments étudiés au sein des cellules.

On considère un échantillon analysé par XRF. Un échantillon correspond à des paramètres d'exposition définis (métal, concentration, temps, milieu). Pour chaque échantillon, plusieurs algues ont été analysées ; et pour chaque algue l'analyse des spectres a permis d'obtenir les cartographies quantifiées de la distribution dans l'algue d'une dizaine d'éléments.

On souhaite analyser, pour toutes les algues d'un échantillon, les similitudes ou les différences entre les distributions spatiales des différents éléments chimiques : quels sont par exemple les éléments qui se répartissent dans les mêmes compartiments subcellulaires, qui forment des motifs superposés ? Il est difficile de s'appuyer uniquement sur des observations visuelles pour faire une analyse exhaustive des données car leur volume est important¹¹. L'utilisation de méthodes statistiques descriptives permet d'analyser la grande quantité de données dont nous disposons de façon systématique et objective.

Les données sont d'abord prétraitées : pour une algue donnée, chacune des cartographies obtenues (Figure 50, A) est lissée par une fonction de Savitzky-Golay qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit (Figure 50, B), l'image obtenue est multipliée par un masque (Figure 50, C) qui permet d'écarter les pixels situés en dehors de l'algue de la suite du traitement, et on applique un seuil à l'image résultante (les pixels dont la valeur est inférieure à la moitié de la valeur du pixel maximal sont mis à zéro) pour ne tenir compte que des « motifs » principaux dans la suite de l'analyse (Figure 50, D).

¹¹ Pour chaque échantillon, 4-5 algues ont été analysées en moyenne, pour chaque algue une dizaine d'éléments chimiques sont cartographiés, et chaque cartographie synthétise environ 4000 valeurs (4000 pixels ?).

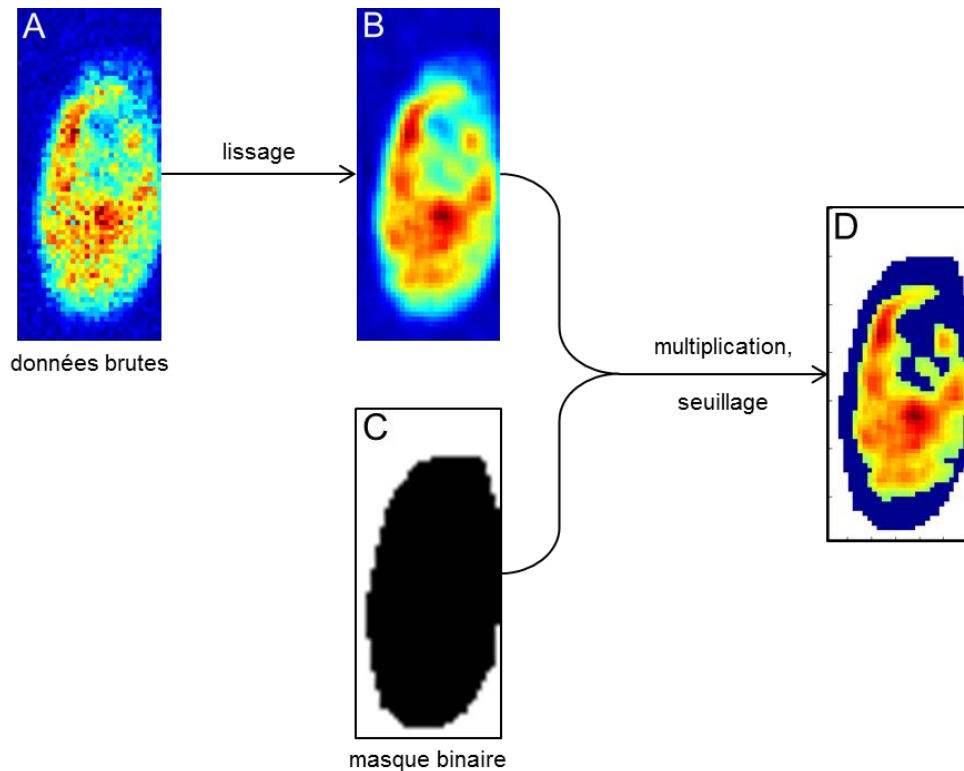


Figure 50 : Prétraitement appliqué aux données avant ACP : lissage, exclusion des pixels extérieurs à l’algue et seuillage, représentés pour un élément chimique

Les images présentées pour chaque élément correspondent à une matrice de données. Une cellule de la matrice possède trois attributs : un numéro de ligne, un numéro de colonne et une valeur. Les numéros de ligne et de colonne correspondent à la position du pixel correspondant sur l’image, et la valeur de la cellule à la valeur (donc la couleur) du pixel (masse de l’élément après lissage et seuillage). On peut réduire ces attributs au nombre de deux pour l’ACP en vectorisant ces matrices. Cette opération est schématisée sur la Figure 51.

Les deux matrices en haut de la figure représentent les matrices correspondant à la distribution du fer et du zinc dans une algue. Les cellules grisées sont celles qui correspondent aux pixels situés à l’intérieur de l’algue, les cellules blanches correspondent aux pixels situés à l’extérieur de l’algue. Pour i et j fixés, on a une correspondance spatiale entre les cellules $Fe_{i,j}$ et $Zn_{i,j}$. On réorganise ces matrices sous forme de vecteurs en supprimant les cellules blanches, et en organisant les cellules grisées en colonne en respectant un ordre systématique. La fusion de ces colonnes donne une nouvelle matrice, qui contient les données de tous les éléments. Une partie de l’information spatiale est perdue (on ne connaît plus les positions exactes des différentes valeurs sur l’image initiale), mais on conserve la correspondance

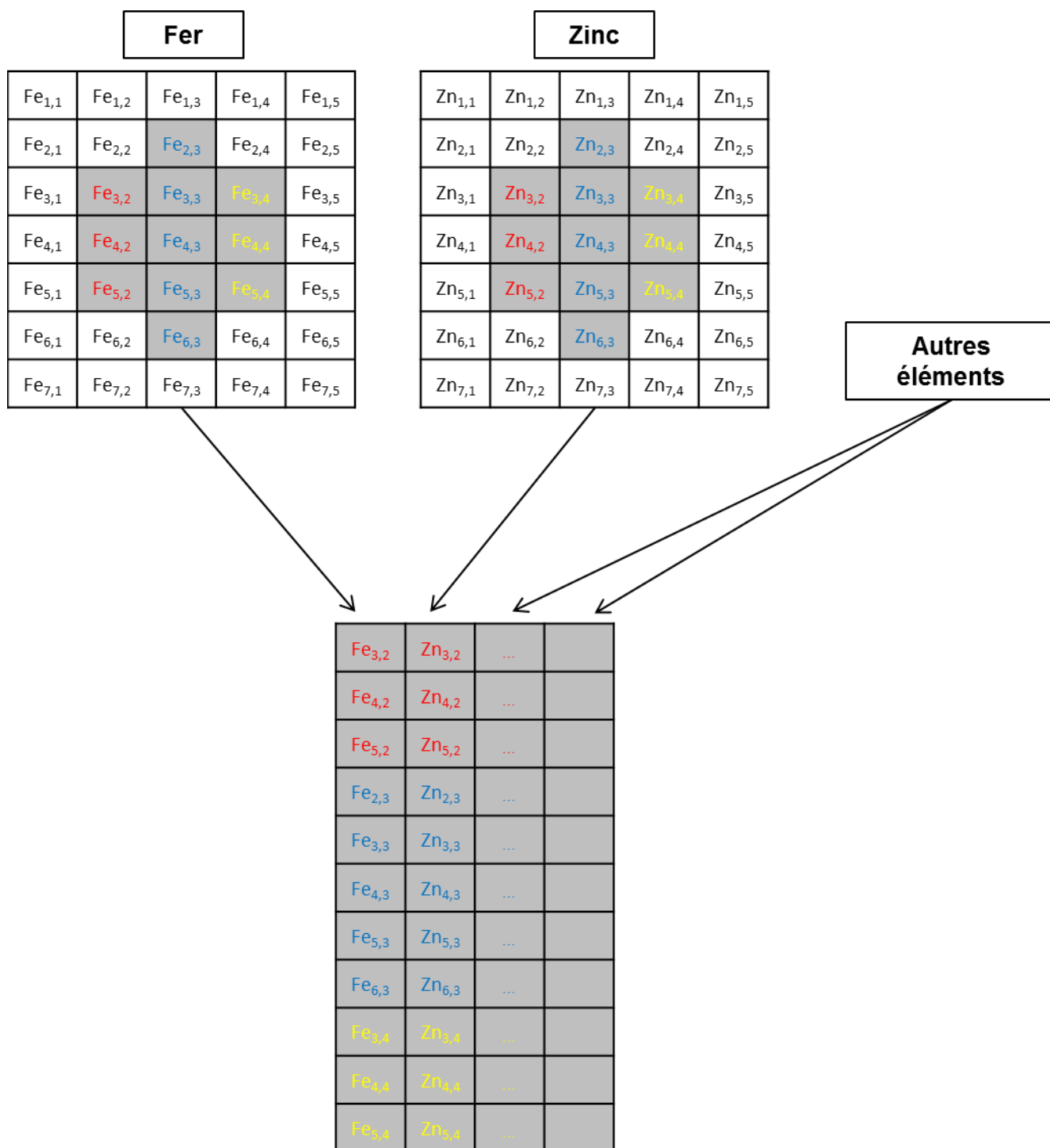


Figure 51 : Prétraitement appliqué aux données avant ACP : vectorisation des matrices

spatiale des valeurs pour les différents éléments (toutes les cellules d'une même ligne correspondent à une même position spatiale initiale). Seule cette correspondance est nécessaire à l'analyse de colocalisation.

Cette nouvelle matrice décrit l'ensemble des pixels situés à l'intérieur de l'algue (les lignes) en fonction d'une dizaine de variables (poids de chaque élément chimique pour ce

pixel, en colonnes). Analyser la colocalisation des éléments dans les cellules revient donc à analyser les corrélations entre ces variables, ce que permet l'analyse en composantes principales.

B. Mise en œuvre des ACP et CAH

On réalise l'ACP de cette matrice et on projette les variables initiales sur les deux premières composantes principales. Pour chaque variable, on définit un vecteur dont l'origine est le centre du cercle des corrélations et dont l'autre extrémité est au point de projection de la variable. Les distributions intracellulaires des variables (les éléments chimiques) dont les projections sont proches et pour lesquelles l'angle entre les vecteurs est petit présentent des similarités.

Les variables peuvent également être classifiées dans différents groupes en fonction de la distance qui les sépare. La classification ascendante hiérarchie (CAH) permet d'opérer ce regroupement sans a priori sur le nombre de classes à constituer : les variables sont regroupées en fonction de la distance qui les sépare, puis on détermine une distance seuil qui définit un nombre plus ou moins important de groupes. Tandis que la distance entre les variables projetées sur le cercle des corrélations ne tient compte que des deux premières composantes principales, on peut dans la CAH tenir compte de toutes les composantes (ce qui revient à faire la CAH sur les données initiales). La distance seuil est une mesure de la différence entre les groupes constitués : une grande distance seuil définit peu de groupes dont les propriétés sont très différentes, tandis qu'une distance seuil plus petite définit davantage de groupes dont certains sont peu différents les uns des autres.

Les ACP et les CAH ont été réalisés avec le logiciel R (version 3.0.1) et la librairie ade4 (Dray et al., 2007). Les scripts utilisés pour réaliser ces analyses sont reproduits ci-dessous :

```
# R script to perform PCA of elemental distribution in algae
# R 3.0.1
# Author: Thomas Leonardo

# load data
data <- read.table('data.csv', sep=',', header=T)
# PCA
library(ade4)
z<- dudi.pca(data, center = T, scale = T, scannf = F)
cl1<-z$li[,1]; cc1<-z$co[,1]; cl2<-z$li[,2]; cc2<-z$co[,2]
# plot
plot(cc1, cc2, pch=18, main="PCA: Projection of the variables on \n the
```

```
correlation circle (F1, F2)",xlim=c(-1,1),ylim=c(-1,1), asp=1, xlab=
"XLabel", ylab= "YLabel", cex.main=2, cex.lab=2)
abline(h=0,v=0)
text(cc1,cc2,row.names(z$co), pos=4, cex=2)
symbols(0,0,circles=1,inches=FALSE,add=TRUE)
```

```
# R script to perform HCA on PCA of elemental distribution output
# R 3.0.1
# Author: Thomas Leonardo

# load data
data <- read.table('data.csv',sep=',', header=T)
# PCA, nf: keep all the axes
library(ade4)
z <- dudi.pca(data, center = T, scale = T, scannf = F, nf=dim(data)[2])
pcaOutput <- z$co
# HCA on PCA output
d <- dist(pcaOutput, method="euclidian")
fit <- hclust(d, method="single")
# plot result
plot(fit, main="HCA, method = single")
```

Annexe 14 Spectroscopie d'absorption X

La spectroscopie d'absorption X (SAX) est une technique qui renseigne sur la spéciation d'un élément donné au sein d'un échantillon. Elle permet par exemple de sonder l'environnement chimique des atomes d'argent accumulés par les algues. Si ces atomes sont présents sous différentes formes chimiques, la méthode permet de déterminer un environnement chimique moyen.

La SAX repose sur la mesure des variations du *coefficient d'absorption* μ d'un échantillon en fonction de l'énergie incidente autour d'un seuil d'absorption propre à l'élément analysé. Un échantillon soumis à un faisceau X monochromatique d'intensité I_0 transmet un rayonnement d'intensité I suivant la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 e^{-\mu x}$; où x est l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau et μ le coefficient d'absorption de l'échantillon. μ dépend de l'énergie du rayon incident E , de la densité moyenne de l'échantillon, du numéro atomique Z et du nombre de masse A des atomes absorbeurs.

L'absorption des rayons X par l'échantillon est due à l'effet photoélectrique, décrit en annexe 11 : lorsqu'un atome est irradié par un photon X d'énergie supérieure à l'énergie de liaison de ses électrons, les électrons peuvent absorber le photon et être émis dans le continuum sous forme de photoélectron. Lors d'une mesure de SAX, on fait généralement varier l'énergie du faisceau incident autour des seuils d'absorption K ou L de l'élément étudié, ce sont donc des électrons des couches internes qui sont expulsés. Suite à l'émission d'un électron de ses couches internes, l'atome se désexcite par fluorescence X ou par émission Auger (cf. annexe 11).

Le coefficient d'absorption d'un échantillon peut être mesuré de deux façons :

- On peut enregistrer les intensités I_0 et I des faisceaux incident et transmis, respectivement. On a alors $\mu(E) \propto \log(I_0/I)$ ¹². Cette mesure « en transmission » est adaptée aux échantillons dont la concentration (pour l'élément étudié) est importante.
- L'intensité des émissions de fluorescence X et d'électrons Auger sont proportionnelles au nombre de photons absorbés par l'échantillon, elles peuvent donc être utilisées pour déterminer les variations du coefficient d'absorption μ . La mesure de la fluorescence de l'échantillon est généralement privilégiée. On a alors

¹² Les coefficients de proportionnalité entre le coefficient d'absorption μ et les grandeurs mesurées n'a pas besoin d'être connu puisqu'on s'intéresse aux variations de μ .

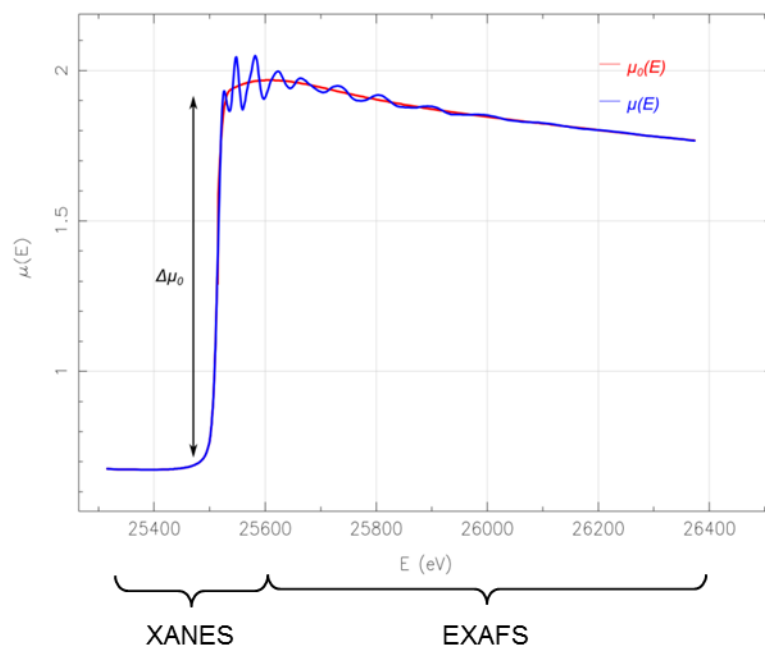


Figure 52 : Spectre d'absorption X d'une feuille d'argent mesuré au seuil K de l'argent

$\mu(E) \propto I_f / I_0$, avec I_f l'intensité d'une raie de fluorescence. Cette mesure « en fluorescence » est adaptée aux échantillons épais ou dans lesquels l'élément étudié n'est pas très concentré.

Quelle que soit la méthode de mesure choisie, le spectre SAX a la même forme générale : il est constitué d'un seuil d'absorption, suivi d'oscillations autour d'une valeur haute (Figure 52). On observe parfois la présence d'un pré-pic situé juste avant le seuil d'absorption.

Le spectre SAX se décompose en deux parties :

- Le XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*, ou spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X), qui couvre environ 100 eV de part et d'autre du seuil d'absorption
- L'EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*, ou spectroscopie de structure au-delà du front d'absorption de rayons X), constitué des oscillations situées au-delà du seuil d'absorption

La forme du XANES est caractéristique du degré d'oxydation de l'élément étudié et de sa géométrie de coordination (ou plus précisément de la symétrie du champ électrique autour de l'atome). Les spectres XANES peuvent être analysés par comparaison avec des spectres de références.

L'EXAFS permet d'obtenir des informations sur le nombre, la distance et la nature des atomes environnant l'atome central. Sur la partie EXAFS du spectre, seules les oscillations du signal sont exploitées, on normalise donc le signal mesuré pour obtenir le signal EXAFS $\chi(E)$:

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\Delta\mu_0(E)}$$

Avec $\mu_0(E)$ l'absorption atomique de l'atome absorbeur, c'est-à-dire l'absorption qu'aurait l'atome central sans voisins (on l'approxime par une fonction continue représentée en rouge sur la Figure 52), et $\Delta\mu_0(E)$ est la variation de l'absorption atomique au niveau du seuil d'absorption.

L'interprétation de l'EXAFS repose sur le fait que le photoélectron émis par l'atome central lors de son ionisation a les propriétés d'une onde. Le signal EXAFS χ est donc plus communément exprimé en fonction du nombre d'onde k :

$$k = \sqrt{\frac{2m(E - E_0)}{\hbar^2}}$$

Avec E_0 l'énergie du seuil d'absorption, m la masse d'un électron et \hbar la constante de Planck réduite.

Le signal EXAFS $\chi(k)$ extrait du spectre de la Figure 52 est présenté Figure 53 (vignette supérieure). On constate que l'amplitude des oscillations décroît rapidement avec k , il est commun de les accentuer en pondérant le signal EXAFS par un facteur k , k^2 ou k^3 (il est pondéré par k^2 sur la vignette du bas de la Figure 53).

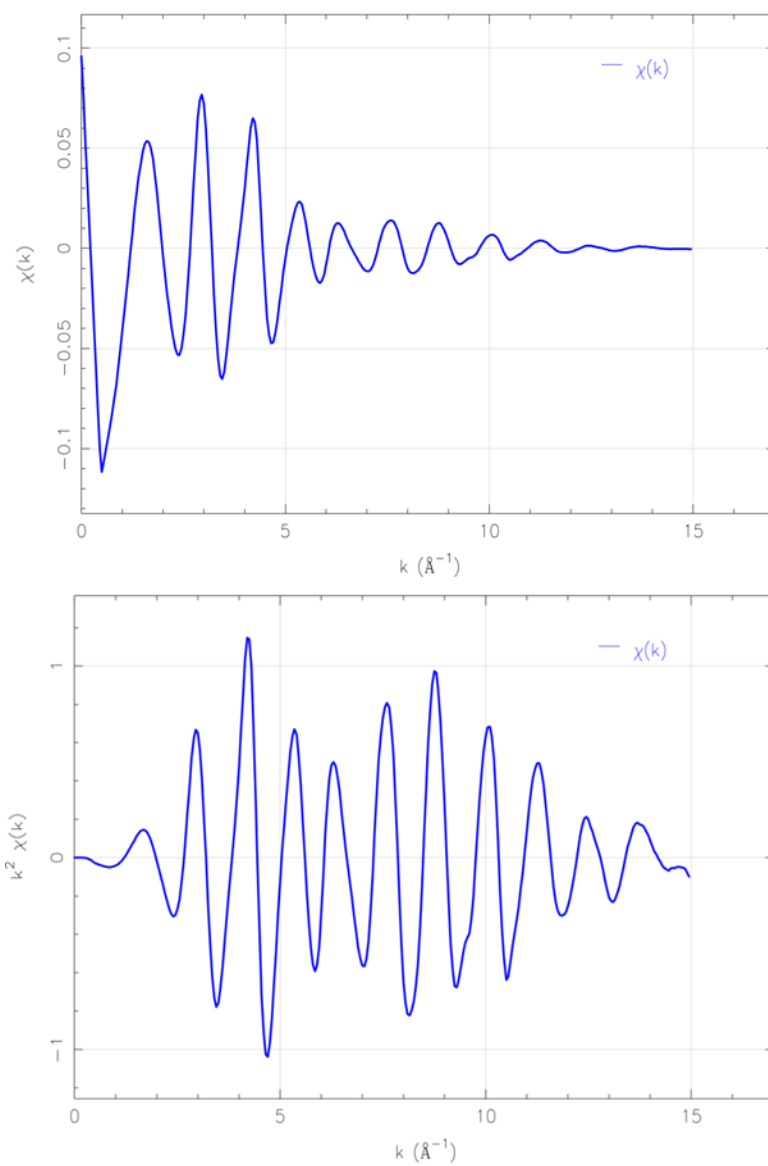


Figure 53 : Spectres EXAFS d'une feuille d'argent, obtenus à partir de la figure précédente. Le spectre du haut représente le signal EXAFS $\chi(k)$ non pondéré, celui du bas est pondéré par un facteur k^2 .

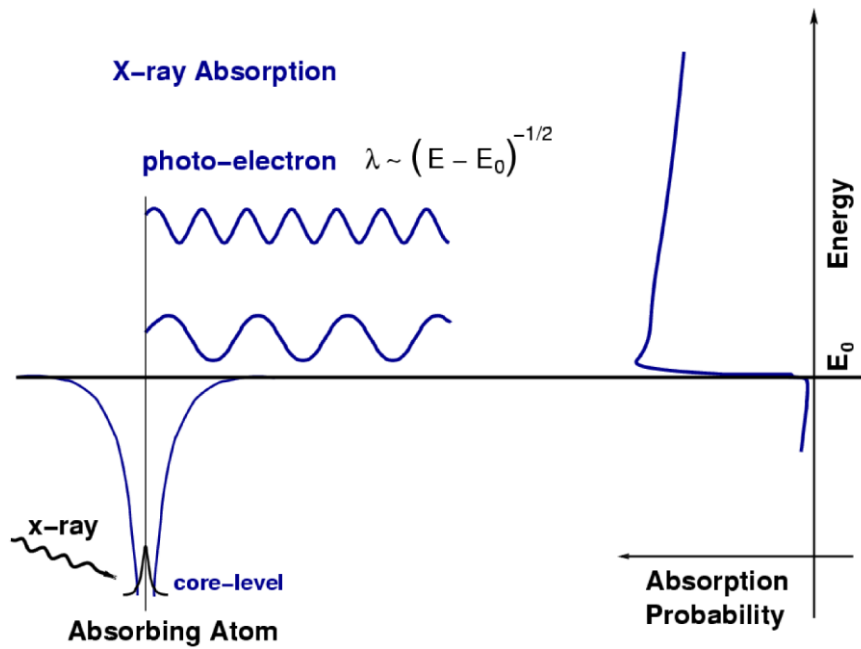


Figure 54 : Probabilité de l'absorption d'un photon X combinée à l'émission d'un photoélectron en fonction de l'énergie du photon incident dans le cas d'un atome isolé. D'après (Newville 2014)

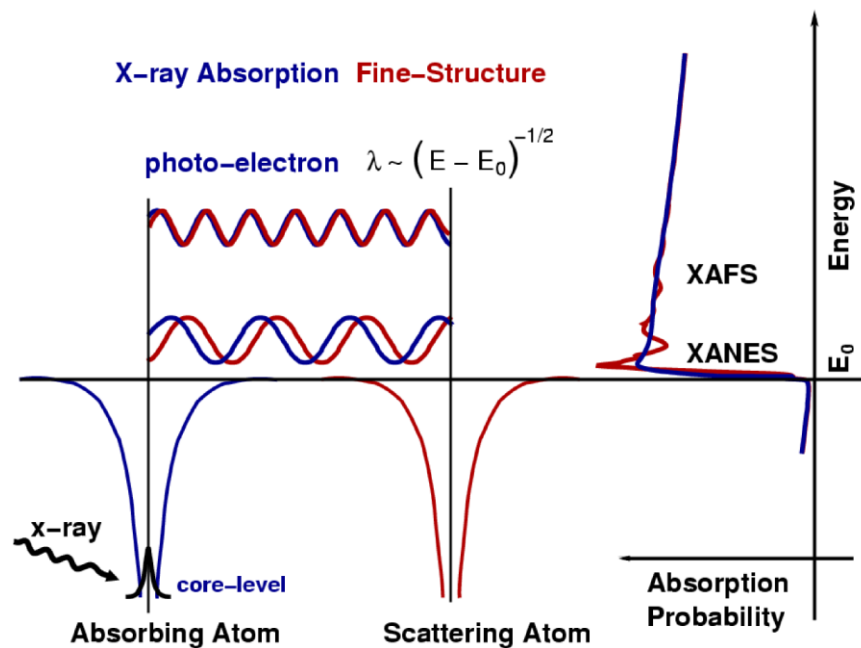


Figure 55 : Probabilité de l'absorption d'un photon X combinée à l'émission d'un photoélectron en fonction de l'énergie du photon incident dans le cas d'un atome avec un voisin. La rétrodiffusion du photoélectron crée des interférences qui modulent le coefficient d'absorption $\mu(E)$. D'après (Newville 2014)

On peut interpréter la forme générale du spectre SAX en considérant un atome isolé (Figure 54, l'axe des énergies est en ordonnée, le spectre SAX est pivoté de 90°). L'absorption d'un photon par un électron suppose l'existence d'un état disponible pour le photoélectron résultant. En dessous de l'énergie E_0 du seuil d'absorption, l'énergie des photons est trop faible pour faire transiter les électrons de cœur vers des couches non occupées, le coefficient d'absorption $\mu(E)$ est donc faible (il n'est pas nul car des électrons des couches supérieures peuvent être émis dans le continuum). L'absorption par les électrons des couches internes devient en revanche possible pour des photons d'énergie égale ou supérieure à E_0 . L'absorption des photons s'accompagne de l'émission d'un photoélectron dont le nombre d'onde k est proportionnel à la racine carré de la différence entre l'énergie E du photon incident et l'énergie E_0 du seuil d'absorption (cf. formule précédente).

Les oscillations du signal EXAFS proviennent de la présence d'autres atomes au voisinage de l'atome central, on peut les interpréter en considérant un atome avec un seul voisin. L'atome voisin peut rétrodiffuser le photoélectron émis par l'atome central. L'onde rétrodiffusée va alors interférer avec l'onde correspondant à l'émission du photoélectron et moduler l'absorption $\mu(E)$ (Figure 55).

Ces interactions peuvent être décrites mathématiquement et permettent d'établir l'équation de l'EXAFS :

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j f_j(k) e^{-2k^2 \sigma_j^2}}{k R_j^2} \sin[2k R_j + \delta_j(k)] e^{-2R_j/\lambda(k)}$$

Où l'on somme la contribution des j premières couches de voisins atomiques (une couche est constituée d'atomes de même nature, situés à la même distance de l'atome central), avec N_j le nombre d'atomes sur la couche, R_j la distance de la couche à l'atome central, $f_j(k)$ un facteur d'amplitude possédant un facteur de Debye-Waller σ_j (qui reflète le désordre statistique et les vibrations atomiques liées à la température), $\delta_j(k)$ le déphasage du photoélectron et $e^{-2R_j/\lambda(k)}$ le facteur d'amortissement qui rend compte des pertes liées à la diffusion inélastique, λ étant le libre parcours moyen du photoélectron.

Plusieurs remarques découlent de cette équation :

- Le facteur d'amortissement et le facteur R_j^2 au dénominateur entraînent une atténuation rapide du signal EXAFS, qui ne permet pas de sonder l'environnement

chimique au-delà de 5 Å de l'atome central. C'est donc l'environnement local des atomes qui est caractérisé.

- Le signal EXAFS est la somme de signaux de fréquence différente, chaque fréquence correspondant au rayon d'une couche de coordination. Il est donc intéressant de considérer la transformée de Fourier de l'EXAFS, sur laquelle apparaît la distribution radiale (à un facteur de phase près) des différentes contributions des atomes environnant l'atome central
- La connaissance des facteurs d'amplitude $f_j(k)$ et des déphasages $\delta_j(k)$ permet de déterminer le nombre N_j de voisins et leur distance R_j à l'atome central. Le facteur $f_j(k)$ étant sensible au numéro atomique Z des atomes voisins, sa détermination peut également permettre de les identifier.

Pour obtenir l'ensemble de ces informations à partir d'un spectre EXAFS mesuré, il faut construire un modèle structural de l'environnement chimique possible de l'atome central, calculer le spectre de ce modèle (en particulier les facteurs d'amplitude $f_j(k)$ et les déphasages $\delta_j(k)$) et ajuster les paramètres du modèle (N_j , R_j , etc.) au spectre mesuré.

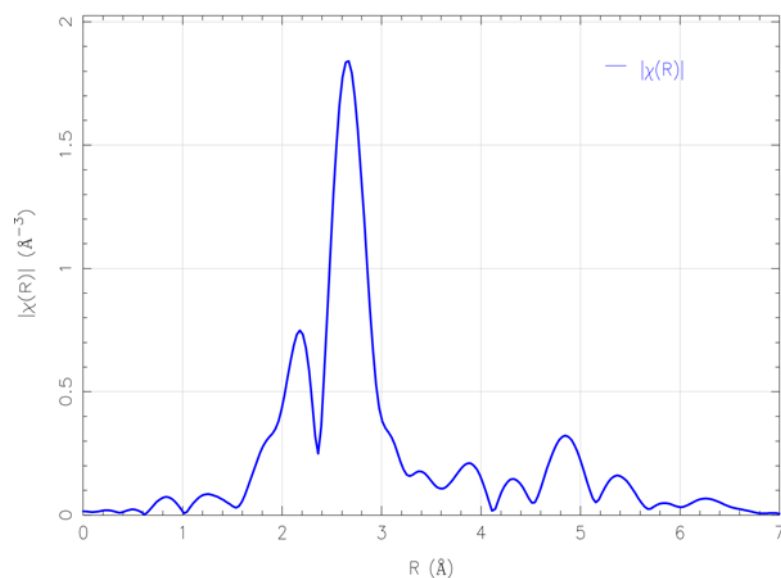


Figure 56 : Module de la transformée de Fourier de l'EXAFS pondéré par k^2 d'une feuille d'argent (cf. spectres précédents)

Annexe 15 Calcul du nombre de coordination moyen d'une nanoparticule

Les nanoparticules sont conventionnellement définies comme étant des objets de taille inférieure à 100 nm. Les nanoparticules, du fait de leur petite taille, ont un rapport surface/volume important. Ce rapport augmente lorsque la taille de la particule diminue et influe sur le nombre de coordination moyen des atomes de la nanoparticule. En effet, contrairement aux atomes situés au cœur de la particule, les atomes situés en surface n'ont pas tous leurs voisins. La taille d'une nanoparticule et sa coordination moyenne sont donc liées et peuvent être déduites l'une de l'autre si l'on connaît les propriétés structurales de la particule.

Deux modèles permettant de relier la taille des nanoparticules à leur coordination moyenne sont rapportés dans la littérature :

- Le premier, particulièrement adapté aux particules de petite taille (contenant de 10 à 1000 atomes, soit environ x à x nm), permet de calculer de façon exacte la coordination de chacun des atomes de la particule
- Le second, davantage adapté aux particules de taille plus grande, approxime la coordination moyenne de la particule

Nous présentons ici ces deux modèles et les formules qui en découlent. On considère dans la suite des nanoparticules sphériques d'argent organisées en maille cubique à faces centrées (CFC).

I. Petites particules : calcul exact de la coordination des atomes d'un polyèdre

Dans ce modèle, notamment présenté par Montejano-Carrizales *et al.* (1997), les nanoparticules sont modélisées par des clusters polyédriques d'atomes construits par couches : on part d'un atome central qu'on entoure complètement d'une première couche d'atomes, puis d'une seconde, etc. Le nombre d'atomes sur chacune des couches dépend de la géométrie des polyèdres. Pour une géométrie donnée, le nombre d'atomes permettant de construire des clusters dont tous les couches sont complètes sont appelés *nombre magiques*.

Une particule sphérique à maille CFC est par exemple approximée par un cluster de structure cuboctaédrique (maille compacte, chaque atome à 12 voisins), pour lequel les nombres magiques sont 13, 55, 147, 309, 561, etc. (correspondant à des clusters constitués de 1 à 5 couches complètes autour de l'atome central, cf. Figure 57).

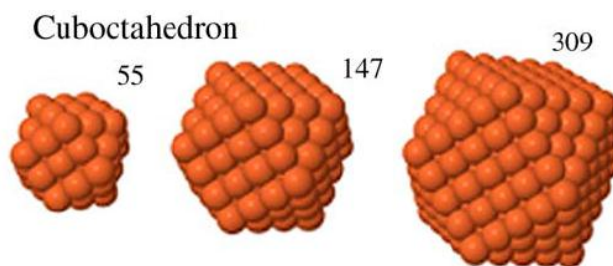


Figure 57: Représentation de clusters cuboctaédriques constitués de 55, 147 et 309 atomes, d'après Montezano-Carrizales *et al.*

Montejano-Carrizales *et al.* (1997) détaillent les propriétés structurales de ces clusters en fonction de leur nombre de couches : coordination des atomes en fonction de leur position (au cœur, sur une face carrée, une face triangulaire, une arête ou un sommet du polyèdre), nombre de chacun des types d'atomes dans les clusters, coordination moyenne du cluster, etc.

Nous avons utilisé ces formules pour évaluer la coordinance moyenne globale, la coordinance moyenne des atomes de surface et le pourcentage d'atomes en surface d'une nanoparticule d'argent en fonction de sa taille (Figure 58). Le diamètre des particules a été calculé à partir du nombre couches C par la formule :

$$diamètre = (2C + 1) \times 2,89\text{Å}$$

Avec $(2C+1)$ le nombre d'atomes sur une grande diagonale du cluster et 2,89 Å la

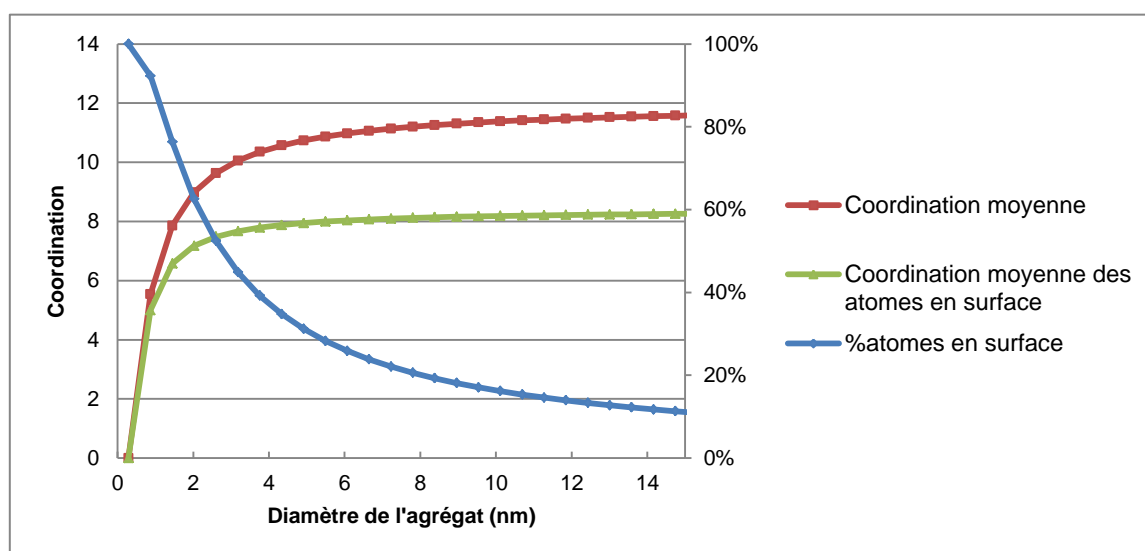


Figure 58 : Evolution des propriétés de coordination des clusters cuboctaédriques en fonction de leur diamètre (modèle Montejano-Carrizales *et al.* (1997))

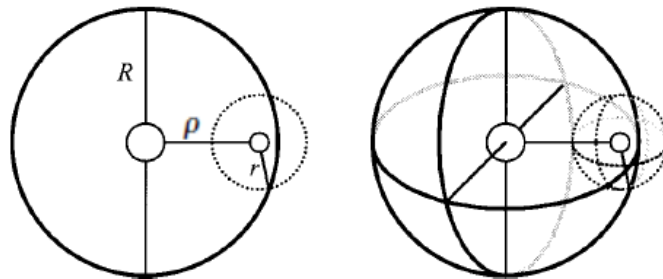
distance interatomique dans une maille d'argent CFC.

Le nombre de coordination moyen des particules augmente rapidement avec leur taille : des particules de diamètre 4 nm ont par exemple déjà un nombre de coordination supérieure à 10 (il est de 12 dans un cristal massif d'argent).

II. Particules de taille plus importante : calcul par approximation sphérique

Calvin *et al.* (2003) proposent une autre façon de calculer la coordination moyenne d'une nanoparticule. En supposant une particule sphérique de rayon R constituée d'atomes ayant pour distance interatomique r , les auteurs approximent le rapport entre le nombre de coordination d'un atome situé à une distance ρ du centre et le nombre de coordination d'un atome entouré de tous ses voisins par la fraction de la surface de la sphère de rayon r centrée sur cette atome qui est à l'intérieur de la particule (la sphère de rayon R) (Figure 59), donnée par la formule :

$$\frac{R^2 - (\rho - r)^2}{4\rho r}$$



Spherical homogeneous model. R is the radius of the crystallite, ρ is the distance from the center of the crystallite to the absorbing atom, and r is the distance from the absorbing atom to the scattering. By integrating the portion of the volume of the small sphere which is within the large sphere over all values of ρ less than R and normalizing by the volume of the large sphere, the magnitude of the termination effect can be approximated.

Figure 59 : Illustration du modèle proposé par Calvin *et al.* (2003)

L'intégration de ce rapport sur le volume de la particule (la sphère de rayon R) permet de calculer la coordination moyenne de la nanoparticule en fonction de son rayon :

$$Coordination_{nanoparticule} = 12 \left[1 - \frac{3r}{4R} + \frac{1}{16} \left(\frac{r}{R} \right)^3 \right]$$

La Figure 60 représente la coordination moyenne de nanoparticules sphériques d'argent CFC ($r = 2,89 \text{ \AA}$) calculée par cette formule et la compare à la coordination obtenue par calcul exact précédemment présentée.

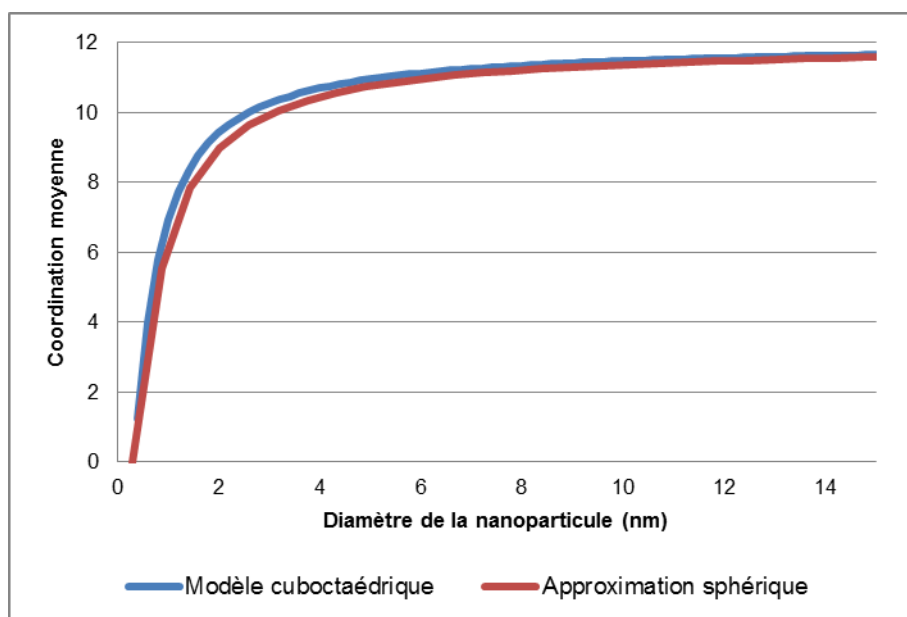


Figure 60 : Coordination moyenne d'une nanoparticule d'argent en fonction de sa taille calculée par l'approximation sphérique et comparaison avec le calcul effectué sur un cuboctaèdre

Les coordinations moyennes calculées par les deux modèles sont assez comparables, bien que l'approximation sphérique surestime un peu la coordination moyenne des nanoparticules de diamètre inférieur à 4 nm.

Bibliographie

- Adam, C., and Garnier-Laplace, J. (2003). Bioaccumulation of silver-110 m, cobalt-60, cesium-137, and manganese-54 by the freshwater algae *Scenedesmus obliquus* and *Cyclotella meneghiniana* and by suspended matter collected during a summer bloom event. *Limnol. Oceanogr.* *48*, 2303–2313.
- Ahmed, M.B., and Twyman, E.S. (1953). The Relative Toxicity of Manganese and Cobalt to the Tomato Plant. *J. Exp. Bot.* *4*, 164–172.
- Ahmed, S., and Evans, H.J. (1959). Effect of cobalt on the growth of soybeans in the absence of supplied nitrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *1*, 271–275.
- AIEA (2002). Application of ion exchange processes for the treatment of radioactive waste and management of spent ion exchangers. (Vienna: International Atomic Energy Agency).
- AIEA (2003). Combined methods for liquid radioactive waste treatment final report of a coordinated research project 1997-2001. (Vienna: International Atomic Energy Agency).
- Allen, H.E., Hall, R.H., and Brisbin, T.D. (1980). Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.* *14*, 441–443.
- Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* *53*, 1331–1341.
- Ambe, S. (1990). Mössbauer study of cobalt and iron in the cyanobacterium (blue green alga). *Hyperfine Interact.* *58*, 2329–2335.
- Appenroth, K.-J. (2010). Definition of “Heavy Metals” and Their Role in Biological Systems. In *Soil Heavy Metals*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 19–29.
- Arnaout, C.L. (2012). Assessing the Impacts of Silver Nanoparticles on the Growth, Diversity, and Function of Wastewater Bacteria. Duke University.
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol.* *141*, 391–396.
- Asthana, R.K., Singh, A.L., and Singh, S.P. (1993). Comparison of Ni-sensitive and Ni-resistant strains of *Nostoc muscorum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *9*, 323–327.
- Audi, G., Bersillon, O., Blachot, J., and Wapstra, A.H. (1997). The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nucl. Phys. A* *624*, 1–124.
- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., and Moreno-Sánchez, R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* *180*, 1–10.
- Bačkor, M., Fahselt, D., and Wu, C.T. (2004). Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Plant Sci.* *167*, 151–157.
- Baker, N.R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev.*

Plant Biol. 59, 89–113.

Baker, A.J.M., Reeves, R.D., and Hajar, A.S.M. (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol.* 127, 61–68.

Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C., and Amiard-Triquet, C. (1991). Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biol. Cell* 72, 103–112.

Barceloux, D.G. (1999). Cobalt. *Clin. Toxicol.* 37, 201–216.

Barriada, J.L., Tappin, A.D., Evans, E.H., and Achterberg, E.P. (2007). Dissolved silver measurements in seawater. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 809–817.

Barwal, I., Ranjan, P., Kateriya, S., and Yadav, S.C. (2011). Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* 9, 1–12.

Baumann, H.A., Morrison, L., and Stengel, D.B. (2009). Metal accumulation and toxicity measured by PAM—Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1063–1075.

Beattie, I.R., and Haverkamp, R.G. (2011). Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal. *Metallomics* 3, 628.

Becker, B. (2007). Function and Evolution of the Vacuolar Compartment in Green Algae and Land Plants (Viridiplantae). In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 1–24.

Benn, T.M., and Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4133–4139.

Berkelman, T., and Lagarias, J.C. (1990). Calcium Transport in the Green Alga *Mesotaenium caldariorum* Preliminary Characterization and Subcellular Distribution. *Plant Physiol.* 93, 748–757.

Berry, W.L., and Wallace, A. (1981). Toxicity: The concept and relationship to the dose response curve. *J. Plant Nutr.* 3, 13–19.

Bhattacharya, D., and Medlin, and L. (1998). Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiol.* 116, 9–15.

Blaby-Haas, C.E., and Merchant, S.S. (2012). The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 1531–1552.

Bovenkamp, G.L., Zanzen, U., Krishna, K.S., Hormes, J., and Prange, A. (2013). X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy Study of the Interaction of Silver Ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6385–6390.

- Bresson, C., Esnouf, S., Lamouroux, C., Solari, P.L., and Den Auwer, C. (2006). XAS Investigation of biorelevant cobalt complexes in aqueous media. *New J. Chem.* *30*, 416.
- Bresson, C., Ansoborlo, E., Malard, V., Eyrolle, F., and Fievet, B. (2009a). Chapitre 29 : Le cobalt.
- Bresson, C., Ansoborlo, E., Malard, V., Eyrolle, F., and Fievet, B. (2009b). Cobalt. In *Toxicologie Nucléaire, Environnementale et Humaine*, (Paris, France: Lavoisier Ed.), pp. 553–573.
- Briat, J.-F., and Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie* *322*, 43–54.
- Brooks, R.R. (1977). Copper and cobalt uptake by *Haumaniastrum* species. *Plant Soil* *48*, 541–544.
- Butler, W.L., and Kitajima, M. (1975). Fluorescence quenching in Photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *376*, 116–125.
- Calmet, D., Charmasson, S., Gontier, G., Meinesz, A., and Boudouresque, C.F. (1991). Chernobyl radionuclides in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*, 1986–1987. *J. Environ. Radioact.* *13*, 157–173.
- Calvin, S., Miller, M.M., Goswami, R., Cheng, S.-F., Mulvaney, S.P., Whitman, L.J., and Harris, V.G. (2003). Determination of crystallite size in a magnetic nanocomposite using extended x-ray absorption fine structure. *J. Appl. Phys.* *94*, 778–783.
- Cardol, P., Bailleul, B., Rappaport, F., Derelle, E., Béal, D., Breyton, C., Bailey, S., Wollman, F.A., Grossman, A., Moreau, H., et al. (2008). An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 7881–7886.
- Carter, K.P., Young, A.M., and Palmer, A.E. (2014). Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chem. Rev.* *114*, 4564–4601.
- CDI (2013). Cobalt Facts - Supply and Demand (Cobalt Development Institute).
- Charley, R.C., and Bull, A.T. (1979). Bioaccumulation of silver by a multispecies community of bacteria. *Arch. Microbiol.* *123*, 239–244.
- Chen, B., Huang, Q., Lin, X., Shi, Q., and Wu, S. (1998). Accumulation of Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni and Pb in *Pavlova viridis* Tseng (Haptophyceae). *J. Appl. Phycol.* *10*, 371–376.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y.S., and Salley, S.O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* *102*, 1649–1655.
- Chen, Z., Porcher, C., Campbell, P.G.C., and Fortin, C. (2013). Influence of Humic Acid on Algal Uptake and Toxicity of Ionic Silver. *Environ. Sci. Technol.* 130724121438003.
- Cherian, M.G., and Kang, Y.J. (2006). Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp. Biol.*

Med. Maywood NJ 231, 138–144.

Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475–486.

Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.

Cobbett, C., and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.

Collins, R.N., and Kinsela, A.S. (2010). The aqueous phase speciation and chemistry of cobalt in terrestrial environments. *Chemosphere* 79, 763–771.

Collins, R.N., Bakkaus, E., Carrière, M., Khodja, H., Proux, O., Morel, J.L., and Gouget, B. (2010). Uptake, localization, and speciation of cobalt in *Triticum aestivum* L.(Wheat) and *Lycopersicon esculentum* M.(Tomato). *Environ. Sci. Technol.* 44, 2904–2910.

Cowan, C.E., Jenne, E.A., and Crecelius, E.A. (1985). Silver speciation in seawater: The importance of sulfide and organic complexation. *Mar. Estuar. Geochem.* 285–304.

Crist, R.H., Oberholser, K., Schwartz, D., Marzoff, J., Ryder, D., and Crist, D.R. (1988). Interactions of metals and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.* 22, 755–760.

Croft, M.T., Warren, M.J., and Smith, A.G. (2006). Algae Need Their Vitamins. *Eukaryot. Cell* 5, 1175–1183.

Dameron, C.T., Reese, R.N., Mehra, R.K., Kortan, A.R., Carroll, P.J., Steigerwald, M.L., Brus, L.E., and Winge, D.R. (1989). Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338, 596–597.

Donner, E., Punshon, T., Guerinot, M.L., and Lombi, E. (2012). Functional characterisation of metal(loid) processes in planta through the integration of synchrotron techniques and plant molecular biology. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 3287–3298.

Drake, P.L. (2005). Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Ann. Occup. Hyg.* 49, 575–585.

Dray, S., Dufour, A.B., and Chessel, D. (2007). The ade4 package II: Two-table and K-table methods. *R News* 7, 47–52.

Dubiel, M., Yang, X.C., and Brunsch, S. (2005). Investigation of Stress State of Silver Nanoparticles in Silicate Glasses by Means of EXAFS. *Phys. Scr.* 729.

Duffus, J.H. (2002). “Heavy metals” a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807.

Dyrssen, D. (1988). Sulfide complexation in surface seawater. *Mar. Chem.* 24, 143–153.

Eccles, H. (1999). Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Trends Biotechnol.* 17, 462–465.

EDF (2014). Centrales nucléaires et environnement - Prélèvements d'eau et rejets (EDP Sciences).

Efremenkov, V.M. (1989). Radioactive waste management at nuclear power plants (IAEA Bulletin).

Eisler, R. (1996). Silver Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. (DTIC Document).

El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H., Osman, M.E.H., and El-Mazaly, E. (2003). Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Braz. J. Plant Physiol.* *15*, 159–166.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* *1*, 529–539.

De Filippis, L.F. (1978). The Effect of Sub-Lethal Concentrations of Mercury and Zinc on *Chlorella IV*. Characteristics of a General Reducing Enzyme System for Metallic Ions. *Z. Für Pflanzenphysiol.* *86*, 339–352.

Florence, D., and Hartmann, P. (2003). Les rejets radioactifs et chimiques des centrales nucléaires d'EDF (EDF/CAPE Saint-Denis).

Florence, D., and Hartmann, P. Les rejets radioactifs et chimiques des centrales nucléaires d'EDF, EDF/CAPE St-Denis.

Fortin, C., and Campbell, P.G. (2001). Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.* *35*, 2214–2218.

Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2000). Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* *19*, 2769–2778.

Foster, P.L. (1977). Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature* *269*, 322–323.

Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y., and Webb, M. (1987). Nomenclature of metallothionein. *Experientia. Suppl.* *52*, 19–22.

Foyer, C.H., and Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* *119*, 355–364.

Foyer, C.H., Lelandais, M., and Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* *92*, 696–717.

Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J., and Salt, D.E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in thlaspi nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* *16*, 2176–2191.

- Frueh, A.J. (1958). The Crystallography of Silver Sulfide, Ag₂S. *Z. Für Krist. - Cryst. Mater.* *110*, 136–144.
- Fukuda, T., Kino, Y., Abe, Y., Yamashiro, H., Kuwahara, Y., Nihei, H., Sano, Y., Irisawa, A., Shimura, T., Fukumoto, M., et al. (2013). Distribution of Artificial Radionuclides in Abandoned Cattle in the Evacuation Zone of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *PLoS ONE* *8*, e54312.
- Gadd, G.M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *84*, 13–28.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* *156*, 609–643.
- Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Parsons, J.G., Gamez, G., Herrera, I., and Jose-Yacamán, M. (2002). XAS investigations into the mechanism (s) of Au (III) binding and reduction by alfalfa biomass. *Microchem. J.* *71*, 193–204.
- Gardea-Torresdey, J.L., Gomez, E., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Troiani, H., and Jose-Yacamán, M. (2003). Alfalfa Sprouts: A Natural Source for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Langmuir* *19*, 1357–1361.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., de la Rosa, G., and Parsons, J.G. (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coord. Chem. Rev.* *249*, 1797–1810.
- Garnham, G.W., Codd, G.A., and Gadd, G.M. (1991). Effect of salinity and pH on cobalt biosorption by the estuarine microalga *Chlorella salina*. *Biol. Met.* *4*, 151–157.
- Garnham, G.W., Codd, G.A., and Gadd, G.M. (1992). Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *37*, 270–276.
- Gaur, J.P., and Rai, L.C. (2001). Heavy Metal Tolerance in Algae. In *Algal Adaptation to Environmental Stresses*, P.D.L.C. Rai, and P.D.J.P. Gaur, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 363–388.
- 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.
- Gilbin, R., Ansoborlo, E., Martin-Garin, A., Frelon, S., Moulin, C., and Floriani, M. (2009). Éléments du cycle biogéochimique spéciation et biodisponibilité élémentaire – approche théorique et analytique. In *Toxicologie Nucléaire, Environnementale et Humaine*, (Paris, France: Lavoisier Ed.), pp. 7–24.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* *48*, 909–930.
- Gillespie, I.M.M., and Philp, J.C. (2013). Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends Biotechnol.* *31*, 329–332.

- Godbold, D.L., Horst, W.J., Collins, J.C., Thurman, D.A., and Marschner, H. (1984). Accumulation of zinc and Organic Acids in Roots of Zinc Tolerant and Non-tolerant Ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *J. Plant Physiol.* *116*, 59–69.
- Gopal, R., Dube, B.K., Sinha, P., and Chatterjee, C. (2003). Cobalt Toxicity Effects on Growth and Metabolism of Tomato. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* *34*, 619–628.
- De Gouvion Saint Cyr, D. (2014). Décontamination de radionucléides dans des effluents liquides par une micro-algue : étude de faisabilité à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote. UM2.
- Graham, L.E. (1996). Green algae to land plants: An evolutionary transition. *J. Plant Res.* *109*, 241–251.
- Grennan, A.K. (2011). Metallothioneins, a Diverse Protein Family. *Plant Physiol.* *155*, 1750–1751.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* *230*, 674–676.
- Gromova, M., and Roby, C. (2010). Toward *Arabidopsis thaliana* hydrophilic metabolome: assessment of extraction methods and quantitative ¹H NMR. *Physiol. Plant.* *140*, 111–127.
- Groot, F. de, Vankó, G., and Glatzel, P. (2009). The 1s x-ray absorption pre-edge structures in transition metal oxides. *J. Phys. Condens. Matter* *21*, 104207.
- Le Guen, B., and Ansoborlo, E. (2004). Le cobalt et ses isotopes.
- Gui, Z., Green, A.R., Kasrai, M., Bancroft, G.M., and Stillman, M.J. (1996). Sulfur K-Edge EXAFS Studies of Cadmium-, Zinc-, Copper-, and Silver-Rabbit Liver Metallothioneins. *Inorg. Chem.* *35*, 6520–6529.
- Gustavs, L., Eggert, A., Michalik, D., and Karsten, U. (2010). Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matrix stress. *Protoplasma* *243*, 3–14.
- Gustavs, L., Görs, M., and Karsten, U. (2011). Polyol Patterns in Biofilm-Forming Aeroterrestrial Green Algae (trebouxiophyceae, Chlorophyta)1. *J. Phycol.* *47*, 533–537.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* *53*, 1–11.
- Hall, A., Fielding, A.H., and Butler, M. (1979). Mechanisms of copper tolerance in the marine fouling alga *Ectocarpus siliculosus* — Evidence for an exclusion mechanism. *Mar. Biol.* *54*, 195–199.
- Halliwell, B. (1990). How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radic. Res.* *9*, 1–32.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* *141*, 312–322.

- Hanikenne, M., Krämer, U., Demoulin, V., and Baurain, D. (2005). A Comparative Inventory of Metal Transporters in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the Red Alga *Cyanidioschizon merolae*. *Plant Physiol.* *137*, 428–446.
- Hänsch, R., and Mendel, R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* *12*, 259–266.
- Harrington, C.F., Roberts, D.J., and Nickless, G. (1996). The effect of cadmium, zinc and copper on the growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid in two strains of the grass, *Festuca rubra*. *Can J Biol* *74*, 1742–1752.
- Hasnain, S.S., Diakun, G.P., Abrahams, I., Ross, I., Garner, C.D., Bremner, I., and Vasak, M. (1987). EXAFS studies of metallothionein. *Experientia. Suppl.* *52*, 227–236.
- Hazemann, J.-L., Proux, O., Nassif, V., Palanchar, H., Lahera, E., Da Silva, C., Brailard, A., Testemale, D., Diot, M.-A., Alliot, I., et al. (2009). High-resolution spectroscopy on an X-ray absorption beamline. *J. Synchrotron Radiat.* *16*, 283–292.
- Heuillet, E., Noreau, A., Halpern, S., Jeanne, N., and Puiseux-Dao, S. (1986). Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. *Biol. Cell* *58*, 79–85.
- Hewitt, E.J., and Bond, G. (1966). The Cobalt Requirement of Non-legume Root Nodule Plants. *J. Exp. Bot.* *17*, 480–491.
- Hiriart-Baer, V., Fortin, C., Lee, D., and Campbell, P. (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.
- Hogstrand, C., and Wood, C.M. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: Implications for water quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* *17*, 547–561.
- Holm-Hansen, O., Gerloff, G.C., and Skoog, F. (1954). Cobalt as an Essential Element for Blue-Green Algae. *Physiol. Plant.* *7*, 665–675.
- Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale (De Boeck Supérieur)*.
- Hörscik, Z.T., and Balogh, Á. (2002). Intracellular distribution of chromium and toxicity on growth in *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biol. Szeged.* *46*, 57–58.
- Howe, G., and Merchant, S. (1992). Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* *98*, 127–136.
- Igamberdiev, A.U., Bykova, N.V., and Kleczkowski, L.A. (1999). Origins and metabolism of formate in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* *37*, 503–513.
- Jauberty, L., Gloaguen, V., Astier, C., Krausz, P., Delpech, V., Berland, A., Granger, V., Niort, I., Royer, A., and Decossas, J.-L. (2011). Bark, a suitable biosorbent for the removal of uranium from wastewater – From laboratory to industry. *Radioprotection* *46*, 443–456.

Johnson, I. (2010). *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition (Life Technologies Corporation).

Johnson, G.V., Mayeux, P.A., and Evans, H.J. (1966). A Cobalt Requirement for Symbiotic Growth of *Azolla filiculoides* in the Absence of Combined Nitrogen. *Plant Physiol.* *41*, 852–855.

Jones, A.M., Garg, S., He, D., Pham, A.N., and Waite, T.D. (2011). Superoxide-Mediated Formation and Charging of Silver Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* *45*, 1428–1434.

Jones, G.D., Forsyth, P.D., and Appleby, P.G. (1986). Observation of 110m Ag in Chernobyl fallout. *Nature* *322*, 313.

Jonnalagadda, S.B., and Rao, P.V. (1993). Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol. C* *106*, 585–595.

Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace elements in soils and plants* (Boca Raton: CRC Press).

Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagedorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., and Burkhardt, M. (2010). Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ. Pollut. Barking Essex* *1987* *158*, 2900–2905.

Kähkönen, M.P., and Heinonen, M. (2003). Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 628–633.

Kalimuthu, K., Suresh Babu, R., Venkataraman, D., Bilal, M., and Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *65*, 150–153.

Kehrer, J.P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* *149*, 43–50.

Kelly, S.D., Hesterberg, D., Ravel, B., Ulery, A.L., and Drees, L.R. (2008). Analysis of soils and minerals using X-ray absorption spectroscopy. *Methods Soil Anal. Part 5*, 387–463.

Kittel, C. (2004). *Introduction to Solid State Physics* (Wiley).

Klaassen, C.D., Liu, J., and Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *39*, 267–294.

Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., and Lead, J.R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* *27*, 1825–1851.

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.

Knauer, K., Behra, R., and Sigg, L. (1997). Adsorption and Uptake of Copper by the Green Alga *Scenedesmus Subspicatus* (chlorophyta)1. *J. Phycol.* *33*, 596–601.

- Kobayashi, M., and Shimizu, S. (1999). Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* *261*, 1–9.
- 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.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., and Smith, J.A.C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* *379*, 635–638.
- Kropat, J., Hong-Hermesdorf, A., Casero, D., Ent, P., Castruita, M., Pellegrini, M., Merchant, S.S., and Malasarn, D. (2011). A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*: A revised mineral nutrient supplement for *Chlamydomonas*. *Plant J.* *66*, 770–780.
- Krzyszowska, M. (2010). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol. Plant.* *33*, 35–51.
- Kuyucak, N., and Volesky, B. (1989). The mechanism of cobalt biosorption. *Biotechnol. Bioeng.* *33*, 823–831.
- Lansdown, A. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use.
- Leclerc, S., and Wilkinson, K.J. (2014). Bioaccumulation of Nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticle or the Free Ion? *Environ. Sci. Technol.* *48*, 358–364.
- Lee, D.-Y., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2004). Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* *23*, 1012–1018.
- Lee, D.-Y., Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2005). Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* *75*, 127–135.
- Van der Lee, J. (1993). CHESS, another speciation and surface complexation computer code. CIG-Ecole Mines Paris.
- 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.
- Leung, B.O., Jalilehvand, F., Mah, V., Parvez, M., and Wu, Q. (2013). Silver(I) Complex Formation with Cysteine, Penicillamine, and Glutathione. *Inorg. Chem.* *52*, 4593–4602.
- Li, M., Zhu, Q., Hu, C., Chen, L., Liu, Z., and Kong, Z. (2007). Cobalt and manganese stress in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): Effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *J. Environ. Sci.* *19*, 1330–1335.
- Liu, J., Reid, R.J., and Smith, F.A. (1998). Mechanisms of cobalt uptake in plants: ^{60}Co

- uptake and distribution in Chara. *Physiol. Plant.* *104*, 351–356.
- Liu, J., Reid, R.J., and Smith, F.A. (2000). The mechanism of cobalt toxicity in mung beans. *Physiol. Plant.* *110*, 104–110.
- 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. (2011). In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ. Exp. Bot.* *72*, 3–17.
- Lukman, A.I., Gong, B., Marjo, C.E., Roessner, U., and Harris, A.T. (2011). Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *J. Colloid Interface Sci.* *353*, 433–444.
- Lustigman, B., Lee, L.H., and Weiss-Magasic, C. (1995). Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *55*, 65–72.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Matsumoto, H., and Hiradate, S. (1997). Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* *390*, 569–570.
- 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.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., and Yamada, T. (1996). The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* *110*, 1145–1150.
- Margoshes, M., and Vallee, B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 4813–4814.
- Martens, J.H., Barg, H., Warren, M.J., and Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *58*, 275–285.
- Mathys, W. (1977). The Role of Malate, Oxalate, and Mustard Oil Glucosides in the Evolution of Zinc-Resistance in Herbage Plants. *Physiol. Plant.* *40*, 130–136.
- Matz, W., Schell, N., Bernhard, G., Prokert, F., Reich, T., Claußner, J., Oehme, W., Schlenk, R., Dienel, S., Funke, H., et al. (1999). ROBL – a CRG beamline for radiochemistry and materials research at the ESRF. *J. Synchrotron Radiat.* *6*, 1076–1085.
- Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* *51*, 659–668.
- Mayer, M., Nyitrai, P., and Keresztes, Á. (2005). Effect of low-concentration stressors on the senescence of detached barley leaves. *Acta Biol. Szeged.* *49*, 105–106.
- McKnight, D.M., and Morel, F.M. (1979). Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnol Ocean.* *24*, 823–837.

- Meharg, A.A. (2005). Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. In *Root Physiology: From Gene to Function*, H. Lambers, and T.D. Colmer, eds. (Springer Netherlands), pp. 163–174.
- Mehra, R.K., Tran, K., Scott, G.W., Mulchandani, P., and Saini, S.S. (1996). Ag(I)-binding to phytochelatins. *J. Inorg. Biochem.* *61*, 125–142.
- Ménager, M.-T., Garnier-Laplace, J., Goyffon, M., and Collectif (2009). *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine* (Tec & Doc Lavoisier).
- Mendes, L.F., Zambotti-Villela, L., Colepicolo, P., Marinho-Soriano, E., Stevani, C.V., and Yokoya, N.S. (2013). Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. *J. Appl. Phycol.* *25*, 1939–1947.
- Mendoza-Cózatl, D.G., and Moreno-Sánchez, R. (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* *1706*, 88–97.
- Metaxatos, A., Panagiotopoulos, C., and Ignatiades, L. (2003). Monosaccharide and amino acid composition of mucilage material produced from a mixture of four phytoplanktonic taxa. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *294*, 203–217.
- Miao, A.-J., Luo, Z., Chen, C.-S., Chin, W.-C., Santschi, P.H., and Quigg, A. (2010). Intracellular Uptake: A Possible Mechanism for Silver Engineered Nanoparticle Toxicity to a Freshwater Alga *Ochromonas danica*. *PLoS ONE* *5*, e15196.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* *7*, 405–410.
- Mohanty, N., Vass, I., and Demeter, S. (1989). Impairment of photosystem 2 activity at the level of secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions. *Physiol. Plant.* *76*, 386–390.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., and Hansson, A. (2007). Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *58*, 459–481.
- Montano, P.A., Zhao, J., Ramanathan, M., Shenoy, G.K., and Schulze, W. (1989). Structure of Ag, Fe and Ge microclusters. *Z. Für Phys. At. Mol. Clust.* *12*, 103–105.
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., and Malcata, F.X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.* *28*, 299–311.
- Montejano-Carrizales, J.M., Aguilera-Granja, F., and Morán-López, J.L. (1997). Direct Enumeration of the Geometrical Characteristics of Clusters. *Nanostructured Mater.* *8*, 269–287.
- Morgan, J.F., and Parker, R.C. (1952). Interrelationships between cobalt and amino acids in tissue culture. *Arch. Biochem. Biophys.* *38*, 267–274.
- Morris, C., Nicolaus, B., Sampson, V., Harwood, J., and Kille, P. (1999). Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus*

vesiculosus. *Biochem J* 338, 553–560.

Moulis, J.-M. (2010). Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *BioMetals* 23, 877–896.

Mourato, M., Reis, R., and Martins, M.L.L. (2012). Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity.

Mullins, G.L., Sommers, L.E., and Housley, T.L. (1986). Metal speciation in xylem and phloem exudates. *Plant Soil* 96, 377–391.

Mutterer, J., and Rasband, W.S. (2009). Droplet: Drag and Drop file processor.

Nagel, K., Adelmeier, U., and Voigt, J. (1996). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 149, 86–90.

Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., and Behra, R. (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Env. Sci Technol* 42, 8959–8964.

Nieboer, E., and Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B Chem. Phys.* 1, 3–26.

Nilanjana, D., Vimala, R., and Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals-An overview. *Indian J. Biotechnol.* 7, 159–169.

Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.

Nowack, B., Krug, H.F., and Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1177–1183.

Ogawa, S., Yoshidomi, T., and Yoshimura, E. (2011). Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1. *J. Inorg. Biochem.* 105, 111–117.

Oku, N., Kendall, D.A., and MacDonald, R.C. (1982). A simple procedure for the determination of the trapped volume of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 691, 332–340.

Olafson, R.W., McCubbin, W.D., and Kay, C.M. (1988). Primary- and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium. *Biochem. J.* 251, 691–699.

Ortega, R. (2005). Chemical elements distribution in cells. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 231, 218–223.

Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., and Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 80–85.

- Palit, S., Sharma, A., and Talukder, G. (1994). Effects of Cobalt on Plants. *Bot. Rev.* *60*, 149–181.
- Park, J.G., and Palmer, A.E. (2014). Quantitative measurement of Ca²⁺ and Zn²⁺ in mammalian cells using genetically encoded fluorescent biosensors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1071*, 29–47.
- Park, J., Song, W.-Y., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T.H., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E., and Lee, Y. (2012). The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury: ABC transporters for PC-dependent Cd and Hg tolerance. *Plant J.* *69*, 278–288.
- Parker, D.L., Schram, B.R., Plude, J.L., and Moore, R.E. (1996). Effect of Metal Cations on the Viscosity of a Pectin-Like Capsular Polysaccharide from the Cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 1208–1213.
- Parkhill, J.-P., Maillet, G., and Cullen, J.J. (2001). Fluorescence-Based Maximal Quantum Yield for PSII as a Diagnostic of Nutrient Stress. *J. Phycol.* *37*, 517–529.
- Peng, H., Yang, A., and Xiong, J. (2013). Green, microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium. *Carbohydr. Polym.* *91*, 348–355.
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., and Cañizares-Villanueva, R.O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* *64*, 1–10.
- Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S.P., Matias, W.G., and Popovic, R. (2012). Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* *87*, 1388–1394.
- De Philippis, R., and Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* *22*, 151–175.
- Piccapietra, F., Allué, C.G., Sigg, L., and Behra, R. (2012). Intracellular Silver Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon Exposure to Carbonate Coated Silver Nanoparticles and Silver Nitrate. *Environ. Sci. Technol.* *46*, 7390–7397.
- Pillai, S., Behra, R., Nestler, H., Suter, M.J.-F., Sigg, L., and Schirmer, K. (2014). Linking toxicity and adaptive responses across the transcriptome, proteome, and phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to silver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 3490–3495.
- Plekhanov, S.E., and Chemeris, Y.K. (2003). Early Toxic Effects of Zinc, Cobalt, and Cadmium on Photosynthetic Activity of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* *30*, 506–511.
- Proux, O., Biquard, X., Lahera, E., Menthonnex, J.-J., Prat, A., Ulrich, O., Soldo, Y., Trévisson, P., Kapoujyan, G., Perroux, G., et al. (2005). FAME: a new beamline for x-ray absorption investigations of very-diluted systems of environmental, material and biological interests. *Phys. Scr.* *2005*, 970.

Proux, O., Nassif, V., Prat, A., Ulrich, O., Lahera, E., Biquard, X., Menthonnex, J.J., and Hazemann, J.L. (2006). Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. *J. Synchrotron Radiat.* *13*, 59–68.

Purcell, T.W., and Peters, J.J. (1998). Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* *17*, 539–546.

Rachlin, J.W., and Grosso, A. (1993). The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *24*, 16–20.

Rai, L.C., and Raizada, M. (1985). Effect of nickel and silver ions on survival, growth, carbon fixation and nitrogenase activity in *Nostoc muscorum*: Regulation of toxicity by EDTA and calcium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *31*, 329–337.

Rai, L.C., Gaur, J.P., and Kumar, H.D. (1981). Phycology and Heavy-Metal Pollution. *Biol. Rev.* *56*, 99–151.

Rai, L.C., Mallick, N., Singh, J.B., and Kumar, H.D. (1991). Physiological and Biochemical Characteristics of a Copper Tolerant and a Wild Type Strain of *Anabaena doliolum* Under Copper Stress. *J. Plant Physiol.* *138*, 68–74.

Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* *27*, 76–83.

RAIS (2014). Silver (007440-22-4).

Rascio, N., and Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* *180*, 169–181.

Ratte, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* *18*, 89–108.

Rausser, W.E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys.* *31*, 19–48.

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

Reeder, R.J., Schoonen, M.A.A., and Lanzirrotti, A. (2006). Metal Speciation and Its Role in Bioaccessibility and Bioavailability. *Rev. Mineral. Geochem.* *64*, 59–113.

Reese, R.N., White, C.A., and Winge, D.R. (1992). Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(gEC)nG Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol.* *98*, 225–229.

Rehr, J.J., and Albers, R.C. (2000). Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure. *Rev. Mod. Phys.* *72*, 621–654.

Reinfelder, J.R., and Chang, S.I. (1999). Speciation and Microalgal Bioavailability of Inorganic Silver. *Environ. Sci. Technol.* *33*, 1860–1863.

- Reyes-Prieto, A., Weber, A.P.M., and Bhattacharya, D. (2007). The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. *Annu. Rev. Genet.* *41*, 147–168.
- Rijstenbil, J.W., Haritonidis, S., Malea, P., Seferlis, M., and Wijnholds, J.A. (1998). Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (Greece, N Aegean Sea). *Hydrobiologia* *385*, 171–181.
- Rivasseau, C., Farhi, E., Atteia, A., and Couté, A. (2011). Une nouvelle micro-algue radiorésistante, Brevet FR 10/00578 du 12/02/2011.
- Rivasseau, C., Farhi, E., Atteia, A., Couté, A., Gromova, M., de Gouvion Saint Cyr, D., Boisson, A.-M., Féret, A.-S., Compagnon, E., and Bligny, R. (2013). An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry. *Energy Environ. Sci.* *6*, 1230.
- Robinson, N.J. (1989). Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *J. Appl. Phycol.* *1*, 5–18.
- Rosko, J.J., and Rachlin, J.W. (1975). The Effect of Copper, Zinc, Cobalt and Manganese on the Growth of the Marine Diatom *Nitzschia closterium*. *Bull. Torrey Bot. Club* *102*, 100.
- Salt, D.E., Prince, R.C., and Pickering, I.J. (2002). Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy. *Microchem. J.* *71*, 255–259.
- Sanchez-Mendieta, V., and Vilchis-Nestor, A.R. (2012). Green Synthesis of Noble Metal (Au, Ag, Pt) Nanoparticles, Assisted by Plant-Extracts. *Noble Met. INTECH* 391–408.
- 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*, Donald L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 1–82.
- Schmitt, E., Rivasseau, C., and Farhi, E. (2010). Etude de l'accumulation de radionucléides par une nouvelle micro-algue (ILL, CEA, CPE Lyon ; Rapport ILL11SC01T).
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* *9*, 671–675.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G., and Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* *214*, 821–828.
- Scott, R., and Ericson, L.-E. (1955). Some Aspects of Cobalt Metabolism by *Rhodomenia palmata* with Particular Reference to Vitamin B12 Content. *J. Exp. Bot.* *6*, 348–361.
- Sharma, S.S., and Dietz, K.J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* *57*, 711–726.
- Sharma, R.M., Panigrahi, S., and Azeez, P.A. (1987). Effect of cobalt on the primary productivity of *Spirulina platensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *39*, 716–720.

Sharma, S.K., Goloubinoff, P., and Christen, P. (2008). Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 341–345.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213–219.

Sigma-Aldrich Phycology Media.

Silver, S., and Phung, L.T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 753–789.

Silverberg, B.A., Stokes, P.M., and Ferstenberg, L.B. (1976). Intranuclear complexes in a copper-tolerant green alga. *J. Cell Biol.* 69, 210–214.

Simkin, A.J., Kuntz, M., Moreau, H., and McCarthy, J. (2010). Carotenoid profiling and the expression of carotenoid biosynthetic genes in developing coffee grain. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 434–442.

Soldo, D., Hari, R., Sigg, L., and Behra, R. (2005). Tolerance of *Oocystis nephrocystioides* to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquat. Toxicol.* 71, 307–317.

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.

Solioz, M., and Odermatt, A. (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 9217–9221.

Song, W.-Y., Park, J., Mendoza-Cózatl, D.G., Suter-Grotemeyer, M., Shim, D., Hörtensteiner, S., Geisler, M., Weder, B., Rea, P.A., Rentsch, D., et al. (2010). Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201013964.

Stamford, N.P.J. (2001). Monosaccharides: Biosynthesis and Degradation. In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III*, P.D.B.O. Fraser-Reid, P.D.K. Tatsuta, and P.D.J. Thiem, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1215–1323.

Stanier, R.Y., and Bazine, G.C. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 225–274.

Stevenson, L.M., Dickson, H., Klanjscek, T., Keller, A.A., McCauley, E., and Nisbet, R.M. (2013). Environmental Feedbacks and Engineered Nanoparticles: Mitigation of Silver Nanoparticle Toxicity to *Chlamydomonas reinhardtii* by Algal-Produced Organic Compounds. *PLoS ONE* 8, e74456.

Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336.

Stokes, P.M., Hutchinson, T.C., and Krauter, K. (1973). Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Can. J. Bot.* 51, 2155–2168.

Struempfer, A.W. (1973). Adsorption characteristics of silver, lead, cadmium, zinc, and nickel on borosilicate glass, polyethylene, and polypropylene container surfaces. *Anal. Chem.* *45*, 2251–2254.

Sujak, A. (2005). Interaction between cadmium, zinc and silver-substituted plastocyanin and cytochrome b 6 f complex — heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus. *Acta Physiol. Plant.* *27*, 61–69.

Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., and Shin, K.-H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *104*, 51–71.

Szivák, I., Behra, R., and Sigg, L. (2009). Metal-Induced Reactive Oxygen Species Production in *Chlamydomonas Reinhardtii* (chlorophyceae)1. *J. Phycol.* *45*, 427–435.

Szpunar, J., Lobinski, R., and Prange, A. (2003). Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Appl. Spectrosc.* *57*, 102A – 112A.

Tan, Y.-F., O’Toole, N., Taylor, N.L., and Millar, A.H. (2010). Divalent Metal Ions in Plant Mitochondria and Their Role in Interactions with Proteins and Oxidative Stress-Induced Damage to Respiratory Function. *Plant Physiol.* *152*, 747–761.

Tease, B.E., and Walker, R.W. (1987). Comparative Composition of the Sheath of the Cyanobacterium *Gloeotheca* ATCC 27152 Cultured with and without Combined Nitrogen. *J. Gen. Microbiol.* *133*, 3331–3339.

Terhaar, C.J., Ewell, W.S., Dziuba, S.P., White, W.W., and Murphy, P.J. (1977). A laboratory model for evaluating the behavior of heavy metals in an aquatic environment. *Water Res.* *11*, 101–110.

Thomson Reuters GFMS (2013). World Silver Summary.

Tillberg, J.-E., and Rowley, J.R. (1989). Physiological and structural effects of phosphorus starvation on the unicellular green alga *Scenedesmus*. *Physiol. Plant.* *75*, 315–324.

Tripathy, B.C., and Mohanty, P. (1981). Stabilization by glutaraldehyde fixation of chloroplast membrane structure and function against heavy metal ion induced damage. *Plant Sci. Lett.* *22*, 253–261.

Turner, A., Brice, D., and Brown, M. (2012). Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* *21*, 148–154.

Tuteja, N., Singh, M.B., Misra, M.K., Bhalla, P.L., and Tuteja, R. (2001). Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *36*, 337–397.

Twiss, M.R., and Nalewajko, C. (1992). Influence of Phosphorus Nutrition on Copper Toxicity to Three Strains of *Scenedesmus Acutus* (chlorophyceae)1. *J. Phycol.* *28*, 291–298.

US EPA (1996). Silver (CASRN 7440-22-4) IRIS.

- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., and Rea, P.A. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* *275*, 31451–31459.
- Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants: Tansley review. *New Phytol.* *181*, 759–776.
- Vuković, Ž. (2002). Environmental impact of radioactive silver released from nuclear power plant. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* *254*, 637–639.
- Watanabe, F., Nakano, Y., Tamura, Y., and Yamanaka, H. (1991). Vitamin B12 metabolism in a photosynthesizing green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* *1075*, 36–41.
- West, F.K., West, P.W., and Iddings, F.A. (1966). Adsorption of Traces of Silver on Container Surfaces. *Anal. Chem.* *38*, 1566–1570.
- Whitton, B.A. (1965). Extracellular Products of Blue -Green Algae. *J. Gen. Microbiol.* *40*, 1–11.
- Whitton, B.A., and Shehata, F.H.A. (1982). Influence of cobalt, nickel, copper and cadmium on the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Environ. Pollut. Ser. Ecol. Biol.* *27*, 275–281.
- Wink, M. (1993). The plant vacuole: A multifunctional compartment. *J. Exp. Bot.* *44*, 231–246.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., and Bassham, D.C. (2007). Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *143*, 291–299.
- Xue, H.-B., and Sigg, L. (1990). Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Res.* *24*, 1129–1136.
- Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* *76*, 167–179.
- Yoosaf, K., Ipe, B.I., Suresh, C.H., and Thomas, K.G. (2007). In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *J. Phys. Chem. C* *111*, 12839–12847.
- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Sato, Y., Satake, K., and Mori, S. (1999). Extraordinary High Aluminium Tolerance of the Acidophilic Thermophilic Alga, *Cyanidium caldarium*. *Soil Sci. Plant Nutr.* *45*, 721–724.
- Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* *5*, 1090–1109.
- Zhang, Y., Obata, H., and Nozaki, Y. (2004). Silver in the Pacific Ocean and the Bering Sea. *Geochem J* *38*, 623–633.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., and Terry, N. (1999). Overexpression of

Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *Plant Physiol.* *119*, 73–80.

(1998). Silver oxides ($\text{Ag}(x)\text{O}(y)$) crystal structure, lattice parameters. In *Non-Tetrahedrally Bonded Elements and Binary Compounds I*, O. Madelung, U. Rössler, and M. Schulz, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–3.