

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS TOXIQUES DE PRODUITS PHARMACEUTIQUES SUR LA
PHYSIOLOGIE DE PLUSIEURS ESPÈCES DE PHYTOPLANCTON.

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

GABRIELLE VERNOUILLET

15 Aout 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Pr. Philippe Juneau pour avoir dirigé ma thèse de doctorat, pour m'avoir conseillé et pour m'avoir permis d'accéder au support matériel au sein de son laboratoire.

Au cours de ma première année de doctorat, j'ai collaboré avec l'Unité de Toxicologie Aquatique - Section Recherche sur les Écosystèmes Fluviaux à Environnement Canada (Centre Saint-Laurent). L'accueil et les judicieux conseils du Dr. Christian Blaise, du Pr. Philippe Eullaffroy et du Pr. Francois Gagné ont apporté à mon travail une aide considérable. J'ai également pu collaborer avec André Lajeunesse sur le dosage de la CBZ. Ses enseignements et sa méticulosité ont été très estimés. Je souhaite aussi remercier Chantale André, Sophie Trepanier, et Joëlle Auclair dont l'assistance technique et l'enthousiasme ont été grandement appréciés.

J'ai eu la chance de pouvoir collaborer avec le Pr. Guy Samson, qui m'a donné les clefs de son laboratoire et toute sa disponibilité, ainsi qu'avec le Pr. Johann Lavaud qui est venu collaborer à notre laboratoire, qu'ils soient ici remerciés pour leurs enseignements.

J'aimerais aussi remercier Mme Lucie Brodeur et le Pr. Marc Lucotte qui ont contribué à la réussite de mon programme au sein du doctorat en sciences de l'environnement.

Merci au Pr. Catherine Jumarie pour m'avoir laissée l'usage de son laboratoire et sa gentillesse éclatante.

J'ai une pensée en la mémoire du Pr. Radovan Popovic, je n'oublierai pas ses poignées de main mémorables ! L'équipe de son laboratoire m'a toujours réservée un accueil chaleureux et Laura, Olivier, Louka, et particulièrement François ont ainsi facilité nombreuses de mes expériences.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire des plus anciens Charles, Annie et Marie-Claude, mais aussi ceux que j'ai pu apprécier au fur et à mesure de mon doctorat Vincent, Francis, Elise, Xue, Natalia, Fran, Thibault et Akash. J'ai aimé vous rencontrer et partager nos questionnements. Pour moi la recherche se fait en équipe, votre support, votre perspicacité et votre amitié y ont fortement contribué !

Les rendez-vous du midi avec Monique Boily, Denis Flippo, Aurélie Girard, Elodie Roques, Andréa Gomez vont définitivement me manquer !

À ceux que je ne nommerais pas, même s'ils sont très fort présents dans ma vie, mais ce n'est pas une biographie, c'est une thèse, alors on s'embrassera et on fêtera à coté des projecteurs.

À ma petite famille montréalaise. Je n'aurais pas imaginé rencontrer des amis aussi précieux que vous. Merci pour m'avoir supportée, soutenue et encouragée. J'ai partagé avec vous des moments fous, drôles, et sérieux. J'ai mûri et changé à vos cotés. J'ai hâte que ça continue !

À mes parents qui m'ont vue partir loin pour entreprendre un projet plus long que prévu mais qui m'ont soutenue indéfectiblement.

À ma sœur, unique et précieuse.

À Thomas, qui a été aussi curieux que moi pour entreprendre ce voyage de l'autre côté de l'Atlantique, et sans le soutien de qui je n'aurais pas réussi à finir. À travers ce périple, j'ai vécu de magnifiques moments avec toi. À toi, qui enchante de poésie ma vie.

AVANT-PROPOS

Les travaux de recherche de mon doctorat ont été présentés sous la forme de trois articles scientifiques. Un article est publié dans une revue internationale, les deux autres sont en voie d'être soumis. Ma contribution à chacun de ces articles est majeure, je suis la contributrice principale du travail expérimental et de la rédaction des manuscrits, c'est pourquoi je figure comme première auteure à chacun de ces articles. La contribution des auteurs est détaillée au début de chaque chapitre.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
AVANT-PROPOS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
Liste des figures	XIII
Liste des tableaux	XIX
Liste des abréviations, des sigles et des acronymes.....	XX
RESUME	XXVII
INTRODUCTION	29
CHAPITRE I.....	34
INTERACTIONS TOXIQUES DES PPHB AVEC L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.....	34

1.1 Les PPHB dans l'environnement.....	34
1.1.1 Portée environnementale de l'étude des PPHB	34
1.1.2 La ciprofloxacine (cipro)	37
1.1.3 Le sulfaméthoxazole (SMX).....	39
1.1.4 La carbamazépine (CBZ).....	41
1.1.5 Bioaccumulation dans la chaîne trophique.	45
1.2. Réponse cellulaire au stress oxydatif.....	47
1.2.1 Formation des espèces activées de l'oxygène (EAO).....	48
1.2.2 Les systèmes antioxydants comme marqueur de stress	50
1.2.3 Conséquences du stress oxydatif sur l'altération des lipides.....	53
1.3 Toxicité des PPHB sur la photosynthèse	54
1.3.1 Le fonctionnement de l'appareil photosynthétique	54
1.3.1.1 Conversion de l'énergie lumineuse en énergie photochimique	54
1.3.1.2 Relation entre le potentiel redox de Q_A et la dissipation d'énergie non- photochimique	56
1.3.1.3 Le transfert cyclique d'électrons au niveau du PSI	57
1.3.1.4 La consommation d' O_2 dans les chloroplastes	60
1.3.1.5 La consommation d' O_2 dans les mitochondries	62
1.3.1.6 Fixation du CO_2	63
1.3.1.7 Synthèse d'ATP	65
1.3.1.8 Quelques particularités de l'appareil photosynthétique des diatomées ..	66
1.3.1.9 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , une algue modèle.....	67
1.4 Les paramètres photosynthétiques comme marqueurs de stress.....	68
1.4.1 Cinétique rapide.....	69
1.4.2 Cinétique lente : mesure de l'activité du photosystème I	74
1.5 Les processus de dissipation non-photochimique.....	77

1.5.1 Description du quenching non-photochimique (NPQ)	77
1.5.1.1 Chez les plantes supérieures et les algues vertes	77
1.5.1.2 Chez les diatomées.....	79
1.5.1.3 Effet des sources alternatives d'électrons sur le NPQ	80
1.6 Deux mécanismes impliqués dans la régulation de transport d'électrons.....	82
1.6.1 Le transfert cyclique d'électrons au PSI	82
1.6.2 La chlororespiration	84
1.7 Le transfert de pouvoir réducteur entre les chloroplastes et les mitochondries....	88
1.7.1 Exportation du NADPH en excès par l'antiport malate / OAA.....	90
1.7.2 Transfert d'ATP et de NADPH par le co-transporteur DHAP/3-PGA.....	92
CHAPITRE 2	95
OBJECTIFS DE LA THESE	95
Objectif 1: Etudier la toxicité de trois PPHB sur l'activité photosynthétique du phytoplancton d'eau douce.	95
Objectif 2 : Étudier les différents processus de réoxydation du pool de plastoquinone chez deux espèces d'algues, une algue verte et une diatomée.....	97
Objectif 3 : Mise en évidence de la bioaccumulation et de l'effet toxique de la carbamazépine sur une chaîne trophique expérimentale.	98
CHAPITRE 3	101
EFFECT OF THREE PHARMACEUTICALS ON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF A GREEN ALGA, <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> , AND A DIATOM, <i>FRAGILARIA CROTONENSIS</i>	101

3.1 Résumé.....	102
3.2 Abstract.....	102
3.4 Materiel and Methods	107
3.4.1 Algal culture	107
3.4.2 Preparation of PPCPs solution and exposure.....	108
3.4.3 Measurement of fluorescence transient	108
3.4.4 Data analysis and statistics	109
3.5 Results and Discussion	110
3.5.1 Carbamazepine (CBZ) effect.....	110
3.5.2 Sulfomethoxathole (SMX) effect.....	113
3.5.3 Ciprofloxacin (cipro) effect.	115
3.6 Conclusion	118
3.7 Acknowledgments	119
3.8 References.....	119
3.9 Figures and Table.....	128
 CHAPITRE 4.....	 134
 DIFFERENCES OF INTERACTION BETWEEN THE TRANSTHYLAKOIDAL PH GRADIENT AND THE LEVEL OF PSI REDUCTION IN DARKNESS BETWEEN A DIATOM AND A GREEN ALGA.	 134
4.1 Résumé.....	136
4.2 Abstract.....	137

4.3 Introduction.....	138
4.4 Materials and methods.....	140
4.4.1 Algal cultures, preparation of samples	140
4.4.2 Fluorescence measurements	141
4.4.3 830nm absorption change measurements	141
4.4.4 NADPH determination	142
4.4.5 Western blot assay	142
4.5 Results and discussion	143
4.7 Figures and Tables.....	159
CHAPITRE 5.....	165
TOXIC EFFECTS AND BIOACCUMULATION OF CARBAMAZEPINE EVALUATED BY BIOMARKERS MEASURED IN ORGANISMS OF DIFFERENT TROPHIC LEVELS.....	165
5.1 Résumé.....	166
5.2 Abstract.....	167
5.3 Introduction.....	168
5.4 Materials and methods.....	170
5.4.1 Aquatic organisms	170
5.4.2 Trophic chain transfer experiment.....	171
5.4.3 Biochemical biomarkers	172
5.4.4 CBZ detection.....	174
5.4.5 Data analysis.....	174

5.5 Results.....	175
5.5.1 CBZ bioaccumulation.....	175
5.5.2 Biochemical biomarkers in trophic chain conditions	175
5.6 Discussion.....	176
5.6.1 CBZ bioaccumulation.....	176
5.6.2 Biochemical biomarkers under trophic chain conditions	177
5.7 Conclusions.....	180
5.8 Acknowledgments	180
5.9 References.....	182
5.10 Table and Figures.....	190
DISCUSSION.....	193
CONCLUSION.....	204
REFERENCES	206
APPENDICE	241
DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE IN AQUATIC ORGANISMS BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY- TANDEM MASS SPECTROMETRY.....	241

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1: La structure de la ciprofloxacine comprend un groupement pipérazine et un groupement fluor qui permet d'augmenter le taux de pénétration dans les cellules. 37
- Figure 1.2: Représentation moléculaire des sulfamidés comprenant un groupe sulfonamide (SO_2NH_2) et un groupement amine (NH_2). 39
- Figure 1.3 : La carbamazépine, un antiépileptique fréquemment retrouvé dans les eaux usées. 41
- Figure 1.4: Représentation schématique de la biotransformation des pharmaceutiques pour augmenter leur polarité, adapté de Daughton (1999). 51
- Figure 1.5: Modèle simplifié du centre de réaction de PSII. Les protéines D1 et D2 sont représentées ainsi que les principaux co-facteurs impliqués dans les réactions de transfert d'électrons. Fe: fer; Mn4: complexe de manganèse; P680 : pigments de la chlorophylle qui sont oxydés à 680 nm; Ph : phéophytine; Q_A et Q_B: plastoquinone A et B ; TyrZ et TyrD: tyrosine (adapté de (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001)..... 55
- Figure 1.6: Transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique. Le photosystème II situé dans le grana, transfère ses électrons au cytochrome b6/f qui migre dans les lamelles stromales où se trouve le photosystème I avec l'ATP synthase, la NDH, la PTOX et la Rubisco (adapté de Peltier (2010). 60

Figure 1.7: Transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Vanlerbergue et Mac Intosh, 1997). Les électrons sont transférés du complexe I au complexe IV (en noir), ce qui s'accompagne de la translocation de protons pour les complexes I, III, et IV. Le gradient de pH transmembranaire active l'ATP synthase (flèche rouge). Une alternative oxydase (AOX) permet l'oxydation de UQ(H₂) en amont du complexe III, et sa réduction est observée en présence de NADH par la Ndh II réductase. Complexe I : NADH déshydrogénase, complexe II : succinate déshydrogénase, complexe III : cytochrome bc₁ oxydoréductase, complexe I V : cytochrome c oxydase. 63

Figure 1.8 : Courbe d'induction de fluorescence désignant les transitions O-J-I-P. La fluorescence est mesurée sur une échelle de temps logarithmique (d'après Strasser *et al.*, 1995). 71

Figure 1.9: Modélisation des flux d'énergie dans l'appareil photosynthétique (adapté de Force *et al.* (2003)). 72

Figure 1.10 : Mesure de l'absorbance du PSI et détermination des paramètres d'oxydation du PSI. Le photosystème I dans son état oxydé (Po) est réduit (Pm) par un flash de lumière saturant (SP) en combinaison avec une lumière de rouge lointain (FR). Le niveau de réduction de PSI est évalué à partir du ratio des mesures d'absorbance à 830nm et 815nm, en présence de lumière actinique (P) et de flash saturant (Pm'). a, fraction du PSI qui est limitée du coté donneur car incapable de séparation de charges ; b, fraction réduite du PSI suite à un flash saturant en présence de lumière actinique ; c, fraction du PSI qui est limitée du coté accepteur car les électrons ne sont pas transférés au NADPH : le PSI n'est pas réduit à son maximum en cas de diminution de l'activité du FNR ou du cycle de Calvin (tiré de Klughammer, *et al.*, (2008)). 76

Figure 1.11 : Réactions enzymatiques qui constituent le cycle de violaxanthine (Vx) et diadinoxanthine (Ddx) (adapté de Niyogi, *et al.* 1997). VDE : Vx dé-époxydase; ZEP : Zéaxanthine époxydase; DDE : diadinoxanthine dé-époxydase; DEP : Ddx époxydase..... 79

Figure 1.12: Relation entre le quenching photochimique (qP) et non-photochimique (NPQ) chez *A. thaliana* (rond noir) et *P. tricornutum* (carré blanc). L'expérience est menée en utilisant des intensités de lumière actinique allant de 30 à 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 81

Figure 1.13: Exportation du NADPH en excès par l'antiport malate / OAA. Fred, Fox : Ferredoxine réduite ou oxydée; OAA : oxaloacétate. 91

Figure 1.14 : Transfert d'ATP et de NADPH par le co-transporteur DHAP/3-PGA entre le chloroplaste et le cytosol. DHAP : dihydroxyacétone 3-phosphate PGA : phospho-glycérate; GP : glycerldéhyde-3-P dehydrogenase.. 94

Figure 3.1: Determination of the area above the JI-phase for dark adapted *C.reinhardtii* control algae (dark line) and algae exposed to 50 mg/L of CBZ (grey line). J-I timescale areas (3-30 ms) are represented for control (dotted area) and exposed algae (hatched line). 128

Figure 3.2: JIP-test parameters expressed as percentage of control for *C. reinhardtii* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150 mg/L), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9 mg/L) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5 mg/L) are shown for each parameter from less concentrated to more concentrated (left to right)..... 129

Figure 3.3: JIP-test parameters expressed as percentage of control for *F. crotonensis* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150 mg/L), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9 mg/L) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5 mg/L) are shown for each parameter from less concentrated to more concentrated (left to right)..... 130

Figure 3.4: Rapid rise fluorescence kinetics plotted on a logarithmic time scale for 15 min dark adapted algae *C. reinhardtii* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). The insert shows the correlation between DI_0/RC and the JI timescale area. The transients were induced by a 6 s red light pulse of $3500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and recorded at room temperature by a Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5) are expressed in mg/L 131

Figure 3.5: Rapid rise fluorescence kinetics plotted on a logarithmic time scale for 15 min dark adapted algae *F. crotonensis* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). The insert shows the correlation between DI_0/RC and the JI timescale area. The transients were induced by a 6 s red light pulse of $3500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and recorded at room temperature by a Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5) are expressed in mg/L 132

Figure 4.1: OJIP transient recorded in *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B) with PEA in the presence of 5mM of NH_4Cl (grey line) and control (dark line). In inserted tables, OJ and JI timescale areas are expressed in arbitrary units. Fluorescence intensity is normalised to the value at point 0, $F_{50,s}$. OJIP transient

were induced by PPFD 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Before measurements cells were placed in the dark during 15 min..... 159

Figure 4.2: Redox kinetics of P700 absorption change induced by saturating light for dark adapted *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B). Samples are treated with NH_4Cl (5mM), DCMU (20 μM), MV (0.5mM), DBMIB (20 μM) or not (black line). P700 kinetics were normalized to the minimum level of absorbance change (P_0) at the dark adapted state. For more details, see Section Material and Methods. 160

Figure 4.3: Content in NADPH in presence of NH_4Cl (5mM), DCMU (20 μM), or DBMIB (20 μM), in *C. reinhardtii* (dark) and *F. crotonensis* (grey). Results express in percentage per control..... 162

Figure 4.4: Expression of PTOX in *F. crotonensis* and *C. reinhardtii* algae. Western- blot analysis of *F. crotonensis* (1), *C. reinhardtii* (2), *A. thaliana* (3), and *E. coli* (4) cells. Western blot analysis was performed using a anti-PTOX-rabbit serum as primary anti-bodies and an anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated as secondary antibodies. D1 protein (32kda) was used as loading control. 162

Figure 4.5: Models representing an interconnection between PQ dark reduction and PSI/PSII oxydo-reduction states for *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B). An electrogenic activity of NAD(P)H deshydrogenase –type I is responsible of a build of a ΔpH in the dark in *F. crotonensis*. The absence of PQ reoxidation by PTOX in *F. crotonensis* leads to a high reduced PQ pool (dark arrow) and a forward reduced PSI donor side (grey arrow) and inversely for *C. reinhardtii*. 164

Figure 5.1: GR activity and CYP450 3A4 activity for *P. subcapitata* exposed to CBZ (150 mg/L). Algae were exposed 24h at a cell density of 10^6 cells/mL at 20°C. *indicates significance at $p < 0.05$ 190

Figure 5.2: Oxidative metabolism enzyme activities in *T. platyurus* fed for 24h with contaminated-CBZ or control algae. Enzymatic activities evaluated were heme oxidase activity (HO), cytochrome P450 3A activity, glutathione-S-transferase (GST) activity, and lipid peroxidation (LPO). For details, see Material and Method section. *indicates significance at $p < 0.05$ 191

Figure 5.3: Oxidative metabolism enzyme activities in *H. attenuata* fed for 6h with *T. platyurus* exposed to contaminated algae or *T. platyurus* exposed to control algae. Enzymatic activities evaluated were heme oxidase activity (HO), cytochrome P450 3A activity, glutathione-S-transferase (GST) activity, and lipid peroxidation (LPO). For details see Material and Method section. *indicates significance at $p < 0.05$ 192

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Tableau récapitulatif sur la présence de la CBZ, du SMX et de la cipro.	44
Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif sur la toxicité de la CBZ, du SMX et de la cipro.	45
Table 3.1: OJ and JI timescale areas expressed in percentage per control. OJ timescale areas are calculated from 0 to 3 ms and JI times scale area is calculated from 3 to 30 ms.....	133
Table 4.1: Repartition of the quantum yield of photochemical energy conversion Y(I) and the energy dissipation of the PSI according to limitation in the donor side Y (ND) and acceptor side Y(NA) in <i>C. reinhardtii</i> and <i>F. crotonensis</i> . Means connected with different letters are different by Tukey HSD (p<0.05).....	161
Table 4.2: O ₂ production in the dark for <i>C. reinhardtii</i> and <i>F. crotonensis</i> in presence of inhibitors. Results express in percentage per control. Means connected with different letters are different by Tukey HSD (p<0.05).....	163
Table 5.1: CBZ concentrations and bioconcentration factors (BAF) for experimental trophic chain organisms. For details, see Material and Method section. * = below quantification limit of the method.	190

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

3-PGA	Acide 3-phosphoglycérique
ABS	Flux de photons absorbé par les pigments de l'antenne
ADN	Acide désoxyribonucléique
AL	Lumière actinique (« Actinic Light »)
AOX	Oxydase alternative respiratoire
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCF	Facteur de bioconcentration
CBZ	Carbamazépine
CC-125	Souche de <i>C. reinhardtii</i>
Chl	Chlorophylle
Cipro	Ciprofloxacine

CO ₂	Dioxyde de carbone
cytb6/f	Complexe protéique contenant le cytochrome b ₆ et le cytochrome f
D1	Protéine D1 du PSII
DBMIB	2,5-dibromo -3-méthyl-6-isopropyl-p-benzoquinone
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée
Ddx	Diadinoxanthine
DI ₀	Dissipation non-photochimique de l'énergie
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dtx	Diatoxanthine
EAO	Espèce active de l'oxygène
EC ₅₀	Concentration efficace médiane, induisant 50% de l'effet maximal
ET ₀	Flux de photons transportés dans la chaîne de transport d'électrons
F' ₀	Fluorescence émise par les antennes chlorophylliennes à l'état d'équilibre du transport d'électrons photosynthétiques lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont oxydés
F' _M	Fluorescence maximale à l'état d'équilibre du transport d'électrons, lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont réduits.
F ₀	Fluorescence de base émise par les antennes chlorophylliennes lorsque

les centres réactionnels du photosystème II sont oxydés

F _M	Fluorescence maximale induite par un éclair saturant, lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont réduits
F _V	Fluorescence variable qui correspond à la capacité de transport des électrons du PSII quand la plante est exposée à une lumière saturante.
F _s	Fluorescence de la chlorophylle à l'état stationnaire
F _d	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine -NADP ⁺ oxydoréductase
FQR	Ferrédoxine -plastoquinone réductase
FR	Lumière dans le rouge lointain (Far red light)
GOGAT	Glutamine Oxoglutarate AminoTransférase
GPK	Glycogène phosphorylase kinase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion sous forme réduite
GSSG	Glutathion sous forme oxydée
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HO	Hème oxydase
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance (« High-performance liquid chromatography »)
LC ₅₀	Dose létale médiane (« median lethal dose »)
LED	Diode à émission de lumière (« Light emitting diodes »)
LHCI ou II	Complexe collecteur d'énergie lumineuse du photosystème I ou II
LPO	Peroxydation des lipides (« Lipid peroxidation »)
MDA	Malondialdéhyde
MDH	Malate déshydrogénase
M ₀	Vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable
MV	Méthylviologène
Mx	Myxothiazol
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NAD(P)H	Nicotidamine adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
Nda2	Complexe NAD(P)H déshydrogénase
Ndh	Complexe NAD(P)H déshydrogénase

NPQ	Atténuation (Quenching) non-photochimique de fluorescence chlorophyllienne
OAA	Acide oxaloacétique
OEC	Complexe de dégagement d'oxygène (« Oxygen evolving complex »)
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
PAM	Fluorescence chlorophyllienne à amplitude modulée
PEA	Plant efficiency Analyser, cinétique à fluorescence rapide
PG	Propylgallate
Pheo	Phéophytine
PLA2	Phospholipase A2
PPCP	Pharmaceutical and personal care product (traduction anglaise de PPHB)
PPHB	Produit pharmaceutique d'hygiène et de beauté (traduction française de PPCP)
PQ	Plastoquinone
PQH ₂	Plastoquinol (Plastoquinone réduite)
PSI	Photosystème I

PSII	Photosystème II
PTOX	Plastoquinone oxydase terminale chloroplastique
Q _A	Quinone A
Q _B	Quinone B
qN	Quenching (atténuation) non-photochimique de fluorescence chlorophyllienne
qP	Atténuation photochimique de fluorescence chlorophyllienne
RC	Centre réactionnel
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
SHAM	Acide salicylhydroxamique
SMX	Sulfaméthoxazole
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	« <i>Thio Barbituric Acid Reactive Species</i> »
TR ₀	Flux de photons capturés par les centres réactionnels
UQ	Ubiquinone

V _J	Fluorescence variable dépendante du niveau de réduction de Q _A
V _X	Violaxanthine
Z _X	Zéaxanthine

RESUME

Les produits pharmaceutiques, d'hygiène personnelle et de beauté (PPHB) sont récemment devenus une préoccupation importante du fait de leur consommation croissante et incontrôlée. Ces substances sont biologiquement actives et leurs effets sur des organismes non-cibles sont préoccupants même à des faibles concentrations. En conséquence, il est important de tenir compte non seulement de leur toxicité induite par une exposition directe, mais aussi des processus de bioconcentration et de bioaccumulation de ces composés pour en prédire le danger potentiel.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux interactions de trois PPHB sur les activités photosynthétiques du premier maillon de la chaîne. Les paramètres photosynthétiques de *Chlamydomonas reinhardtii* sont peu affectés. Au contraire, chez *Fragilaria crotonensis*, la carbamazépine (CBZ) augmente la dissipation non-photochimique d'énergie (DI_0/RC) ce qui, couplé à une diminution de la capacité de transport d'électrons (ET_0/TR_0), indique une photoinhibition des algues. En présence de sulfaméthoxazole (SMX) ou de ciprofloxacine (cipro), il y a une diminution importante du transport d'électrons (ET_0/RC) due respectivement à une limitation du piégeage d'électrons (TR_0/RC) ou de la réduction de ET_0/TR_0 . Nos résultats ont montré que les effets des PPHB avaient une forte inhibition de la réduction du pool de plastoquinone (PQ) selon une intensité croissante $CBZ < SMX < cipro$ particulièrement chez *F. crotonensis* contrairement à *C. reinhardtii* qui est moins sensible. Nous nous sommes alors interrogés sur les différences des processus de réoxydation du pool de PQ chez ces deux espèces.

En utilisant une combinaison d'inhibiteurs spécifiques de la plastoquinone oxydase terminale chloroplastique (PTOX) et en étudiant les limitations du côté donneur et accepteur au niveau du PSI, nous avons montré que la réoxydation du pool de PQ par PTOX n'est pas significative chez *F. crotonensis* au contraire de ce qu'on pouvait observer chez *C. reinhardtii*. Ces résultats ont été confirmés par la mesure de la production de O_2 et l'absence d'activité de l'oxydase chloroplastique a été mise en évidence. De plus, l'absence de réoxydation par une PTOX chez *F. crotonensis* mène à un haut niveau de réduction du pool de PQ au noir. La formation d'un gradient de pH au noir chez *F. crotonensis* a suggéré une activité électrogénique de la NAD(P)H déshydrogénase. Nous avons proposé chez *F. crotonensis* un modèle représentant la

NAD(P)H deshydrogénase de type I active qui génère un gradient de protons tandis que l'activité de PTOX n'est pas significative.

Un dernier objectif de notre projet de recherche était d'établir des données sur l'écotoxicité de PPHB humains comme la carbamazépine (CBZ) que l'on retrouve systématiquement dans le fleuve Saint-Laurent. Nous avons mis au point une chaîne trophique expérimentale constituée d'une microalgue, *Pseudokirchmeriella subcapitata*, d'un crustacé, *Thamnocephalus platyurus*, et d'une hydre, *Hydra attenuata*. Nous avons mesuré des facteurs de bioconcentration de 2,2 et 12,6 pour les deux premiers maillons et seulement des traces de la CBZ chez *H. attenuata*. De plus, chez *T. platyurus* la CBZ diminue l'activité enzymatique du cytochrome CYP450 3A4-like tout en stimulant l'activité de l'hème oxydase globale (HO) (76%) et de la glutathion S-transférase (GR) (130%). Au contraire, chez *H. attenuata*, l'activité enzymatique du CYP450 3A4-like est augmentée. Pour les deux dernières espèces, la diminution de la peroxydation des lipides est un indicateur de l'activité redox de la CBZ.

L'évaluation du risque toxicologique liée aux PPHB pour être pertinente doit être estimée en considérant plusieurs espèces et différents maillons de la chaîne trophique.

Mots clés : SMX, CBZ, cipro, fluorescence chlorophyllienne, photosynthèse

INTRODUCTION

Parmi les différents composés organiques qui sont retrouvés dans l'environnement, les produits pharmaceutiques, d'hygiène personnelle et de beauté (PPHB) sont récemment devenus une préoccupation importante du fait de leur consommation croissante et incontrôlée. Il est d'ailleurs fort probable que cette contamination aille en s'amplifiant en raison du vieillissement de la population (Blaise, 2006). Ces produits pharmaceutiques et leurs métabolites ont été détectés dans les eaux usées du fait de leur pharmacocinétique et de leur métabolisme selon un usage thérapeutique normal (excrétion urinaire et fécale) (Daughton et Ternes, 1999) ce qui s'ajoute à une technologie de traitement des eaux usées peu performante pour dégrader spécifiquement ces composés (Ternes, 1998). Ainsi ils sont retrouvés dans des quantités variables dans les eaux de surface, les eaux profondes (Farre *et al.*, 2001) et les sédiments (Zuccato *et al.*, 2000). Les concentrations mesurées dans l'environnement aquatique sont de l'ordre du nanogramme au microgramme par litre (ng- μ g/L). Cette pollution émergente est susceptible d'affecter des organismes allant des microalgues aux bélugas en passant par les poissons. Bien qu'ils puissent être dégradés dans l'environnement par des processus biotiques ou abiotiques (Andreozzi *et al.*, 2002), il est acquis que ces composés peuvent être considérés comme une pollution persistante du fait de leur apport continu dans l'environnement. Il y a eu récemment une prise de conscience sur l'importance d'étudier l'effet de l'exposition continue des produits pharmaceutiques humains sur des organismes aquatiques (Daughton et Ternes, 1999; Calamari *et al.*, 2003; *Environment Agency.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004). Jusqu'à aujourd'hui, la capacité des organismes à concentrer une substance par rapport à sa concentration dans l'environnement a été mise en évidence

sur des substances organiques comme des alkylphénols, nonylphénols, le diclofenac, le triclosan, le triclocarban et sur des agents anti-bactériens (Ahel *et al.*, 1993 ; Nimrod et Benson, 1996 ; Servos, 1999 ; Delepee *et al.*, 2004 ; Schwaiger *et al.*, 2004; Correa-Reyes *et al.*, 2007). Ils représentent une exposition multigénérationnelle pour les organismes résidents (Daughton et Ternes, 1999). Ces substances sont biologiquement actives et leurs effets sur des organismes non-cibles sont préoccupants même à des faibles concentrations. En conséquence, il est important de tenir compte non seulement de leur toxicité induite par une exposition directe mais aussi des processus de bioconcentration et de bioaccumulation de ces composés pour en prédire le danger potentiel. Dans ce contexte, une partie de mon projet de recherche a été d'étudier la bioaccumulation de la carbamazépine (CBZ) par une chaîne trophique expérimentale. Ce médicament utilisé contre l'épilepsie est systématiquement détectée dans les eaux du fleuve St-Laurent à des concentrations comprises entre 0,7 et 6,3 µg/L (Ternes, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003). La CBZ est un composé relativement lipophile avec un coefficient de partition eau-octanol de 2,45, ce qui en fait une substance bioaccumulable. La constitution d'une minichaîne trophique expérimentale représente une approche informative et exploratoire sur la bioaccumulation et la bioamplification de la CBZ et l'étude du devenir des substances pharmaceutiques dans le milieu naturel vient répondre à un véritable intérêt pour la protection et la préservation environnementale.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons également ciblé le premier maillon de cette chaîne trophique en traitant les mécanismes d'adaptation des algues exposées aux PPHB. En effet la toxicité de ces produits sur les processus de photoprotection des algues n'a pas été étudiée à ce jour. Étudier la relation entre ces mécanismes permet d'affiner la compréhension et la prédiction de la toxicité de polluants aquatiques sur le phytoplancton. Le phytoplancton regorge d'une grande diversité phylogénétique d'algues eucaryotes et de bactéries procaryotes. On y retrouve en particulier les diatomées (Bacillariophyta), qui forment le groupe

taxonomique le plus vaste avec plus de 10 000 espèces recensées (Adl *et al.*, 2005). Elles sont alors responsables du quart de la fixation globale du carbone (Falkowski *et al.*, 1998) et jouent un rôle prépondérant dans les océans et les eaux douces. Les diatomées sont ainsi un modèle privilégié pour étudier l'effet de l'exposition aux contaminations chimiques du compartiment aquatique dont les concentrations peuvent fortement varier selon les lieux, les normes de purification et les pratiques de consommation. Les stress conséquents aux expositions sont variables selon la périodicité, et induisent le développement de mécanismes de dissipation de l'énergie par des processus non-photochimiques (Lavaud et Kroth, 2006; Murata *et al.*, 2007). Dans les deux autres parties de mon projet de recherche, nous comparerons les processus photochimiques chez deux espèces de phytoplancton : la diatomée, *Fragilaria crotonensis* et l'algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les microalgues constituent un organisme privilégié pour l'étude de la régulation des flux d'électrons photosynthétiques car elles ont une croissance plus grande que les plantes supérieures et peuvent être isolées facilement. Les algues unicellulaire présentent une grande flexibilité pour moduler le flux d'électrons selon leur environnement (Cardol, *et al.*, 2011). Ainsi une revue de littérature montrera que des processus majeurs de la photosynthèse ont été élaborés en utilisant comme modèle des algues vertes, comme l'oxydation de l'eau (Joliot et Kock, 1975), la capacité des deux photosystèmes à moduler l'absorption de la lumière (les états de transition) (Bonaventura et Myers, 1969), la chlororespiration (Bennoun, *et al.*, 1982) ou encore le transfert cyclique des électrons autour du PSI (Iwai, *et al.*, 2010). Des études sur l'effet de facteurs environnementaux sur la physiologie cellulaire ont également été réalisées sur des microalgues. Par exemple, l'étude de la modulation de l'intensité lumineuse sur la capacité photochimique a été réalisée chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* et la diatomée *Skeletonema costatum* (Falkowski, *et al.*, 1980), mais aussi associée à une limitation en nutriments sur des populations phytoplanctoniques en mésocosmes (Bergmann, *et al.*, 2002).

Les fluctuations de l'intensité lumineuse ou des stress environnementaux peuvent limiter la fixation de CO₂ et mener à l'absorption de plus grande quantité d'énergie que la plante ne peut utiliser par la photosynthèse (Govindjee et Govindjee, 1974). C'est pourquoi la dissipation de photons et d'électrons en excès est un processus majeur pour protéger l'appareil photosynthétique des dommages photo-induits. Le quenching non-photochimique est associé à une acidification du lumen des thylacoïdes qui est alors responsable de l'activation de processus de photoprotection comme la déépoxydation des pigments secondaires, les xanthophylles, et la dissipation d'énergie non-photochimique par la chaleur. Ce gradient de protons a été observé aussi bien chez les plantes supérieures, les algues vertes que chez les diatomées. Il est intéressant de noter que le quenching non-photochimique (NPQ) n'est pas affecté en présence d'inhibiteurs de transport linéaire d'électrons (DCMU) et de la phosphorylation cyclique (MV) sous illumination alors que le gradient de pH est abolit chez la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* (Eisenstadt *et al.*, 2008). La chlororespiration, en tant que processus de transport alternatif d'électrons, est connue pour générer un gradient de protons transthylacoïdaux issus du NADPH, associé à la réoxydation du pool de plastoquinone (Cournac, 2002). Les électrons issus de l'oxydation du NADPH sont transférés au pool de PQ en impliquant une NADPH déshydrogenase identifiée *ndh2* chez *C. reinhardtii* (Mus *et al.*, 2005). De plus, la réoxydation du pool de plastoquinone mène à la réduction de l'eau comme accepteur final d'électrons (Rumeau, 2007). Des travaux récents ont montrés que le pool de plastoquinone pouvait être réoxydé préférentiellement par le cytochrome b6/f et ensuite dirigé vers le PSI (Grouneva, 2009). Ces deux voies auront des effets différents sur le niveau de réduction du PSI en redirigeant les électrons et en modifiant l'activité du PSI pendant la transition lumière/obscurité. C'est pourquoi nous avons également exploré, dans une dernière partie de ce projet de recherche comment la chlororespiration peut avoir un impact sur le niveau de réduction du PSI. Pour cela, nous avons utilisé un agent découplant (NH₄Cl), un inhibiteur du transfert cyclique d'électrons autour du PSI, le méthylviologène (MV), et des inhibiteurs de la

chlororespiration (le propylgallate (PG) et l'acide salicylhydroxamique (SHAM)) chez *C. reinhardtii*, une algue verte, et *F. crotonensis*, une diatomée. Face à la contamination continue des compartiments aquatiques par des polluants émergents, ce projet de recherche apporte des réponses sur la toxicité des PPHB sur le premier maillon de la chaîne alimentaire.

CHAPITRE I

INTERACTIONS TOXIQUES DES PPHB AVEC L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE

1.1 Les PPHB dans l'environnement

1.1.1 Portée environnementale de l'étude des PPHB

Les produits pharmaceutiques d'hygiène et de beauté (PPHB) contiennent des composés que nous utilisons dans notre vie quotidienne incluant des savons, parfums, désinfectants, déodorants mais aussi par extension, certains auteurs y intègrent des composés pharmaceutiques comme des médicaments anti-inflammatoires, des stéroïdes, des contraceptifs, des antimicrobiens *etc.* (Saulnier *et al.*, 2007). Bound et Voulvoulis (2006) ont relevé, dans un sondage réalisé au Royaume-Uni, que 98% des personnes interrogées possédaient ce type de pharmacie dans leur armoire à pharmacie. La moitié des sondés abandonnaient leur traitement avant la fin, laissant une partie de leur médication non-utilisée. Le surplus des pharmaceutiques est souvent éliminé dans les toilettes ou à la poubelle, ce qui revient à alimenter les eaux usées ou les décharges publiques. Leur prescription est élargie du domaine de la santé humaine à vétérinaire. En général ces drogues sont administrées aux élevages à travers la nourriture, bien qu'une partie soit injectée, elles peuvent être administrées individuellement aux animaux ou à tout le troupeau. Les PPHB ont permis

d'améliorer les conditions d'hygiène et d'augmenter la durée de vie ces deux derniers siècles mais ils sont aussi des sources de contamination environnementale en forte croissance qui peuvent avoir un impact sur des organismes non-cibles. En 2002, entre 100 000 et 200 000 tonnes d'antibiotiques sont utilisées dans le monde avec des répartitions qualitatives différentes selon les pays indiquant à quel point les attentes des patients, les attitudes face à la prise de médicaments, les usages de prescriptions sont liés aux pratiques médicales et au marketing pharmaceutique (Wise, 2002). Au Canada, les chiffres de la vente de produits pharmaceutiques ont doublé entre 1996 et 2004 passant de 6,6 milliards à 13,8 milliards de dollars (Holtz, 2006). L'agence Nationale du Médicament Vétérinaire, en France, met en avant une augmentation nette des ventes d'antibiotiques en 2011 par rapport à 1999 soit de 148,25 % (soit 1,36 tonnes) pour les céphalosporines et de 57,64 % (soit 1,9 tonnes), pour les fluoroquinolones.

Depuis un peu plus de 10 ans, la progression des technologies analytiques, notamment en chromatographie, a permis d'augmenter la détection des composés jusqu'au ng/L mais aussi d'élargir le spectre des composants pharmaceutiques présents dans l'environnement (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Ternes, 1998; Richardson *et al.*, 2005). De nombreuses classes différentes de produits pharmaceutiques ont ainsi été détectées et certaines sont connues pour être persistantes dans l'environnement (Zuccato *et al.*, 2000; 2004). Cela a permis d'améliorer la prise en considération de ces contaminations environnementales qui sont parfois retrouvées dans des quantités similaires à celles des produits chimiques liés à l'agronomie (Chen *et al.*, 2006). Sur la base des relations écologiques structure-activité des produits chimiques (ECOSAR), une étude de Sanderson (2004) a testé près de 600 composés pour leur toxicité dans l'environnement aquatique. En effet, la plupart des produits pharmaceutiques ont une polarité élevée et une faible volatilité qui les rendent susceptibles d'être transportés vers le compartiment aquatique (Boxall *et al.*, 2004). Pour les algues, près d'un quart des antibiotiques prescrits sont très

toxiques ($EC_{50} < 1 \text{ mg/L}$). Pour les daphnies, 44% sont très toxiques ($EC_{50} < 1 \text{ mg/L}$) et près de 16% sont extrêmement toxiques, ($EC_{50} < 0.1 \text{ mg/L}$). Pour les poissons, presque un tiers de tous les antibiotiques prescrits sont très toxiques ($EC_{50} < 1 \text{ mg/L}$) et près de la moitié sont toxiques ($EC_{50} < 10 \text{ mg/L}$) (Sanderson *et al.*, 2004). Cependant, les données écotoxicologiques sont disponibles pour moins de 1% des produits pharmaceutiques (ECETOX (UE) et ECOTOX (US)) (Jones *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2004). De plus, parmi les nouveaux produits pharmaceutiques seul un petit nombre d'entre eux ont été soumis à une évaluation des risques, incluant des tests écotoxicologiques (Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Cela est principalement dû au fait que les concentrations prédites ou mesurées de l'environnement (PEC ou MEC) sont inférieures à la valeur seuil pour le déclenchement de l'évaluation des risques écotoxicologiques (Sanderson *et al.*, 2003). La prescription des 25 plus importants pharmaceutiques au Royaume-Uni a dépassé la valeur de déclenchement d'évaluation des risques environnementaux dans les eaux de surface, et peut donner lieu à des effets aigus et chroniques écotoxicologiques pour l'environnement aquatique, ce qui justifie les préoccupations environnementales (Jones *et al.*, 2002).

Cependant, les PPHB sont destinés à être biologiquement actifs, et sont rendus particulièrement efficaces pour affecter des fonctions biochimiques et physiologiques des systèmes biologiques. Ils présentent souvent des groupements acides ou basiques et sont fréquemment des molécules polaires. Dans la section suivante, nous présenterons trois PPHB majoritairement détectés dans les eaux de surface : la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole et la carbamazépine, qui seront l'objet d'étude dans le cadre de ma thèse.

1.1.2 La ciprofloxacine (cipro)

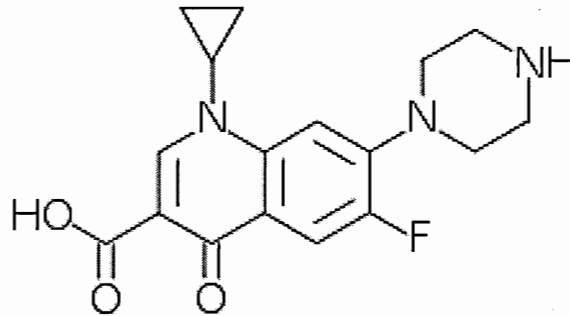


Figure 1.1: La structure de la ciprofloxacine comprend un groupement pipérazine et un groupement fluor qui permet d'augmenter le taux de pénétration dans les cellules.

Parmi les antibiotiques, les fluoroquinolones font partie de ceux qui sont les plus prescrits derrière les macrolides et les pénicillines. Ils génèrent 3 milliards de dollars de vente dans le monde (Applebaum et Hunter, 2000 ; Emmerson et Jones, 2003). Parmi eux, le Levoquin (levofloxacin) et la cipro sont les antibiotiques les plus prescrits aux États-Unis. Les quinolones servent à traiter des infections des voies urinaires, respiratoires et systémiques. Ces composés sont appréciés dans les pratiques cliniques car la fluorine permet une meilleure pénétration du composé dans la cellule et sa bioconcentration. Pourtant, seuls 50-70 % de la cipro sont biodisponibles lors de l'usage thérapeutique (Campoli-Richards *et al.*, 1988). De plus, ils ont une large gamme d'action puisqu'ils ciblent autant les bactéries gram-positives que gram-négatives. Leur action contre les microorganismes est d'inhiber sélectivement la synthèse d'ADN, en modifiant sa nature superenroulée (Hawkey, 2003). Ces composés sont prescrits à des concentrations qui ne modifient pas l'activité enzymatique des mammifères. Cependant, les doses thérapeutiques de quinolones ont en général toute une gamme d'effets secondaires, y compris des vertiges, des maux de tête, des convulsions, des tremblements, et des changements

dans la vision. Ils peuvent également endommager le cartilage, ce qui peut entraîner des dommages permanents, la diarrhée, des nausées, des vomissements, des éruptions cutanées et des démangeaisons. Certains des quinolones de troisième génération ont également été associés à des problèmes cardiaques, y compris l'insuffisance cardiaque (Jjemba et Robertson, 2005). Des bioessais, réalisés avec des eaux usées provenant d'un hôpital suisse, ont mis en cause l'effet mutagène de la cipro (Hartmann *et al.*, 1998). Entre 60-80 % du Levoquin (Stass et Kubitza, 1999) et 84% de la cipro sont excrétés sans métabolisation (Volmer *et al.*, 1997). On les retrouve à des concentrations médianes de 0,02 mg/L dans 26% des eaux de surfaces des États-Unis (Kolpin *et al.*, 2002). Les antibiotiques de type fluoroquinolones comme la cipro, ont été retrouvés dans les effluents d'hôpitaux à des concentrations comprises entre 2.10^9 - 11.10^9 ng/L, à la sortie des stations d'épuration à des concentrations comprises entre 90-1000 ng/L, dans les effluents (<6-310 ng/L), de même que dans les eaux de surface comme dans la rivière Lambro en Italie, (14,36 ng/L) et la rivière Mondego au Portugal (79,6-119,2 ng/L). De plus, la persistance dans l'environnement est un risque qu'il ne faut pas négliger car des antibiotiques de la classe des fluoroquinolones ont été trouvés dans les sédiments à des concentrations qui peuvent atteindre 4.8 mg/kg (Lindberg *et al.*, 2005).

La phytotoxicité de la cipro sur la croissance diffère selon les espèces, ainsi elle est importante chez la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* avec une EC_{50} médiane de 49 µg/L (Robinson *et al.*, 2005). Tandis que les plantes supérieures, *Lemna gibba* et *Lemna minor*, sont plus résistantes : la EC_{50} est de plus d'un ordre de grandeur supérieur soit de 698 et 106 µg/L chez *L. gibba* et *L. minor* respectivement (Brain *et al.*, 2004 ; Robinson *et al.*, 2005; Brain *et al.*, 2008). L'algue verte *Selenastrum capricornutum* est 150 fois moins sensible que la cyanobactérie avec une inhibition de la croissance (EC_{50}) de 7400 µg/L (Robinson *et al.*, 2005). Pourtant les cibles de la cipro, les topoisomérases, ont été identifiées aussi bien chez les algues vertes (*C. reinhardtii*) (Thompson et Mosig, 1985) que chez les plantes supérieures (Wall *et al.*,

2004). Cette différence de toxicité de la cipro sur la croissance des espèces peut avoir pour effet de réduire la biomasse d'une population d'une espèce d'algue tout en affectant peu une autre espèce d'algue vivant dans le même milieu. L'étude de Wilson, *et al.*, (2003) compare des échantillons de phytoplancton prélevés en amont et en aval d'une usine de traitement puis exposés à la cipro. Une réduction significative des diatomées *Navicula* et des algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* est observée pour des concentrations différentes de cipro de 0,12 µg/L et 1,2 µg/L respectivement. Dans le cadre de leurs tests, cette étude révèle que la structure finale de la communauté algale, en considérant la biomasse respective des espèces, se trouve changée sous l'effet de la cipro.

1.1.3 Le sulfaméthoxazole (SMX)

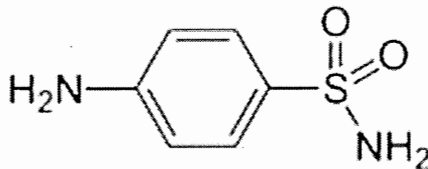


Figure 1.2: Représentation moléculaire des sulfamidés comprenant un groupe sulfonamide (SO_2NH_2) et un groupement amine (NH_2).

Les médicaments qui contiennent un groupe sulfonamide ont été introduits dans les années 1930s et font partie des plus vieux antibiotiques encore utilisés de nos jours pour leurs propriétés antimicrobiennes. De plus, ils sont utilisés dans l'élevage à usage prophylactique, pour éviter les épidémies, ce qui en fait les antibiotiques les plus prescrits dans l'industrie de l'élevage (Sarmah, *et al.*, 2006). Ils sont actifs contre les bactéries gram-négatif et gram-positifs. Chez l'homme, ils sont principalement utilisés pour contrôler les infections des fonctions urinaires, pulmonaires, du système nerveux (Sarmah, *et al.*, 2006). Comme d'autres antibiotiques, ils ont une structure

primaire analogue à des métabolites intermédiaires (Al-Ahmad, *et al.*, 1998; Boxall *et al.*, 2004). En conséquence, ils jouent un rôle d'inhibiteur compétitif non-fonctionnel et inactivent les processus métaboliques cibles. Ils permettent de limiter la multiplication bactérienne en inhibant compétitivement l'acide para-aminobenzoïque (PABA) dans le cycle du métabolisme de l'acide folique. Ils provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et induisent la mort cellulaire (O'Neill *et al.*, 2001). Ces composés sont hydrophiles avec un pKa compris entre 4.5 et 7.5. Leur solubilité est comprise entre 0,1g/L et 8 g/L (Sarmah *et al.*, 2006). Le sulfaméthoxazole (SMX) est le plus prescrit des sulfonamides aux États-Unis, il est très souvent en association avec le Triméthoprime. Des doses orales de sulfonamides sont absorbées et éliminées par le foie et les reins avec 20-60% excrétés sous leur forme non métabolisée (Queener et Gutierrez, 2003).

Segura *et al.* (2009), notent des concentrations du SMX de l'ordre de 100ng/L dans les eaux de surface et de 1000ng/L dans les eaux usées et les expliquent par une faible affinité du SMX pour les solides, ce qui facilite son transport dans la phase aqueuse. Son rapport indique aussi que les concentrations observées de SMX dans les eaux de surfaces ne sont pas assez élevées pour affecter la plupart des espèces aquatiques mais que les concentrations des eaux usées viennent affecter les espèces les plus sensibles comme les bactéries. Des tests de toxicité aiguë chez des rotifères indiquent des concentrations (EC₅₀ et LC₅₀) comprises entre 15,5 mg/L à 35 mg/L, qui est croissante selon les espèces suivantes *Ceriodaphnia dubia* < *Vibrio fischeri* < *Daphnia magna* < *Brachionus calyciflorus* < *Thamnocephalus platyurus* (Isidori *et al.*, 2005) allant jusqu'à 177 mg/L chez *D.magna* (Jung *et al.*, 2008). Des tests de toxicité chronique indiquent une toxicité toujours variée selon les espèces et qui reste très élevée même si les concentrations d'inhibition de 50% de la croissance baissent entre 3-10 fois selon les espèces. Ainsi chez *C. dubia* et *B. calyciflorus*, les EC₅₀ médianes sont estimées à 9,63 mg/L et 0,21 mg/L respectivement (Eguchi *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2004). De plus, Il a été montré que le SMX agissait sur voie de

biosynthèse des folates non seulement des bactéries mais aussi chez les plantes (Quinlivan *et al.*, 2003), ce qui en fait une préoccupation supplémentaire pour la toxicité sur des organismes non-cibles. Une concentration aussi faible que 3,36 µg/L affecte 50% de la synthèse de l'acide p-aminobenzoïque chez *Lemna gibba* (Brain *et al.*, 2008).

1.1.4 La carbamazépine (CBZ)

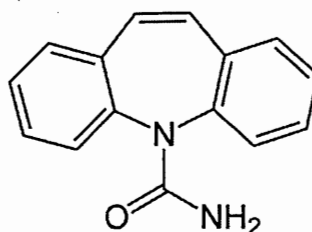


Figure 1.3 : La carbamazépine, un antiépileptique fréquemment retrouvé dans les eaux usées.

La consommation d'anxiolytique, d'hypnotiques, neuroleptiques est en forte croissance dans les pays développés. La CBZ a été initialement utilisée presque exclusivement pour l'épilepsie cependant son utilisation a également été étendue à la schizophrénie, des épisodes maniaques aigus, et des épisodes dépressifs du trouble bipolaire en raison de ses stabilisateurs de l'humeur (Kudoh *et al.*, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003). Elle est également utilisée dans le traitement de l'alcoolisme (Sternebring *et al.*, 1992) ainsi que la toxicomanie (Bertschy *et al.*, 1997). Elle agit sur le récepteur des neurotransmetteurs chez les mammifères et bloque les canaux voltages dépendants (Ambrosio *et al.*, 2002). Elle est métabolisée par le cytochrome P450 formant une variété de métabolites tels que la 10,11-dihydro-10,11-epoxycarbamazépine (par oxydation), qui sont ensuite métabolisées en glucuronides conjugués. Le CYTP450 3A4 est présent dans toute une gamme d'autres organismes, y compris les plantes, les vertébrés et les invertébrés (Azmitia, 1999). Ainsi, l'impact de la CBZ sur des organismes non-cibles ne peut pas être négligé. La CBZ est

fortement utilisée dans les pays développés, mais n'est pas prescrite aux États-Unis (Ambrosio *et al.*, 2002). En, 2001, déjà 29 tonnes de CBZ étaient prescrites au Canada (IMS Health Canada, 2001).

La CBZ a montré des sensibilités très variables sur la croissance au sein de différentes espèces d'algues. Ainsi, la cyanobactérie, *Synechococcus leopolensis* et la diatomée, *Cyclotella meneghiniana*, montrent un EC_{50} similaire avec respectivement 17 mg/L et 10 mg/L (Ferrari, *et al.*, 2004) ; alors que les algues vertes *Desmodesmus subspicatus* et *P. subcapitata*, montrent une EC_{50} à 74 mg/L et >100 mg/L (Cleuvers, 2003 ; Ferrari *et al.*, 2004). Chez les invertébrés, la sensibilité à la CBZ sur la croissance est plus importante et les différences de NOEC entre les espèces sont aussi d'un ordre de grandeur, pour les daphnies, *C. dubia* (0,025 mg/L), les rotifères, *B. calcyflorus* (0.377 mg/L) (Ferrari *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004) et les larves de mouches, *Chironomus riparius* (0.625 mg/kg) (Nentwig *et al.*, 2004). Oetken *et al.* (2005) ont montré que l'exposition de l'invertébré *C. riparius* à des sédiments contaminés par la CBZ inhibait la formation de la chrysalide avec un EC_{50} de 160 g/kg, ainsi la CBZ peut s'adsorber aux sédiments, et constitue une menace pour les organismes qui se nourrissent sur la matière organique. La CBZ est omniprésente dans l'environnement et possède un faible taux d'élimination par les stations d'épuration (7%). Elle est systématiquement retrouvée dans les eaux de surface dans des concentrations qui oscillent entre 0,7 et 6,3 µg/L (Ternes, 1998 ; Metcalfe *et al.*, 2003) suite aux activités anthropogéniques (Clara *et al.*, 2004). En plus de la retrouver dans les eaux de surface, la CBZ est retrouvée dans les eaux souterraines à des concentrations qui atteignent 900 ng/L . Un programme de surveillance effectué sur le Rhin (Allemagne) pendant plus d'une décennie, a montré la détection régulière de la CBZ, avec une concentration moyenne annuelle de 100 ng/L (Sacher *et al.*, 2008). Ces résultats confortent l'hypothèse que la présence de CBZ dans l'environnement peut représenter une menace réelle.

Les concentrations en pharmaceutiques inférieures à 0,2 g/kg dans les élevages sont considérées comme négligeables et non thérapeutiques. Cependant, la plupart des pharmaceutiques sont faiblement métabolisés après leur administration chez les humains ou les animaux. Ainsi de fortes concentrations de pharmaceutiques sont excrétées. De plus, certains métabolites peuvent aussi être transformés à nouveau en composés parents. Les proportions du composé excrété sous sa forme non métabolisée sont de 15% pour le SMX (Ternes, 1998), 84% pour la cipro (Volmer *et al.*, 1997), et seulement de 1-2% pour la CBZ (Ternes, 1998). Seulement 29% de la CBZ est éliminée de la phase aqueuse durant le traitement des eaux usées, et ses métabolites ne sont pas éliminés (Miao *et al.*, 2004).

Tableau 1.1 : Tableau récapitulatif sur la présence de la CBZ, du SMX et de la cipro.

		Pays	Concentrations (ng/L)	Références
Carbam azépine pKa= 13,9	STP effluent	<i>Espagne</i>	120-310	Gomez <i>et al.</i> , 2007
	STP effluent	<i>Finlande</i>	290-400	Vieno <i>et al.</i> , 2006
	STP effluent	<i>Roumanie</i>	<30-75.1	Moldovan, 2006
	STP effluent	<i>Suède</i>	1680	Bendz <i>et al.</i> , 2005
	eaux souterraines	<i>Allemagne</i>	900	Sacher <i>et al.</i> , 2001
	STP effluent	<i>Allemagne</i>	2100	Ternes, 1998
	STP effluent	<i>France</i>	193-420	Leclercq <i>et al.</i> , 2009
Sulfam éthoxazol pKa ₁ = 1,7 pKa ₂ = 5,6	STP influent	<i>Taiwan</i>	179-1760	Lin <i>et al.</i> , 2009
	STP influent	<i>Luxembourg</i>	13-155	Pailler <i>et al.</i> , 2009
	STP effluent	<i>Corée du sud</i>	3,8-407	Kim <i>et al.</i> , 2007
	STP influent	<i>Corée</i>	156-984	Choi <i>et al.</i> , 2008
	STP influent	<i>USA</i>	ND-1000	Brown <i>et al.</i> , 2006
	STP influent	<i>USA</i>	300	Karthikeyan et Meyer, 2006
	rivière Tevere	<i>Italie</i>	402	Perret <i>et al.</i> , 2006
Ciprofloxacine pKa ₁ = 6,2 pKa ₂ = 8,8	eau de surface	<i>USA</i>	20	Calamari <i>et al.</i> , 2003
	rivière Po	<i>Italie</i>	ND-26,5	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
	STP influent	<i>USA</i>	ND-1000	Brown <i>et al.</i> , 2006
	STP influent	<i>Portugal</i>	418,8-667,1	(Seifrtov <i>et al.</i> , 2008)
	STP influent	<i>USA</i>	150	Karthikeyan et Meyer, 2006
	STP influent	<i>Suède</i>	90-300	Lindberg <i>et al.</i> , 2005
	rivière Mondego	<i>Portugal</i>	79,6-119,2	Pena <i>et al.</i> , 2007

Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif sur la toxicité de la CBZ, du SMX et de la cipro.

Composé	Taxon	Espèce	Mesure	Données	Référence
Carbamazépine	crustacé	<i>D. magna</i>	EC50 (48h)	> 100 mg/L	(Cleuvers <i>et al.</i> , 2003)
	crustacé	<i>D. magna</i>	EC50 (48h)	> 100 mg/L	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
			EC50 (96h)	76,3 mg/L	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
	crustacé	<i>D. magna</i>	EC50 (48h)	> 13,8 mg/L	(Ferrari <i>et al.</i> , 2003)
	crustacé	<i>C. dubia</i>	EC50 (48h)	77,7 mg/L	(Ferrari <i>et al.</i> , 2003)
	algue	<i>D. subspicatus</i>	EC50	74 mg/L	(Cleuvers <i>et al.</i> , 2003)
	lentilles d'eau	<i>L. minor</i>	EC50 (7d)	25,5mg/L	(Cleuvers <i>et al.</i> , 2003)
	cnidaire	<i>H.attenuata</i>	LC50(96h)	29,4 mg/L	(Quinn <i>et al.</i> , 2008)
		EC50(96h)	15,52 mg/L	(Quinn <i>et al.</i> , 2008)	
Sulfaméthoxazole	cnidaire	<i>H. attenuata</i>	LC50(96h)	> 100 mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
	rotifère	<i>B. calyciflorus</i>	LC50(24h)	26,27 mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
			EC50(48h)	9,63 mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
	crustacé	<i>T. platyurus</i>	LC50(24h)	35,36mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
	crustacé	<i>D. magna</i>	EC50(24h)	25,20mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
	crustacé	<i>C. dubia</i>	EC50(24h)	15,51 mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
	algue	<i>P. subcapitata</i>	EC50(72h)	0,52 mg/L	(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
Ciprofloxacine	algue	<i>M. aeruginosa</i>	EC50(24h)	49 µg/L	Robinson <i>et al.</i> , 2005)
	lentilles d'eau	<i>L. minor</i>	EC50(24h)	106 µg/L	Robinson <i>et al.</i> , 2005)
	lentilles d'eau	<i>L.gibba</i>	EC50(24h)	698 µg/L	Robinson <i>et al.</i> , 2005)
	algue	<i>S. capricornu</i>	EC50(24h)	7,4 mg/L	Robinson <i>et al.</i> , 2005)
	algue	<i>P. subcapitata</i>	EC50(24h)	18,7mg/L	Robinson <i>et al.</i> , 2005)

1.1.5 Bioaccumulation dans la chaîne trophique.

Les réseaux trophiques complexes, du phytoplancton aux poissons de grande taille, la longueur de la chaîne est caractéristique essentielle car elle joue sur la structure de la communauté et sur la diversité des espèces. Au delà des réseaux trophiques naturels qui sont sophistiqués et possèdent des architectures complexes, des chaînes linéaires ont leur place dans la théorie écologique et sont un moyen pour résumer les réseaux complexes entre les flux d'énergie entre les producteurs primaires et les prédateurs

au sommet de la chaîne alimentaire (Pace, 1999) L'efficacité du transfert de la production primaire du phytoplancton à la production secondaire du second maillon ainsi que le rendement de la production secondaire et de la production tertiaire sont évalués (Voutsas, 2002). La mise en place d'une chaîne trophique expérimentale en toxicologie en environnement permet de dépasser les simples constats de toxicité pour appréhender les mécanismes responsables de la bioaccumulation et des transferts de contaminants au sein des systèmes biologiques ainsi que les processus entraînant des effets subléthaux. Ces objectifs nécessitent d'évaluer l'influence des facteurs biotiques, abiotiques et de contamination (Voutsas, 2002). Selon un degré de réductionnisme plus ou moins important les méthodologies se caractérisent par différents niveaux d'études : de l'expérience en laboratoire, en milieu semi-naturel (mésocosme), jusqu'aux études de terrain (Amiard *et al.*, 1997). Elles permettent des niveaux de compréhension et d'extrapolation différents. Au sein d'un organisme, la bioaccumulation va dépendre de la nature du polluant, si il a un rôle biologique ou non, si il est régulé et excrété ou non par l'organisme (Amiard *et al.*, 1987). La bioaccumulation va dépendre aussi du sexe, de l'âge, de l'état physiologique, et du cycle de vie des organismes étudiés. Le degré de pollution, la dégradabilité du composé, la saison sont des facteurs qui peuvent aussi être déterminants. De plus, ces facteurs peuvent interagir sans que la part de chacun soit aisée à élucider (Amiard *et al.*, 1987). Une difficulté de la toxicologie est de pouvoir estimer dans quelle proportion les résultats acquis en laboratoire peuvent être extrapolés aux milieux naturels. Le moyen d'y remédier est de mieux estimer la spéciation chimique des polluants et les interactions entre eux ou avec d'autres facteurs abiotiques, mais aussi d'affiner nos connaissances sur la sensibilité des organismes (Amiard *et al.*, 1987 ; Correa-Reyes *et al.*, 2007 ; Spencer *et al.*, 1996).

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés particulièrement à trois catégories de composés prescrits pour des pathologies différentes. Destinés à la santé humaine voire animale, ils ont en commun de faire partie des six PPHB les plus prescrits au

monde (Molstad *et al.*, 2002). Si la consommation de la plupart des PPHB est inévitable pour le maintien de notre bien être, nous ne pouvons pas continuer à produire et consommer sans nous préoccuper des dommages collatéraux sur des espèces non-cibles. Pour mieux utiliser les PPHB dans l'environnement, nous devons améliorer notre connaissance des processus de toxicité, de transfert de toxicité et de l'impact sur les écosystèmes. Les effets directs et indirects sur notre écosystème doivent être étudiés afin de pouvoir les minimiser.

1.2. Réponse cellulaire au stress oxydatif

Le dosage des pharmaceutiques constitue un moyen de détecter une contamination du milieu mais ne permet pas de déterminer son impact sur les populations. Pour ce faire, le dosage des pharmaceutiques dans le milieu est souvent associé à l'utilisation de marqueurs biologiques et biochimiques comme l'activité des enzymes anti-oxydantes, du potentiel génotoxique (Isidori *et al.*, 2005), ou encore du niveau de peroxydation lipidique (Quinn *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2008). Les «biomarqueurs» sont définis comme une variation de composants, processus, structures ou fonctions cellulaires ou biochimiques, inductibles par les contaminants qui peuvent être mesurés dans un échantillon ou un système biologique (Lagadic *et al.*, 1997). Ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer la contamination d'un milieu mais aussi l'effet des pharmaceutiques au niveau cellulaire. L'outil de surveillance de l'environnement a donc évolué ces dernières années pour ajouter en complément du suivi chimique de la qualité de l'environnement aquatique, une veille biologique. Cette approche de surveillance biologique permet d'illustrer les relations entre la présence des contaminants chimiques dans le milieu et les réponses écologiques.

1.2.1 Formation des espèces activées de l'oxygène (EAO)

Un certain nombre de xénobiotiques organiques et inorganiques exercent leur toxicité par des mécanismes d'oxydo-réduction (Seaton *et al.*, 1995; Ercal *et al.*, 2001; Bagchi *et al.*, 2002). Ces mécanismes comprennent plusieurs événements distincts qui peuvent résulter dans des dommages oxydatifs directs, tels que la formation d'espèces actives de l'oxygène (EAO), l'apparition de couples redox (par exemple, le chrome [Cr (VI) / Cr (III)], et la formation d'intermédiaires réactifs de la molécule native (Ercal *et al.* 2001). Comme une alternative possible, les mécanismes d'action de certains xénobiotiques aussi peuvent interférer avec certains systèmes antioxydants essentiels, par exemple, le glutathion (GSH) du système, entraînant ainsi un déséquilibre redox (Geoffroy *et al.*, 2001 ; Gagne *et al.*, 2006 ; Quinn *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, les EAO constituent spécifiquement un moyen de défense des cellules végétales qui ne possèdent pas de système immunitaire car ils réagissent avec les composés biochimiques de la cellule. Ils sont produits naturellement dans la cellule. Les EAO sont des molécules qui présentent un ou plusieurs électrons appariés (Halliwell, 2006) formant des radicaux libres. Le dioxygène, en dépit de permettre le développement du métabolisme aérobie, est une molécule réactive qui peut mener à la formation de EAO qui peuvent ensuite altérer des molécules biologiques. La réactivité du dioxygène est limitée aux molécules capables d'apporter un ou deux électrons non appariés. La transformation énergétique de la molécule de dioxygène mène, dans un premier temps à la formation de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui est très instable, sa concentration dans la cellule peut donc être considérée comme négligeable (Foyer et Noctor, 2005). Lorsqu'un électron est transféré au dioxygène, se constitue l'anion superoxyde (O_2^-), qui réagit entre autre avec les lipides pour former des hydroperoxydes. La réduction du dioxygène par deux électrons mène à la formation de peroxyde (H_2O_2), qui oxyde préférentiellement les molécules qui possèdent des groupements thiols ($-\text{SH}$) (Halliwell, 2006). Deux radicaux hydroxyles

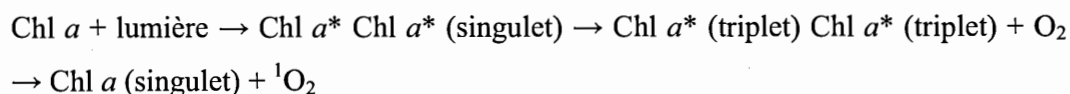
(OH) sont formés suite à la réaction du peroxyde avec deux électrons tandis qu'une réaction avec quatre électrons mène à la formation de H₂O. Les radicaux hydroxyles réagissent avec tous types de molécules tandis que l'anion superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagissent préférentiellement avec des enzymes (Halliwell, 2006). La quantité de H₂O₂ dans la cellule est de l'ordre du micromolaire (Halliwell, *et al.*, 2006).

C'est pourquoi les cellules d'organisme aérobie possèdent des molécules ayant un fort pouvoir réducteur, comme les couples GSH/GSSG (glutathion réduit/glutathion oxydé), NAD(P)/NAD(P)H (nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé/réduit), TRXox/TRXred (thiorédoxine oxydée/réduite), Fdox/Fdred (ferrédoxine oxydée/réduite) et, surtout chez les plantes, l'ascorbate (déhydroascorbate/ascorbate) (Foyer et Noctor, 2011). Le GSH et l'ascorbate peuvent réduire l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène et servent aussi de co-substrat aux enzymes anti-oxydantes de détoxication des EAO. En effet, ils sont impliqués dans la voie dite Halliwell-Asada au cours de laquelle le H₂O₂ est réduit en H₂O et en monodéhydroascorbate (MDHA) par l'ascorbate peroxydase (APX) en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électrons. Par la suite le MDHAR, un enzyme de type adénine dinucléotideflavine (FAD), va réduire l'acorbate oxydé (MDHA), et recycler l'ascorbate et le déshydroascorbate (DHA) en utilisant le NAD(P)H. Le DHA sera quant à lui réduit en ascorbate par la déshydroascorbate réductase (DHAR) qui va utiliser du glutathion (GSH) comme donneur d'électrons. Le glutathion oxydé (GSSG) sera réduit ensuite par la glutathion réductase (GR) en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (Noctor et Foyer, 1998). Ils participent ainsi à l'homéostasie redox de la cellule et dans des conditions normales, le cytoplasme cellulaire est un milieu réducteur (Foyer et Noctor, 2005).

Les chaînes de transport d'électrons des chloroplastes sont des sources majeures d'EAO. Suite à une exposition à des xénobiotiques, lorsque l'énergie d'excitation de

la chlorophylle n'est pas utilisée pour la photochimie, elle peut être transmise au dioxygène. Dans l'appareil photosynthétique, au niveau du photosystème I (PSI), une surcharge d'électrons peut mener à une déviation des électrons de l'accepteur principal, le NADP⁺, vers l'oxygène (réaction de Mehler) par la ferrédoxine. Cette voie est amplifiée quand le cycle de Calvin est inhibé par des xénobiotiques ou quand les enzymes du cycle de Calvin sont dégradées par les EAO (Foyer et Noctor, 2011). Au niveau du PSII, la photolyse de l'eau peut aussi générer des EAO et engendrer des dommages oxydatifs (Niyogi, 1999). Nishiyama *et al.*, (2006) ont montré que la protéine D1 constitutive du PSII est sensible aux EAO et peut subir directement des dommages oxydatifs ou voir sa synthèse inhibée.

La chlorophylle *a* excitée a également la capacité de transmettre un électron au dioxygène suite à la séparation des charges :



Les EAO peuvent se retrouver dans le lumen où ils sont dégradés par la superoxydedismutase (SOD), responsable de la dismutation du H₂O₂ (Asada *et al.*, 1974). Chez certains organismes photosynthétiques, des pigments accessoires de l'antenne collectrice des photosystèmes, les caroténoïdes, forment un autre système anti-oxydant non enzymatique. Leur capacité à capter l'énergie de la chlorophylle triplet et de l'oxygène singulet leur confère des propriétés anti-oxydantes. Ils retrouvent leur état initial en perdant leur énergie sous forme de chaleur (Niyogi, 1999).

1.2.2 Les systèmes antioxydants comme marqueur de stress

Le métabolisme des xénobiotiques est complexe et implique plusieurs enzymes. Dans une première phase du métabolisme des xénobiotiques, un groupement réactif comme

l'hydroxyle est généralement ajouté à un xénobiotique. Dans un second temps, les xénobiotiques sont conjugués avec un métabolite endogène. Cette conjugaison rend plus hydrophyles les xénobiotiques et facilite leur excrétion. Il existe une certaine diversité parmi les enzymes impliquées dans les deux phases de détoxification et elle est augmentée par les différences qu'on retrouve selon les espèces et les types cellulaires. Un xénobiotique peut avoir des effets différents, induire ou activer les enzymes. La plupart des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques existent sous forme d'isoenzymes qui coexistent dans un individu et qui peuvent intervenir différemment, selon le sexe ou les stades de développement par exemple (Daughton et Ternes, 1999).

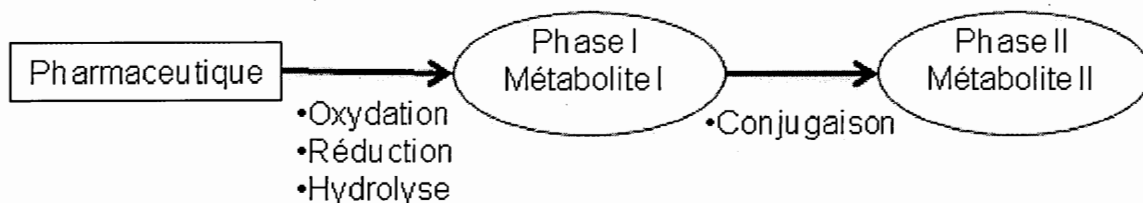
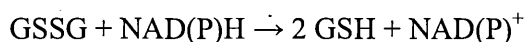


Figure 1.4: Représentation schématique de la biotransformation des pharmaceutiques pour augmenter leur polarité, adapté de Daughton (1999).

La plupart des pharmaceutiques sont métabolisés par des enzymes de biotransformation de phase I. Cette étape n'est pas obligatoire certains pharmaceutiques sont métabolisés directement par des enzymes de phase II (voir ci-après). Les cytochromes de type P450 ajoutent généralement un groupement réactif comme un groupement hydroxyle tout en consommant de l'oxygène et du NADPH. En conséquence, à cette étape les xénobiotiques deviennent des molécules réactives, qui peuvent être plus toxiques que le composé parent. Les enzymes du cytochrome P450 impliquées dans le métabolisme des pharmaceutiques sont les enzymes Cyp3A4, Cyp1A1, Cyp1A2, Cyp2D6, et Cyp2C. Du fait du manque d'informations spécifiques des cytochromes P450 chez les algues et les invertébrés, un essai

générique pour toutes les P450 a été mis au point qui consiste à évaluer l'activité hème oxydase des hémoprotéines dénaturées (Thomas *et al.*, 1976).

Si ces molécules ne sont pas métabolisées en phase II, elles peuvent causer des dommages aux protéines, à l'ARN, et à l'ADN cellulaire (Smith et Brian, 1991). Les enzymes de phase II conjuguent les xénobiotiques avec une molécule endogène qui rend ces composés hydrosolubles et ainsi plus faciles à excréter à travers l'urine ou la bile. Plusieurs types de conjugaisons existent comme la glucuronidation, la sulfation, l'ajout d'acide aminé ou d'un groupement glutathion. L'activité de biotransformation de phase II peut être évaluée par la glutathion-S-transférase, sa conjugaison de la CBZ hydroxylée a été mise en évidence (Jancova *et al.*, 2010). De plus, l'activité de la glutathion réductase (GR) est impliquée dans la maintenance du niveau cellulaire de glutathion. Elle constitue la dernière réaction enzymatique du cycle Asada-Halliwell-Foyer. Il s'agit d'un cycle de réactions enzymatiques successives qui permet la réduction de H₂O₂ dans le stroma du chloroplaste, dans les mitochondries ou dans le cytosol. La glutathion réductase (GR) est une flavoprotéine qui utilise le NADP(H) comme co-facteur. La réaction catalysée par la GR est la suivante:



Le glutathion (GSH) joue un rôle déterminant car il contribue à la régulation du potentiel redox de la cellule, agissant comme tampon dans les cellules, et constitue un des systèmes non-enzymatiques de la cellule. Sa synthèse est stimulée lors de situations de stress et son accumulation est associée à une augmentation de la concentration des EAO. Le glutathion réduit principalement les peroxydes et sa concentration dans les cellules végétales peut s'élever à 5mM (Foyer et Noctor, 2011). Sa forme réduite (GSH) est très soluble dans l'eau et sa forme oxydée (GSSG) peut être jusqu'à 100 fois moins concentrée dans le cytosol que dans la mitochondrie (Noctor et Foyer, 1998). Par la suite, les catalases (CAT) sont des enzymes qui vont

catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène. On les retrouve proche des peroxysomes mais aussi des chaînes de transport d'électrons. La mesure de l'activité catalasique est souvent utilisée pour observer les effets de stress (Halliwell, 2006).

Pour détecter l'exposition à des contaminants comme les PPHB, la mesure des activités enzymatiques spécifiques a souvent été utilisée ces dernières années en tant que marqueur biochimique (Blaise, *et al.*, 1998). En effet, ces enzymes sont souvent solubles et certaines sont inductibles par les contaminants dont elles permettent la détoxification. Cette caractéristique rend leur activité intéressante à mesurer et en fait un marqueur biochimique. Leur intérêt en tant que biomarqueurs a été démontré par exemple, suite à des contaminations aux pesticides chez *L. minor* (Teisseire et Vernet, 2000 ; 2001) et chez *Scenedesmus obliquus* (Geoffroy, *et al.*, 2001).

1.2.3 Conséquences du stress oxydatif sur l'altération des lipides.

Les lipides et en particulier les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée des EAO. La peroxydation des lipides consiste en la formation de nouveaux radicaux lipidiques. Ce processus se décrit selon un mode d'action en 3 étapes : 1) initiation par un radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), hydroperoxyde ($\text{HOO}\cdot$) ou lipidique ($\text{LO}\cdot$; $\text{LOO}\cdot$); 2) propagation : le radical alkyl forme un radical peroxyde en réagissant avec $^3\text{O}_2$; 3) terminaison : l'assemblage des radicaux lipidiques résulte en un produit non radicalaire (Cillard et Cillard, 2006). Des composés comme les tocophérols ou la glutathion peroxydase sont capables d'interrompre ces chaînes de peroxydation (Cillard et Cillard, 2006). La peroxydation lipidique vient perturber la fluidité membranaire et modifier le transport des électrons. Cela peut favoriser la formation d'EAO et amplifier le processus. Le taux de MDA (acide malonedialdéhyde) est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par certains contaminants (HAP, PCB, pesticides, métaux). Les hydroperoxydes ainsi formés se décomposent en intermédiaires radicalaires et en aldéhydes dont un des représentants

les plus réactifs est le MDA. Le MDA est un agent alkylant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le dosage de ce composé présente donc un intérêt certain chez les espèces soumises à des contaminations multiples (Narbonne *et al.*, 1991). La méthode d'analyse du MDA appelée TBARS (Thio Barbituric Acid Reactive Species) traduit une peroxydation lipidique (Pellerin-Massicote, 1994). Elle peut donc aussi inclure la réactivité d'autres entités radicalaires.

1.3 Toxicité des PPHB sur la photosynthèse

1.3.1 Le fonctionnement de l'appareil photosynthétique

1.3.1.1 Conversion de l'énergie lumineuse en énergie photochimique

Le photosystème II (PSII), localisé dans les membranes des thylacoïdes des chloroplastes, est hautement efficace dans la conversion de l'énergie lumineuse en énergie photochimique par une étape de séparation de charges (Diner et Babcock, 1996). Il utilise l'énergie lumineuse pour extraire quatre électrons à partir de l'eau ce qui libère du dioxygène. Les électrons sont ensuite transférés à travers une chaîne de cofacteurs redox vers la plastoquinone terminale Q_B (Figure 1.5) (Joliot *et al.*, 1969 ; Kok *et al.*, 1970 ; Diner et Babcock, 1996; Goussias *et al.*, 2002).

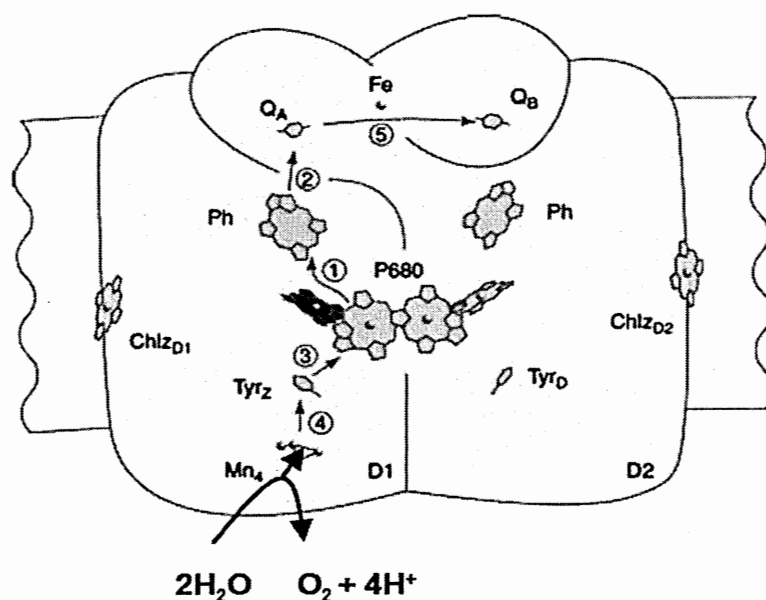


Figure 1.5: Modèle simplifié du centre de réaction de PSII. Les protéines D1 et D2 sont représentées ainsi que les principaux co-facteurs impliqués dans les réactions de transfert d'électrons. Fe: fer; Mn_4 : complexe de manganèse; P680 : pigments de la chlorophylle qui sont oxydés à 680 nm; Ph : phéophytine; Q_A et Q_B : plastoquinone A et B ; TyrZ et TyrD: tyrosine (adapté de (Rutherford et Krieger-Liszky, 2001))

L'absorption de la lumière par le PSII mène à un état excité des pigments de la chlorophylle, $*P680$, puis $*P680$ donne un électron à une molécule voisine, la phéophytine (Pheo) (Figure 1.5) et forme une paire de radical $P680^+Pheo^-$ (étape 1, Figure 1.5). Cette séparation de charge est stabilisée par le transfert d'électrons à la plastoquinone Q_A formant la paire de radical $P680^+Q_A^-$ (étape 2, Figure 1.5). Par la suite, le cation $P680^+$ hautement réactif extrait un électron d'une tyrosine, TyrZ (étape 3, Figure 1.5). Après l'oxydation, TyrZ éjecte un proton et la paire de radicaux $TyrZ(H^+)Q_A^-$ est stabilisée par les électrons fournis par le complexe de manganèse (étape 4, Figure 1.5). Par la suite, l'électron transféré de Q_A^- à Q_B mène à la formation stable de $S_2Q_B^-$ (étape 5, Figure 1.5). Cette étape de séparation de charge

caractérise la conversion d'énergie lumineuse en énergie photochimique. La formation de $^3\text{P680}$ peut arriver en cas de recombinaison de charge (à partir de la paire $\text{P680}^+\text{Pheo}^-$) et potentiellement former $^3\text{O}_2$ à partir de O_2 ce qui occasionne alors des dommages oxydatifs à la cellule (cf. chapitre 1 partie 1.2.1).

Du côté accepteur d'électrons, le transfert d'électrons implique deux plastoquinones acceptrices d'électrons, une quinone primaire Q_A et une quinone secondaire Q_B . Bien que les deux soient des plastoquinones, leurs propriétés physiques et chimiques diffèrent. Q_A peut accepter un seul électron ce qui n'entraîne pas de protonation observable (Diner et Babcock, 1996). Q_B de son côté, accepte deux électrons et deux protons formant un intermédiaire stable de semi-quinone Q_B^- (Bouges Bocquet, 1973; Diner et Babcock, 1996). Malgré sa stabilité, sa forme réduite est échangeable avec le pool de quinone dans la membrane (Velthuys, 1981).

La conversion d'énergie lumineuse en énergie photochimique a lieu également au niveau du PSI et de ses antennes collectrices. L'absorption de l'énergie lumineuse par antennes collectrices de lumière du PSI fait passer le centre réactionnel du PSI à l'état excité (P700^*). Puis la séparation de charge se fait entre le P700^* et la molécule de chlorophylle *a* (A_0). La plastocyanine va ensuite fournir un électron au P700^+ , qui est successivement transféré à la phylloquinone, aux complexes protéiques fer-souffre, puis à la ferrédoxine pour réduire l'accepteur final d'électron, le NADP^+ , catalysé par la ferrédoxine NADP^- réductase (Jensen *et al.*, 2007).

1.3.1.2 Relation entre le potentiel redox de Q_A et la dissipation d'énergie non-photochimique

Le potentiel redox de Q_A dépend du retour à l'état réduit de P680 qui peut se faire directement entre Q_A^- et P680^+ ou bien en passant par une étape intermédiaire de réduction de la phéophytine (Pheo). Des facteurs environnementaux peuvent ralentir la réaction retour. Par exemple, le bromoxonyl, un herbicide phénolique, vient

encombrer physiquement la région, fait passer la réaction retour par la voie indirecte Pheo avec un plus haut rendement et donne lieu à la formation de $^3\text{P680}$. Ce $^3\text{P680}$ peut ensuite réagir avec $^3\text{O}_2$ formant des espèces activées de l'oxygène (EAO), $^1\text{O}_2$. Par contre, l'utilisation d'un herbicide de type uréique (DCMU), qui va augmenter le potentiel redox du couple $\text{Q}_\text{A} / \text{Q}_\text{A}^-$, vient favoriser la formation directe de $(\text{P}^+ \text{Q}_\text{A}^-)$ plutôt que de $(\text{P}^+ \text{Pheo}^-)$. Ainsi la formation de $^1\text{O}_2$ est diminuée dans ce cas, en présence de DCMU plutôt que d'un herbicide phénolique (Fufezan *et al.*, 2007). Le potentiel redox du couple $\text{Q}_\text{A} / \text{Q}_\text{A}^-$ est donc déterminant quand à la formation de $^3\text{P680}$ et la formation de EAO.

1.3.1.3 Le transfert cyclique d'électrons au niveau du PSI

Un transfert cyclique d'électrons autour du PSI est observé lorsque les électrons, situés du côté accepteur du PSI, sont redirigés vers les transporteurs situés entre les deux photosystèmes, tels que le pool de PQ ou le cytochrome b6/f. Ce mécanisme permet la synthèse d'ATP car il s'accompagne d'un transfert de protons du stroma vers le lumen des thylacoïdes (Arnon, 1955). Un herbicide, le méthylviologène (MV), est connu pour être un accepteur d'électrons provenant du côté accepteur du PSI et vient inhiber le transfert cyclique d'électrons. Le DBMIB, un analogue des quinones qui agit au niveau du site Qo du cytochrome b6/f, va à la fois bloquer le transport d'électrons au-delà du cyt b6/f (Trebst et Reimer, 1973 ; Cleland et Bendall, 1992) et empêcher la réoxydation du pool de PQ. Cette dernière étape étant déterminante, car c'est l'état redox du pool de PQ qui permet la circulation cyclique des électrons au niveau du PSI (Figure 1.6).

Il a aussi été montré que le NADH pouvait réduire le pool de PQ *via* une NAD(P)H réductase (NDH) et constituer une voie de réduction non-photochimique (Mills *et al.*, 1979 ; Endo *et al.*, 1997 ; Corneille *et al.*, 1998) sur des thylacoïdes de *C. reinhardtii* (Godde et Trebst, 1980), d'épinard ou de pomme de terre (Endo *et al.*, 1997 ; Corneille *et al.*, 1998). Une étude récente a mis en évidence un complexe impliquant

une NAD(P)H-déshydrogénase étroitement associé sous forme de super complexe avec le photosystème I chez *Arabidopsis* (Peng et Shikanai, 2011). Une autre voie alternative a été mise en évidence, chez les plantes supérieures, pour le transport cyclique d'électrons, impliquant la ferrédoxine-réductase et la protéine PGR5 (Munekage *et al.*, 2002; Dal Corso *et al.*, 2008) sans que leur rôle soit tout à fait défini (Nandha *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2008). Il a été suggéré que le transport cyclique d'électrons est essentiel pour l'équilibre ATP/NADPH, mais aussi pour la protection des photosystèmes contre la réduction de l'appareil photosynthétique par les réductants du stroma (Miyake, 2010) car le transport cyclique d'électrons est capable de générer un gradient de protons et donc d'induire un quenching non-photochimique pour dissiper l'énergie lumineuse absorbée en excès (Niyogi, 1999).

En présence de stress osmotique, la double augmentation de l'activité et de la concentration de PSI par rapport à PSII a été observée (Canaani, 1990; Schubert et Hagemann, 1990; Jeanjean *et al.*, 1993). L'augmentation de l'activité de PSI / PSII est un résultat du transfert cyclique d'électrons autour du PSI (Hibino *et al.*, 1996), ce qui augmente le niveau d'ATP, nécessaire pour le transport ionique. Il a souvent été observé que le transfert cyclique d'électrons autour du PSI est stimulée en conditions d'anaérobiose, de stress oxydatif ou ionique (Ravenel *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 1995). Le transfert cyclique d'électrons autour du PSI protège le chloroplaste contre des dommages photooxydatifs irréversibles en maintenant un gradient de protons transthylacoïdaux quand le transport linéaire d'électrons est limité. De la même manière, suite à un stress oxydatif chez *Chlorella vulgaris*, la synthèse de protéines reliées au PSI est augmentée, ce qui favorise la réception des électrons provenant de PSII (Qian *et al.*, 2008). Cette stratégie de protection de la photosynthèse constitue un processus adaptatif particulièrement observé dans des conditions défavorables (Pfannschmidt, 2003).

Chez *C. acidophila*, un faible pH environnemental (entre 1.5 et 5) a pour effet d'augmenter le transport d'électrons tandis que le transfert cyclique autour du PSI est encore peu actif (Gimmler *et al.*, 2000; Gerloff-Elias *et al.*, 2005). Cette augmentation de la pression sur le PSII ajoutée à une augmentation du NPQ se traduit soit par une augmentation de l'importance du cycle des xanthophylles et de la concentration en zéaxanthine, soit par une transition en stade 2 qui correspond à un déplacement des antennes collectrices vers le PSI (Goss et Garab, 2001). En effet, les antennes collectrices du PSI ont des spectres d'absorption différents de ceux du PSII : l'activité du PSI est favorisée par une lumière d'excitation à 710 nm alors qu'elle est de 680 nm pour le PSII. L'ajustement de la taille des antennes collectrices permet de réguler la vitesse de transport des électrons entre les deux photosystèmes selon la distribution d'énergie lumineuse absorbée par les deux photosystèmes. Le stade 1 s'obtient quand la taille des antennes du LHCI associées au PSII augmente et que celle des antennes LHCI associées au PSI diminue, l'inverse correspond à l'état 2. Ces états s'obtiennent du fait de la réversibilité de la liaison des antennes aux photosystèmes. Chez *C. reinhardtii*, le choc osmotique stimule la donation d'un électron chlororespiratoire des composants du stroma vers le pool de plastoquinone, ce qui a pour effet de réduire la chaîne intersystème et de favoriser le passage au stade 2 (Endo *et al.*, 1995). En outre, le déroutage des électrons vers l'oxygène en aval du PSII mais en amont du PSI, soit *via* la chlororespiration, est une stratégie parmi d'autres qui permet de détourner les contraintes inhérentes à des conditions lumineuses ou de nutriments et qui permet la colonisation des algues des environnements aquatiques (Cardol *et al.*, 2008).

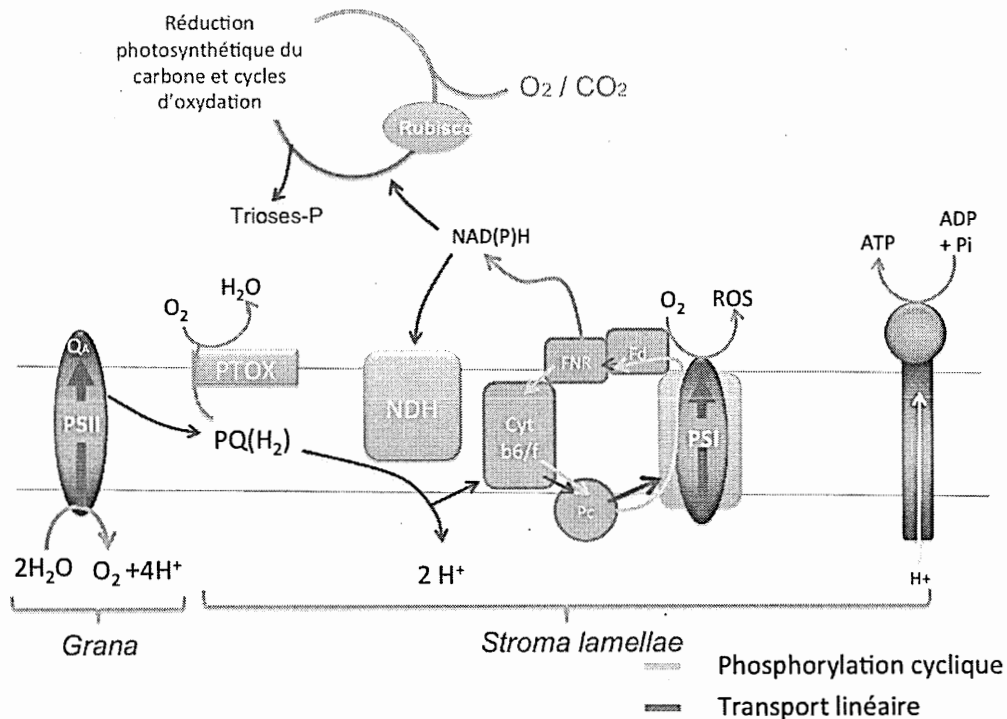


Figure 1.6: Transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique. Le photosystème II situé dans le grana, transfère ses électrons au cytochrome b₆/f qui migre dans les lamelles stromales où se trouve le photosystème I avec l'ATP synthase, la NDH, la PTOX et la Rubisco (adapté de Peltier (2010)).

1.3.1.4 La consommation d'O₂ dans les chloroplastes

La séparation de charge induite par l'absorption de l'énergie lumineuse par les antennes collectrices du PSII a pour effet de délocaliser un électron au niveau de la Chl *a* qui est ensuite transféré à la chaîne photosynthétique (cf Figure 1.6). L'accumulation de charges positives au niveau du complexe de dégagement d'oxygène (OEC), qui se trouve du côté donneur du PSII, permet la photolyse de l'eau entraînant une production de dioxygène. Au cours de la photosynthèse, au niveau du côté accepteur du PSI, l'oxygène moléculaire peut être utilisé comme

accepteur final d'électrons au lieu du NADPH. Cela conduit à la formation d'anion superoxyde et constitue la réaction de Mehler (Mehler, 1951). La détoxification des formes actives de l'oxygène qui sont produites lors de cette réaction font intervenir des réactions enzymatiques impliquant la superoxyde dismutase (SOD) et le cycle ascorbate-glutathion. L'oxygène produit au niveau du PSII et réduit au niveau du PSI amène un bilan nul pour les échanges net de dioxygène.

Le dioxygène peut également être réduit au niveau du pool de plastoquinone : la réoxydation du pool de PQ par la PTOX a pour effet de réduire O₂, l'eau étant le produit final de la réduction du dioxygène (cf Figure 1.6). Au cours de ce processus, une étude a mis en évidence un ratio 1:1 entre la production d'oxygène et sa réduction, à partir de dioxygène radiomarqué et en utilisant la spectrométrie de masse (Cournac *et al.*, 2000). Cela vient confirmer que les électrons du stroma sont transférés au pool de PQ puis au dioxygène *via* PTOX.

Il a été montré que PTOX transfère efficacement des électrons en excès au dioxygène et joue ainsi un rôle important dans la photoprotection du PSII chez l'espèce alpine *Ranunculus glacialis* quand elle est acclimatée à faible température (Streb *et al.*, 2005). Chez la cyanobactérie marine *Synechococcus*, PTOX semble avoir pour rôle de maintenir le PSII oxydé sous des conditions fluctuantes de lumière quand l'activité du PSI est limitée du fait de faibles concentrations en fer (Bailey *et al.*, 2008). Le modèle originale de Bennoun, en 1982, localisait une oxydase terminale du côté luminal de la membrane de thylacoïdes (Bennoun, 1982). Cependant le modèle actuel place plutôt la PTOX du côté stromal de la membrane (Lennon *et al.*, 2003 ; Peltier *et al.*, 2010). De plus, il a été relevé que la chlororespiration n'était pas électrogénique mais que PTOX ne pouvait produire un gradient de protons seulement si elle était couplée à la NDH (Cournac *et al.*, 2000).

1.3.1.5 La consommation d'O₂ dans les mitochondries

La respiration implique l'oxydation de composés carbonés et la production de NADH ou de FADH et une production simultanée de CO₂ (Figure 1.7). Les réductants (NADH ou FADH) sont oxydés par la suite par la chaîne photosynthétique, et la phosphorylation oxydative, pour produire de l'ATP en consommant du dioxygène au profit de l'eau. Si la photosynthèse est un processus de réduction, la respiration est un processus d'oxydation qui fait intervenir des complexes protéiques localisés au sein de la membrane interne mitochondriale (Douce et Neuburger, 1989).

Le complexe I, NADH déshydrogénase, oxyde le NADH et les électrons sont transférés au pool d'ubiquinone, puis au cytochrome bcl (complexe III) et au cytochrome c oxydase (complexe IV). Ces complexes ont une activité électrogénique, un gradient de protons est formé entre la matrice et l'espace intermembranaire, ce qui permet la synthèse d'ATP (Krömer *et al.*, 1995).

Le pool d'ubiquinone (UQ) peut être réduit par le complexe succinate déshydrogénase (complexe II) en oxydant le FADH₂ et sans produire de gradient de protons. La Ndh II reductase permet aussi la réduction du pool d'UQ en présence de NADH. L'oxydation du pool d'ubiquinone peut se faire à son tour grâce à une oxydase respiratoire alternative (AOX) qui réduit le dioxygène en eau (Vanlerberghe et McIntosh, 1997).

L'importance des voies de transport d'électrons mitochondriales par le cytochrome ou par AOX peut être étudiée en utilisant des inhibiteurs spécifiques. Par exemple : l'acide salicylhydroxamique (SHAM), un inhibiteur de AOX ; le myxothiazol (MX) ou l'antimycine A, des inhibiteurs de la voie principale de transport d'électrons (cytochrome bc1). Ces composés diminuent la production de dioxygène sans altérer la photosynthèse chez les algues *C. reinhardtii* (Cournac *et al.*, 2002). À l'obscurité, le rapport NADPH/NADP⁺ augmente dans les chloroplastes de *C. reinhardtii* grâce à

un contrôle du potentiel redox causé par l'activité mitochondriale (Rebeille et Gans, 1988 ; Gans et Rebeille, 1990). La respiration dans le noir peut être stimulée par l'intensité lumineuse précédant la phase d'obscurité. L'utilisation du SHAM montre l'importance de cette respiration chez les algues *Selena stumminutum*, *C. reinhardtii*, et *Euglena gracilis* (Lynnes et Weger, 1996; Xue *et al.*, 1996 ; Ekelund, 2000).

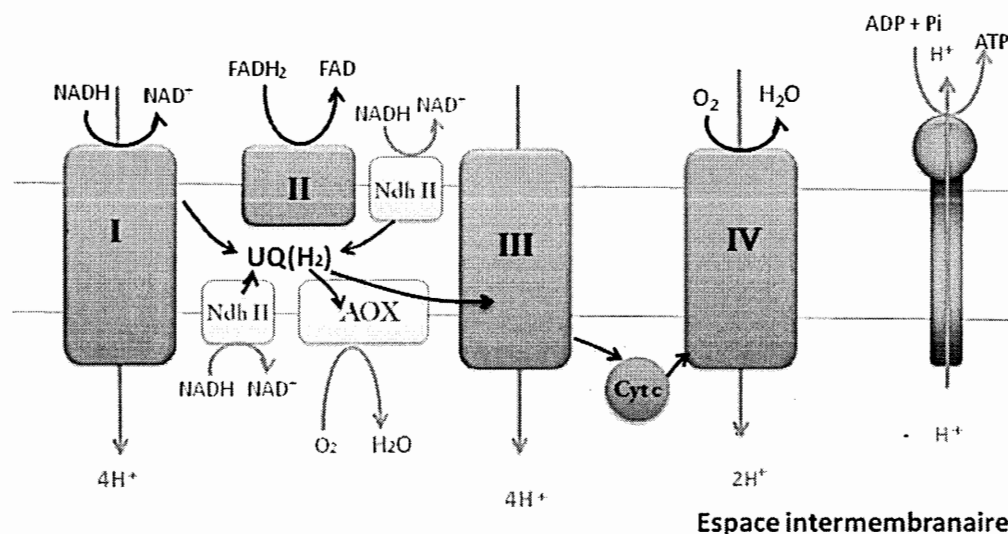


Figure 1.7: Transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Vanlerbergue et Mac Intosh, 1997). Les électrons sont transférés du complexe I au complexe IV (en noir), ce qui s'accompagne de la translocation de protons pour les complexes I, III, et IV. Le gradient de pH transmembranaire active l'ATP synthase (flèche rouge). Une alternative oxydase (AOX) permet l'oxydation de UQ(H₂) en amont du complexe III, et sa réduction est observée en présence de NADH par la Ndh II réductase. Complexe I : NADH déshydrogénase, complexe II : succinate déshydrogénase, complexe III : cytochrome b₁ oxydoréductase, complexe IV : cytochrome c oxydase.

1.3.1.6 Fixation du CO₂

La fixation du CO₂ se fait dans le stroma des thylacoïdes par la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui catalyse la production de 3-

phosphoglycérate (3-PGA) à partir du ribulose 1,5-bisphosphate et de CO₂. Le 3-PGA rentre dans le cycle de Calvin où il est converti en triosephosphates, entraînant la consommation du NADPH et de l'ATP, eux-mêmes produits grâce au transport photosynthétique d'électrons. Une limitation en CO₂ amène une réduction de la consommation de NADPH dans le cycle de Calvin, et diminue le pool de NADP⁺ disponible dans la cellule. Comme le NADP⁺ est un accepteur d'électrons majeur dans la cellule : son absence augmente la réduction, à sa place, de O₂, ce qui vient générer des espèces activées de l'oxygène (EAO) (Asada, 1999).

Sous l'effet de stress oxydatif, la production de H₂O₂ vient détruire les protéines, comme la Rubisco, enzyme responsable de l'assimilation du CO₂ (Knopf et Shapira, 2005) ou la protéine D1 dans les chloroplastes (Takahashi et Murata, 2006; Nishiyama *et al.*, 2001). De plus, parmi les herbicides les plus répandus, le glufosinate, en plus d'induire un stress oxydatif chez l'algue unicellulaire *C. vulgaris* (augmentation du MDA; de l'activité enzymatique de la SOD, de la CAT et de la peroxydase) diminue aussi significativement le nombre de transcrit du gène *rbcl* qui code pour la grande sous-unité de la Rubisco (Qian *et al.*, 2008). De plus, sous l'effet d'un stress oxydatif, l'agrégation des ARNm de la Rubisco sous forme de granules est mise en évidence chez *C. reinhardtii* (Knopf et Shapira, 2005) ce qui bloque la transcription de la Rubisco. Plus spécifiquement, de fortes intensités lumineuses induisent un stress oxydatif et sont responsables de la localisation des ARNm cellulaires dans des granules localisés dans les chloroplastes (cpSG) de *C. reinhardtii* (Uniacke et Zerges, 2008). Dans ces granules de stockage et de protection des ARNm, la synthèse de la Rubisco est aussi réprimée directement. C'est d'abord le stress oxydatif qui réprime la transcription de la Rubisco plutôt que l'inhibition de l'appareil photosynthétique (Uniacke et Zerges, 2008) ainsi l'inhibition du PSII par le DCMU, un herbicide du PSII, n'active pas significativement la formation de ces granules. Sous l'effet de l'intensité lumineuse, la suppression de la synthèse de la grande sous-unité de la Rubisco a pour conséquence le blocage de la photorespiration

qui mène à une baisse des réactions de la photosynthèse (Sauer *et al.*, 1987; Lacuesta *et al.*, 1992), en dépit de la stimulation de la synthèse de novo de la protéine D1 du PSII (Shapira *et al.*, 1997).

1.3.1.7 Synthèse d'ATP

Le maintien du gradient de protons au niveau des membranes des thylacoïdes est essentiel à la synthèse d'ATP. Quand l'apport énergétique est insuffisant, le cytosol est rapidement acidifié (Gimmler, 2001). Le coût métabolique pour maintenir un pH cytosolique neutre au sein d'un milieu environnemental acide se reflète par une plus grande activité photosynthétique nette (Gerloff-Elias *et al.*, 2005). Ainsi dans le cas particulier de cette étude, chez *C. acidophila*, l'effet du pH est prédominant par rapport à l'intensité lumineuse car la variation de l'intensité lumineuse sous-saturante ou supra-saturante (10 et 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) n'affecte ni la croissance, ni la photosynthèse nette ou la production d'oxygène (Gerloff-Elias *et al.*, 2005). D'après Gimmler *et al.* (2001) cette activité respiratoire dans le noir est suffisamment importante et déterminante pour expliquer d'une part, qu'un faible pH extracellulaire n'est pas une cause majeure de la baisse du taux de croissance en milieu naturel et d'autre part, la survie des algues en milieu acide. Langner, *et al.*, (2009) montrent que l'adaptation à un milieu environnemental acide est favorisée par une augmentation de la respiration au noir et une diminution de l'efficacité de l'absorption de la lumière en comparant *C. acidophila* avec *C. reinhardtii*.

L'inhibition de la synthèse d'ATP bloque la réparation du PSII, qui inclut les étapes de dégradation de la protéine D1, synthèse du précurseur de la protéines D1, insertion du précurseur nouvellement synthétisé dans la membrane du thylacoïde avec d'autres protéines du PSII, maturation de la protéine D1, assemblage du OEC (Allakhverdiev *et al.*, 2005). En effet, le DCCD, un inhibiteur de la synthèse d'ATP, bloque la synthèse de la protéine D1 (Murata *et al.*, 2007), ce qui ce qui montre que le niveau d'ATP plutôt que le gradient de protons est essentiel pour le remplacement de la protéine D1.

Par extension, la réparation du PSII est sensible au niveau d'ATP alors que la dégradation du PSII n'est pas affectée par le transport d'électrons ou le niveau d'ATP. En effet, la vitesse de dégradation du PSII est proportionnelle à l'intensité lumineuse mais n'est pas affectée par l'inhibition du transport d'électrons au niveau de PSII, ni par l'accélération du transport au niveau de PSI ou par l'inhibition de la synthèse d'ATP (Allakhverdiev *et al.*, 2005; Hakala *et al.*, 2005).

1.3.1.8 Quelques particularités de l'appareil photosynthétique des diatomées

Les diatomées forment le plus grand groupe taxonomique des eucaryotes unicellulaires (Adl *et al.*, 2005) grâce à leur aptitude à développer une phase rapide de croissance qui leur permet de dominer le phytoplancton par leur biomasse quand les conditions sont favorables. Elles jouent un rôle important parmi les cyanobactéries, les haptophytes, et les dinoflagellés marines dans la régulation de la concentration en CO₂ atmosphérique et alimentent les couches profondes des océans en matière organique quand les conditions de croissance sont défavorables. Le succès des diatomées s'explique par leur capacité à utiliser la silice pour la synthèse des composants de leur membrane cellulaire nommée frustule. La morphologie de la frustule est différente selon les espèces. Cette particularité joue un rôle dans le pH de la cellule car il est connu que la silice de la membrane est un excellent tampon. Les diatomées sont le résultat de l'endosymbiose d'une algue eucaryote photosynthétique, probablement une espèce d'algue rouge, par un eucaryote non photosynthétique (Oudot-Le Secq *et al.*, 2007; Oudot-Le Secq et Green, 2011). Cela a pour conséquence que les chloroplastes des diatomées possèdent une enveloppe membranaire constituée de quatre bicouches (Wilhelm *et al.*, 2006). La couche extérieure est liée au réticulum endoplasmique et forme un réticulum endoplasmique chloroplastique (Kilian et Kroth, 2005). Les membranes de thylacoïdes des diatomées ne sont pas différenciées en grana et en lamelles stromales : il n'y a pas de grana

contrairement aux algues vertes. Les membranes de thylacoïdes forment un groupe de trois lamelles empilées sur toute la longueur du chloroplaste.

De plus, il existe quelques différences dans la composition des protéines intrinsèques au PSII. Des espèces de diatomées côtières ne possèdent pas de plastocyanine qui est remplacée par le cytochrome *c6* qui constitue le transporteur d'électron mobile entre le *cytb6/f* et le PSI (Bohme et Kunert, 1980). Cependant des espèces océaniques utilisent la plastocyanine, comme chez *Thalassiosira oceanica* (Peers et Price, 2006) et d'autres possèdent les deux protéines (Marchetti, *et al.*, 2012; Peers et Price, 2006). La protéine PsaM qui joue un rôle dans la trimérisation du PSI chez les cyanobactéries a été identifiée mais seulement avec 50% d'homologie (Veith et Buchel, 2007). Ceci vient expliquer pourquoi le PSI existe sous sa forme trimérique chez des cyanobactéries, mais il existe sous forme monomérique chez les diatomées et *C. reinhardtii* (Veith et Buchel, 2007). Cela suggère que les interactions entre le PSI et les polypeptides de type fucoxanthine dans les complexes antennaires des diatomées sont de taille et de forme comparable à ceux observés au complexe LHC du photosystème I des algues vertes (Veith et Buchel, 2007).

1.3.1.9 *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue modèle.

L'algue verte unicellulaire *C. reinhardtii* (Chlorophyceae) est étudiée depuis plusieurs années comme modèle de cellule eucaryote photosynthétique (Harris, 2001). Les cellules de *C. reinhardtii* sont entourées d'une paroi cellulaire composée de glycoprotéines. Le chloroplaste occupe environ 40% du volume cellulaire et entoure le noyau. Le chloroplaste et le cytoplasme peuvent contenir des vacuoles. Dans le stroma, on retrouve des thylacoïdes et le pyrénoloïde. L'exposition à la lumière dans un milieu de culture approprié donne des cultures uniformes comprenant des cellules mobiles car *C. reinhardtii* possède un flagelle (Harris, 2001). Cet organisme est facilement contrôlable en laboratoire, avec un taux de croissance rapide qui permet d'analyser des effets sur plusieurs générations (Sueoka, 1967). *C. reinhardtii* a été

l'objet de nombreuses études sur de nombreuses thématiques aussi variées que photosynthèse, la respiration, les rythmes circadiens, la mobilité cellulaire, la tolérance aux métaux lourds (Harris, 2001; Remacle et Matagne, 1998). De nombreuses techniques de biologie moléculaire comme la transformation des génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial ont été réalisées avec succès. Les génomes du chloroplaste et de la mitochondrie sont complètement séquencés ce qui a donné à cette algue le statut d'organisme modèle (Gray et Boer, 1988; Michaelis *et al.*, 1990; Maul *et al.*, 2002). Ces particularités en font un modèle intéressant à comparer avec d'autres espèces d'algues pour étudier les différences sur les processus de transport des électrons suite à des expositions à des contaminants aquatiques.

1.4 Les paramètres photosynthétiques comme marqueurs de stress

La photosynthèse est l'un des processus métaboliques les plus importants chez les algues, et mesurer leur activité photosynthétique est un indicateur de leur état de santé. La mesure de la fluorescence de la Chl *a* est une méthode fréquemment utilisée pour mesurer la capacité photochimique des organismes photosynthétiques (Govindjee et Papageorgiou, 1971 ; Papageorgiou et Govindjee, 2004). C'est une technique non invasive qui a l'avantage de pouvoir être effectuée sur les organismes *in vivo*, et si la fluorescence de la Chl *a* ne représente que 2-10 % de l'énergie absorbée, cette technique est hautement sensible. L'irradiation d'organismes photosynthétiques, préalablement exposés au noir, a pour effet de stimuler le signal de fluorescence, dans un premier temps, puis ce dernier diminue jusqu'à ce qu'il atteigne un état d'équilibre. Cette diminution du rendement de fluorescence appelé quenching est dû conjointement à une augmentation de la photochimie et à des processus de désactivation non-photochimique (Schreiber *et al.*, 1994). Une variation de la fluorescence est utilisée pour évaluer l'effet de xénobiotiques sur des plantes supérieures mais aussi sur les microalgues (Schreiber *et al.*, 1994 ; El Jay *et al.*, 1997 ; Juneau *et al.*, 2002; Frankart *et al.*, 2003). Il apparaît que certains paramètres de

mesure de la fluorescence sont plus sensibles que d'autres aux stress environnementaux. Par exemple, le rendement opérationnel (Φ'_M) et le quenching non photochimique (qN) peuvent être de meilleurs indicateurs de la réponse aux stress que le quenching photochimique (qP) sur des algues exposées aux herbicides (Frankart *et al.*, 2003) ou limitées en silicates (Lippemeier *et al.*, 1999). L'usage de différentes méthodologies de mesure de la fluorescence donnera un point de vue sur la physiologie et informera également au niveau du PSII et PSI sur l'effet de l'exposition à des xénobiotiques. Les paramètres photosynthétiques mesurés au PEA seront détaillés dans la sous-partie suivante.

1.4.1 Cinétique rapide

On obtient des informations sur les cinétiques rapides de fluorescence de la Chl *a*, en utilisant le Plant Efficiency Analyzer (PEA) (Strasser *et al.*, 1995). La source de lumière du PEA provient de diodes (LED, light emitting diodes) qui atteignent leur maximum d'intensité en 50 μ s. Cet instrument permet de mesurer les transitions de fluorescence à très forte intensité lumineuse ($> 3000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), avec une grande résolution, et un fort ratio signal/bruit (Govindjee *et al.*, 1992; Strasser *et al.*, 1995). Les transitions de fluorescence OJIP sont décrites par Srivastava *et al.* (1995) et correspondent aux modifications de transport des électrons dans le PSII évaluées sur une échelle allant de 50 μ s à plus ou moins 6 s selon l'expérience. Elles permettent d'évaluer des caractéristiques importantes de la réduction du PSII comme la capture d'énergie, le transport d'électrons, et la dissipation dépendante du Δ pH en chaleur dans les complexes antennaires (Strasser *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'usage du PEA pour évaluer la capacité photosynthétique du phytoplancton a été particulièrement employé pour étudier les plantes supérieures et les algues vertes. D'autres espèces comme les diatomées, sont l'objet d'un intérêt plus récent (Antal *et al.*, 2009).

Les transitions de la fluorescence de la Chl *a* alignées sur une échelle semi-logarithmique forment les étapes nommées O,J,I,P et correspondent aux niveaux

d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons associés au PSII (Srivastava *et al.*, 1995, Strasser, 2000). L'utilisation de lumière saturante ($>3000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) permet de réduire complètement le PSII. La fluorescence initiale F_0 (phase O), évaluée à 50 μs (Strasser *et al.*, 1995 ; Strasser et Stirbet, 2001) augmente jusqu'à un maximum F_M (phase P). Les centres réactionnels sont fermés jusqu'à ce que Q_B lie deux protons du lumen après réception de deux électrons et se lie au pool de plastoquinone pour transférer ses électrons (Kraus et Weiss, 1991). Dans le cas où le PSII est détruit, une transition de fluorescence, dite phase K, apparaît à ~ 0.3 ms. La réduction de la quinone Q_A (phase J, 2 ms) et du pool de plastoquinone (phase I, 30 ms) forment deux étapes intermédiaires (Neubauer et Schreiber, 1987).

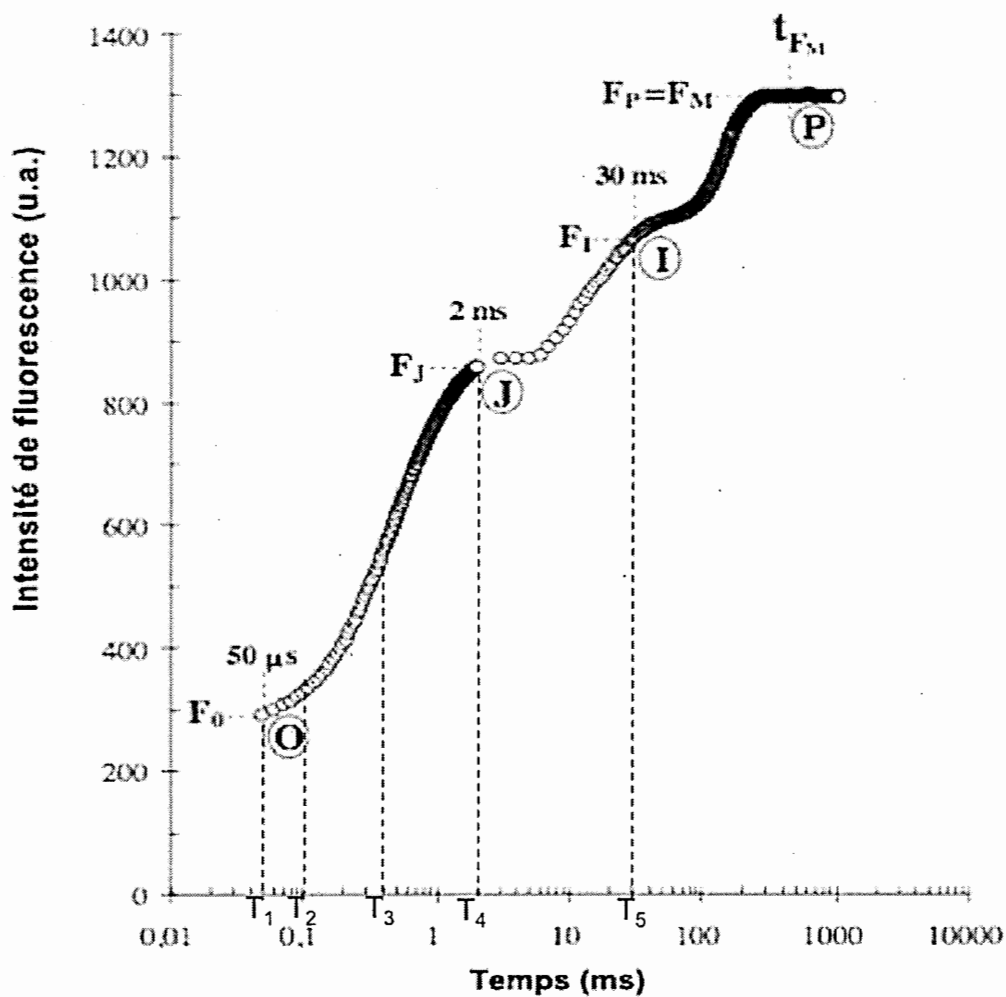


Figure 1.8 : Courbe d'induction de fluorescence désignant les transitions O-J-I-P. La fluorescence est mesurée sur une échelle de temps logarithmique (d'après Strasser *et al.*, 1995).

Traditionnellement, la phase O-J correspond à la réduction de la quinone Q_A (Neubauer et Schreiber, 1987), tandis que la seconde transition de fluorescence J-I est associée à la réduction de l'accepteur secondaire d'électron Q_B (Strasser *et al.*, 1995).

Le niveau de fluorescence maximale est atteint quand tous les transporteurs intersystèmes sont réduits et constituent la phase P (Vredenberg, 2000).

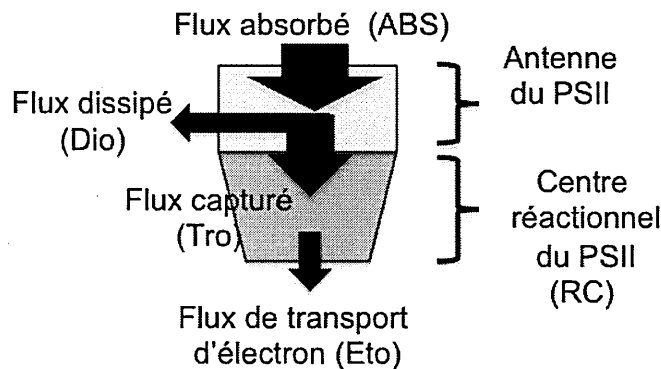


Figure 1.9: Modélisation des flux d'énergie dans l'appareil photosynthétique (adapté de Force *et al.* (2003)).

Les flux d'énergie dans l'appareil photosynthétique peuvent être représentés sous forme de flux d'abord absorbés par les antennes du PSII (ABS), puis capturés par les centres réactionnels (TR_0), avant d'être enfin transportés dans la chaîne de transport d'électrons (ET_0) (voir Figure 1.9). La dissipation sous forme de chaleur, de fluorescence et de transfert aux autres systèmes dépend du ratio des centres réactionnels actifs/inactifs. Les flux sont évalués selon les ratios suivants :

- Le rendement des réactions photochimiques primaires du photosystème II (Φ_{MII}) est exprimé avec F_M comme fluorescence maximale, estimée à la transition P, tandis que la fluorescence minimale est évaluée à 50 μ sec, soit le temps nécessaire pour que le pulse de lumière saturante du PEA atteigne son intensité maximale (Force *et al.*, 2003).

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_{50\mu\text{sec}}) / F_M$$

- L'absorption de l'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière au niveau du centre réactionnel fonctionnel du PSII (ABS/RC). Ce ratio permet d'évaluer le nombre total de photons absorbés par les molécules de Chl *a* en fonction du nombre de centre réactionnels actifs. Il dépend de la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable (M_0), qui prend en compte la réoxydation de Q_A par les transporteurs situés après Q_A , mais aussi de la fluorescence variable dépendante du niveau de la réduction de Q_A (V_J) (Force *et al.*, 2003).

$$\text{ABS/RC} = M_0 / V_J / \Phi_{\text{MII}}$$

avec:

$$M_0 = F_{300\mu\text{sec}} - F_{50\mu\text{sec}} / (F_M - F_{50\mu\text{sec}}) \times 0.25$$

$$V_J = F_{2\text{msec}} - F_{50\mu\text{sec}} / (F_M - F_{50\mu\text{sec}})$$

- La vitesse maximale de capture (trapping) de photons au niveau du PSII (TR_0/RC) est une expression de la capture des électrons utilisés pour la séparation de charge par les centres réactionnels. Elle est estimée en fonction de la réduction de Q_A et du nombre de centres réactionnels actifs (Force *et al.*, 2003).

$$\text{TR}_0/\text{RC} = M_0 / V_J$$

- Le transport des électrons à partir un centre réactionnel du PSII au-delà de Q_A est exprimé par le paramètre ET_0/RC . Il évalue donc la réoxydation du Q_A par transfert des électrons issus d'un centre réactionnel actif du PSII dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques (Force *et al.*, 2003).

$$\text{ET}_0/\text{RC} = (M_0 / V_J) \times (1 - V_J)$$

- La probabilité qu'un électron qui a réduit Q_A poursuive son itinéraire dans la chaîne de transport des électrons (ET_0/TR_0) est estimée de la manière suivante (Force *et al.*, 2003):

$$ET_0/TR_0 = (1 - V_j)$$

- Une fraction de l'énergie est non photochimique. L'énergie non utilisée pour le transport des électrons (DI_0/RC) est dissipée sous forme de chaleur et s'exprime en fonction des centres réactionnels actifs du PSII (Strasser *et al.*, 2000).

$$DI_0/RC = (ABS/RC - (M_0 / V_j))$$

- Les mesures de transport des électrons et leur capture sont liées aux conditions expérimentales comme la qualité de l'échantillon, si les chloroplastes ou les thylacoïdes sont intacts, de l'adaptation au noir et de la présence ou l'absence d'accepteur d'électron. Ces mesures de fluorescence fournissent des informations qui correctement interprétées renseignent sur l'état physiologique de l'appareil photosynthétique de l'espèce étudiée (Strasser *et al.*, 2000; Force *et al.*, 2003).

1.4.2 Cinétique lente : mesure de l'activité du photosystème I

Contrairement à la section précédente, où la fluorescence variable était utilisée pour évaluer le transport des électrons dans le PSII, nous utiliserons des mesures d'absorbance pour estimer les rendements photochimiques du PSI. En effet, le PSI ne possède pas un niveau de fluorescence suffisant pour être sensible à l'état fonctionnel de son centre réactionnel. Cependant, non seulement les antennes de chlorophylles rattachées au PSI (P700) absorbent à 700nm mais on observe aussi une variation de l'intensité d'absorbance dans la région de 800-850 nm lors de son oxydation.

Les processus de dissipation d'énergie autour du PSI peuvent être étudiés en utilisant des pulses de lumière saturante et différentes conditions de lumière qui modulent l'état redox du PSI. L'énergie de dissipation du PSI est distribuée selon un rendement opérationnel du PSI (Y(I)) ainsi que d'une part, d'une limitation du côté donneur (YND), et d'autre part, par une limitation du côté accepteur (YNA) (Klughammer et Schreiber, 1994 ; 2008).

Des mesures d'absorption à 830 nm permettent de mesurer le niveau d'oxydation du photosystème I (Schreiber *et al.*, 1993). Le Dual PAM (Dual-wavelength fluorescence monitoring system, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) mesure la différence de signal entre 875nm et 830 nm et indique la variation relative du niveau de réduction du PSI. Le niveau d'absorbance minimal (Po) est obtenu après une période à l'obscurité tandis que l'oxydation complète du P700 (Pm) est obtenue en utilisant des flashes saturants de lumière dans le rouge lointain (Far red). Des niveaux intermédiaires d'oxydation (P) sont obtenus, en présence de lumière actinique (AL), et correspondent à une fraction partiellement oxydée du P700, limitée du côté donneur du PSI par la réduction des électrons en provenance du PSII. Un flash de lumière saturant en présence de lumière actinique indique une fraction du P700 limitée par la fraction de PSI dont le côté accepteur ne peut pas être oxydé par un pulse saturant. Par exemple, une limitation côté accepteur serait observée en cas d'inactivité du FNR, comme c'est le cas après une période à l'obscurité (Klughammer et Schreiber, 2008).

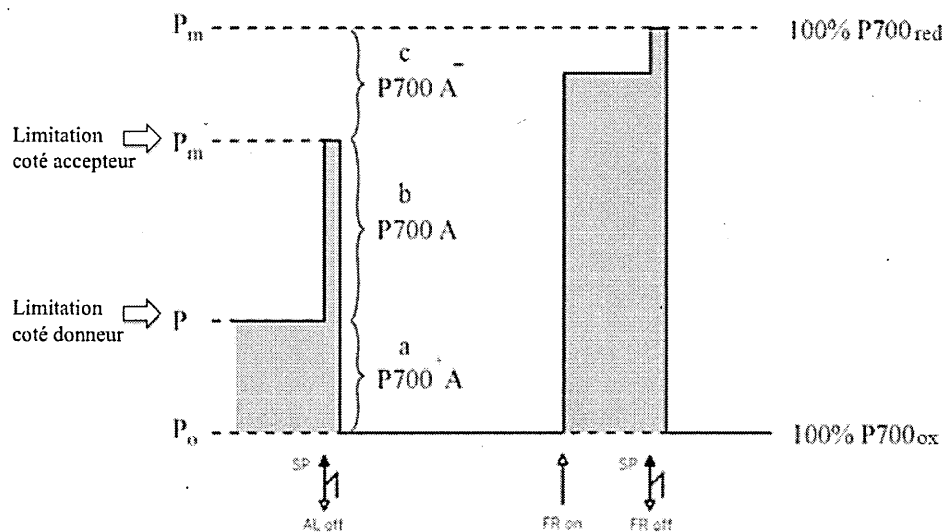


Figure 1.10 : Mesure de l'absorbance du PSI et détermination des paramètres d'oxydation du PSI. Le photosystème I dans son état oxydé (P_o) est réduit (P_m) par un flash de lumière saturant (SP) en combinaison avec une lumière de rouge lointain (FR). Le niveau de réduction de PSI est évalué à partir du ratio des mesures d'absorbance à 830nm et 815nm, en présence de lumière actinique (P) et de flash saturant (P_m'). a, fraction du PSI qui est limitée du côté donneur car incapable de séparation de charges ; b, fraction réduite du PSI suite à un flash saturant en présence de lumière actinique ; c, fraction du PSI qui est limitée du côté accepteur car les électrons ne sont pas transférés au NADPH : le PSI n'est pas réduit à son maximum en cas de diminution de l'activité du FNR ou du cycle de Calvin (tiré de Klughammer, *et al.*, (2008)).

Le rendement de la conversion d'énergie ($Y(I)$) est estimé selon la formule suivante :

$$Y(I) = (P_m' - P) / (P_m - P_o) \text{ (Klughammer et Schreiber, 2008).}$$

La dissipation non-photochimique autour du PSI due à une limitation du côté donneur ($Y(ND)$), représente la fraction oxydée du PSI, qui ne sera pas réduite même sous l'effet de la lumière actinique et induit une dissipation d'énergie du côté donneur du PSI.

$$Y(\text{ND}) = (P - P_o) / (P_m - P_o) \text{ (Klughammer et Schreiber, 2008).}$$

La dissipation non-photochimique autour du PSI due à une limitation côté accepteur ($Y(\text{NA})$), représente la fraction réduite du PSI qui ne peut transférer ses électrons à un accepteur d'électron du fait d'une limitation de l'activité du FNR, du cycle de Calvin ou d'une limitation en NADP^+

$$Y(\text{NA}) = (P_m - P_m') / (P_m - P_o) \text{ (Klughammer et Schreiber, 2008).}$$

Ainsi l'énergie capturée par le PSI peut être répartie selon trois rendements complémentaires comme illustrés dans la figure 1.11:

$$Y(\text{I}) + Y(\text{ND}) + Y(\text{NA}) = 1 \text{ (Klughammer et Schreiber, 2008).}$$

1.5 Les processus de dissipation non-photochimique

1.5.1 Description du quenching non-photochimique (NPQ)

1.5.1.1 Chez les plantes supérieures et les algues vertes

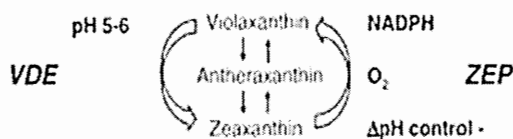
Le quenching non-photochimique (NPQ) de l'émission de fluorescence de la chlorophylle *a* est le résultat de la dissipation de l'énergie des électrons du PSII en excès. Elle est régulée par l'amplitude d'un gradient de pH localisé au niveau de la membrane du thylacoïde du chloroplaste, lui-même généré par le transport d'électron photosynthétique (Niyogi, 1999 ; Perkins *et al.*, 2006). Le NPQ est considéré comme un processus de régulation de la photosynthèse car plus le transport d'électron est important, plus le gradient de pH va augmenter et stimuler des processus métaboliques activés par de faibles pH. Ainsi, dans le stroma, on observe la protonation de protéines du LHC associé au PSII. La liaison des protéines ainsi protonées avec un pigment alternatif à la chlorophylle, la zéaxanthine, génère un changement conformationnel du LHC qui induit la dé-excitation de la ^1Chl et la

dissipation thermique qui en résulte. Quand la quantité de photons absorbée n'est plus en excès et donc que le gradient de pH diminue, le changement conformationnel du LHC est rapidement réversible. La protéine PsbS associée au PSII joue un rôle dans la détection de la variation de pH (Li *et al.*, 2000), et va lier la zéaxanthine et déclencher des changements de conformation au sein de l'antenne du PS II pour favoriser la dissipation d'énergie (Li *et al.*, 2002).

Le NPQ est constitué de trois composantes, qE, qT et qI. La première composante du NPQ, soit qE, est un quenching qui est relié au pH du lumen et qui est sensible à la présence de zéaxanthine (Horton et Hague, 1988). Une composante intermédiaire, soit qT, correspond à la déphosphorylation du LHCII mais dépend de l'activation du côté accepteur du PSI (Schansker *et al.*, 2006). La dernière composante, qI, est reliée aux processus de photoinhibition qui nécessitent la synthèse de D1 (Krause et Jahns, 2004).

Chez les plantes supérieures et les algues vertes, un faible pH active la violaxanthine déépoxydase qui convertit la violaxanthine (Vx) en zéaxanthine (Zx) et constitue une partie du cycle des xanthophylles (Yamamoto *et al.*, 1999). Une forte corrélation entre un gradient de protons transthylacoïdal, un fort taux de Zx et le NPQ a été démontrée chez plusieurs espèces (Richter *et al.*, 1999; Goss *et al.*, 2006 ; Goss et Jakob, 2010). Selon les études, le processus de dissipation par la Zx semble impliquer la protéine PsbS, ou la protéine LHCSR qui est son homologue chez *C. reinhardtii* et chez les diatomées (Peers et Niyogi, 2008; Peers *et al.*, 2009), et est liée à un changement structurel du LHCII. De plus, la concentration en Zx favorise l'agrégation du LHCII et la Vx joue un rôle d'inhibiteur d'agrégation (Holt *et al.*, 2005; Ruban *et al.*, 2012). Le rôle de la Zx est toujours en cours d'investigation, les interactions entre Zx et la Chl *a* impliquent une séparation de charge entre Zx et la molécule de Chl *a* (Holt *et al.*, 2005). Le NPQ peut être estimé par une mesure de l'augmentation de la concentration en zéaxanthine (Zx) chez les algues vertes.

Cycle de Violaxanthine



Cycle de Diadinoxanthine

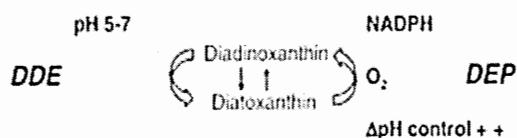


Figure 1.11 : Réactions enzymatiques qui constituent le cycle de violaxanthine (Vx) et diadinoxanthine (Ddx) (adapté de Niyogi, *et al.* 1997). VDE : Vx dé-époxydase; ZEP : Zéaxanthine époxydase; DDE : diadinoxanthine dé-époxydase; DEP : Ddx époxydase.

1.5.1.2 Chez les diatomées.

Chez les diatomées, la diatoxanthine (Dt) est un analogue de la Zx et possède une fonction similaire (Wentworth *et al.*, 2003). La diadinoxanthine (Dx) et la diatoxanthine (Dt) forment le cycle des xanthophylles des diatomées qui, à la différence des algues vertes, ne présente pas d'intermédiaire entre la forme époxydée et dé-époxydée. Le pool de xanthophylles des diatomées est retrouvé à des concentrations plus fortes que chez les algues vertes et les plantes vascularisées (Lavaud *et al.*, 2002). De plus, la diadinoxanthine dé-époxydase est activée à des pH plus faibles donc à de plus faibles intensités lumineuses ou à de plus courtes durées d'exposition à la lumière comparativement aux plantes supérieures (Jakob *et al.*, 2001). Le cycle des xanthophylles est d'autant plus important chez les diatomées du fait de l'absence d'état de transition. Les diatomées peuvent accumuler des taux

élevés de Dt ce qui augmente leur capacité de photoprotection lors de stress lumineux (Schumann *et al.*, 2007). Ces processus de régulation permettent selon Lavaud, *et al.* (2007) plus de flexibilité et d'accélérer la réponse à l'environnement lumineux.

Eisenstadt *et al.* (2008) suggèrent que chez les diatomées, le NPQ, comme le cycle des xanthophylles, sont dépendants de changements organisationnels du PSII. Miloslavina *et al.* (2009) approfondissent le rôle du PSII dans le NPQ chez *Cyclotella meneghiniana* et *Phaeodactylum tricornutum* en mettant en évidence deux types de site de quenching sans que cela ne modifie l'importance du NPQ. Un premier site de quenching est localisé dans l'antenne rattachée au photosystème II et un second dans une antenne de fucoxanthine indépendante des deux photosystèmes. La Dt peut accepter l'énergie d'excitation de la Chl *a* et la dissiper sous forme de chaleur après conversion interne (Frank *et al.*, 1996). Ainsi, le mécanisme du NPQ - Dt dépendant, est similaire à celui des algues vertes en ce sens où on observe deux sites indépendants responsables du NPQ à l'équilibre.

Grouneva, *et al.*, (2008) décrivent, chez *C. meneghiniana*, un NPQ complexe constitué de trois stades dépendants de la luminosité. Un premier composant, généré juste après l'illumination de l'appareil photosynthétique, est modulé par le gradient de pH transthylacoïdal, l'intensité lumineuse et la concentration initiale du pool de Dt. Un second NPQ sera observé à l'équilibre après une illumination à forte intensité lumineuse et est une fonction de la concentration en Dt produite lors de cette phase lumineuse. Enfin, une troisième composante est observable 10s après la transition lumière-obscurité, il dépend du taux de Dt formé lors de la phase actinique de la phase lumineuse.

1.5.1.3 Effet des sources alternatives d'électrons sur le NPQ

Ruban, *et al.* (2004) utilisent un régime de lumière spécifique (5min de lumière/55min d'obscurité) chez les diatomées *P. tricornutum* pour stimuler un NPQ

de 3 à 5 fois supérieur que chez *Arabidopsis thaliana* soumis à un régime normal de lumière (16h de lumière/ 8h d'obscurité). Grâce à ce procédé, ils mettent en évidence d'une part, que la relation entre qP et le NPQ n'est pas linéairement réciproque chez ces diatomées contrairement aux plantes supérieures et d'autre part que le NPQ augmente seulement lorsque l'état redox du PS II est très proche de la saturation. Ruban *et al.*, (2004) en déduisent que certaines sources supplémentaires de protons sont nécessaires chez *P. tricornutum* pour déclencher le NPQ. Ceux-ci pourraient provenir, par exemple, du transport cyclique d'électrons autour du PSI, qui est activé lorsque le transport d'électrons linéaires est saturé (Caron *et al.*, 1987).

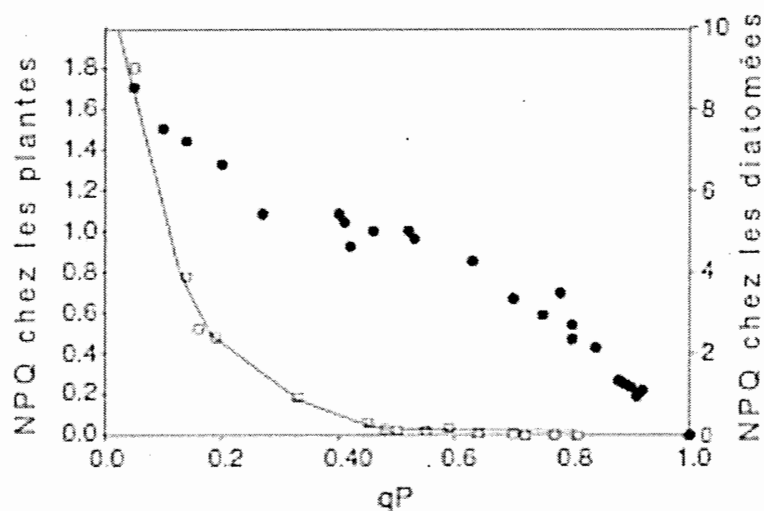


Figure 1.12: Relation entre le quenching photochimique (qP) et non-photochimique (NPQ) chez *A. thaliana* (rond noir) et *P. tricornutum* (carré blanc). L'expérience est menée en utilisant des intensités de lumière actinique allant de 30 à 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

En effet, des sources alternatives de protons comme la chlororespiration et/ou le transfert cyclique d'électrons autour de PSI sont responsables d'un gradient de

protons suffisamment grand pour générer un NPQ (Jakob *et al.*, 2001; Lavaud *et al.*, 2006). Plus particulièrement chez les diatomées, une faible acidification du thylacoïde du lumen peut suffire à activer la Dx dé-époxydase et donc le cycle des xanthophylles (Lavaud *et al.*, 2006). Une telle acidification pourrait être générée par la chlororespiration (Ting et Owens, 1993 ; Jakob *et al.*, 2001). De plus, chez les diatomées *P. tricornutum*, la dissipation du gradient de pH inhibe le cycle des xanthophylles mais pas le NPQ ce qui indique que le NPQ et la dé-époxydation de Dx ne sont pas absolument liés (Eisenstadt, *et al.*, 2008). C'est le gradient de protons associé à la protonation du pool de PQ qui sont essentiels pour déclencher le NPQ et non pas le gradient de pH associé au niveau de Dt comme chez les algues vertes (Eisenstadt, *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il a été suggéré qu'une partie du pool de Dt ne participe pas au quenching de fluorescence (Schumann *et al.*, 2007) ou seulement dans des conditions de forte luminosité et pour de courtes expositions (Dimier *et al.*, 2007). On notera aussi que sous un régime de lumière qui stimule le NPQ (Ruban *et al.*, 2004), la taille du pool de xanthophylle est fortement augmentée. Une autre explication pourrait être aussi que le gradient de pH inactive l'époxydation de Dt, ce qui permet de maintenir une forte concentration de Dt à des fortes intensités lumineuse (Goss *et al.*, 2006).

1.6 Deux mécanismes impliqués dans la régulation de transport d'électrons.

1.6.1 Le transfert cyclique d'électrons au PSI

L'existence d'un transfert cyclique d'électrons autour de PSI a d'abord été mis en évidence à partir de chloroplastes de plantes supérieures (Arnon et Chain, 1975). Dans ce processus, les électrons issus du PSI sont redirigés vers la chaîne de transport intersystème au niveau de PQ ou au niveau du complexe cyt b6/f par la ferrédoxine

(Fdx) puis la ferrédoxine NADP⁺ réductase (FNR) (Malkin et Chain, 1980). Le transfert cyclique d'électrons s'accompagne d'un transfert de protons du stroma vers le lumen des thylacoïdes. Ce mécanisme permet la dissipation d'énergie au niveau du PSI et favorise la synthèse d'ATP (Rumeau, *et al.*, 2007) (voir Figure 1.6).

Les protéines PGR5 (Protein Gradient Regulation 5) et PGRL1 (PGR5-like photosynthetic phenotype I) ont été associées soit à une réduction directe du pool de PQ soit à une réinjection des électrons originaires de Fd dans le complexe du cytochrome b6/f (Munekage *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2010). Elles semblent donc jouer un rôle dans la régulation du transfert cyclique autour de PSI.

Les chloroplastes des plantes supérieures possèdent un complexe protéique qui participe activement au transfert cyclique d'électron, codé par les gènes chloroplastiques et nucléaires, qui contient une NADH déshydrogénase (Ndh-1) responsable de la réduction de PQ (Joët *et al.*, 2001 ; Munekage *et al.*, 2004; Rumeau *et al.*, 2007). Chez *C. reinhardtii*, la réduction du pool de PQ est attribuée à une NADH déshydrogénase (Ndh-2 ou Nda2) (Mus *et al.*, 2005 ; Jans *et al.*, 2008; Desplats *et al.*, 2009). A l'opposé de Ndh-1 qui est un complexe électrogénique (Peltier et Cournac, 2002), Ndh-2 catalyse la réduction de PQ de manière non électrogénique. En conséquence, la voie qui passe par Ndh-2 génère moins de gradient de protons et donc moins d'ATP que celle qui passe par Ndh-1. Il est possible que Ndh-1 catalyse directement le transfert d'électrons autour du PSI. Chez *Chlamydomonas*, la coexistence de cette voie avec celle de FQR est démontrée en utilisant un inhibiteur de PTOX, l'antimycine A. Les électrons en provenance du côté accepteur du PSI viennent réduire le pool de PQ. Ce transfert peut être bloqué en utilisant un analogue des quinones, le DBMIB (Finazzi *et al.*, 1999), qui agit au niveau du site Qo du cytochrome b6/f (Trebst, 2007) et empêche à la fois le transport cyclique et linéaire des électrons et la réoxydation du pool de PQ.

1.6.2 La chlororespiration

Décrite pour la première fois en 1982, par Bennoun, la chlororespiration se déroule selon une étape de réduction non photochimique du pool de PQ par une NAD(P)H-déshydrogénase (Ndh) puis une étape d'oxydation par une oxydase terminale chloroplastique (PTOX) en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électrons (Bennoun, 1982). La génération d'un gradient de protons à travers la membrane des thylacoïdes est couplée à ce transport d'électrons chlororespiratoires et à la réduction consécutive du pool de PQ (Wilhelm et Duval, 1990). La découverte de nouveaux composants moléculaires de la membrane des thylacoïdes, comme NDH, PTOX, ou PGR5 et la régulation de l'expression de certains de ces composants suite à l'exposition à des stress environnementaux, a relayé l'intérêt pour ces voies alternatives (Joët *et al.*, 2002; Mus *et al.*, 2005 ; DalCorso *et al.*, 2008; Munekage *et al.*, 2010).

Chez les diatomées, l'activité chlororespiratoire a été décrite lors de courtes périodes d'adaptation au noir (Caron *et al.*, 1987 ; Ting et Owens, 1993). Dans ces deux études la génération d'un gradient de protons au noir induit un NPQ. Lors de périodes prolongées au noir, Jakob, *et al.*(2001) montrent chez *P. tricornutum* que le gradient de protons induit par la chlororespiration permet de générer la dé-époxydation de Dx et d'accumuler de fortes concentrations en Dtx.

Ceci diffère des algues vertes avec lesquelles il n'a jamais été montré une accumulation de Zx sous l'effet de la chlororespiration. En effet, la chlororespiration a une capacité de transport d'électrons de seulement 10% de la respiration mitochondriale et est considérée comme trop faible pour induire une acidification du lumen suffisante pour activer la dé-époxydation (Peltier *et al.*, 1987).

Chez *C. reinhardtii*, une activité d'oxydase chloroplastique similaire à celle de l'alternative oxydase mitochondriale (AOX) est fortement stimulée lorsque que le

pool de PQ est réduit et prévient la photoinhibition (Cournac, 2002). PTOX2 est l'oxydase principale impliquée dans la chlororespiration chez *C. reinhardtii* selon Houille-Vernes *et al.* (2011).

Des gènes homologues à PTOX ont été trouvés dans un grand nombre de microalgues, et sont clairement distincts de celui de AOX, présent dans les mitochondries (Peltier *et al.*, 2010). Il est possible que cette voie de transport des électrons provienne d'ancêtres communs et endosymbiotiques, des cyanobactéries, chez qui les mécanismes photosynthétiques et respiratoires partagent les mêmes membranes. La combinaison de l'activité de PTOX et de la NADH déshydrogénase peut contribuer à la régulation du transport d'électrons (Rumeau *et al.*, 2007). PTOX peut efficacement oxyder le pool de PQ réduit (Cournac, 2002; Joet *et al.*, 2002), ce qui en fait une voie alternative lors de la photosynthèse pour éviter la sur-réduction du pool de PQ (Niyogi, 2000). L'utilisation d'inhibiteurs a permis de démontrer que la chlororespiration pouvait se produire à la lumière contrairement aux premières observations (Peltier *et al.*, 1987). L'utilisation de DCMU, qui inhibe le flux d'électrons au niveau du PSII, met en évidence un transfert chlororespiratoire d'électrons, activé sous l'effet de la lumière actinique et accompagné d'un fort NPQ (Caron *et al.*, 1987; Eisenstadt *et al.*, 2008; Grouneva *et al.*, 2009). La présence d'un gradient de protons transmembranaire est confirmée par une accumulation parallèle de Dtx et par la réversibilité du processus en présence d'un agent découplant (Grouneva *et al.*, 2009).

De plus, l'utilisation combinée du DCMU et de methylviologène (MV) – un inhibiteur du transport cyclique d'électrons autour du PSI- n'a pas d'effet sur le gradient de pH après illumination, ce qui invalide l'origine du gradient de protons par le transfert cyclique d'électrons chez *P. tricornutum* (Eisenstadt *et al.*, 2008).

Cependant différentes études montrent qu'il peut exister des différences conséquentes entre les espèces de diatomées concernant le transport alternatif d'électrons. Chez les cellules de *P. tricornutum* exposées à la lumière et au DCMU, la réduction du pool de PQ est accompagnée d'un gradient de protons (Grouneva *et al.*, 2009). L'activation de la dé-époxydation est reliée à la présence d'une NAD(P)H-déshydrogénase similaire à celle trouvée chez les plantes supérieures (Sazanov *et al.*, 1998). Au contraire, dans les mêmes conditions, chez *C. meneghiniana*, l'ajout de DCMU ne stimule pas le NPQ et n'active pas la dé-époxydation (Grouneva *et al.*, 2008, 2009). Cependant, l'observation simultanée de la fluorescence du PSII et du PSI par des changements d'absorbance du P700 montre la réduction du pool de PQ. Grouneva *et al.*, (2009) mettent en avant un type de Ndh-2 qui ne contribuerait pas à une translocation de protons à travers la membrane des thylacoïdes (Peltier et Cournac, 2002 ; Jans *et al.*, 2008). Ainsi, la génération d'un gradient de protons et l'activation de la de-époxydation de Dtx serait empêchée. Ces mêmes auteurs font alors l'hypothèse que chez *C. meneghiniana*, le pool de PQ est réduit à partir de réductants du stroma puis, au lieu d'être réoxydé par PTOX, les électrons sont transférés au PSI et contribuent finalement à la production de NADPH.

Certaines études ont commencé à étudier la régulation des voies alternatives d'électrons selon l'exposition à des stress environnementaux. Brunet *et al.*, (2006; 2007) montrent que le phytoplancton vivant à une profondeur d'environ 80m, présente un degré de dé-époxydation de la Dx nettement plus élevé par rapport au phytoplancton dans les couches d'eau située directement au-dessus. En effet, dans ces conditions de lumière incidente de très faible intensité, une accumulation de Dt est observée. Elle n'est pas sensible à des variations du cycle jour-nuit contrairement à ce qui est observé chez des algues présentes à la surface. Cela suggère que cette augmentation en Dt n'est pas liée à des processus de photoprotection mais est plutôt due à une activation de l'enzyme de dé-époxydation (la DDE) induite par un courant

alternatif de transport des électrons, certainement l'activité chlororespiratoire (Brunet *et al.*, 2007).

Des études sur des microalgues marines, impliquent PTOX dans l'adaptation à des conditions océaniques oligotrophiques (Mackey *et al.*, 2008). Le reroutage des électrons de PQ vers O₂ est une stratégie commune au phytoplancton marin particulièrement dans des conditions oligotrophiques (Mackey *et al.*, 2008).

La souche RCC809 de l'algue verte *Ostreococcus sp.* s'adapte à des eaux profondes et à de faibles intensités lumineuses (Cardol *et al.*, 2008). RCC809 est caractérisée par un fort ratio de PSII/PSI, attribué à un manque de fer dans son habitat naturel, qui rend cette espèce particulièrement sensible à la photoinhibition. Le transfert linéaire d'électrons du PSII vers le PSI est accompagné d'un transfert alternatif d'électrons. Les électrons issus du PSII réduisent le pool de PQ et la réoxydation du pool de PQ par une oxydase génère la formation de H₂O aussi bien à l'obscurité qu'à l'exposition à la lumière. Ce transfert alternatif d'électrons génère un gradient de pH qui augmente le NPQ (Six *et al.*, 2008) et facilite la synthèse d'ATP additionnel. Ainsi, cette voie alternative de transfert d'électrons permet l'adaptation d'*Ostreococcus sp.* à un environnement océanique exposé à de faibles intensités lumineuses (Cardol *et al.*, 2008).

Les diatomées peuvent être exposées à des conditions de lumière fluctuante (Macintyre *et al.*, 2000 ; Sarthou *et al.*, 2005) et à des périodes d'obscurité prolongée dans leur habitat naturel lorsqu'elles sont à plusieurs centaines de mètres de profondeur (Murphy et Cowles, 1997). Les résultats sur l'interaction entre les flux d'électrons alternatifs et le cycle des xanthophylles indiquent que les voies alternatives d'électrons peuvent être d'une grande importance pour le métabolisme cellulaire des diatomées. En outre, le maintien d'un gradient de protons de type chlororespiratoire et d'un cycle activé des xanthophylles, pendant des périodes à

l'obscurité, évite une baisse du pool de Dt, et pourrait donc être avantageux lors d'une nouvelle exposition des cellules à forte illumination (Grouneva *et al.*, 2009).

1.7 Le transfert de pouvoir réducteur entre les chloroplastes et les mitochondries

Les chloroplastes utilisent le CO₂ atmosphérique et de l'énergie lumineuse pour générer des composés carbonés et des réductants tandis que les mitochondries utilisent ces composés pour produire de l'ATP.

Dans des conditions normales de croissance, le métabolisme cellulaire requiert une consommation naturelle de NADPH et ATP. La photorespiration est l'activité oxygénase de la Rubisco qui consomme au total 4 NADPH et 6.5 ATP par oxygénation en incluant la refixation du CO₂ non assimilé (Lorimer et Andrews, 1981; Dry et Wiskich, 1987). Le cycle de Calvin consomme 12 molécules de NADPH et 18 molécules d'ATP (Scheibe, 1987, 1991). Le NADPH exporté du chloroplaste sert également à l'assimilation de l'azote et permet la réduction cytosolique du NO₃⁻ en NO₂⁻ par la nitrate réductase (NR). Tandis que dans le chloroplaste, le NO₂⁻ est réduit en NH₄⁺, par la Fd et en présence d'ATP permet l'assimilation du NH₄⁺, la synthèse de glutamine et des acides aminés (Huppe et Turpin, 1994). Une étude sur l'effet de l'assimilation de l'azote chez les algues vertes, en condition de privation d'azote, montre que l'addition subséquente de NO₃⁻ ou de NH₄⁺ mobilise les équivalents réducteurs pour l'assimilation de l'azote et ralentit l'activité des enzymes du cycle de Calvin (Huppe et Turpin, 1994; Hurry *et al.*, 1995). Comme la vitesse de l'assimilation de l'azote représente 4% de la vitesse de fixation du carbone, selon les espèces et les conditions environnementales, la demande en NADPH est diminuée et le niveau de réduction du chloroplaste augmente (Huppe et Turpin, 1994). Cela montre l'importance de la balance NADPH/NADP sur la photosynthèse bien que dans le milieu naturel, la photosynthèse est rarement limitée par la demande en NADPH liée à l'assimilation en azote.

En cas d'excès d'énergie lumineuse, la production de NADPH est plus importante que sa consommation (ratio NADPH/NADP élevé) et les composants du transport photosynthétique d'électrons sont réduits, ce qui diminue l'efficacité photochimique et augmente les processus de dissipation non-photochimique de l'énergie (fluorescence, NPQ, chaleur). C'est pourquoi, suite à une forte activité photosynthétique, les chloroplastes exportent dans le cytoplasme des équivalents réducteurs produits en excès qui seront stockés, sous forme de malate par exemple, ou oxydés par la respiration mitochondriale. Il existe des mécanismes spécifiques par lesquels les métabolites sont échangés entre les chloroplastes et les mitochondries *via* le cytosol. Le transfert de métabolites est observé à travers les membranes mitochondriales et chloroplastiques *via* des navettes, ou par des transporteurs spécifiques qui peuvent impliquer l'ATP ou le NADPH.

Le niveau redox du pool de PQ du chloroplaste est intimement lié à l'activité mitochondriale. Dans le noir, le niveau d'oxydation du pool de PQ diminue suite à une augmentation du niveau de NADPH associé à un affaiblissement du niveau d'ATP, en raison de l'inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale chez *C. reinhardtii* (Cuello *et al.*, 1995). Une augmentation de la glycolyse vient également expliquer la diminution de cette oxydation du pool de PQ. Chez *Chlorella*, au noir, le gradient électrochimique au niveau de la membrane thylacoïdienne peut être rétabli par un ajout d'ATP (Joliot et Joliot, 1980). La glycolyse est fortement impliquée dans la régulation du niveau redox de PQ. Une activation de la glycolyse favorise la réduction du pool de PQ en augmentant le niveau de NADPH chez *C. reinhardtii* (Cuello *et al.*, 1995). Dans les feuilles d'épinards, la réduction des plastoquinones dans le noir dépend de réductants du stroma (Harris et Heber, 1993). Afin que les chloroplastes fonctionnent normalement à la lumière il est important que le pool de PQ reste partiellement réduit dans le noir pour fournir les électrons au PSI au moment de l'exposition à la lumière. Le pouvoir réducteur des mitochondries et les réactions de dégradation dans le chloroplaste permettent de maintenir PQ réduite

(Bulte *et al.*, 1990). La réduction des plastoquinones dans le noir a été observée sur les algues et les plantes supérieures (Farineau, 1990; Meunier et Popovic, 1990; Harris et Heber, 1993) et la re-réduction de PQ est observée dans le noir après une oxydation du PSI par une lumière dans le rouge lointain (Farineau, 1990; Meunier et Popovic, 1990). La réduction de PQ par le NADP(H) peut être médiée par une NADP(H) oxydoréductase localisée dans la membrane des thylacoïdes (Godde et Trebst, 1980).

1.7.1 Exportation du NADPH en excès par l'antiport malate / OAA.

Le NADPH chloroplastique en excès est préférentiellement utilisé pour réduire le OAA chloroplastique en malate qui est ensuite exporté hors du chloroplaste. L'enzyme NADP⁺-MDH est activée par un haut niveau de NADPH dans le chloroplaste et son activité est inhibée par O₂ et le NADP⁺ (Scheibe, 1987). Dans le cytosol (peroxysomes ou mitochondries), le malate est réoxydé pour régénérer le OAA et libérer le NADPH et de l'ATP. Le NADP(H) peut également être exporté grâce aux transporteurs bidirectionnels spécifiques malate/oxaloacétate (Mal/OAA) présents sur les membranes mitochondriales et chloroplastiques.

La conversion réversible du malate en OAA génère la réduction du NADP⁺ en NADPH. Ainsi, le transport de malate d'un compartiment donné vers un autre, par exemple du chloroplaste vers le cytosol ou du cytosol vers la mitochondrie, puis la conversion du malate en OAA par la malate déshydrogénase (MDH) dans le compartiment de destination libère du NADPH et donne ainsi lieu à l'exportation du pouvoir réducteur (Berkemeyer, *et al.*, 1998).

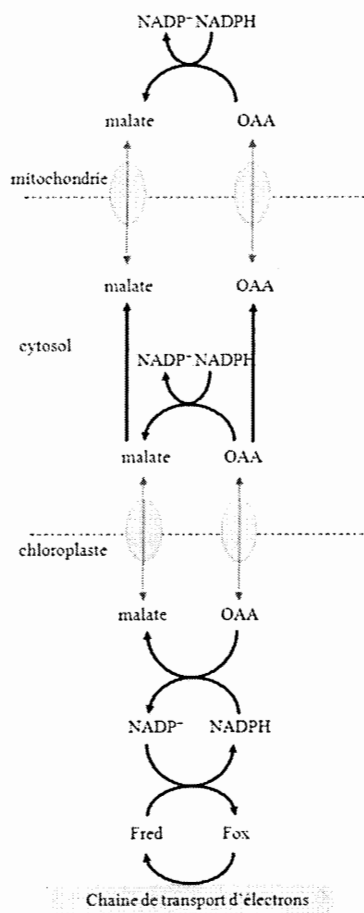


Figure 1.13: Exportation du NADPH en excès par l'antiport malate / OAA.

Fred, Fox : Ferredoxine réduite ou oxydée; OAA : oxaloacétate (Berkemeyer, *et al.*, 1998).

Ainsi, *C. reinhardtii*, à la lumière, quand le NADPH est synthétisé dans les chloroplastes, la MDH est activée et le NADPH est exporté. Une activité mitochondriale importante peut réduire les effets réducteurs de la photoinhibition en éliminant les équivalents réducteurs produits par une activité photosynthétique en excès (Oquist *et al.*, 1993; Shyam *et al.*, 1993; Raghavendra *et al.*, 1994; Hurry *et al.*, 1995). De plus, si la demande en ATP est faible et que la disponibilité en ADP est réduite, les mitochondries des plantes sont capables de maintenir une activité qui ne serait pas phosphorylante et donc n'aboutirait pas à la synthèse finale d'ATP. L'oxydase alternative (AOX) (Day et Wiskich, 1995) est capable de réoxyder le NADPH en présence de O₂ sans la contribution des complexes III et IV de la chaîne de transport des électrons des mitochondries. Elle est inhibée par le myxothiazol (MX).

La réoxydation du NADPH peut se faire également au niveau du PSI *via* la réaction de Mehler, où les formes de l'oxygène sont détoxifiées par une succession de réactions enzymatiques faisant intervenir une monodéhydroascorbate réductase NADP-dépendante. Cependant, des expériences avec des feuilles entières d'épinard et de tournesols (Wiese *et al.*, 1998), mais aussi réalisée sur des chloroplastes (Badger, 1985) ont montré que la réaction de Mehler n'était pas suffisante à elle seule pour protéger de la photoinactivation.

Ces divers systèmes d'élimination du pouvoir réducteur en excès montrent leurs capacités à répondre de multiples manières à des changements de leur environnement.

1.7.2 Transfert d'ATP et de NADPH par le co-transporteur DHAP/3-PGA

Les mitochondries possèdent des translocateurs spécifiques pour exporter l'ATP vers le cytosol en échange d'ADP. Cela en fait des transporteurs plus actifs et qui ont plus d'affinité pour l'ATP, que ceux des chloroplastes.

Chez les chloroplastes, l'exportation d'ATP est moindre par rapport aux mitochondries et est indirecte. Dans un premier temps, les chloroplastes exportent un composé phosphorylé, le dihydroxyacétone 3-phosphate (DHAP) qui est transporté à travers la membrane chloroplastique *via* un transporteur spécifique. Puis, dans le cytosol deux voies sont possibles, le DHAP est soit convertit en 3-phospho-glycérate (3-PGA) par la phosphoglycérate kinase (GPK) ce qui produit de l'ATP et du NADH, soit par la NADP^+ -GAPDH (glyceraldehyde-3-P déshydrogénase) qui transforme aussi le DHAP en 3-PGA et produit seulement du NADPH. Ce dernier processus, qui permet l'exportation du NADPH seul, est plus important que le système phosphorylant (Kromer, 1995).

Par ailleurs, l'exportation d'ATP *via* des translocateurs d'ATP situés sur la membrane des chloroplastes, est encore moins importante. À partir d'une souche mutante pour l'ATP synthase de *C. reinhardtii*, il est montré que quand la concentration en ATP est limitée dans le chloroplaste, l'activité du co-transporteur de DHAP/3-PGA est plus importante que celle du translocateur ATP/ADP, et le DHAP est convertit en ATP et PGA. Le PGA peut être ensuite exporté vers le cytoplasme où il peut être transformé à nouveau en GAP en consommant de l'ATP.

Dans une moindre mesure, il existe aussi une voie qui permet d'exporter un pouvoir oxydant de la mitochondrie au cytosol et transporter dans le chloroplaste un intermédiaire qui viendra réoxyder la Ferrédoxine. Dans le cytosol, la décarboxylation du citrate mitochondrial (un intermédiaire du cycle de Krebs) libère du NADPH et du 2-oxoglutarate. Ce dernier peut être importé dans le chloroplaste par le translocateur 2-OG/malate. Là, il est catalysé par la GOGAT avec la glutamine pour donner du glutamate et réoxyder la ferrédoxine.

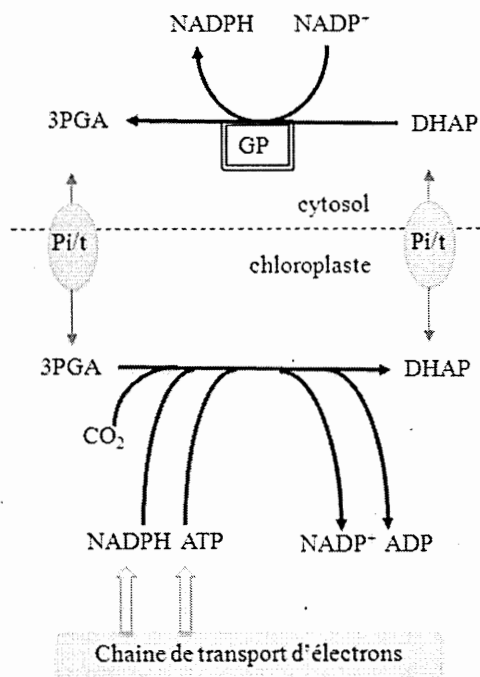


Figure 1.14 : Transfert d'ATP et de NADPH par le co-transporteur DHAP/3-PGA entre le chloroplaste et le cytosol. DHAP : dihydroxyacetone 3-phosphate PGA : phospho-glycérate; GP : glyceraldéhyde-3-P dehydrogénase

Le NAD(P)H cytosolique peut aussi être oxydé dans des faibles proportions, par des NAD(P)H déshydrogénases localisées sur la membrane externe des mitochondries. Cet enzyme a 57 fois plus d'affinité pour le NAD(P)H que pour le NADH. La régulation de ces transports est modulée de différentes manières. Un fort niveau de phosphate inorganique va déterminer la conversion de DHAP en pyruvate ou malate. Plutôt que d'être assimilé dans la synthèse des sucres qui libère du phosphate inorganique, le DHAP est alors transporté dans la mitochondrie. Par ailleurs, dans la mitochondrie, l'exportation de citrate est balancée par l'importation de OAA ou de malate (Foyer et Noctor, 2005).

CHAPITRE 2

OBJECTIFS DE LA THESE

Objectif 1: Etudier la toxicité de trois PPHB sur l'activité photosynthétique du phytoplancton d'eau douce.

Les produits pharmaceutiques et leurs métabolites sont omniprésents dans l'environnement aquatique. Certains d'entre eux sont persistant et bioaccumulables, et relativement mal éliminés dans les stations d'épuration des eaux usées. De plus, leur émission continue dans les eaux usées contribue ainsi à augmenter leur persistance. Des antibiotiques comme la ciprofloxacine (cipro), et le sulfaméthoxazole (SMX), ou encore un antiépileptique comme la carbamazépine (CBZ) font partie des pharmaceutiques qui sont systématiquement détectés dans les eaux usées de surface (Ternes, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003; Webb, 2001) Mis en présence de stress, il est connu que le phytoplancton protège son appareil photosynthétique notamment en piégeant les EAO, par la synthèse de pigments photosynthétiques, ou encore en modifiant ses processus photochimiques (Mac Intyre, 2002; Polimene *et al.*, 2012; Murata *et al.*, 2007). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux interactions de ces produits pharmaceutiques avec certains mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique au niveau du PSII, comme le réarrangement de la taille des antennes, une transition d'état, ou la diminution du piégeage d'électron. (Strasser, *et al.*, 1995; 2000). Le pool de plastoquinone forme une connection fonctionnelle

entre les deux photosystèmes. L'état redox de PQ joue un rôle dans la régulation de certains processus comme le transport linéaire d'électrons, la chlororespiration, le transport cyclique d'électrons autour du PSI (Cournac, *et al.*, 2002 ; Bennoun 2001; Haldimann et Tsimilli-Michael, 2002). Il a été envisagé que le site de liaison de la plastoquinone au PSII au niveau de Q_B soit déterminant dans le rendement de fluorescence de la *Chl a* (Schreiber, 2002). Nous avons cherché à comprendre les modes d'action de ces trois PPHB sur deux espèces d'algues d'eau douce et à évaluer la sensibilité de ces deux espèces du point de vue de leur activité photosynthétique et du niveau de réduction du pool de PQ. L'évaluation de la toxicité sur le phytoplancton peut être réalisée en déterminant l'activité photosynthétique par des mesures de fluorescence chlorophyllienne. En effet, la fluorescence à cinétique rapide (PEA) est une technique qui permet de mesurer la fluorescence de la chlorophylle *a* (*Chl a*) de manière simple, rapide, et non invasive et qui permet ainsi d'évaluer l'état physiologique des plantes et des algues. En utilisant différentes valeurs de fluorescence (les transitions de fluorescence OJIP) (Strasser, *et al.*, 2004), il est possible d'estimer plusieurs paramètres reliés à l'activité photosynthétique et physiologique quand les algues sont exposées aux effets toxiques des polluants ou des stress environnementaux. Ces rendements de fluorescence sont des indicateurs importants dans l'évaluation des processus de la dissipation d'énergie et sont utilisés comme des outils de détermination de la toxicité de xénobiotiques en écotoxicologie (Juneau et Popovic, 1999; Juneau *et al.*, 2002).

En choisissant deux espèces d'algues, une diatomée, *Fragilaria crotonensis*, et une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, nous avons comparé les variations de la réoxydation du pool de plastoquinones par trois PPHB: le SMX, la cipro et la CBZ.

Objectif 2 : Étudier les différents processus de réoxydation du pool de plastoquinone chez deux espèces d'algues, une algue verte et une diatomée.

Dans une seconde partie, nous avons voulu approfondir nos observations sur les différences dans la photosynthèse de ces deux espèces et en particulier sur leur processus de réoxydation du pool de plastoquinone. Nous nous sommes interrogés particulièrement sur les interactions entre les voies alternatives d'électrons et le niveau de réduction du côté donneur du PSI. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la chlororespiration qui possède une activité de transporteur alternatif d'électrons et qui a une activité d'oxydo-réduction du pool de PQ à l'obscurité (Peltier et Cournac, 2002). Le processus de la chlororespiration est localisé entre les PSI et PSII au niveau de la plastoquinone (Bennoun, 1982). Cet accepteur d'électrons subit une étape de réduction et d'oxydation non-photochimique grâce à une NADH-déshydrogénase et une oxydase chloroplastique (PTOX). La chlororespiration est donc une activité respiratoire où l'oxygène moléculaire est l'accepteur final d'électrons avant d'être réduit en H₂O (Cournac *et al.*, 2002). Le mécanisme de la chlororespiration implique la protéine PTOX qui est une oxydo-réductase quinone-oxygène, homologue à l'oxydase alternative des mitochondries. La PTOX joue un rôle dans l'oxydation non photochimique du pool de plastoquinone (Cournac *et al.*, 2000). Les mesures de consommation d'oxygène par la chlororespiration d'énergie peuvent s'effectuer par polarographie à l'aide d'une électrode de Clark.

Dans cette deuxième partie de ce projet de recherche, nous avons donc exploré comment un processus chlororespiratoire peut influencer le niveau de réduction PSI. La réduction du PSI pourra être étudiée par des mesures de modification d'absorbance à l'aide du Dual-PAM. Nous étudierons la modulation de la réduction du PSI sous l'effet d'un agent découplant (NH₄Cl), d'un inhibiteur de transfert cyclique d'électrons autour du PSI, le méthylviologène (MV) (Heber, 2002), et des

inhibiteurs de la chlororespiration (le propylgallate (PG) et l'acide salicylhydroxamique (SHAM) chez *C. reinhardtii*, et *F. crotonensis*.

Objectif 3 : Mise en évidence de la bioaccumulation et de l'effet toxique de la carbamazépine sur une chaîne trophique expérimentale.

Des niveaux de toxicité faible de PPHB peuvent induire des taux de mortalité moindre au niveau du premier maillon de la chaîne trophique du compartiment aquatique. Cependant un transfert de toxicité peut avoir lieu au niveau des maillons supérieurs de la chaîne trophique par des processus de bioconcentration et de bioaccumulation. Un dernier objectif de notre projet de recherche est d'établir des données sur la toxicité d'un produit pharmaceutique humain comme la carbamazépine (CBZ) et son transfert à travers une chaîne trophique expérimentale. Dans cette partie, nous mettrons en place une mini-chaîne trophique expérimentale composée d'une microalgue, *Pseudokirchneriella subcapitata*, d'un crustacé, *Thamnocephallus platyurus*, et d'une hydre, *Hydra attenuata*, afin d'évaluer la toxicité et la bioconcentration de la CBZ. L'usage de cette chaîne trophique est essentiel pour apporter de nouvelles considérations sur la bioaccumulation des produits pharmaceutiques et construire une stratégie adéquate pour évaluer les effets toxicologiques de ces substances.

Nous avons choisi la CBZ car elle est utilisée contre l'épilepsie que l'on retrouve systématiquement dans le fleuve Saint-Laurent à des concentrations comprises entre 0,7 et 6,3 µg/L (Ternes, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003). De plus, la CBZ est relativement lipophile avec un coefficient de partition eau-octanol de 2,45, ce qui en fait une substance bioaccumulable. Ce composé est marqueur d'activité anthropogénique des effluents urbains en raison de sa persistance (121,6 jours (Andreozzi *et al.*, 2002 ; Clara *et al.*, 2004). Selon la relation entre le facteur de bioconcentration, qui est le rapport entre la concentration en CBZ dans l'organisme et

celle du milieu naturel, et le coefficient de partage eau-octanol chez le poisson, la CBZ peut se bioaccumuler entre 10 et 100 fois (Voutsas *et al.*, 2002). En outre, la CBZ est fortement corrélée à la peroxydation lipidique et à la viabilité cellulaire, à des concentrations similaires à celles retrouvées dans l'environnement (Gagné *et al.*, 2005). Des tests de toxicité aiguë ont montré que des effets sub-létaux sont observés chez *Daphnia* à 92 µg/L et que la concentration létale chez le poisson zèbre est de 43 µg/L (Thacker, 2005). A notre connaissance, l'étude de la bioconcentration de la CBZ n'a pas encore été étudiée à ce jour. La CBZ a été conçue pour réaliser un effet biologique (Henschel *et al.*, 1997), et leur devenir et les effets à l'égard des organismes non-cibles dans le compartiment aquatique doit être considéré dans l'environnement.

Dans notre hypothèse de travail nous avons considéré la capacité de bioaccumulation de la CBZ sur une courte durée pour une concentration élevée comme cela se fait lors de tests de toxicité aiguë (Ramade, 2005). Les tests de toxicité aiguë (court temps d'exposition, forte concentration) constituent une étape préliminaire aux études de toxicité chronique (long temps d'exposition, faible concentration). Nous avons choisi une concentration d'exposition du premier maillon de la chaîne qui ne présente pas de toxicité, selon le temps d'exposition, chez *P. subcapitata* pour permettre le transfert trophique au maillon supérieur. Ainsi, la cyanobactérie, *Synechococcus leopolensis* et la diatomée, *Cyclotella meneghiniana*, présentent une EC₅₀ similaire avec respectivement 17 mg/L et 10 mg/L (Ferrari, *et al.*, 2004) ; alors que les algues vertes sont moins sensibles avec une EC₅₀ de 74 mg/L et 110 mg/L pour *Desmodesmus subspicatus* et *Chlorella vulgaris* respectivement (Cleuvers, 2003 ; Ferrari *et al.*, 2004; Jos *et al.*, 2003). Ces résultats sont d'un ordre de grandeur proche de ceux observés dans notre étude où à une concentration aussi élevée que 150 mg/L, la CBZ ne présente pas de toxicité sur l'inhibition de la croissance de *P. subcapitata*. La croissance des algues est mesurée à l'aide d'un compteur de cellules (*Coulter Counter*).

Le second maillon de la chaîne, le crustacé *T. platyurus*, est couramment utilisé pour des tests de toxicité (Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006). Il a été choisi car c'est une proie de choix pour *H. attenuata*, le troisième et dernier maillon de la chaîne. *H. attenuata* est fréquemment utilisé pour effectuer des tests de toxicité car un test normalisé chez *H. attenuata* a été mis au point pour évaluer le potentiel toxique d'échantillons d'eau douce (Trottier *et al.*, 1997). Il est caractérisé par sa simplicité d'application et sa rentabilité (Trottier *et al.*, 1997). Des biomarqueurs physiologiques tels que des tests de mortalité ont été effectués chez le crustacé et l'hydre ainsi qu'une observation des stades de développement de l'hydre. Pour évaluer le transfert de toxicité de la CBZ sur le métabolisme des organismes étudiés, des marqueurs biochimiques ont été mesurés tels que l'activité des enzymes du stress oxydant (GST, GR, hème oxydase, peroxydation des lipides).

CHAPITRE 3

**EFFECT OF THREE PHARMACEUTICALS ON
PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF A GREEN ALGA,
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII, AND A DIATOM,
FRAGILARIA CROTONENSIS.**

*Gabrielle Vernouillet, Philippe Juneau **,

**Department of Biological Sciences-TOXEN, Université de Québec à
Montréal, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada*

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique, est en voie de soumission.

J'ai contribué à l'élaboration des idées de ce projet, et j'ai réalisé les expériences et l'analyse des résultats. J'ai écrit la version initiale de l'article et contribué aux versions suivantes avec P. Juneau.

3.1 Résumé

Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la carbamazépine (CBZ) augmente la dissipation non-photochimique d'énergie sous forme de chaleur, ou de fluorescence (DI_0/RC). De plus, la diminution du F_M , après 15 min au noir, et l'absence d'inhibition du niveau de piégeage d'électrons (TR_0/RC) indique un état photoinhibé des algues. Au contraire, le sulfaméthoxazole (SMX) induit seulement de faibles arrangements de la taille des antennes et de l'activité de piégeage d'électrons des centres réactionnels. L'effet de la ciprofloxacine (cipro) est différent car on peut voir une petite activation de la proportion de photons utilisés pour la réduction de Q_A qui peut résulter d'une diminution des centres réactionnels actifs ou d'une transition d'état. Chez *Fragilaria crotonensis*, en présence de cipro et de CBZ, la diminution du ET_0/RC n'est pas le résultat d'une diminution du piégeage d'électrons (TR_0/RC) comme pour le SMX mais de la réduction de la capacité de transport d'électrons (ET_0/TR_0). C'est en amont du piégeage d'électrons que la cipro et le CBZ interagissent avec le côté donneur du PSII ce qui suggère une limitation dans la réoxydation de Q_A^- . De plus, nos résultats ont montré que les effets des pharmaceutiques avaient une forte inhibition de la réduction de PQ selon une intensité croissante $CBZ < SMX < cipro$ particulièrement chez *F. crotonensis*, et contrairement à *C. reinhardtii* qui est moins sensible.

3.2 Abstract

In the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, carbamazepine (CBZ) increases non-photochemical dissipation of energy as heat, or fluorescence (DI_0/RC). In addition, the decrease in F_M after 15 min of dark, and the absence of inhibition of electron trapping level (TR_0/RC) indicated photoinhibited algae. Sulfamethoxazole (SMX)

induced only low arrangements of antenna size and slight decrease in electron trapping reaction centers activity. The effect of ciprofloxacin (cipro) is different because there is a small activation of the proportion of photons used for the reduction of Q_A , which may result from a decrease in active centers or a state transition. In *Fragilaria crotonensis*, in the presence of CBZ and cipro, ET_0/RC decrease is not the result of a decrease in the electron trapping (TR_0/RC) as for SMX but from a reduced capacity electron transport (ET_0/TR_0). Here, CBZ and cipro interact upstream of the electron trapping with the donor side of PSII which suggests a limitation in the reoxidation of Q_A^- . In addition, our results showed that the pharmaceuticals had a strong inhibition of the reduction of PQ according to increasing intensity $CBZ < SMX < cipro$ especially in *F. crotonensis* in contrast to *C. reinhardtii*, which is less sensitive.

3.3 Introduction

Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) have been extensively studied for their environmental effects on non-target organisms (Lanzky et Halling-Sørensen, 1997; Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Geoffroy *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005). Antibiotics represent a large class of PPCPs, widely used in diverse applications such as human and veterinary medicine, agriculture, industry and livestock production. In the UK, an increase of 45 tons of veterinary antibiotics

sales was observed in 2010, according to data recorded by the Veterinary Medicines Directorate report (Executive Agency of the Department for Environment, 2011/12). In 2009, the average consumption of antibiotics within countries of the European Union increased by 18% compared to 1999, with 21.3 Defined Daily Doses per 1000 habitants per day (standard posology for a 70kg adult) (Afssa, 2011). Indeed, by considering increasing human consumption and non-adapted removal through sewage treatment plants before discharge in freshwaters (Ternes, 1998; Petrovic *et al.*, 2005; Karthikeyan et Meyer, 2006) high concerns are raised concerning their side effects on freshwater microorganisms.

Quinolone and sulfonamide antibiotics are among the five most used PPCPs and are found frequently in groundwaters (Miao *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2005). Indeed, ciprofloxacin (cipro), a quinolone, was detected at concentrations of 0.045-0.108 µg/L in sewage effluents in Switzerland (Golet *et al.*, 2001) and between 0.118-0.4 µg/L in Canada (Ims Health Canada). In some waterbodies of China, cipro was found at concentrations between 0.7 and 124.5 µg/L (Klummerer, 2001), levels higher than the lethal concentration determined for aquatic microorganisms (Boxall *et al.*, 2004). Halling-Sørensen *et al.* (2000) showed that this PPCP has adverse effect on growth of *Selenastrum capricornutum* and *Microcystis aeruginosa* with EC50-72h of respectively 2.97 and 0.005 mg/L. Sulfamethoxazole (SMX) is one of the most frequently detected sulfonamides in groundwater and has been found at concentrations up to 0.22 µg/L in Germany (Sacher *et al.*, 2001), 0.41 µg/L in

United States (Lindsey *et al.*, 2001) and between 0.243-0.871 $\mu\text{g/L}$ in Canada (Miao *et al.*, 2004). SMX (1.5 mg/L) and cipro (1.5 mg/L) induced, after 96h exposure, a significant decrease (up to 20%) of chlorophyll content in *S. capricornutum*. Photosynthetic rate was also decreased by up to 22% at concentrations of 0.5 mg/L and 1 mg/L of SMX and cipro respectively (Liu *et al.*, 2011). Carbamazepine (CBZ) as an antiepileptic drug is one of the most commonly detected PPCPs in municipal sewage-treatment plant effluents due to anthropogenic activities (Zhang *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1999; Clara *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). This compound is not degraded in freshwater environments and is found at concentrations ranging from 0.7 to 6.3 $\mu\text{g/L}$ (Ternes, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003; Lajeunesse et Gagnon, 2007). In green algae, previous studies showed that CBZ exposure induced a decrease in growth and chlorophyll *a* content (Zhanga *et al.*, 2012) and also a toxicity transfer between aquatic trophic levels (Vernouillet *et al.*, 2010).

PPCPs used as antimicrobial agents were designed to target gram-negative bacteria although some activity is seen with some gram-positive bacteria (Hawkey, 2003) and effects on non-target organisms, such as plants and aquatic microorganisms, were also previously observed. Cipro, has been shown to have a genotoxic action on plants as a result of DNA-topoisomerase II inhibitory activity (Khadra *et al.*, 2012). Robinson *et al.* (2005) reported growth EC₅₀-24h of 17 $\mu\text{g/L}$ for the cyanobacteria *M. aeruginosa* and a more than 1000 times higher EC₅₀ (18.7 mg/L) for the green alga, *Selenastrum capricornutum*. Consequently, a large range of sensitivity between

prokaryotes, such as cyanobacteria, and eukaryotes, such as green alga, has been shown for growth of these organisms, but to our knowledge no information exists on PPCPs toxicity on diatoms. Furthermore, it was previously shown that some chemicals affecting processes having no obvious link with photosynthesis may alter photosynthetic electron transport of phytoplankton (Chen *et al.*, 2007; Mohapatra *et al.*, 2010; Perron and Juneau 2011). Indeed, further studies are required to investigate physiological response of freshwater algae to extensively used antibiotics, preventing DNA replication (cipro and SMX), and antiepileptic (CBZ). However, chlorophyll fluorescence measurements were shown to be a useful tool to indicate photosynthetic efficiency in algae. Measurements of photochemical capacity and yield were proved to be a rapid, non-invasive, and reliable method to evaluate photosynthetic performance under environmental pollution (Strasser *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 1994). Therefore, although PPCPs were not designed to directly affect photosynthesis, we investigated how photosynthetic activity and energy fluxes within photosystem II of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* and a diatom, *Fragilaria crotonensis* may be affected by cipro, SMX, and CBZ.

3.4 Materiel and Methods

3.4.1 Algal culture

Fragilaria crotonensis was isolated from a water sample collected in July 2008 in Réservoir Choinière, (Eastern Townships, Québec, Canada) (Deblois *et al.*, 2012) and *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-125) culture was obtained from the Chlamydomonas Genetic Center (Duke University, Durham, NC). Cells were cultivated in batch cultures of 500 mL high salt growth medium (Sueoka *et al.*, 1967), for green algae, and CHU-10 (Stein, 1973), for diatoms, with a light : dark cycle of 16: 8 h at a light intensity of 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ provided by white fluorescent lamps (Sylvania cool white F22T12/CW/VHO, Canada) at 25 ± 1 °C.

PEA measurements were performed when the algal cultures were in the exponential growth phase at a biomass of 10 μg of Chl *a* /mL.

In order to determine Chl *a* concentration, cells were harvested by filtration on a 0.8 μm pore size membrane filter. Extraction of Chl *a* was done in 100% MeOH at 78°C for 60 min (Lorenzen, 1967). The extract was centrifugated for 10 min at 2500g at 4°C and the OD of the supernatant was measured with a spectrophotometer (Cary300WINUV, Varian, USA) at wavelengths of 480 and 665 nm prior and after acidification with HCl. To correct sample turbidity, a measurement at 750 nm was used. Chl *a* concentration was calculated according to Lorenzen (1966).

3.4.2 Preparation of PPCPs solution and exposure

PPCPs were bought from Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich Canada*, Oakville, ON) and dissolved in water and dimethyl sulfoxide (DMSO) (Final concentration of DMSO < 0.5%). At that concentration, DMSO has no effect on photosynthetic activity and photosystem II energy fluxes (data not shown and El Jay (1996)). Algal cultures were exposed in triplicate for 72 hours to various concentrations of carbamazepine (CBZ) (0, 0.5, 5, 50, 150 mg/L), sulfamethoxazole (SMX) (0, 0.001, 0.0025, 0.1, 0.5, 2, 9 mg/L) and ciprofloxacin (cipro) (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 5mg/L).

3.4.3 Measurement of fluorescence transient

Fast fluorescence induction curves were recorded with a Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech, Norfolk, England) on 2 mL of samples in 6-mm diameter vials using the aqueous-phase attachment at a light intensity of 3500 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (Strasser *et al.*(1995). Prior to PEA fluorescence measurements, treated algal samples were dark-acclimated for 15 min. for complete re-oxidation of PSII associated electron carriers. According to (Strasser *et al.*, 1995), the O transient was considered as the minimal fluorescence (F_0) at 50 μs when all reaction centers of PSII are open and the P transient as the maximal fluorescence yield, (F_M), when all reaction centers of PSII are closed. The variable fluorescence yields related to J and I transients were respectively determined at 2 ms and 30 ms. Kinetics were normalized to their corresponding F_0 level. Chl *a* fluorescence transients (OJIP) indicated the reduction of the photosynthetic electron transport chain (Schansker et Strasser, 2005). More

specifically, the O-J timescale area represents the reduction of the PSII acceptor side by Q_A and Q_B reduction. The J-I phase represents the partial reduction of PQ pool and lastly the I-P phase indicated the reduction of the acceptor side of PSI (Munday et Govindjee, 1969; Schansker et Strasser, 2005). Various parameters describing energy fluxes within PSII were calculated according to Force *et al.* (2003).

The area above the fluorescent transient was treated separately according to O-J-I-P phases. We assumed that PSII electron carriers including the PQ-pool were reduced in control algae at P transient (F_M) (Schansker *et al.*, 2003; Schansker et Strasser, 2005). The area above the O-J timescale represents the number of electrons needed for PSII acceptor side reduction. The area above the J-I timescale is proportional to the number of electrons needed for the reduction of the PQ-pool. Areas represented in Figure 3.1 and were calculated by taking into account the changes in the fluorescence signal and using a linear time-base (Toth, 2007). We used F_M from the control to compare fluorescence kinetics of the various treatments, in order to prevent any bias by using a different F_M for each kinetic curve (Toth *et al.*, 2007).

3.4.4 Data analysis and statistics

Data were expressed as mean \pm standard deviation. All data were analyzed using GraphPad Prism software version 4.0 (PRISM4) (GraphPad Software Inc, LaJolla, CA). Statistical analyses between controls and exposed samples were done by one way analysis variance (ANOVA) and Tukey–Kramer multiple comparisons tests (p

values < 0.05 were considered significant).

3.5 Results and Discussion

3.5.1 Carbamazepine (CBZ) effect

Figures 3.2 and 3.3 shows J-I-P test parameters of *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B) after 72h exposure to different concentrations of CBZ. Our results showed that absorption flux per reaction center (ABS/RC) of *C. reinhardtii* increased by 26 % at the highest concentration (150 mg/L) without affecting maximal trapping rate of PSII (TR_0/RC) and electron transport rate in an active reaction center (ET_0/RC). The increase of absorption flux was associated with augmented energy dissipation through active reaction centers (Di_0/RC) by 44% and 80 % compared to the control for 50 mg/L and 150 mg/L of CBZ respectively. No change of the reduction rate of Q_A (M_0) combined with no modification in the probability that an electron present in Q_A enters in the electron transport chain (ET_0/TR_0) indicated that Q_A-Q_B electron transfer was not affected by CBZ. This result suggests that increased CBZ concentrations lead to increased energy absorption, which is dissipated through heat since ET_0/TR_0 was unchanged. The area above the O-J step of the rapid fluorescence kinetic reflects the number of electrons necessary to reduce the PSII acceptor side. The area over the following J-I step is proportional to the number of electrons needed to reduce the PQ-pool (Schansker *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007). In *C. reinhardtii*, CBZ concentrations from 50 to 150 mg/L induced an increase of the

O-J area by 37% to 39 %, respectively, compared to the control (Table 3.1). For the same concentrations of CBZ, the J-I area was strongly enhanced by 208% and 246% compared to the control. This indicates that although CBZ did not affect the rate of electron transport (M_0 and ET_0/TR_0), the number of electrons needed to reduce the primary electron acceptors and the PQ-pool seem to be enhanced by this PPCP in *C. reinhardtii*. Furthermore, this high level of PQ pool oxidation is positively correlated with effective dissipation (DI_0/RC) ($r^2= 0.87$) (Figure 3.2 A). CBZ may stimulate more electrons to reduce the PQ pool, which might in turn increase energy dissipation through heat, and fluorescence. Since the effective antenna size of the remaining active RCs enhanced, this increase in the effective dissipation of an active RC (DI_0/RC) indicated a loss of connectivity between PS II units. Also, the decline in F_M after 15 min darkness may not be due to a state-2 transition, since no decrease is seen at the trapping level, but may instead be attributed to photoinhibitory quenching.

F. crotonensis was shown to be more sensitive to CBZ exposure than *C. reinhardtii* and the effect was observed at concentrations as low as 5 mg/L . The effective antenna size per reaction center (ABS/RC) increased by 68% when CBZ concentration was 150 mg/L , while the electron transport per reaction center in PSII (ET_0/RC) decreased in presence of 5mg/L to 150 mg/L CBZ from 39% to 61% compared to the control, respectively (Figure 3.3 A). Consequently, energy dissipation through active reaction centers (DI_0/RC) was augmented from 28% to 250% for the same concentrations. High energy dissipation associated with a decline

in the electron trapping probability (ET_0/TR_0) (from 40 to 62 %) may indicate photoinhibited algae (Force, 2003). The fluorescence at the origin (M_0) related to the rate of Q_A reduction and Q_A reduction level (VJ) increased by 35% and 33% respectively at 150 mg/L are in accordance with the observed slowdown in electron transport (ET_0/RC). Furthermore, for *F. crotonensis* (Table 3.1), the area above the curve at O-J and J-I timescales were increased by exposure to 150 mg/L CBZ by up to 63% and 306% respectively compared to the control, showing that CBZ toxicity induces an effect similar to the effect observed in the presence of ammonium chloride for the same algal species (Vernouillet *et al.*, submitted). Interestingly, the ABS/RC increase is positively correlated to the electrons needed to reduce Q_A , Q_B and PQ-pool ($r^2 = 0.955$; data not shown), which might indicate a link between the regulation in the amount of light reaching the RC and the PQ-pools oxidized level. Indeed, it is known that an oxidized PQ-pool is associated with LHC dephosphorylation and movement of electrons to PSII (Allen, 1981) and could thus explain the increase in the number of photons absorbed by active centers (ABS/RC). This effect is coupled with a decline in electron transport probability (ET_0/RC) associated with a reduction in electron transport capacity (ET_0/TR_0). Furthermore, this severe diminution in these electron transport parameters of the adjusted JIP-test is similar to a typical DCMU fluorescence transient with plateau-like effect on the I level (Force, *et al.*, 2003) and suggests a limitation of Q_A -reoxidation. It is noteworthy that the area above the curve at J-I is also positively correlated with Di_0/RC ($r^2 = 0.963$) as this might indicate that

even a larger number of electrons are needed to reduce PQ, with a large loss of energy as heat or fluorescence.

These results may indicate that CBZ stimulated PQ pool oxidation and induced a loss of absorbed energy through heat or fluorescence (Strasser *et al.* 2000). Taken together, this suggests *F. crotonensis* is photoinhibited. Contrary to *C. reinhardtii*, we noticed that CBZ induced an inhibition of PSII electron transport in *F. crotonensis*, indicating that these two species might have different protection mechanisms against this PPCP.

3.5.2 Sulfomethoxathole (SMX) effect

In *C. reinhardtii*, SMX did not significantly affect PSII fluorescence parameters (Figure 3.2 B) even at the highest concentration (9 mg/L). O-J timescale areas (Table 3.1) are also not significantly induced by SMX but J-I timescale areas are increased in a range of 29% to 40 % by SMX increasing concentrations. These results indicated that there are small adjustments of antennae size and trapping activity by reaction centers to allow electron transfer and compensate for dissipation of excess photon by other pathways. Our results are in accordance with a previous study demonstrating a reduced photosystem II quantum yield for another green alga, *Desmosdesmus subspicatus* (Escher *et al.*, 2005).

In *F. crotonensis*, SMX had a strong toxic effect on electron transport (ET_0/RC) (Figure 3.3 B). Indeed, a decrease of 68% compared to the control was noticed at the

highest concentration (9 mg/L) as a result of an inhibition at the energy trapping level since Q_A - Q_B electron transfer probability (ET_0/TR_0) was also strongly diminished even for low concentrations of SMX (0.1 mg/L =-26%). The Q_A reduction level (V_j) and net rate of PS II closure (M_0) were weakly affected until the highest concentration, suggesting that Q_A reduction was not the major response site for SMX (Figure 3.3 B) since the M_0 parameter takes into consideration the reduced Q_A^- that can be reoxidised via electron transport beyond Q_A . In agreement with these results, O-J area timescale (Table 3.1) was less affected (29% to 37% between 0.1 mg/L and 9 mg/L) than J-I area timescale, which was increased respectively from 284% to 539%, compared to the control for the same SMX concentrations. These results seem to indicate that SMX limits electron transfer to Q_A , Q_B and the PQ-pool and therefore contributes to decrease linear electron transport. As a consequence, there is an increase of dissipation energy (Di_0/RC) by 76% at the highest concentration.

In *F.crotonensis*, the decrease in electron transport activity (ET_0/RC) could be explained by SMX limitation of the linear electron transport between PSII quinones and PQ-pool by SMX (Figure 3.3 B). On the other hand, *C. reinhardtii* was not similarly affected by SMX exposure since the first step of the quinone reduction was not affected by this PPHP.

3.5.3 Ciprofloxacin (cipro) effect.

In *C. reinhardtii*, an increase by 20% at the highest concentration of cipro in effective dissipation (DI_0/RC) (Figure 3.2 C) indicated a slow down in PSII primary photochemistry and is accompanied by a small increase (12%) of absorbed photon by light harvesting antennae (LHCII) with respect to functional PSII reaction centers (ABS/RC). Also, the proportion of photons used for the reduction of Q_A (TR_0/RC) was slightly increased by 9%, which may be the result of a diminution of the number of active reaction centers or the induction of a state transition. There is no meaningful limitation in Q_A reduction since increasing concentrations of cipro did not modify the O-J timescale area (Figure 3.4 C). The J-I timescale area was also not affected by increasing concentrations of this PPCP. We also notice that the electron transport rate (ET_0/RC) of *C. reinhardtii* was not limited by cipro even at high concentrations.

For *F. crotonensis* (Figure 3.3 C), increasing concentrations of cipro decreased electron transport (ET_0/RC) by 12% to 67% at 0.01 mg/L and 5mg/L of cipro respectively. This decline in ET_0/RC was not a result of a decline in trapping (TR_0/RC) but from a reduction in the electron transport capacity (ET_0/TR_0) (16 % to 63% compared to the control). An earlier study (Aristilde *et al.*, 2010) showed that cipro could interact stereochemically with the pheophytin-quinone-type of PSII and can inhibit the catalytic activity of the reaction center II. This could explain the observed limitation in electron transport probability. Furthermore, a decline in electron chain probability (ET_0/TR_0) associated with an increase in dissipation by the

active reaction center (DI_0/RC) from 30% to 125% indicated a possible photoinhibitory effect of cipro on *F. crotonensis*. Usually, dissipation of energy takes place as heat, fluorescence or energy transfer to other systems and is modulated by the ratio of active/inactive reaction centers. This dissipation is reflected by an augmented antenna size (ABS/RC), in the same range as DI_0/RC , from 12% to 150 % respectively at 0.01 mg/L and 5mg/L . In addition, O-I and J-I timescale (Figure 3.5 C) areas are drastically increased from a starting concentration of cipro of 0.001mg/L (34% and 293%, respectively) to the highest concentration of 5mg/L (82% and 1038%). Dissipative energy is positively correlated with the J-I timescale area ($r^2=0.94$) and we suggest that stereochemical interaction of ciprofloxacin with PSII-pheophytin-quinone might also stimulate PQ pool oxidation (Figure 3.5 C).

Moreover, quinolones such as cipro are known to favor ROS formation by a CYP450-dependent reaction (Arriaga-Alba *et al.*, 2000). Indeed, Nie *et al.* (2008) reported that cipro stimulated anti-oxidant enzyme activity in *Chlorella vulgaris*. Catalase activity increased by 8.2-fold at 12.5 mg/L of cipro. Glutathione S-transferase catalyzed conjugation of electrophilic compounds to glutathione and was 1.4 times higher at 12.5 mg/L of cipro (Nie *et al.*, 2008). Also, NADPH is the main electron source used in protection mechanism against oxidative stress but was also shown to be involved in non-photochemical reduction of plastoquinones (Mus *et al.*, 2005). Antioxidant enzymes activities are increased in *Selenastrum capricornutum* following cipro and SMX addition above 1.5 mg/L (Nie *et al.*, 2013) The ascorbate

glutathione cycle and catalase, superoxide dismutase and glutathion peroxidase activities are stimulated as a defense against cipro toxicity. Also, Nie *et al.* (2013) demonstrated that SMX exposure induced GR activity above 1.0 mg/L and reduced the xanthophyll cycle and GST activity, which is known to diminished damages on the photosynthetic apparatus. In our study, SMX was less toxic than cipro notably in *F. crotonensis*. An explanation might be that SMX caused an uncoupling of thylakoid membranes, causing a rise of transthylakoidal pH gradient (Nie, *et al.*, 2013). Indeed, an increased the total xanthophylls cycle pool size, which are known to be involved in photoprotection was observed in *P. subcapitata* (Liu *et al.*, 2011).

In *F. crotonensis*, there is a great increase in the J-I area in presence of increasing concentration of CBZ, SMZ and cipro compared to *C. reinhardtii*. This result was associated with an increase in the dissipation of heat at the level of the antenna chlorophylls (DI_0/RC) and a decrease in the flux of electrons from Q_A to the electron transport chain per center (ET_0/RC). Similar results were observed in presence of amoxilin in *Synechocystis sp* (Pan *et al.*, 2008) and arsenic in *Microcystis aeruginosa* (Wang *et al.*, 2012). According to these results, we suggest that the electron transport after Q_A was partly prevent by PPCPs.

Furthermore, we suggested that increased J-I area might be explained by an inhibition of electron transport at the donor side of PSII, and lead to an increase of $P680^+$, which is known to be a fluorescence quencher (Neubauer *et al.*, 1987 ; Govindjee, 1995).

3.6 Conclusion

The PQ pool became increasingly more oxidized following exposure to CBZ, SMX, and cipro. These results showed a clear difference in PPCPs sensitivity between the two studied species. These results showed a clear difference in sensitivity to PPCPs between the two algae studied, with *F. crotonensis* more sensitive to PPCP toxicity and *C. reinhardtii* more resistant. More specifically, CBZ exposure enhanced oxidized level of PQ pool and cipro-targeted electron transport around PSII. Also a decrease in electron transfer between Q_A - Q_B and PQ following SMX exposure was observed. These differences in the mode of action depending on the algal species were not highlighted to our knowledge in earlier studies. We showed here that the PPCPs studied in the present study could differentially affect the photosynthetic activity of freshwater microalgae and may potentially unbalance the green algae/diatom ratio. Further studies are therefore needed to study this effect in contaminated waters. Also, due to their low toxicity CBZ, SMX and cipro may not induce significant effects on algae in aquatic field. Nevertheless, further studies should take into account the chronic and multigenerational contamination to specify the evaluation of their potential of toxicity. Furthermore, since the two studied species have differences in their PQ-redox processes in the dark (Vernouillet *et al.*, submitted) and that PPCPs seem to interact with PQ pool reoxidation indicating that further research is needed to better understand the differences in the mode of action of these compounds in both species.

3.7 Acknowledgments

The authors want to thank Karine Dufresne for her appreciated technical assistance. This research was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) research grants awarded to P.J.

3.8 References

- Afssa (2011). Dix ans d'évolution des consommations d'antibiotiques en France. A. f. d. s. s. d. p. d. santé.: 23p.
- Aristilde, L., A. Melis, *et al.* (2010). "*Inhibition of Photosynthesis by a Fluoroquinolone Antibiotic.*" *Environ. Sci. Technol.* 44: 1444–1450.
- Arriaga-Alba, M., R. Rivera-Sánchez, *et al.* (2000). "*Antimutagenesis of beta-carotene to mutations induced by quinolone on Salmonella typhimurium.*" *Arch Med Res.* 31(2): 156-161.
- Boxall, A. B. A., L. A. Fogg, *et al.* (2004). "*Veterinary medicines in the environment.*" *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180: 1-91.
- Chen, M., K. Ohman, *et al.* (2006). "*Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada.*" *Water Quality Research Journal of Canada* 41(4): 351-364.
- Clara, M., B. Strenn, *et al.* (2004). "*Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of*

Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration." Water Res 38(4): 947-954.

Deblois, C. P., K. Dufresne, *et al.* (2012). "*Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine.*" Aquatic Toxicology 126: 77-84.

El Jay, A. (1996). "*Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, Chlorella vulgaris and Selenastrum capricornutum.*" Archives of Environmental Contamination and Toxicology 31: 84-90.

Escher, B. I., N. Bramaz, *et al.* (2005). "*In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life.*" Environmental Science and Technology 39(9): 3090-3100.

Executive Agency of the Department for Environment, F. R. A. (2011/12). Veterinary Medicines Directorate Annual Report & Accounts: 56.

Force, L., C. Critchley, *et al.* (2003). "*New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants.*" Photosynthesis Research 78: 17-33.

Geoffroy, L., D. Dewez, *et al.* (2003). "*Oxyfluorfen toxic effect on S. obliquus evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers.*" Arch Environ Contam Toxicol 45(4): 445-452.

Golet, E. M., A. C. Alder, *et al.* (2001). "*Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection.*" Analytical Chemistry 73(15): 3632-3638.

- Govindjee (1995). "*Sixty-tree years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence.*" Australian Journal of Plant Physiology 22: 131-160.
- Halling-Sorensen, B., H. C. Holten Lutzhoft, *et al.* (2000). "*Environmental risk assessment of antibiotics: Comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin.*" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46(SUPPL. 1): 53-58.
- Halling-Sørensen, B., N. Nielsen, *et al.* (1998). "*Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment.*" Chemosphere 36: 357-393.
- Hawkey, P. (2003). "*Mechanisms of quinolone action and microbial response.*" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51(Suppl S1): 29-35.
- ImsHealthCanada (2009). Canadian CompuScript, Statistics Canada, December data month.
- Karthikeyan, K. G. and M. T. Meyer (2006). "*Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin.*" Sci. Total Environ 36(196-207).
- Khadra, A., E. Pinelli, *et al.* (2012). "*Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the Vicia faba micronucleustest.*" Ecotoxicology and Environmental Safety 16: 187-192
- Klumnerer, K. (2001). "*Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - A review.*" Chemosphere 45(6-7): 957-969.
- Lajeunesse, A. and C. Gagnon (2007). "*Determination of acidic pharmaceutical products and carbamazepine in roughly primary-treated wastewater by solid-*

- phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry.*" International Journal of Environmental Analytical Chemistry 87(8): 565-578.
- Lanzky, P. and B. Halling-Sørensen (1997). "*The toxic effects of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms.*" Chemosphere 35: 2553-2561.
- Lindsey, M. E., M. Meyer, *et al.* (2001). "*Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry.*" Analytical Chemistry 73(19): 4640-4646.
- Liu, B., W. Liu, *et al.* (2011). "*Growth response and toxic effects of three antibiotics on Selenastrum capricornutum evaluated by photosynthetic rate and chlorophyll biosynthesis.*" Journal of Environmental Sciences 23(9): 1558-1563.
- Liu, B. Y., X. P. Nie, *et al.* (2011). "*Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in Selenastrum capricornutum.*" Ecotoxicology and Environmental Safety 74(4): 1027-1035.
- Lorenzen, C. J. (1966). "*A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration.*" Deep-Sea Res. 13: 223-227.
- Lorenzen, C. J. (1967). "*Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations.*" Limnology Oceanography 12: 343-346
- Metcalf, C. D., B. G. Koenig, *et al.* (2003). "*Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants.*" Environ Toxicol Chem 22(12): 2872-2880.

- Miao, X-S., F. Bishay, *et al.* (2004). "*Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada.*" *Environ. Sci. Technol.* 38: 3533-3541.
- Mohapatra, P. K., R. Khillar, B. Hansdah and R. C. Mohanty (2010). "*Photosynthetic and fluorescence responses of Solanum melangena L. to field application of dimethoate.*" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(1): 78-83.
- Munday, J. C. J. and Govindjee (1969). "*Light-Induced Changes in the Fluorescence Yield of Chlorophyll-a In Vivo. The Effect of Preillumination on the Fluorescence Transient of Chlorella pyrenoidosa.*" *Biophysical Journal* 9(1): 22-35.
- Mus, F., L. Cournac, *et al.* (2005). "*Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Biochimica et Biophysica Acta.* 1708: 322-332.
- Neubauer, C. and U. Schreiber (1987). "*The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side.*" *Zeitschrift fur Naturforschung* 42: 1246--1254.
- Nie, X. P., B. Y. Liu, *et al.* (2013). "*Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in Pseudokirchneriella subcapitata.*" *Environmental Pollution* 172: 23-32
- Nie, X., X. Wang, *et al.* (2008). "*Response of the freshwater alga chlorella vulgaris to trichloroisocyanuric Acid and ciprofloxacin.*" *Environ Toxicol Chem* 27(1): 168-173.

- Nunes, B., F. Carvalho, *et al.* (2005). "*Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: Gambusia holbrooki, Artemia parthenogenetica, and Tetraselmis chuii.*" *Eco-toxicol Environ Saf.* 61: 413-419.
- Pan, X., C. Deng, *et al.* (2008). "*Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of Synechocystis sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests.*" *Aquatic Toxicology* 89(4): 207-213.
- Petrovic, M., M. D. Hernando, *et al.* (2005). "*Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples.*" *J. Chromatogr. A* 1067(1-14).
- Pinto, E., T. C. S. Sigaud-Kutner, *et al.* (2003). "*Heavy metal-induced oxidative stress in algae.*" *Journal of Phycology* 39(6): 1008-1018.
- Pospisil, P. (2012). "*Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II.*" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(1): 218-231.
- Richardson, B. J., P. K. S. Lam, *et al.* (2005). "*Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China.*" *Mar. Pollut. Bull.* 50: 913-920.
- Robinson, A., J. Belden, *et al.* (2005). "*Toxicity of fluoroquinone antibiotics to aquatic organisms.*" *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(2): 423-430.
- Robinson, A. A., J. B. Belden, *et al.* (2005). "*Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms.*" *Environ Toxicol Chem* 24(2): 423-430.

- Sacher, F., F. T. Lange, *et al.* (2001). "Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany." *Journal of Chromatography A* 938(1-2): 199-210.
- Sanderson, H., R. Brain, *et al.* (2004). "Toxicity classification and evaluation of four pharmaceutical classes: Antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones." *Toxicology* 203: 27-40.
- Schansker, G., A. Srivastava, *et al.* (2003). "Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves." *Funct Plant Biol* 30 785-796.
- Schansker, G. and R. J. Strasser (2005). "Quantification of non- Q_B -reducing centers in leaves using a far-red pre-illumination." *Photosynth Res* 84(1-3): 145-151.
- Schansker, G., S. Z. Toth, *et al.* (2005). "Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP." *Biochim Biophys Acta* 1706(3): 250-261.
- Schreiber, U., W. Bilger, *et al.* (1994). *Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Ecophysiology of photosynthesis. Ecological studies.* E. D. Schulze and M. M. Caldwell. Berlin, Germany, Springer Verlag. 100: 49-70.
- Seiler, R. L., S. D. Zaugg, *et al.* (1999). "Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells." *Ground Water* 37(3): 405-410.
- Stein, J. (1973). *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements.*

- Strasser, R. J., A. Srivastava, *et al.* (1995). "*Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria.*" *Photobiochemistry and Photobiophysics* 61(1): 32-42.
- Strasser, B., A. Srivastava, *et al.* (2000). *The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation.* M. Yunus, Pathre, U., and Mohanty, P. London, Taylor and Francis: 445-483.
- Sueoka, N., K. S. Chiang, *et al.* (1967). "*Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of Chlamydomonas reinhardtii. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores.*" *Journal of Molecular Biology* 25: 44-67.
- Ternes, T. A. (1998). "*Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.*" *Water Research* Volume 32,(Issue 11): 3245-3260.
- Torres, M. A., M. P. Barros, *et al.* (2008). "*Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review.*" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(1): 1-15.
- Toth, S. Z., G. Schansker, *et al.* (2007). "*A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient.*" *Photosynth Res* 93(1-3): 193-203.
- Vernouillet, G., P. Eullaffroy, *et al.* (2010). "*Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels.*" *Chemosphere* 80(9): 1062-1068.

- Vernouillet, G., J. Lavaud, *et al.* (submitted). "*Interaction between pH gradient and PSI reduction level in dark adapted diatom, Fragilaria crotonensis, and green alga, Chlamydomonas reinhardtii.*"
- Wang, S., D. Zhang, *et al.* (2012). "*Effects of arsenic on growth and photosystem II (PSII) activity of Microcystis aeruginosa.*" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84: 104-111
- Zhang, X., E. Brammer, *et al.* (1997). "*Effects of light photon flux density and spectral quality on photosynthesis and respiration in Porphyra yezoensis (Bangiales, Rhodophyta).*" *Phycological Research* 45: 29-37.
- Zhanga, W., M. Zhanga, *et al.* (2012). "*Eco-toxicological effect of Carbamazepine on Scenedesmus obliquus and Chlorella pyrenoidosa.*" *environmental toxicology and pharmacology* 33 344–352.

3.9 Figures and Table

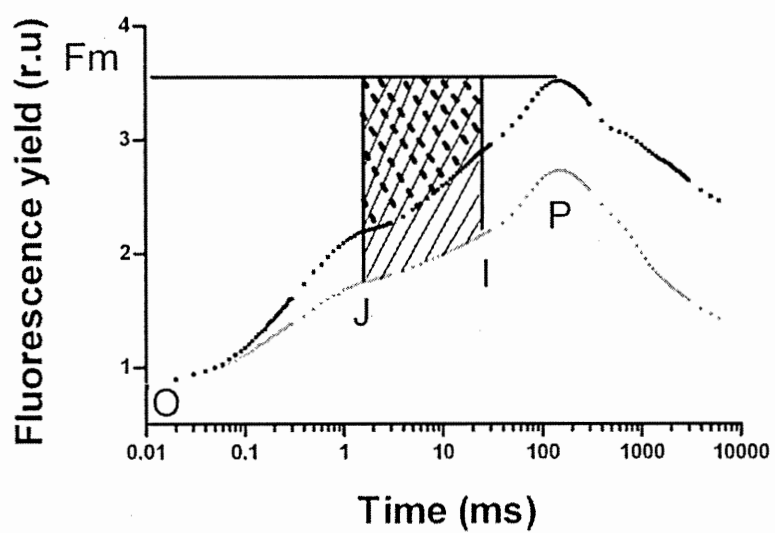


Figure 3.1: Determination of the area above the JI-phase for dark adapted *C.reinhardtii* control algae (dark line) and algae exposed to 50 mg/L of CBZ (grey line). J-I timescale areas (3-30 ms) are represented for control (dotted area) and exposed algae (hatched line).

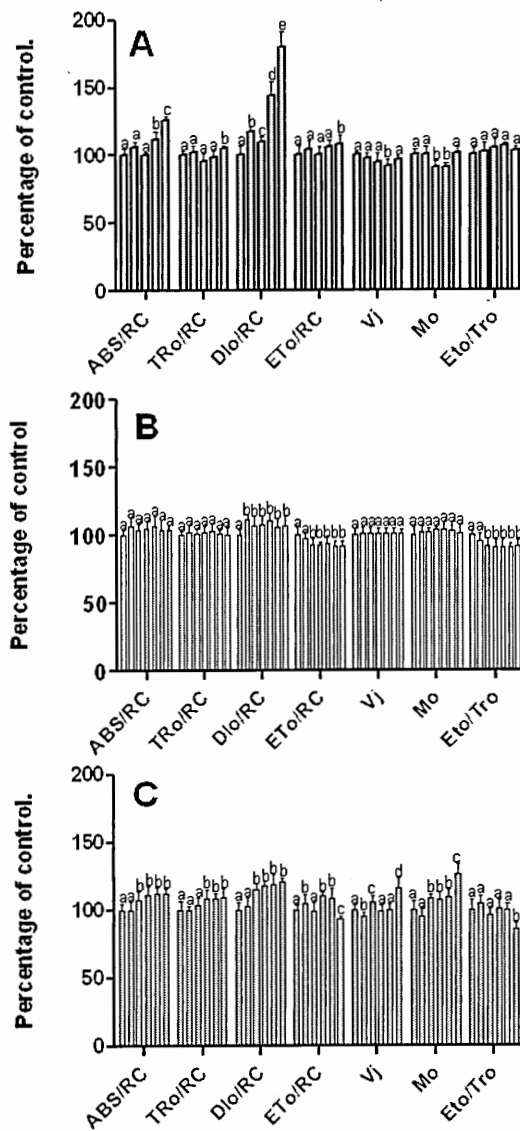


Figure 3.2: JIP-test parameters expressed as percentage of control for *C. reinhardtii* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150 mg/L), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9 mg/L) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5 mg/L) are shown for each parameter from less concentrated to more concentrated (left to right).

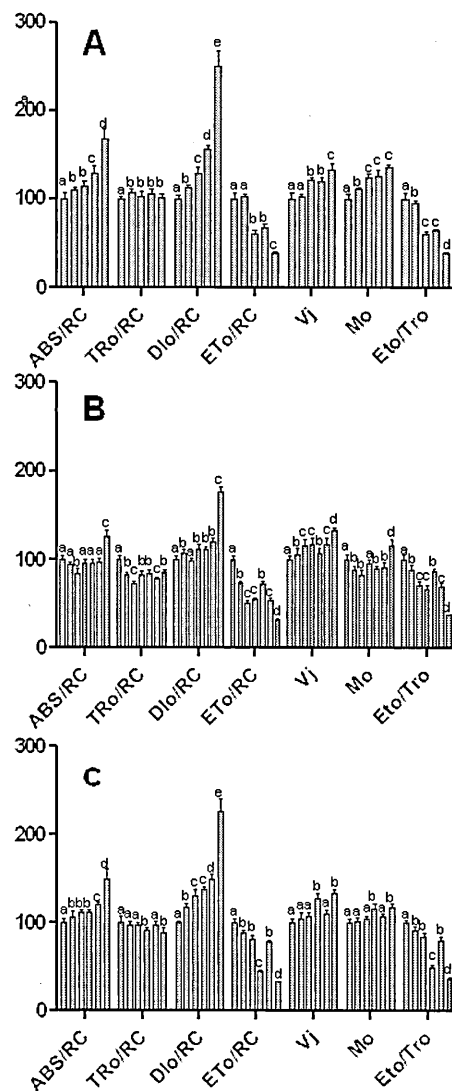


Figure 3.3: JIP-test parameters expressed as percentage of control for *F. crotonensis* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150 mg/L), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9 mg/L) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5 mg/L) are shown for each parameter from less concentrated to more concentrated (left to right).

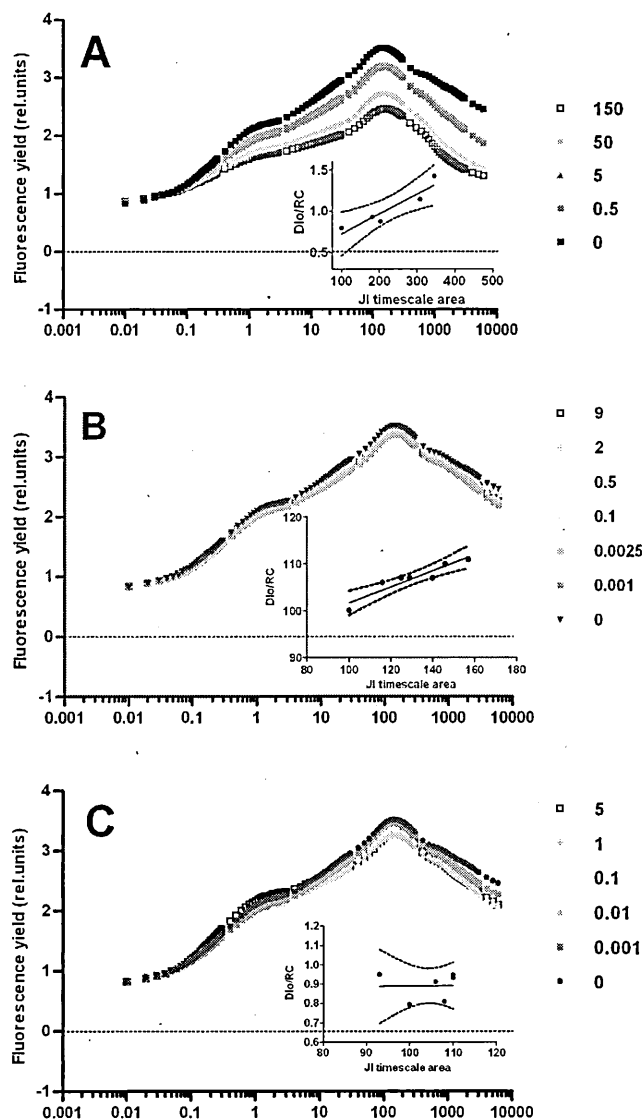


Figure 3.4: Rapid rise fluorescence kinetics plotted on a logarithmic time scale for 15 min dark adapted algae *C. reinhardtii* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). The insert shows the correlation between DI_0/RC and the JI timescale area. The transients were induced by a 6 s red light pulse of $3500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and recorded at room temperature by a Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5) are expressed in mg/L.

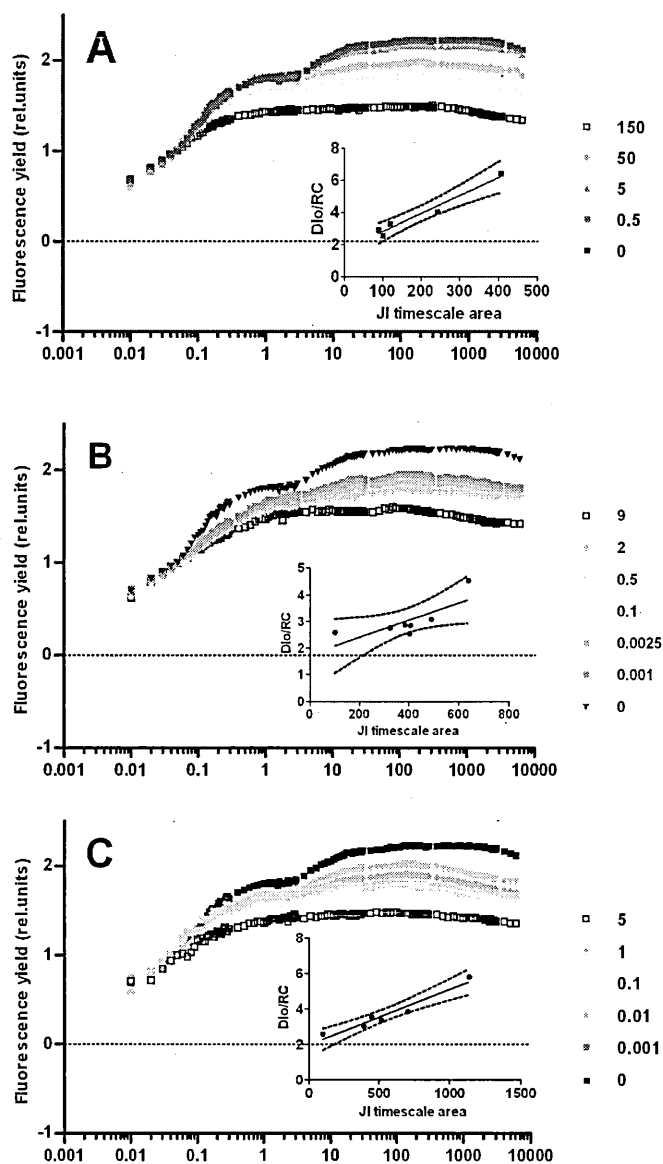


Figure 3.5: Rapid rise fluorescence kinetics plotted on a logarithmic time scale for 15 min dark adapted algae *F. crotonensis* in presence of increasing concentrations of CBZ (A), SMX (B) or cipro (C). The insert shows the correlation between DI_0/RC and the JI timescale area. The transients were induced by a 6 s red light pulse of $3500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and recorded at room temperature by a Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech). Concentrations of CBZ (0; 0.5; 5; 50; 150), SMX (0; 0.0005; 0.0025; 0.1; 0.5; 2; 9) and cipro (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 5) are expressed in mg/L.

Table 3.1: OJ and JI timescale areas expressed in percentage per control. OJ timescale areas are calculated from 0 to 3 ms and JI times scale area is calculated from 3 to 30 ms.

mg/l	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>				<i>Fragilaria crotonensis</i>			
	OJ timescale area		JI timescale area		OJ timescale area		JI timescale area	
	mean	+/- SD	mean	+/- SD	mean	+/- SD	mean	+/- SD
CBZ								
0	100	3	100	5	100	3	100	3
0.5	113	4	182	12	108	4	89	4
5	120	4	203	13	100	4	119	7
50	137	3	308	20	132	4	242	11
150	139	8	346	23	163	9	406	10
SMX								
0	100	3	100	4	100	6	100	2
0.001	108	2	157	12	125	7	324	8
0.0025	105	3	129	5	129	3	403	18
0.1	104	3	125	7	129	6	384	12
0.5	105	5	146	4	133	4	407	14
2	104	3	116	6	133	6	489	16
9	103	3	140	4	137	7	639	34
CIPRO								
0.00	100	4	100	5	100	3	100	2
0.001	106	5	108	3	134	6	393	20
0.01	104	2	106	4	134	4	516	19
0.1	101	3	110	3	118	4	448	50
1	100	6	110	3	150	7	706	30
5	88	2	93	4	182	6	1139	26

SCHAPITRE 4

DIFFERENCES OF INTERACTION BETWEEN THE TRANSTHYLAKOIDAL PH GRADIENT AND THE LEVEL OF PSI REDUCTION IN DARKNESS BETWEEN A DIATOM AND A GREEN ALGA.

Gabrielle Vernouillet¹, Johann Lavaud², Guy Samson³ and Philippe Juneau^{1}*

1) Department of Biological Sciences, TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory, University of Québec in Montréal, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada.

2) UMR 7266 «LIENSs», CNRS / University of La Rochelle, Institute for Coastal and Environment (ILE), 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle Cedex, France.

3) Plant Biology Research Group, Department of Chemistry-Biology, University of Québec at Trois-Rivières, C. P. 500, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada.

Ce chapitre, présenté sous forme d'article scientifique, est en voie de soumission.

Pour ce projet, j'ai collaboré à l'élaboration des idées avec les autres co-auteurs. J'ai réalisé les expériences. J'ai contribué avec P. Juneau à l'analyse des résultats. J'ai écrit la version initiale de l'article et la rédaction finale a été le fruit des contributions de J. Lavaud, G. Samson, et P. Juneau. G. Samson a contribué à la réalisation des expériences de dosage de NADPH dans son laboratoire.

4.1 Résumé

Nous avons exploré la façon dont la génération d'un gradient de protons transmembranaire thylacoïdales peut être reliée au niveau de réduction du PSI dans l'obscurité chez une algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et une diatomée, *Fragilaria crotonensis*. Chez *F. crotonensis*, l'augmentation de la fluorescence due à un agent de découplage (NH_4Cl) en cinétique rapide d'induction de fluorescence indique que la réduction du côté accepteur du PSI (Y_{NA}) est fortement diminuée par rapport à celle observée chez *C. reinhardtii*. Il a également été montré que la limitation de Y_{NA} a augmenté de 46% en présence de NH_4Cl chez *F. crotonensis*. La limitation de Y_{NA} par le NADPH dans *F. crotonensis* a été confirmée par une augmentation de 20% du pool de NADPH en présence de NH_4Cl par rapport au témoin. Le méthylviologène (MV) diminue la limitation de Y_{NA} par 3 fois chez *F. crotonensis*, mais pas chez *C. reinhardtii*, ce qui suggère que le PSI de *F. crotonensis* à l'obscurité est dans un état plus réduit que le PSI de *C. reinhardtii*. Le transfert d'électrons PSII-PSI est fortement inhibé en présence de DCMU chez *F. crotonensis* mais, chez *C. reinhardtii* les électrons peuvent provenir de la réoxydation de PQ comme le montre la diminution de la limitation côté donneur du PSI (Y_{ND}) en présence de DCMU. Par ailleurs, nous avons montré qu'il y avait une limitation de Y_{ND} de 41% en présence de NH_4Cl dans *F. crotonensis* mais pas chez *C. reinhardtii*. Lorsque AOX et PTOX sont inhibées en présence de propylgallate (PG), on observe une limitation côté donneur du PSI chez *C. reinhardtii*, mais pas dans *F. crotonensis*. Cela suggère qu'il n'y a pas de réoxydation du pool de PQ par les processus chlororespiratoires dans *F. crotonensis*. Nous avons proposé un modèle représentant un processus lié au niveau de la réduction de PSI impliquant une NA(D)PH-déshydrogénase électrogénique, et une PTOX dont l'activité n'est pas significative chez *F. crotonensis*.

4.2 Abstract

We explored how generation of a thylakoidal transmembrane proton gradient can be related to PSI reduction level in the dark in a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and a diatom *Fragilaria crotonensis*. In *F. crotonensis*, the augmented fluorescence due to an uncoupling agent (NH_4Cl) in fast fluorescence induction kinetic indicated that the reduction of the acceptor side of PSI is highly diminished compared to that in *C. reinhardtii*. It was also shown that PSI acceptor side (Y_{NA}) increased by 46% in the presence of NH_4Cl in *F. crotonensis*. PSI acceptor side limitation by NADPH in *F. crotonensis* was confirmed by a 20% increase of NADPH pool in the presence of NH_4Cl compared to the control. Methylviologen, (MV), diminished Y_{NA} limitation by 3 times in *F. crotonensis* but not in *C. reinhardtii*, suggesting that PSI of *F. crotonensis* in the dark are in a more reduced state than PSI of *C. reinhardtii*. PSII-PSI electron transfer was strongly inhibited in the presence of DCMU in *F. crotonensis* but in *C. reinhardtii* electrons can still come from PQ reoxidation as shown by a decrease in PSI donor side limitation in the presence of DCMU. Furthermore, we showed that there was a PSI donor side (Y_{ND}) limitation of 41% in the presence of NH_4Cl in *F. crotonensis* but not in *C. reinhardtii*. When both AOX and PTOX were inhibited, in the presence of propylgallate (PG), a PSI donor side limitation in *C. reinhardtii* occurred, but not in *F. crotonensis*. This suggests that there is no PQ pool reoxidation by the so-called chlororespiratory processes in *F. crotonensis*. We proposed a model representing a process related to PSI reduction level involving an electrogenic NA(D)PH-deshydrogenase but not a significant PTOX activity in *F. crotonensis* in the dark.

Keywords: Alternative electron transport, diatom, green alga, PSI reduction level, pH gradient

Abbreviations: PTOX: Plastid terminal oxidase; PQ: Plastoquinone; PS: photosystem; Ndh: NAD(P)H dehydrogenase; Y_{NA} : Quantum yield of non-photochemical energy dissipation due to acceptor side ; Y_{ND} : Quantum yield of non-photochemical energy dissipation due to donor side.

4.3 Introduction

Diatoms are a major CO₂ trapper by supplying ~20% of the annual net photosynthetic carbon fixation on earth (Field *et al.*, 1998) and are present in marine and in freshwater environments (Smetacek, 1999; Ittekkot *et al.*, 2006). Their ubiquitous presence may be explained in part by their unique strategies to cope with rapid changes of environmental light conditions (Medlin and Kaszmarska, 2004). These organisms are known to have a strong non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) related to heat dissipation which is activated by acidification of the thylakoid lumen (Lavaud *et al.*, 2002a; Lavaud *et al.*, 2002b) and this NPQ formation may occur in the dark due to a chlororespiratory activity inducing Δ pH (Ting and Owens, 1993; Dijkman et Kroon, 2002). Indeed, it was shown that highly reduced photosynthetic chain, following an excess of light treatment, a substantial fraction of PSII-generated electrons were rerouted to oxygen due to an chloroplatic plastoquinol terminal oxidase activity in the dark (Peltier *et al.*, 2010). Therefore, chlororespiration, as an alternative electron transport pathway, is believed to generate a thylakoid transmembrane proton gradient by diverting electron from a PQ-oxidase and reducing O₂ with protons provided by NADPH (Cournac *et al.*, 2002). Jakob and collaborators (Jakob *et al.*, 2001) suggested that in a diatom, *Phaeodactylum tricorutum*, reduction of PQ pool could occurs through a NADPH reductase (*ndh*), which participates directly in the pH gradient buildup. Recently, it was shown that electrons derived from NADPH oxidation are transferred to PQ pool by a NADPH reductase identified as *ndh2* in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Cyclotella meneghiniana* (Mus *et al.*, 2005; Grouneva *et al.*, 2009). Reoxidation of PQ pool may then occur through

a plastid terminal oxidase (PTOX) in *C. reinhardtii* and *P. tricornutum* leading electrons to O₂ as the final electron acceptor (for a review see (Rumeau *et al.*, 2007)) or PQ pool may be preferentially reoxidised by cyt/b6f as in *C. meneghiniana* (Grouneva *et al.*, 2009). These different pathways would then have different effects on the pH gradient and the reduction level of PSI by diverting electrons and then modifying PSI activity during light to dark transition.

Recently, several studies have demonstrated an increased activity of non-photochemical reduction of plastoquinone pool associated with an electrochemical proton gradient and an increased expression of chlororespiratory enzymes under some specific stress conditions, such as light and/or cold stress (Simkin *et al.*, 2003; Streb *et al.*, 2005; Houille-Vernes *et al.*, 2011). Chlororespiratory activity may therefore acts as a safety valve for photosynthetic apparatus by preventing over-reduction of PSI electrons donors and avoiding photoinhibitory damages to PSII (Niyogi, 2000; Peltier and Cournac, 2002; Streb *et al.*, 2005). These processes are known to be tightly related to several redox exchange shuttles between chloroplasts and mitochondria (Hoefnagel *et al.*, 1998) helping to balance reductant molecules in the stroma. Molecular component involved in auxiliary electron transport pathways such as Ndh-1, Ndh-2, PGR5, and PTOX were identified in *C. reinhardtii* (Mus *et al.*, 2005; Finazzi and Forti, 2004; Peltier *et al.*, 2010). Processes of reduction and oxidation of plastoquinone in darkness were studied in *C. reinhardtii* and makes this green algae the actual model for chlororespiration in microorganisms (Bennoun, 2002, Cournac *et al.*, 2002, Houille *et al.*, 2011).

It was recently shown that the diatom *Fragillaria crotonensis* was much more sensitive to a PSII-binding herbicide, atrazine, than other algal species when the electron carriers' availability were decreased by high light acclimation (Deblois *et al.*, 2012). This distinctive response, having an impact on the PSI reduction, to the combination of atrazine and light compared to other algal species raises some

questions on the difference in the possible involvement of PSI electron donor reduction level among the species. Since evidence for the existence of a respiratory electron transport chain inside the chloroplast was presented for the green alga *C. reinhardtii* (Peltier *et al.*, 1987) but also for diatoms (Peltier and Cournac, 2002), it was our intention to evaluate in a green algae and a diatom the relation between the generation of a thylakoidal transmembrane proton gradient and the PSI donor side limitation. In this context, we compared how alternative electron pathways may have influenced PSI reduction level of *C. reinhardtii* (known to have a strong chlororespiratory activity involving *ndh2*) and *F. crotonensis*.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Algal cultures, preparation of samples

Chlamydomonas reinhardtii (CC-125) culture was obtained from the Chlamydomonas Genetic Center (Duke University, Durham, NC) and *Fragilaria crotonensis* was isolated from a water sample collected in July 2008 in Réservoir Choinière, (Eastern Townships, Québec, Canada) (Deblois *et al.*, 2012). Cells were cultivated in batch culture of 500 mL high salt growth medium (Sueoka *et al.*, 1967), for green algae, and CHU-10, for diatoms, (Stein, 1973) with a light to dark cycle of 16: 8 h at a light intensity of 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ provided by white fluorescent lamps (Sylvania cool white F22T12/CW/VHO, Canada) at 25 ± 1 °C.

All experiments were performed when the algal cultures were in exponential growth phase and then concentrated to obtain a biomass of 30 μg of *Chl a*/ mL for Dual PAM and NADPH measurements and 10 μg of *Chl a*/ mL for PEA measurements. For chlorophyll *a* determination, algal cells were harvested using filtration on a 0.8 mm pore size membrane filter, and chlorophyll *a* was extracted in 100% MeOH at 78°C. The extract was then centrifuged 10min at 2500g at 4°C and the supernatant was

measured with a spectrophotometer (Cary300WINUV, Varian, USA) at wavelengths of 480 and 665nm prior and after acidification with HCl. A measurement at 750 nm was used to correct the sample turbidity. Chl *a* concentration was calculated according to Lorenzen (1966). Different modulators of electron transport were added in full darkness 10 min before the different measurements: NH₄Cl (5mM), Methylviologen (MV) (0.5 mM), DCMU (20μM), DBMIB (20μM), Salicylhydroxamic Acid (SHAM) (0.5mM), Propylgallate (PG) (1μM), Myxothiazol (MX) (1μM).

4.4.2 Fluorescence measurements

Fast fluorescence induction curves were recorded with a Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech, Norfolk, England) as described in Strasser *et al.* (1995). Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min and cells were uniformly placed on glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) using low-pressure filtration. For these measurements the light intensity of the 6 s flash was set to 3500 μmol/m²/s. According to (Strasser *et al.*, 1995), the O transient (50μs) was considered as the minimal fluorescence (F₀) when all reaction centers of PSII are open and the P transient as the maximal fluorescence yield, (F_M), when all reaction centers of PSII are closed. The variable fluorescence yields related to J and I transients were respectively determined at 2 ms and 30 ms.

4.4.3 830nm absorption change measurements

Measurements of 830 nm absorption change measurements were carried out at room temperature by using dual-wavelength fluorescence monitoring system (Dual-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) according to (Klughammer and Schreiber, 2008). P700 oxidation is measured in a dual-wavelength mode and is differentiated by a positive transmission signal change between 875 nm minus 830 nm. P₀ is the minimal P700 signal measured for completely reduced P700 after 15min in the dark. P_m

corresponds to the maximal level of P700 transmittance change observed upon fully oxidation and obtained after a saturating pulse in the presence of far-red light. In the presence of actinic light (AL), a P700 transmittance signal (P) is measured and (P-Po) corresponds to the oxidized fraction limited by donor side closed center for a complete PSI oxidation. A SP-pulse applied during AL light showed a Pm' level of P700 transmittance change which indicated a fraction (Pm-Pm') limited by acceptor side closed centers which cannot be oxidized by a SP pulse.

A quantum yield of photochemical energy conversion (Y(I)) was estimated as $Y(I) = (Pm' - P) / (Pm - Po)$ while the quantum yield of non-photochemical energy dissipation was estimated as followed : due to donor side limitation $Y(ND) = (P - Po) / (Pm - Po)$ and due to acceptor side limitation $Y(NA) = (Pm - Pm') / (Pm - Po)$ (Schreiber *et al.*, 1993).

4.4.4 NADPH determination

A Xe- PAM system (Walz, Effeltrich, Germany) was used to evaluate UV-excited NAD(P)H fluorescence. UV excitation filter (Schott UG11 - center wavelength of 340 nm), and two detection filters (Schott BG18 - center wavelength of 510 nm, and Schott KV418 - long pass filter with an edge wavelength of 418 nm) were used for the measurement. Reduction of the pyridine nucleotide pool is indicated by an increase in blue-green fluorescence in the dark. Due to the intrinsic fluorescence of the inhibitors, we measured the difference between dark NADPH level and the level of NADPH after a saturating FR flash which permits to empty PSI of electrons and reduce NADPH as final electron acceptor of PSI (Schreiber *et al.*, 1993; Mi *et al.*, 2000; Schreiber and Klughammer, 2009).

4.4.5 Western blot assay

Algal cells were lysed with a lysis buffer (50mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl and

EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN) and total cell protein concentration was quantified with Bradford protein assay (Bradford, 1976). For each sample, 25 μg of total cell extract was electrophoretically separated onto 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (BioRad). Membranes were blocked in phosphate buffered saline solution (PBS), pH 7.3, containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) in the presence of 5 % nonfat dry milk powder for 1 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with polyclonal anti-PTOX-rabbit serum obtained from Uniplastomic, France used at 1/750 dilution or anti-PsbA (D1)-rabbit serum (Agrisera) used at 1/5000 dilution. Following incubation, membranes were washed three times with PBS-T and then incubated for 1h at room temperature with anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated (Amersham Biosciences, USA). Signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Perkin, Elmer, Boston, MA).

4.5 Results and discussion

Fluorescence kinetic of *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 4.1A (dark line)) depicted typical transients obtained for green algae: from a minimum O level (30 μs) to the maximum P level (Fm) via J (2-3 ms) and I (30 ms) steps (Strasser *et al.*, 1995). For *Fragilaria crotonensis*, however, we noticed that the P-step was significantly reduced (Figure 4.1B, dark line). This difference in the fluorescence kinetics may indicate that the reduction of the acceptor side of PSI in *F. crotonensis* is highly diminished compared to that in *C. reinhardtii*. Indeed, the I-P phase was shown to be related to the filling up of the Fd-pool (Schansker and Strasser, 2005), and to a very efficient reoxidation of PSII since this phenomenon was previously observed in the presence of MV (Dewez *et al.*, 2007). The use of NH_4Cl , as a protonophore removing the proton gradient across thylakoid membranes, induced the complete abolition of the usual decrease after the P level for *F. crotonensis* (Figure 4.1B, grey line), which was not the case for *C. reinhardtii* (Figure 4.1A, grey line). Therefore, we assume

that a strong ΔpH -dependent NPQ is present in the dark for *F. crotonensis*, as it was recently demonstrated in marine diatom, *Thalassiosira weissflogii* (Antal *et al.*, 2009) and other species (Jakob *et al.*, 2001). It is noteworthy that ammonium is a source of nitrogen for algae (Thacker and Syrett, 1972) and is assimilated into amino acids by the GS / GOGAT cycle (glutamine synthetase / glutamate synthase) in chloroplasts. Turnover of major protein in *C. reinhardtii* (Rubisco, ATP synthase) was recently estimated about 40 min ($t_{1/2}$) (Sauer *et al.*, 2014). Hence, this process was not considered in our study, since algae were exposed to NH_4Cl only during 7min. Then, we focus on the effect of NH_4Cl in the membranes to abolish the transthylakoidal proton gradient (Krause *et al.*, 1982, Rottenberg and Grunwald, 1972, Lavaud, *et al.* 2002a, b). Also, the abolition of the fluorescence yield decrease after P-step in the presence of NH_4Cl indicated that this pH gradient influences the PSII-PSI electron transport induced by a saturating flash of dark adapted *F. crotonensis*, but not for *C. reinhardtii*.

The area over the O-J and J-I are known to be proportional, respectively, to the number of electrons needed to reduce the PSII acceptor side (Q_A and Q_B) and the PQ-pool (Schansker and Strasser, 2005; Toth *et al.*, 2005). We noticed that for *C. reinhardtii* the use of NH_4Cl did not influence the number of electrons needed for the reduction of Q_A - Q_B and PQ-pool (inserted Table Figure 4.1A). In *F. crotonensis*, the removal of the pH gradient increased this number by 3 fold (inserted Table Figure 4.1B), indicating that the transthylakoidal proton gradient has a strong influence on the early photosynthetic electron transporters. In *F. crotonensis* the effect of NH_4Cl was also to induce the apparition of the P phase (Figure 4.1B), indicating a possible link between the reduction of Fd-pool on the acceptor side of PSI, and thus the efficiency of PSI to drain electrons from PSII, and the pH gradient.

To further examine the possible link between PSI acceptor side, and pH gradient formation, we investigated energy conversion efficiency in PSI by

measuring P700 absorbance changes upon illumination by a saturating pulse in the presence of various modulators of PSII-PSI electron transport. The presence of NH_4Cl decreased the amplitude of the oxydation-reduction-oxydation phases of P700 during saturating pulse to a small degree compared to the control, in *C. reinhardtii*, while it only permits a small oxydation at the beginning of the illumination for *F. crotonensis*, and no change in this redox state was noticed thereafter (Figure 4.2). This indicates that in *F. crotonensis* pH gradient after dark adaptation has an important influence on the redox state of PSI, while for *C. reinhardtii* this phenomenon was not substantial. Indeed, NH_4Cl induced, compared to the control, an increase in the limitation on PSI acceptor side, $Y(\text{NA})$, by 36% in *C. reinhardtii* and 46% in *F. crotonensis* (Table 4.1). Also, in the presence of NH_4Cl , the PSI donor side limitation, Y_{ND} , decreased in *F. crotonensis* (by 69%), but did not change in *C. reinhardtii* indicating a more reduced PSI donor side in *F. crotonensis*. Then, NH_4Cl , by abolishing ΔpH , might decrease ATP-synthase activity and consequently, a low level of ATP may increase the level of chloroplastic NADPH, unused in the Calvin cycle, and therefore an unbalanced NADPH/ATP ratio can be obtained (see below for more explanation).

Moreover, when the electron transport was blocked by either DCMU or DBMIB the PSI reduction usually observed after the initial oxydation is completely abolished for both algae (Figure 4.2), and therefore PSI reached its maximum oxydized state, after only 2–3 ms. This is in accordance with the inhibition of electron transfer after Q_A (J-phase) in the presence of DCMU (data not shown). Under these conditions, no electron was donated to PSI to induce its transient reduction as earlier observed for two diatom species, *Cyclotella meneghiniana* and *Phaeodactylum tricorutum* (Grouneva *et al.*, 2009).

For both species, the observed reduction of PSI after its initial oxydation disappeared (Figure 4.2) when methylviologen (MV) was used to compete with

ferredoxin-NADP oxidoreductase for electrons arriving from the ferredoxin and to prevent cyclic electron flow around PSI (Heber, 2002). We can notice that for *F. crotonensis* the oxidation level obtained in the presence of MV is higher than the control. Indeed, there is 70% less limitation in PSI acceptor side than in the presence of MV ($Y_{NA(MV)} = 0.062$) compared to the control ($Y_{NA(control)} = 0.206$) in *F. crotonensis*, while there is only a 6% decrease in *C. reinhardtii* ($Y_{NA(control)} = 0.173$ and $Y_{NA(MV)} = 0.184$). Since MV drained electrons from PSI, these results indicate that, for dark adapted conditions, PSI of *F. crotonensis* are in a more reduced state than those of *C. reinhardtii*, where a smaller difference in the oxidation level was noticed between the MV treated algae and the control. These results emphasized our hypothesis that there is an inhibition on the acceptor side of *F. crotonensis*, which limits the drainage of electrons.

We also evaluated the NADPH reduction level in the presence of NH_4Cl , DCMU and DBMIB, by measuring NADPH content in cells in *F. crotonensis* and *C. reinhardtii*. We found that NH_4Cl increased NADPH content by 20% compared to the control for *F. crotonensis*, while for *C. reinhardtii*, NADPH content was not significantly modified. The difference in the modification of the NADPH content between the two species tends to confirm the cause of the electron transport limitation at the PSI level for *F. crotonensis*. As expected, no reduction of $NADP^+$ was measured in the presence of DBMIB for both algae (Figure 4.3) since FNR did not get electrons from PSI and was not able to reduce $NADP^+$. In the presence of DCMU, no $NADP^+$ reduction by electron PSII-mediated pathways can be obtained. However, in the presence of DCMU we observed 10% of reduced $NADP^+$ compared to the control for *C. reinhardtii*, while it was by 29% for *F. crotonensis* suggesting that $NADP^+$ reduction processes occurred even when PSII-PSI electron transport is blocked at Q_B binding site. These results are in accordance with the increase in the PSI acceptor side, Y_{NA} , limitation (only 7% in *C. reinhardtii* and 32% in *F. crotonensis*) in the presence of DCMU suggesting a reduction in electron transfer after PSI due to a larger pool of

NADPH in *F. crotonensis*. Furthermore, we noticed an increased PSI donor side limitation in the presence of DBMIB and DCMU for both species (Table 4.1). In the presence of DCMU, PSI donor side limitation was increased by 5.2 and 3.6 times for *C. reinhardtii* ($Y_{ND(DCMU)} = 0.550$) and *F. crotonensis* ($Y_{ND(DCMU)} = 0.648$) respectively. Comparatively, the oxidized fraction of P700 was further increased in the presence of DBMIB: by 6 times for *C. reinhardtii* ($Y_{ND(DBMIB)} = 0.630$) and by 4 times in *F. crotonensis* ($Y_{ND(DBMIB)} = 0.694$). These results suggest a strong decrease in electron transfer from PQ to PSI donor side in the presence of DCMU reflecting the very low PSI quantum yield in the presence of DBMIB for both algae. Our results are in accordance with those obtained by Mi et al. (2000), where for *Synechocystis* an almost complete inhibition of $NADP^+$ reduction in wild-type cells were obtained in the presence of DBMIB, while DCMU did not completely abolish $NADP^+$ reduction. Indeed, in the presence of DCMU, electrons can still come from PQ pool reoxidation. Given these results, it appears that for *F. crotonensis* the electrons reducing PSI are coming from the PQ pool in the dark and the PSI donor side limitation was related to PQ reduction level.

According to Cournac *et al.* (2002), PQ pool reoxidation in the dark may occur due to chlororespiratory activity involving a plastid terminal oxidase (PTOX). Therefore, we may hypothesize that in *C. reinhardtii*, PQ pool is more oxidized than in *F. crotonensis* due to a larger activity of PTOX. In order to study chlororespiratory pathway involvement in *F. crotonensis* and *C. reinhardtii*, we used propylgallate (PG) as an inhibitor of both chloroplastic and mitochondrial alternative respiratory oxidases, respectively PTOX and AOX (Cournac *et al.*, 2000) and salicylhydroxamic acid (SHAM) as an inhibitor of AOX alone (Peltier *et al.*, 1987). A combination with myxothiazol (MX), as an inhibitor of mitochondrial cytochrome bc_1 complex, completed a total inhibition of mitochondrial respiration (Ravenel and Peltier, 1991). A limitation at the acceptor side was observed in a similar order of magnitude in the presence of either SHAM+MX or PG+MX with an elevation of 53% for both

treatments in *C. reinhardtii* or 107 and 105% respectively in *F. crotonensis* compared to the control algae. Since respiratory processes are inhibited by these inhibitors, there is neither PQ pool reoxydation by PTOX nor NADPH reoxydation by a NAD(P)H dehydrogenase. As an indirect consequence, NADPH/NADP ratio increased in the stroma. This result is in accordance with the observed link between the increased limitation on the acceptor side and the high level of NADPH (see above). We also observed a limitation in the presence of NH_4Cl (Y_{NA}) respectively elevated by 37% and 46% for *C. reinhardtii* and *F. crotonensis*) due to the increased level of NADPH which may slow down the electron drainage by PSI.

We have shown that the *C. reinhardtii* PSI donor side, Y_{ND} , was not restricted by SHAM+MX inhibition ($Y_{\text{ND}}= 0.106$) but was significantly limited (by 55%) compared to the control due to PG+MX inhibition ($Y_{\text{ND}}= 0.058$). Indeed, PTOX activity is inhibited by PG, which will decrease PQ reoxydation, and consequently PSI donor side limitation is decreased. On the other hand, PSI donor side of *F. crotonensis* was indifferently affected by a combined inhibition of PTOX and AOX (PG) ($Y_{\text{ND}}= 0.079$) or by the inhibition of only AOX (SHAM) ($Y_{\text{ND}}= 0.081$) and showed a higher inhibition compared to the control (48% each). Since PSI donor side limitation was not enhanced by PTOX inhibition in *F. crotonensis*, it suggests that the PQ pool reoxydation by PTOX is not significant in this diatom contrary to what we can observe in *C. reinhardtii*. Moreover, we observed that there is no similar PTOX between both algae since there is an absence of PTOX protein (34 kDa) in a Western blot analysis of *F. crotonensis* (Figure 4.4). Nevertheless, further studies need to confirm this result with a diatom specific antibody. Differences between *C. reinhardtii* and *F. crotonensis* could be explained by PTOX paralogs (ptox1 and ptox2) phylogenetically close to each other in chlorophyceae and more distant in diatoms (Peltier *et al.*, 2010). To corroborate these results, we measured O_2 consumption in the presence of the same inhibitors in the dark. For *C. reinhardtii* and *F. crotonensis* O_2 consumption was reduced respectively by 46% and 42% in the dark

due to mitochondrial respiratory inhibition by SHAM+MX (Table 4.2). These results are in accordance with the 50% decrease in respiration observed previously in *C. reinhardtii* in the presence of these inhibitors (Cournac *et al.*, 2002). However, we showed that the oxygen consumption of the two studied species responded differently to PG+MX treatment. We noticed a higher reduction of O₂ consumption in the presence of PG for *C. reinhardtii* (26%) and no change for *F. crotonensis* (38%), and corroborated inhibition of PTOX activity in *C. reinhardtii* in the dark, while *F. crotonensis* there is no additional inhibition of O₂ consumption following inhibition with PG + MX. This confirmed that there is no significant PTOX activity in *F. crotonensis* in the dark.

A model representing the interconnection between dark respiratory activity and PSI/PSII oxydo-reduction states for *C. reinhardtii* and *F. crotonensis* is represented in Figure 4.5. The absence of PQ reoxidation by PTOX in *F. crotonensis* leads to a highly reduced PQ pool. Some studies consider PTOX as a safety valve to avoid PQ pool overreduction (Field *et al.*, 1998; Streb *et al.*, 2005, Niyogi, 2000), while in recent literature different results are observed about light effect on PTOX activity and level. Indeed, at high light intensity, PTOX level was stimulated in *R. glacialis* (Laureau *et al.*, 2013), whereas it decreased in *C. reinhardtii* (Houille *et al.*, 2012). Interestingly, a low ratio PSII/PSI following a PSII antennae degradation due to high light intensity is suggested to be responsible for a high oxidation level of PQH₂ (Houille *et al.*, 2012). In *C. reinhardtii*, *ptox2* mutants showed PQ pool overreduction, and a decreased photochemistry efficiency due to a migration of antennae from PSI to PSII was induced (Houille *et al.*, 2012). An absence of PTOX activity in *F. crotonensis* might limit PQ pool reoxidation at moderated light intensities. Further studies might evaluate PSII/PSI ratio at fluctuant light intensities in *F. crotonensis*. From a genetic point of view, in microalgae, PTOX is encoded by two distinct homologous genes in diatoms and chlorophyceae that would result from a duplication event of a common gene (Peltier *et al.*, 2010). Separated functions in the cell have not

been defined so far but Grouneva *et al.* (2009) illustrated, in a diatom *C. meneghiniana*, an alternative electron pathways and electrons are preferentially transferred from PQ to cytb6/f instead of PTOX. For *C. reinhardtii*, chlororespiratory pathway involves a NADPH-reductase-2 type (*Ndh2*) and the electron transfer is not electrogenic (Mus *et al.*, 2005). We demonstrated that a Δ pH is formed in the dark in *F. crotonensis* suggesting an electrogenic activity of NAD(P)H deshydrogenase. Such a thylakoid type I NAD(P)H dehydrogenase was first identified in higher plants (Sazanov *et al.*, 1998), and corroborated the build-up of a proton gradient. We therefore proposed that a NAD(P)H dehydrogenase-I (*ndh*) is active and generated a Δ pH in *F. crotonensis*, but that PTOX activity is not significant. In the higher plant, *Arabidopsis thaliana*, a loss of PTOX activity was shown to limit carotenoid biosynthesis (Carol *et al.*, 1999) due to the interaction of PTOX with an enzyme in the metabolism of carotenoids, the phyene desaturase (Josse *et al.* 2000). Also, a limitation of de-epoxydation in the xanthophyll cycle is observed in tomato deficient in PTOX (Trouillard and Shahbazi, 2012). Yet, *ptox2* mutation in *C. reinhardtii* does not change carotenoid biogenesis in the presence of light or not, suggesting that this role is assigned to *ptox1*. (Houille *et al.*, 2012; Laureau *et al.*, 2013). Also, similarly to *P. tricornutum*, there is a pH gradient across the thylakoid membrane in *F. crotonensis* which suggests the possibility that the deepoxydation diadinoxanthine will take place as well as a strong NPQ (Grouneva *et al.*, 2009). If the diatom *C. meneghiniana* also showed differences compared to PQ pool reoxydation process illustrated in *P. tricornutum* (Grouneva *et al.* 2009), to our knowledge, *F. crotonensis* is the only known species which followed the proposed scheme in this study. Differences between higher plants and algae regarding *ptox* role can be explained by the discovery of two homologous proteins of the platidic oxidase, *ptox1* and *ptox2* in algae, whereas there is only one in higher plants (Sun and Wen, 2011). But, the role and activity level of PTOX remained to be specify in algae.

4.6 Bibliography

- Antal, T. K., D. N. Matorin, et al. (2009). "*Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer.*" *Photosynth Res* 102(1): 67-76.
- Bradford, M. (1976). "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bennoun, P. (2002). "*The present model for chlororespiration.*" *Photosynthesis Research* 73: 273-277.
- Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M (1999) "*Mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation.*" *Plant Cell* 11(1): 57-68
- Cournac, L. Latouche, G, Cerovic, Z.G, Redding, K, Ravenel, J, Peltier, G (2002). "*In Vivo Interactions between Photosynthesis, Mitorespiration, and Chlororespiration in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Plant Physiol* 129.
- Cournac, L., È.-M. Josse, et al. (2000). "*Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration.*" *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 355: 1447-1454.

- Deblois, C. P., K. Dufresne, *et al.* (2012). "Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine." *Aquatic Toxicology* 126: 77-84.
- Dewez, D., P. Eullaffroy, *et al.* (2007). "Rapid chlorophyll a fluorescence transients of *Lemna minor* leaves as indication of light and exogenous electron carriers effect on photosystem II activity." *Photochemistry and Photobiology* 83(3): 714-721.
- Dijkman, N. A. and B. M. A. Kroon (2002). "Indications for chlororespiration in relation to light regime in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66: 179-187.
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, *et al.* (1998). "Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components." *Science* 281: 237-240.
- Finazzi, G. and G. Forti (2004). "Metabolic flexibility of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by the link between state transitions and cyclic electron flow." *Photosynthesis Research* 82(3): 327-338.
- Grouneva, I., T. Jakob, *et al.* (2009). "The regulation of xanthophyll cycle activity and of non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms *Phaeodactylum tricorutum* and *Cyclotella meneghiniana*." *Biochim Biophys Acta* 1787(7): 929-938.
- Heber, U. (2002). "The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants." *Photosynthesis Research* 73(1-3): 223-231.

- Hoefnagel, M. H. N., O. K. Atkin, *et al.* (1998). "Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark." *Biochimica et Biophysica Acta* 1366: 235-255.
- Houille-Vernes, L., F. Rappaport, *et al.* (2011). "Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): 20820-20825.
- Ittekkot, V., D. Unger, *et al.* (2006). The perturbed silicon cycle. *The Silicon Cycle: Human Perturbations and Impacts on Aquatic Systems.*, Island Press 66: 245-252.
- Jakob, T., R. Goss, *et al.* (2001). "Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*." *Journal of Plant Physiology* 158: 383-390.
- Josse, È.-M., A. J. Simkin, *et al.* (2000). "A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation." *Plant Physiology* 123: 1427-1436.
- Klughammer, C. and U. Schreiber (2008). "Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I." Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany. PAM Application Notes 1: 11-14.
- Krause, G., C. Vernotte, *et al.* (1982). "Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae." *Biochim Biophys Acta* 679: 116-124.

- Laureau, C., R. De Paepe, *et al.* (2013). "*Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species Ranunculus glacialis L.*" *Plant, Cell and Environment* 36(7): 1296-1310.
- Lavaud, J., B. Rousseau, *et al.* (2002)a. "*In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching.*" *FEBS Lett* 523(1-3): 163-166.
- Lavaud, J., H. J. van Gorkom, *et al.* (2002)b. "*Photosystem II electron transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms.*" *Photosynthesis Research* 74: 51-59.
- Lorenzen, C. J. (1966). "*A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration.*" *Deep-Sea Res.* 13: 223-227.
- Medlin, L., K. and I. Kaszmarska (2004). "*Evolution of diatoms: morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision.*" *Phycologia* 43: 245-270.
- Mi, H., C. Klughammer, *et al.* (2000). "*Light-Induced Dynamic Changes of NADPH Fluorescence in Synechocystis PCC 6803 and Its ndhB-Defective Mutant M55.*" *Plant Cell Physiology* 41(10): 1129-1135.
- Mus, F., L. Cournac, *et al.* (2005). "*Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Biochimica et Biophysica Acta.* 1708: 322-332.

- Niyogi, K. K. (2000). "Safety valves for photosynthesis." *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455-460.
- Peltier, G. and L. Cournac (2002). "Chlororespiration." *Annual Review of Plant Biology* 53: 523-550.
- Peltier, G., J. Ravenel, *et al.* (1987). "Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas* evidence for a chlororespiration. ." *Biochim Biophys Acta* 893: 83-90.
- Peltier, G., D. Tolleter, *et al.* (2010). "Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae." *Photosynthesis Research* 106(1-2): 19-31.
- Ravenel, J. and G. Peltier (1991). "Inhibition of chlororespiration by myxothiazol and antimycin A in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Photosynthesis Research* 28(3): 141-148.
- Rottenberg, H. and T. Grunwald (1972). "Determination of ΔpH in Chloroplasts 3. Ammonium Uptake as a Measure of ΔpH in Chloroplasts and Sub-ChloroplastParticles." *Eur.J.Biochem.* 25: 71-74.
- Rumeau, D., G. Peltier, *et al.* (2007). "Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response." *Plant Cell Environ* 30(9): 1041-1051.
- Sauer, M. L., B. Xu, *et al.* (2014). "Metabolic labeling with stable isotope nitrogen (^{15}N) to follow amino acid and protein turnover of three plastid proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proteome Sci* 12(1): 14.

- Sazanov, L. A., P. A. Burrows, et al. (1998). "*The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes.*" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 95: 1319-1324.
- Schansker, G. and R. J. Strasser (2005). "*Quantification of non- Q_B -reducing centers in leaves using a far-red pre-illumination.*" Photosynth Res 84(1-3): 145-151.
- Schreiber, U. and C. Klughammer (2009). "*New NADPH/9-AA module for the DUAL-PAM-100: Description, operation and examples of application.*" PAM Application Notes 2: 1-13.
- Schreiber, U., C. Neubauer, et al. (1993). "*PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: A highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research.*" Photosynthesis Research 36: 65-72.
- Simkin, A. J., A. M. Labouré, et al. (2003). "*Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves.*" Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 58(5-6): 371-380.
- Smetacek, V. (1999). "*Diatoms and the ocean carbon cycle.*" Protist 150(1): 25-32.
- Stein, J. (1973). *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press. 448p
- Strasser, R. J., A. Srivastava, et al. (1995). "*Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria.*" Photobiochemistry and Photobiophysics 61(1): 32-42.

- Streb, P., E. M. Josse, *et al.* (2005). "Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*." *Plant, Cell and Environment* 28(9): 1123-1135.
- Sueoka, N., K. S. Chiang, *et al.* (1967). "Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores." *Jour. Mol. Biol* 25: 44-67.
- Ting, C. S. and T. G. Owens (1993). "Photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching processes in diatom *Phaeodactylum tricoratum*." *Plant Physiology* 101: 1323-1330.
- Thacker, A. and P. J. Syrett (1972). "The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*." *New Phytol* 71: 423-433.
- Toth, S. Z., G. Schansker, *et al.* (2005). "In intact leaves, the maximum fluorescence level ($F(M)$) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: a DCMU-inhibition study." *Biochim Biophys Acta* 1708(2): 275-282.
- Trouillard, M., M. Shahbazi, *et al.* (2012). "Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(12): 2140-2148.
- Sun X, Wen T (2011) "Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses." *J Biosci* 36(5): 951-956

4.7 Figures and Tables

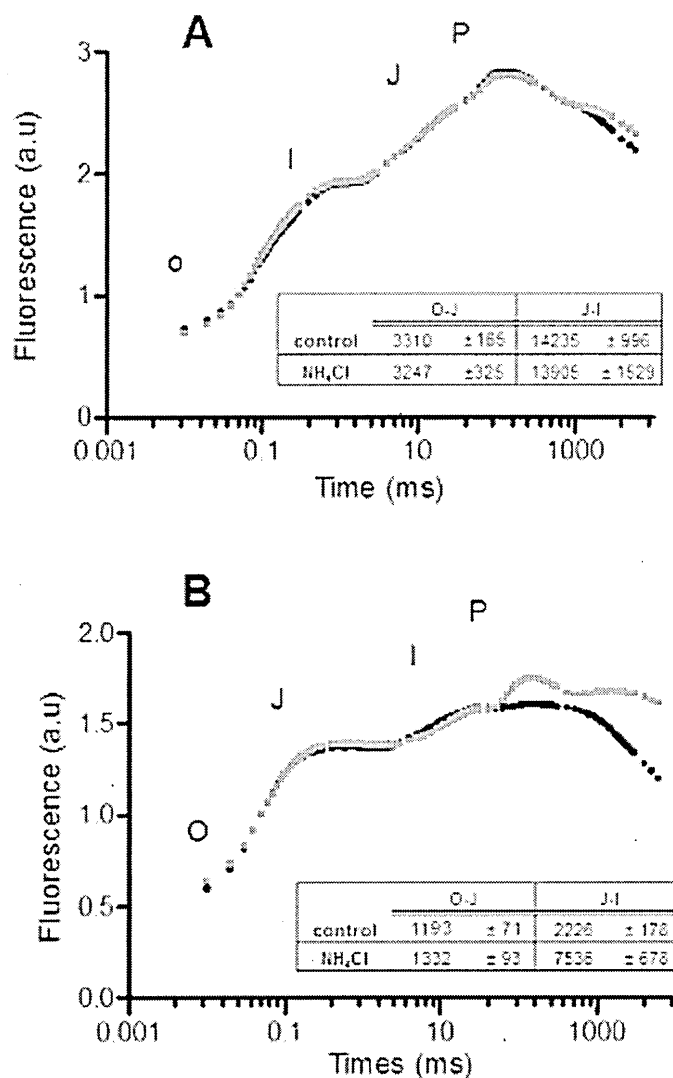


Figure 4.1: OJIP transient recorded in *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B) with PEA in the presence of 5mM of NH₄Cl (grey line) and control (dark line). In inserted tables, OJ and JI timescale areas are expressed in arbitrary units. Fluorescence intensity is normalised to the value at point 0, F_{50,s}. OJIP transient were induced by PPF 3000 μmol/m²/s. Before measurements cells were placed in the dark during 15 min.

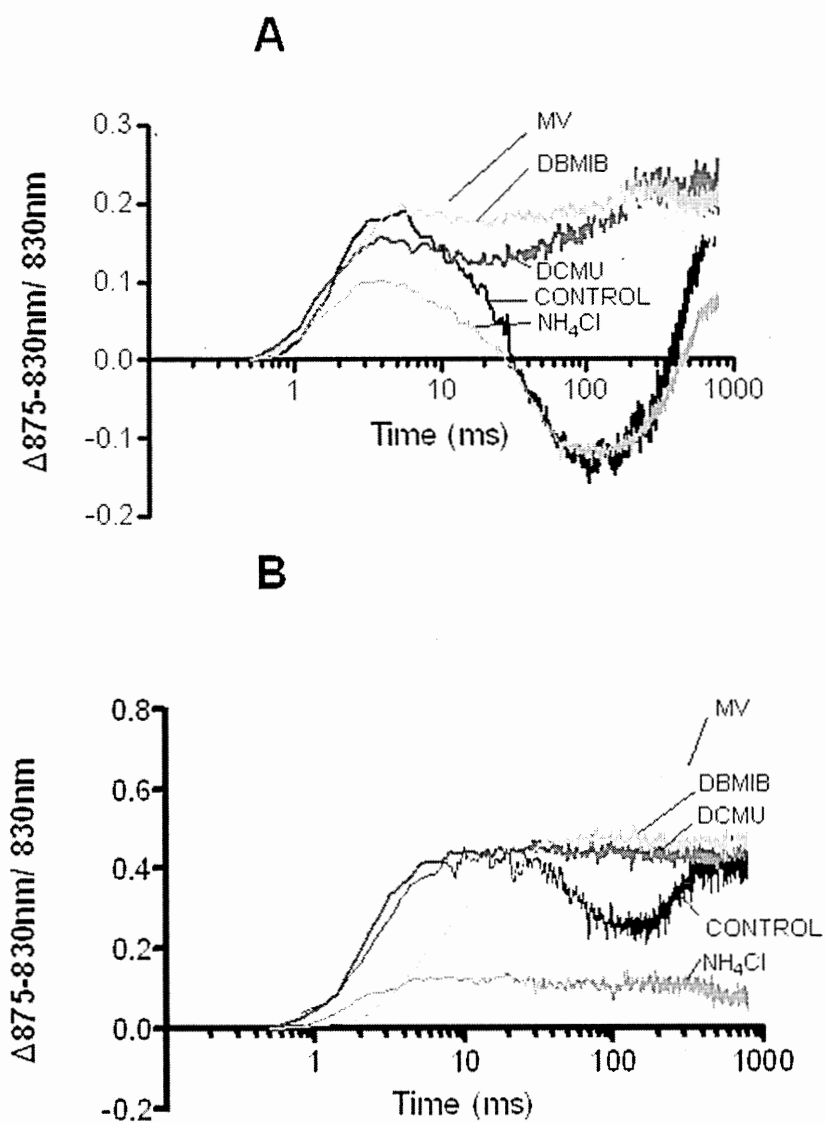


Figure 4.2: Redox kinetics of P700 absorption change induced by saturating light for dark adapted *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B). Samples are treated with NH₄Cl (5mM), DCMU (20 μ M), MV (0.5mM), DBMIB (20 μ M) or not (black line). P700 kinetics were normalized to the minimum level of absorbance change (P_0) at the dark adapted state. For more details, see Section Material and Methods.

Table 4.1: Repartition of the quantum yield of photochemical energy conversion Y(I) and the energy dissipation of the PSI according to limitation in the donor side Y (ND) and acceptor side Y(NA) in *C. reinhardtii* and *F. crotonensis*. Means connected with different letters are different by Tukey HSD ($p < 0.05$).

	<i>C. reinhardtii</i>					
	Y(I)		Y(ND)		Y(NA)	
Control	0,722 ^a	± 0,003	0,105 ^a	± 0,002	0,173 ^a	± 0,004
NH₄Cl	0,669 ^a	± 0,036	0,095 ^a	± 0,011	0,236 ^b	± 0,015
SHAM + MX	0,628 ^{ab}	± 0,030	0,108 ^a	± 0,005	0,264 ^c	± 0,011
PG + MX	0,678 ^a	± 0,034	0,058 ^b	± 0,011	0,264 ^c	± 0,009
DCMU	0,265 ^c	± 0,023	0,550 ^c	± 0,010	0,185 ^d	± 0,004
DBMIB	0,055 ^d	± 0,024	0,630 ^d	± 0,012	0,315 ^e	± 0,008
MV	0,696 ^a	± 0,035	0,120 ^e	± 0,002	0,184 ^d	± 0,003
	<i>F. crotonensis</i>					
	Y(I)		Y(ND)		Y(NA)	
Control	0,617 ^a	± 0,019	0,177 ^a	± 0,006	0,206 ^a	± 0,006
NH₄Cl	0,448 ^b	± 0,024	0,251 ^b	± 0,012	0,301 ^b	± 0,012
SHAM + MX	0,290 ^c	± 0,010	0,284 ^c	± 0,009	0,426 ^c	± 0,017
PG + MX	0,290 ^c	± 0,015	0,288 ^c	± 0,0135	0,422 ^c	± 0,021
DCMU	0,080 ^d	± 0,042	0,648 ^d	± 0,0036	0,272 ^b	± 0,010
DBMIB	0,020 ^e	± 0,007	0,694 ^d	± 0,014	0,286 ^b	± 0,009
MV	0,764 ^f	± 0,035	0,174 ^a	± 0,008	0,062 ^d	± 0,002

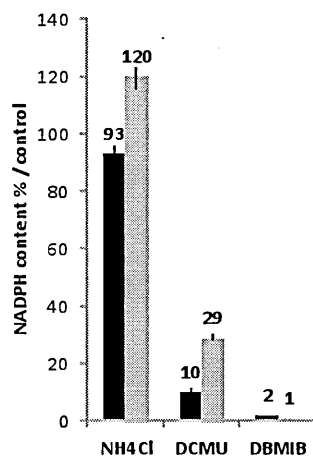


Figure 4.3: Content in NADPH in presence of NH₄Cl (5mM), DCMU (20μM), or DBMIB (20μM), in *C. reinhardtii* (dark) and *F. crotonensis* (grey). Results express in percentage per control.

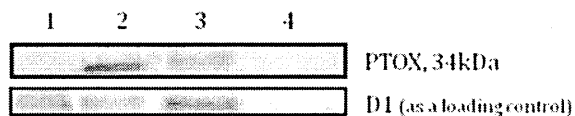


Figure 4.4: Expression of PTOX in *F. crotonensis* and *C. reinhardtii* algae. Western- blot analysis of *F. crotonensis* (1), *C. reinhardtii* (2), *A. thaliana* (3), and *E. coli* (4) cells. Western blot analysis was performed using an anti-PTOX- rabbit serum as primary anti-bodies and an anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated as secondary antibodies. D1 protein (32kda) was used as loading control.

Table 4.2: O₂ production in the dark for *C. reinhardtii* and *F. crotonensis* in presence of inhibitors. Results express in percentage per control. Means connected with different letters are different by Tukey HSD (p<0.05).

	<i>C. reinhardtii</i>	<i>F. crotonensis</i>
control	100 ± 5	100 ± 5
PG + MX	26 ^a ± 6	38 ^a ± 3
SHAM + MX	46 ^b ± 5	42 ^a ± 5

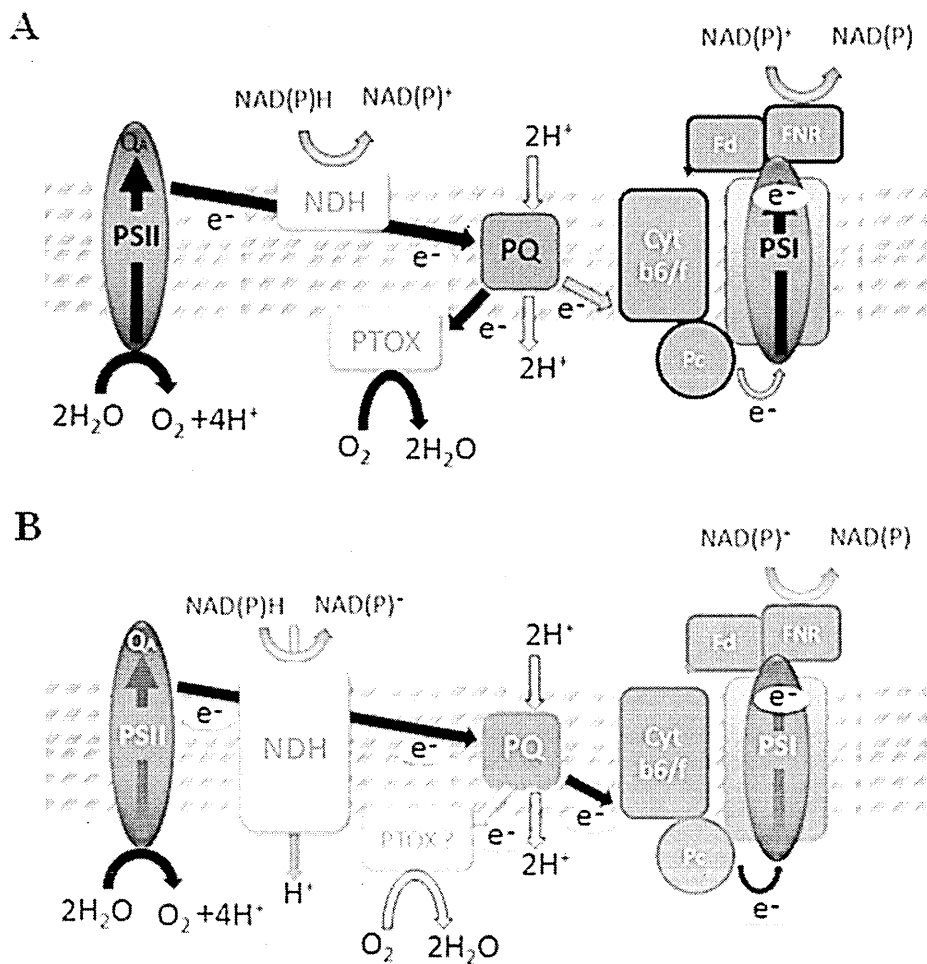


Figure 4.5: Models representing an interconnection between PQ dark reduction and PSI/PSII oxydo-reduction states for *C. reinhardtii* (A) and *F. crotonensis* (B). An electrogenic activity of NAD(P)H dehydrogenase –type I is responsible of a build of a ΔpH in the dark in *F. crotonensis*. The absence of PQ reoxidation by PTOX in *F. crotonensis* leads to a high reduced PQ pool (dark arrow) and a forward reduced PSI donor side (grey arrow) and inversely for *C. reinhardtii*.

CHAPITRE 5

TOXIC EFFECTS AND BIOACCUMULATION OF CARBAMAZEPINE EVALUATED BY BIOMARKERS MEASURED IN ORGANISMS OF DIFFERENT TROPHIC LEVELS

*Gabrielle Vernouillet^a, Philippe Eullafroy^b, André Lajeunesse^c, Christian Blaise^c,
François Gagné^c, Philippe Juneau^a,*

*^a Department of Biological Sciences-TOXEN, Université de Québec à Montréal, Succ.
Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada ;*

*^b Laboratoire Plantes, Pesticides et Développement durable, EA 2069, (URVVC), BP
1039, Université de Champagne-Ardenne, 51687 Reims Cedex 2, France ;*

^c Environment Canada, 105 McGill Street, Montreal, Quebec, Canada.

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique, a été accepté pour publication dans la revue "Chemosphere" le 30 avril 2010. Pour ce projet, j'ai élaboré les idées principales avec les concours de C. Blaise, P. Eullafroy et P. Juneau. J'ai travaillé

avec A. Lajeunesse pour le dosage de la carbamazépine et effectué les autres expériences de laboratoire à Environnement Canada. J'ai contribué à l'analyse des résultats et la rédaction des versions de l'article avec P.Eullafroy, C. Blaise, F. Gagné, et P. Juneau.

5.1 Résumé

La carbamazépine (CBZ) est un médicament antiépileptique persistant que l'on retrouve dans les eaux usées des usines de traitement et dans les effluents. Notre étude visait à examiner la bioaccumulation et la toxicité de la CBZ à l'aide d'une chaîne trophique aquatique expérimentale composée de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*, du crustacé *Thamnocephalus platyurus*, et du cnidaire, *Hydra attenuata*. La bioaccumulation de la CBZ a été estimée par spectrométrie de masse en tandem avec une chromatographie en phase liquide et a révélé les facteurs de bioaccumulation de 2,2 et 12,6, respectivement, dans les algues et les crustacés. Aucune bioaccumulation significative n'a été observée chez *H. attenuata*. Chez *T. platyurus*, une forte stimulation des activités de l'hème oxydase globale (HO) (76%), et de la glutathione-S-transférase (GST) (130%) ont été observées. Une inhibition drastique de l'activité du cytochrome P450 3A-like suggère une altération de l'activité enzymatique par CBZ. Toutefois, chez *H. attenuata*, une augmentation dans l'activité globale des cytochromes, et plus spécifiquement dans celle du cytochrome P450 3A-like a été trouvée, tandis que l'activité GST a été inhibée. La peroxydation lipidique a été réduite chez *T. platyurus* et *H. attenuata* suggérant que l'activité d'oxydoréduction de la CBZ lipophile était en jeu. Cette étude a mis en évidence les processus de transfert de toxicité de la CBZ entre différents niveaux trophiques chez des organismes aquatiques.

5.2 Abstract

The antiepileptic drug carbamazepine (CBZ) readily persists in sewage-water treatment plant wastewaters and finds its way into receiving water bodies. Our study sought to examine the bioaccumulation and toxicity of CBZ using an experimental aquatic trophic chain composed of the green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*, the crustacean, *Thamnocephalus platyurus*, and the cnidarian, *Hydra attenuata*. Bioaccumulation of CBZ was estimated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and revealed bioaccumulation factors of 2.2 and 12.6, respectively, in algae and crustaceans. No significant bioaccumulation was observed in *H. attenuata*. In *T. platyurus*, a strong stimulation of global heme oxidase (HO) (76%), and glutathione-S-transferase (GST) activity (130%) but a drastic inhibition of cytochrome P450 3A-like activity was found which suggests alteration of enzyme activity by CBZ. However, in the hydranth *H. attenuata*, an increase in both global cytochrome and cytochrome P450 3A-like activity was found, while GST activity was inhibited. Lipid peroxidation was reduced in *T. platyurus* and *H. attenuata* suggesting that redox activity of the lipophilic CBZ was at play. This study highlighted the processes of carbamazepine toxicity transfer between trophic levels in aquatic organisms.

Keywords:

Carbamazepine Toxicity Bioaccumulation Trophic chain Enzymatic biomarkers

5.3 Introduction

Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) are a class of environmental contaminants resulting mainly from human and veterinary utilization (Zuccato *et al.*, 2000). Over the past decade, many PPCPs have been systematically detected in wastewater, since they are excreted unmetabolized or as active metabolites, and their complete removal by conventional technologies of water treatment appears to be impossible (Ternes, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006). PPCPs have been developed to modify specific biochemical pathways in humans, but when discharged to aquatic ecosystems they can also exert adverse effects on biota. These compounds are considered persistent owing to their continuous discharge into lakes and rivers (Webb, 2001). Even when small concentrations are found in surface waters, their continuous input leads to multigenerational exposure for resident organisms (Daughton and Ternes, 1999).

Carbamazepine (CBZ), an antiepileptic drug and a relatively lipophilic compound ($K_{ow} = 2.2$), is one of the most commonly detected PPCPs in municipal sewage-treatment plant effluents (Seiler *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Anthropogenic activities produce a continuous input of CBZ to the environment (Clara *et al.*, 2004), and this compound is not degraded in freshwater environments (Lajeunesse and Gagnon, 2007; Zhou *et al.*, 2009), thus concentrations found in natural waters vary between 0.7 and 6.3 $\mu\text{g/L}$ (Ternes, 1998; Metcalfe *et al.*, 2003). Although the toxicity and mode of action of many PPCPs were previously evaluated (Ayscough *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006), little is known about the bioaccumulation of these compounds in aquatic species. The capacity of organisms to increase their internal contaminant concentrations relative to their environment has been studied for a few organic contaminants such as alkylphenols, nonylphenol, diclofenac, triclosan, triclocarban and some antibacterial agents (Ahel *et*

al., 1993; Nimrod and Benson, 1996; Servos, 1999; Delepee *et al.*, 2004; Schwaiger *et al.*, 2004; Coogan *et al.*, 2007; Correa-Reyes *et al.*, 2007).

In this context, our study first sought to investigate the bioaccumulation of CBZ through an experimental trophic chain. CBZ was previously shown to have physiological and morphological toxic effects on aquatic organisms only at relatively high concentrations (Quinn *et al.*, 2008). However, one could not exclude possible toxic effects of bioaccumulated CBZ when evaluated by biochemical biomarkers known to be more sensitive to CBZ than physiological or morphological biomarkers (Quinn *et al.*, 2008). It is well known that many pharmaceuticals require biotransformation for elimination. Indeed, it appears that most drugs are metabolized by cytochromes of the P4503A and 2C8 families (Stresser *et al.*, 2000). Because of the lack of information on the presence of cytochrome P450 specific families in algae and invertebrates, a generic assay for all cytochromes P450 was used which consists in the evaluation of heme oxidase activity from denatured hemoproteins (Thomas *et al.*, 1976). Phase II biotransformation activity was determined by following GST activity, which is implicated in the conjugation of hydroxylated CBZ (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001). The increase in the oxidative biotransformation of xenobiotics could also lead to oxidative stress in cells. Oxidative stress and damage were followed by measuring respectively the activity of glutathione reductase (GR) activity which is implicated in the maintenance of reduced glutathione levels and lipid peroxidation (LPO) in the post-mitochondrial fraction of cells (Peakall and Walker, 1994; Laville *et al.*, 2004).

Therefore, the purpose of this study was to examine the bioaccumulation of CBZ through an experimental food chain composed of the green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*, the crustacean, *Thamnocephalus platyurus*, and the cnidarian, *Hydra attenuata*. The toxic effects of accumulated CBZ in tissues were investigated by following the general (benzidine) and specific (cytochrome P4503A-like) activity of

cytochrome P450 for CBZ, the activity of conjugating enzyme glutathione-S-transferase (GST) and the evaluation of oxidative stress and damage as determined by GR activity and LPO levels, respectively.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Aquatic organisms

The primary producer *P. subcapitata* (formerly named *Selenastrum capricornutum*) was obtained in the form of algal beads from MicroBioTests Inc. (Gent, Belgium, <http://www.microbiotests.be>). Algae were released and transferred into the algal culturing medium from MicroBioTests Inc., pH = 7.5 (Creasel, 1996). The algal inoculate was taken from an exponentially growing culture and added to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 200 mL of test or control solution to obtain an initial cell density of 10^6 cells/mL. Erlenmeyers were placed in a growth chamber at 25 °C under continuous illumination of 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Cell density was measured with a particle counter (Beckman Coulter Multisizer 3). CBZ (Sigma–Aldrich, #C4024) was prepared in *P. subcapitata* growth medium containing 0.5% DMSO. This solvent concentration did not induce any toxicity (data not shown).

T. platyurus, a primary consumer, is a fairy shrimp native to the Southern High Plains playas (USA). This crustacean bioassay was conducted using a commercial kit and followed the manufacturer's protocol (Thamnotoxkit, MicroBioTests Inc., Gent, Belgium, <http://www.microbiotests.be>). First, *T. platyurus* larvae were hatched from cysts after 20–22 h incubation at 25 °C in reconstituted freshwater (EPA medium, Thamnotoxkit, MicroBioTests Inc., Gent, Belgium, <http://www.microbiotests.be>) under constant illumination of 76 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. After 24 h of incubation at 20 °C, a lethal effect was determined when crustaceans failed to exhibit any internal or external

movement during 10s of observation according to the standard operational procedure of this MicroBioTest (Thamnotoxkit, 1995).

H. attenuata were cultured in 1 L of modified hydra medium (TES 0,11 g/L ; CaCl 0147 g/L , pH = 7) (Galen, 1969) and fed daily with *Artemia fransiscana* “brine” shrimp as reported by Blaise and Kusui (1997).

Organism’s ability to graze lower trophic specie was the major selection criteria of these organisms. The organisms were also chosen based on their sensitivity to different pollutants (Joubert, 1980; Blaise, 1986; Persoone *et al.*, 1994; Blaise and Kusui, 1997; Juneau *et al.*, 2001; Ralph *et al.*, 2007).

5.4.2 Trophic chain transfer experiment

For trophic chain experiments, *P. subcapitata* (10^6 cells/mL) were exposed in triplicate to 150 mg/L CBZ for 24 h. This CBZ concentration and treatment time did not induce any change on algal growth and photosystem II photosynthetic efficiency (data not shown), and therefore was used to contaminate the first trophic level and to evaluate the ability of CBZ to be transferred to higher trophic organisms. The negative control consisted of the solvent vehicle DMSO at a final concentration of 0.5% v/v. After 24 h incubation, the algae were harvested by centrifugation (1000 g, 10 min), the algal medium was carefully decanted, and the algae (pellets) were resuspended in fresh medium. The algal suspension was precipitated/resuspended likewise three more times to remove residual CBZ (maximal remaining concentration was 10–20 ng/L in the algal pellet and 0.1–0.5 ng/L in the *T. platyurus* media). The cell pellet was then resuspended in *T. platyurus* hatching medium to obtain a final cell density of 10^9 cells/mL. Ten milliliters of CBZ-contaminated or control algae were added as food to 250 collected *T. platyurus* adults and incubated in a Petri dish (diameter 55 mm) in triplicate for 24 h at 20 °C, allowing enough time for ingestion of algae and releasing the content of their guts. After this exposition, all *T. platyurus*

were alive and in movement indicating that *T. platyurus* were exposed to sublethal CBZ concentrations through contaminated algae. Then, *H. attenuata* were fed during 6 h with *T. platyurus* previously exposed to contaminated algae (Thamnotoxkit, 1995). A ratio of 10 *T. platyurus* per *H. attenuata* was employed. This ratio prevented any food limitation since each *H. attenuata* eats an average of seven *T. platyurus* during this specific period. *H. attenuata* were also fed for 6 h with *T. platyurus* exposed to control algae. Afterwards, micro-algae, micro-crustaceans and Hydra organisms were homogenized for ensuing biomarker measurements or CBZ detection.

5.4.3 Biochemical biomarkers

Algae were homogenized at 4 °C in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH = 7, containing 1 mM EDTA, using ultrasound (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 100) according to Janknegt *et al.* (2007). *T. platyurus* and *H. attenuata* were washed with buffer containing 50 mM NaCl, 25 mM MOPS and 1 mM EDTA, pH = 7.2, then were homogenized at 4 °C using a Teflon pestle tissue grinder. The homogenate was centrifuged at 15000g for 20 min at 4 °C, and the supernatant (S15) was retained to test for enzymatic activity.

The evaluation of the global cytochrome P450 activity was determined based on the principle that denatured hemoproteins have heme oxidase (peroxidase) activity (Thomas *et al.*, 1976). Total heme oxidase activity (HO) in the post-mitochondrial S15 fraction was determined according to the benzidine oxidation method (Connon *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 2004). The S15 fraction (25 µl) was mixed with 0.1 mM benzidine and 0.15% H₂O₂ in 0.2 M sodium acetate, pH 5.0, containing 0.1% triton X-100. Data were expressed as the increase in absorbance at 620 nm/min/mg proteins. The activity of cytochrome P450 3A4 (and 2C8) was determined by using the specific substrate dibenzylfluorescein (Stresser *et al.*, 2000). Substrate concentration was at 10 µM concentration in the presence of 0.2 mM NADPH (as the electron

donor) and the S15 fraction (50 μ l). The rate of dibenzylfluorescein oxidation was measured over time by fluorometry 485 nm excitation and 530 nm emission. Enzyme activity was expressed in terms of product formation (relative fluorescence units)/min/mg proteins. The negative controls consisted in the addition of all these components with the exception of NADPH.

The phase II conjugation activity was measured by GST activity. GST catalyzes the conjugation reaction of reduced glutathione (GSH) with electrophilic substrates such as dinitrochlorobenzene, which recognizes all GST isoenzymes in tissues (Habig *et al.*, 1974). The appearance of glutathione conjugate was measured at 340 nm over time (0–30 min) at 30 °C using an absorbance microplate reader. Enzyme activity was expressed as the formation of product (increase of absorbance) min/mg proteins in the corresponding fraction.

GR plays a key role in oxidative metabolism by regenerating GSH (reduced form of glutathione) from GSSG (oxidized form of glutathione), and thus has a role of redox buffer (Halliwell and Foyer, 1978; O'Donovan *et al.*, 1999). GR activity was measured by the change of absorbance at 412 nm due to the reduction of DTNB (5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) by GSH in 2-nitro-5-thiobenzoic acid as described previously (Smith *et al.*, 1988). Enzyme extract (200 μ L) was added to the assay mixture (800 μ L) containing 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.5 mM DTNB, 0.1 mM NADPH (Final volume = 1 mL). After an incubation of 40 min, 1 mM GSSG was added to start the reaction. The TNB formation was monitored at 412 nm during 16 min. The negative controls consisted in the addition of all these components with the exception of GSSG, which was replaced by water.

The oxidative damage of polyunsaturated fatty acid was determined by following changes in LPO. LPO was evaluated in S15 fraction (containing the microsomal membranes where xenobiotic biotransformation occurs) according to the

thiobarbituric acid reactant (TBAR) methodology described by Decker (1988). Total protein content was determined in all homogenate and S15 fractions by the method of Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin for calibration.

5.4.4 CBZ detection

After exposure, medium was eliminated by centrifugation, and algal pellets, *T. platyurus*, or *H. attenuata* were washed with sterile and deionised water to eliminate interstitial water. Algal pellet was resuspended in 1 mL sterile and deionised water, and homogenized by ultrasound treatments (3 x 30 s, on ice). *T. platyurus* and *H. attenuata* were homogenized at 4 °C using a Teflon pestle tissue grinder in water, and supernatant (15 000g, 20 min, 4 °C) was used to detect CBZ. CBZ was extracted twice with ethylacetate solution to release CBZ from the homogenates. CBZ was quantified by Thermo Finnigan HPLC Surveyor System on a Gemini C18 column (150 x 2.0mm i.d. x 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) with a mass spectrometer detector (TSQ Quantum Ultra™ triple quadrupole by Thermo Fisher Scientific Inc.). Negative controls consisted of DMSO-treated organisms. In real matrix, we defined the limit of detection as the lowest concentration of analyte having a minimum S/N ratio of three for a spiked sample containing ~ 0.0021 mg of crushed organisms. Then the limit of detection was 0.2 ng/L for CBZ (based on 20 µL injected). Mean recoveries in matrix were obtained by triplicate analysis and gave satisfactory percentages of recovery of $92.9 \pm 4.4\%$. These results indicated the method was accurate and precise. The whole methodology is described in detail in Lajeunesse *et al.* (2009).

5.4.5 Data analysis

LC₅₀ and EC₅₀ values were calculated using the ToxTest version 2, US EPA software. Growth-IC₅₀ was estimated using Microsoft Excel. Variability between the exposed

and control organisms was tested by one-way analysis of variance (ANOVA) using STATISTICA, StatSoft, Inc. (Tulsa, USA), (significance, $p \leq 0.05$).

5.5 Results

5.5.1 CBZ bioaccumulation

CBZ was readily accumulated by the algae exposed to 150 mg/L . CBZ (Table 5.1). After 24 h incubation with CBZ, algal cells contained 10.2 mg CBZ/g dry biomass of algae (426×10^9 cells/g dry weight). Considering the cellular volume of cultivated *P. subcapitata* ($74.3 \mu\text{m}^3$), calculated according to Hillebrand *et al.* (1999), the average CBZ concentration inside the cells was estimated to be 321.7 $\mu\text{g/mL}$. The bioconcentration factor after 24 h exposure ($\text{BAF}_{24 \text{ h}}$) was determined as the ratio between CBZ concentration in algal cells divided by the initial CBZ concentration in water. Thus, the bioconcentration factor of *P. subcapitata* for CBZ under the present conditions was 2.2. *T. platyurus* accumulated 128.6 mg of CBZ/g dry biomass after 24 h feeding on CBZ-treated algae. The bioconcentration factor was determined as the ratio between the CBZ concentration in *T. platyurus* divided by the CBZ concentration in algal cells normalized to dry weight. Thus, the bioconcentration factor ($\text{BAF}_{24 \text{ h}}$) of *T. platyurus* for CBZ was 12.6. The CBZ accumulation by *H. attenuata* after feeding for 6 h on CBZ-contaminated *T. platyurus* was shown to be negligible, since only traces of CBZ were found in *H. attenuata*. Indeed, measured CBZ levels in 45 Hydra were between 0.2 ng (detection limit) and 0.6 ng (quantification limit).

5.5.2 Biochemical biomarkers in trophic chain conditions

To characterize the effect of CBZ on *P. subcapitata*, *T. platyurus*, and *H. attenuata* in trophic chain conditions, the oxidative potential of this lipophilic compound was evaluated through the activity of phase I (total and specific cytochrome P450

activity), the activity of phase II conjugation activity (GST) and oxidative stress (GR activity) and damage (LPO).

Phase I biotransformation enzyme activities were first estimated. In *P. subcapitata* exposed to 150 mg/L CBZ, we observed a cytochrome P450 3A4-like activity, which was significantly reduced by 55% compared to control (Fig 5.1). In *T. platyurus* fed with CBZ-exposed alga, we also observed a strong inhibition of cytochrome P450 3A4-like activity (Fig 5.2). In contrast, the global activity of cytochrome P450, as determined by heme oxidase (HO), was significantly induced in *T. platyurus* (76% compared to the control) (Fig 5.2). In *H. attenuata*, the third trophic level organism, fed with *T. platyurus* contaminated with CBZ, both global cytochrome P450 and cytochrome P450 3A4-like activity were significantly increased by 63% and 433% respectively (Fig 5.3).

GR activity was 40% more active for CBZ-treated *P. subcapitata* (Fig 5.1) and GST activity was stimulated by 130% in *T. platyurus* fed with CBZ-treated *P. subcapitata* (Fig 5.2). In Hydra, although HO and cytochrome activities were stimulated, phase II biotransformation enzyme GST was not activated (Fig 5.3). Interestingly, we noticed a similar decrease for *T. platyurus* and *H. attenuata* in LPO (72% and 56%, respectively) in the presence of CBZ (Figs 5.2 and 5.3).

5.6 Discussion

5.6.1 CBZ bioaccumulation

This study was the first to examine the bioaccumulation and early biological effects of CBZ in aquatic organisms. A CBZ 24h bioconcentration factor of 2.2 was found for *P. subcapitata* algae. This BAF_{24h} was less important than that obtained following 2 h of nonylphenol exposition in micro-algae *Isochrysis galbana* (6940) (Correa-Reyes *et al.*, 2007), and for a 10 d exposition of oxolonic acid (250–450), flumequine

(75–140), and oxytetracycline (100– 200) in bryophytes (Delepee *et al.*, 2004), but BAF values depend greatly on the studied species and the lipophilicity and ionization state of the chemical (Voutsas *et al.*, 2002; Delepee *et al.*, 2004). Although accumulation of CBZ in *T. platyurus* was more important than in algae (12.6 times), only traces of CBZ were found in *H. attenuata*. This indicates that either the uptake of CBZ in *H. attenuata* was very weak, or there is a high detoxification activity in this cnidarian as revealed by increased HO and cytochrome P450 3A4-like activity. This study corroborated a previous study on the induction of biotransformation enzymes by CBZ in Hydra (Quinn *et al.*, 2004). A longer exposure time of Hydra to contaminated *T. platyurus* would not have changed this result since the number of grazed *T. platyurus* was evaluated to seven per Hydra for the first 6 h and no more was grazed for a longer exposure time, up to 72 h (data not shown) The potential of CBZ uptake and/or bioaccumulation in aquatic organisms warrants further investigations on the early biochemical effects in these organisms.

5.6.2 Biochemical biomarkers under trophic chain conditions

CBZ has been shown to induce cytochrome P450 3A4 activity in human cells (Spina *et al.*, 1996) and cytochrome 3A subfamily in mouse (Pirmohamed *et al.*, 1992). This cytochrome catalyzes the 3-hydroxylated product of CBZ in liver microsomes (Pearce *et al.*, 2002). CYP 450 3A4 gene has been found in barley (Nguyen, 2005), in *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant *et al.*, 2007) and in *Daphnia* (Ikenaka *et al.*, 2006). This suggests that cytochrome P450 3A4-like activity could be present in *P. subcapitata*, *T. platyurus* and in *H. attenuata*. However, in order to unequivocally determine that the measured activity arose specifically from CYP450 3A4 or 2C8, further studies detecting the gene and its corresponding mRNA will be needed for the three species. In CBZ-exposed algal cells, we noticed a strong inhibition of CYP450 3A4-like activity, while inhibition was almost complete for *T. platyurus* that grazed on contaminated algae (Figs 5.1 and 5.2). Since CBZ concentrations were 10 times

higher in *T. platyurus* as compared to *P. subcapitata* (Table 5.1), it is likely that CBZ or CBZ-reactive metabolites may have blocked its activity in *T. platyurus*, as demonstrated recently (Pearce *et al.*, 2008). In contrast, both the global cytochrome P450 and cytochrome P450 3A4-like activities in *H. attenuata* were drastically increased (Fig. 5.3) in agreement with a previous study in hydra exposed to CBZ via water (Quinn *et al.*, 2004). Moreover, it was recently demonstrated that oxidative metabolism (cytochrome P450 3A4-related activities, and lipid peroxidation) was induced by CBZ in rainbow trout hepatocytes (Gagné *et al.*, 2006). Although we have detected by HPLC only trace levels of CBZ in hydra, a significant increase in activity was observed, demonstrating the high sensitivity of this enzymatic assay.

Global cytochrome P450 activity as determined by heme oxidase (HO) activity was strongly stimulated in *T. platyurus* compared to cytochrome P4503A4-like activity (Fig 5.2). This may indicate that other cytochromes might have been at play in the metabolism of CBZ. The substrate used was also responsive to cytochrome P450 2C8 but the 2C family is usually absent in aquatic organisms, hence their sensitivity to phenobarbital (Buhler and Wang-Buhler, 1998). In *H. attenuata*, the induction of HO activity by 63% (Fig 5.3) found in our study agrees with a recent study in which hemoprotein activity was induced by dissolved CBZ in the exposure media (Quinn *et al.*, 2004).

In *T. platyurus*, GST activity increased by 130% compared to control (Figure 5.2). This could be caused by the formation of thiol metabolites resulting from CBZ oxidation (Pearce *et al.*, 2005), or indicate that CBZ is being conjugated for elimination purposes. A possible explanation resides in the ability of GST to perform a nucleophilic substitution of GSH with the existing functional groups of CBZ. CBZ is a carboxylated iminostilbene ($R-N-CO-NH_2$) where the carbonyl ($C=O$) moiety might react with GSH. This will require further analysis through HPLC-MS/MS to identify whether such metabolites occurs in this microcrustacean. In *H. attenuata*,

weak GST activity in the presence of CBZ indicated that GST played a less important detoxification role than in *T. platyurus*, which might be a consequence of the strong induction of phase I biotransformation enzymes (CYP450 3A4/2C8 and HO).

Although modulation of biotransformation enzyme activities differ between *T. platyurus* and *H. attenuata*, the overall consequence for both organisms exposed to CBZ triggers a decrease in LPO, an indicator of lipid hydroperoxide breakdown products (Figs 5.2 and 5.3). Since LPO was determined in the S15 fraction where microsomes and membrane vesicles are found, the decrease in LPO levels suggests that the lipophilic CBZ (membrane bound) might have acted as radical scavenger thus preventing fatty acid oxidation in these membranes. However, we may hypothesize that LPO can also be decreased by another mechanism. Indeed, it has been shown that CBZ down-regulated cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂) activity in rat brain (Ghelardoni *et al.*, 2004; Bazinet *et al.*, 2006). PLA₂ inhibition is known to prevent phospholipid hydrolysis by limiting the amount of arachidonic acid available for oxidative metabolism (Adibhatla and Hatcher, 2003). Therefore, since PLA₂ is present in *H. attenuata* (Borelli *et al.*, 1995) and also in crustaceans (Rivera *et al.*, 1999), it is possible that CBZ decreased LPO by directly downregulating PLA₂ activity.

P. subcapitata GR activity increased 40% in comparison to the control. Such strong induction of GR was previously reported in *Scenedesmus obliquus* in response to two herbicides, oxyfluorfen and diuron, known to induce oxidative stress (Geoffroy *et al.*, 2001). Teisseire and Vernet (2000, 2001) also found an induction of GR and other antioxidant enzymes for *Lemna minor* exposed to pesticides. The protective role of GR in plants and algae is related to the stabilization of enzymes involved in carbon fixation, and to the removal of hydrogen peroxide and superoxide (Halliwell and Foyer, 1978; Foyer *et al.*, 1994; Mittler *et al.*, 2004). Indeed, GR did not directly deactivate ROS, but was indirectly involved in this process by maintaining glutathione in its predominantly reduced state (Foyer *et al.*, 1997). This latter

nonenzymatic antioxidant could quench ROS directly or indirectly by regenerating ascorbic acid, another antioxidant compound (Foyer *et al.*, 1994).

5.7 Conclusions

Although the high concentration of CBZ (150 mg/L) used experimentally is unlikely to be found in the environment (Fent *et al.*, 2006), this work indicates the ability of CBZ to bioaccumulate in aquatic organisms through food contamination. Further research is mandatory to examine the long term effect of CBZ exposure by food and water and the potential accumulation of its degradation products in the food chain.

The importance of applying multiparametric biomarkers and an experimental trophic chain to evaluate the potential toxicity of CBZ transfer through an aquatic food web was demonstrated. Although the advantages of using enzymatic biomarkers are obvious, no previous biomarker work has been reported for *T. platyurus* and, to our knowledge, toxicity assessments accomplished with this organism were only based on mortality (Blaise, 2000; Nalecz-Jawecki and Persoone, 2006). We have shown that there is a strong modulation of biotransformation enzyme activities and lipid peroxidation in the three studied organisms following direct exposure (*P. subcapitata*) or the ingestion of contaminated food (*T. platyurus* and *H. attenuata*). Results showed that these biochemical biomarkers were sensitive to CBZ toxicity induced by CBZ trophic transfer.

5.8 Acknowledgments

The technical assistance of Chantale André, Mélanie Douville, Sophie Trepanier, and Joëlle Auclair was gratefully appreciated. This research was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Research Grant awarded to P. Juneau. Environment Canada co-authors acknowledge that this work

was conducted under the Municipal Effluent Research Program of Environment Canada, Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Centre Saint-Laurent Research Group, with funding provided by the Saint-Lawrence River Action Plan.

5.9 References

- Adibhatla, R. M. and J. F. Hatcher (2003). "*Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia.*" *J Neurosci Res* 73(3): 308-315.
- Ahel, M., J. McEvoy, et al. (1993). "*Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms.*" *Environ Pollut* 79(3): 243-248.
- Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova (2001). "*Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics.*" *Cell Mol Life Sci* 58(5-6): 737-747.
- Ayscough, N. J., J. Fawell, et al. (2001). "*Review of Human Pharmaceuticals in the Environment.*" R&D technical support: 390.
- Bazinet, R. P., J. S. Rao, et al. (2006). "*Chronic carbamazepine decreases the incorporation rate and turnover of arachidonic acid but not docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat: relevance to bipolar disorder.*" *Biol Psychiatry* 59(5): 401-407.
- Blaise, C. (1986). "*Micromethod for acute aquatic toxicity assessment using the green alga *Selenastrum capricornutum*.*" *Toxicity Assessment* 1: 377-385.
- Blaise, C. (2000). "*Canadian Application of Microbiotests to assess the Toxic Potential of Complex Liquid and Solid Media.*" *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring* 1: 3-12.
- Blaise, C. and T. Kusui (1997). "*Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay.*" *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12: 53-60.
- Borelli, L., V. Carginale, et al. (1995). "*Phospholipase A 2 and protein kinase C enzymatic activities and their interactions in *Hydra vulgaris*.*" *Comp. Biochem. Physiol* 111(2): 211-219.
- Bradford, M. M. (1976). "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Buhler, D. R. and J. L. Wang-Buhler (1998). "*Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring.*" *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121(1-3): 107-137.
- Chen, M., K. Ohman, et al. (2006). "*Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada.*" *Water Quality Research Journal of Canada* 41(4): 351-364.
- Clara, M., B. Strenn, et al. (2004). "*Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration.*" *Water Res* 38(4): 947-954.
- Connon, R., R. E. Dewhurst, et al. (2003). "*Haem peroxidase activity in Daphnia magna: a biomarker for sub-lethal toxicity assessments of kerosene-contaminated groundwater.*" *Ecotoxicology* 12(5): 387-395.
- Coogan, M. A., R. E. Edziyie, et al. (2007). "*Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream.*" *Chemosphere* 67(10): 1911-1918.
- Correa-Reyes, G., M. T. Viana, et al. (2007). "*Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain.*" *Chemosphere* 68(4): 662-670.
- Creasel (1996). "*Algaltokit F™, Freshwater Toxicity Test with Microalgae. Standard Operational Procedure.*" Deinze, Belgium.: p. 28.
- Daughton, C. G. and T. A. Ternes (1999). "*Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?*" *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6: 907-938.
- Decker, E. A., M. C. Erickson, et al. (1988). "*Enzymic lipid oxidative activities of sarcoplasmic reticulum in several species of northwest Atlantic fish.*" *Comp Biochem Physiol C* 91: 7-9.
- Delepee, R., H. Pouliquen, et al. (2004). "*The bryophyte Fontinalis antipyretica Hedw. bioaccumulates oxytetracycline, flumequine and oxolinic acid in the freshwater environment.*" *Sci Total Environ* 322(1-3): 243-253.

- Fent, K., A. A. Weston, et al. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." *Aquat Toxicol* 76(2): 122-159.
- Ferrari, B., Mons R., et al. (2004). "Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment ?" *Environ Toxicol Chem* 23(5): 1344-1354.
- Foyer, C. H., M. Lelandais, et al. (1994). "Photooxidative stress in plants." *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- Foyer, C. H., H. Lopez-Delgado, et al. (1997). "Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling." *Physiol. Plant.* 100(241).
- Gagne, F., C. Blaise, et al. (2006). "Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes." *Ecotoxicol Environ Saf* 64(3): 329-336.
- Galen, D. (1969). "Culturing Methods for Hydra " *The American Biology Teacher* 31(3): 174-177.
- Geoffroy, L., M. Couderchet, et al. (2001). Effet du diuron, de l'oxyfluorène et du cuivre sur l'activité catalasique de *Scenedesmus obliquus*. Produits phytosanitaires. Analyse, résidus, métabolites, écotoxicologie, modes d'action, transfert ... M. Couderchet, P. Eullaffroy and G. Vernet. Reims, France, Presses Universitaires de Reims: 157-166.
- Ghelardoni, S., Y. A. Tomita, et al. (2004). "Chronic carbamazepine selectively downregulates cytosolic phospholipase A2 expression and cyclooxygenase activity in rat brain." *Biol Psychiatry* 56(4): 248-254.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, et al. (1974). "Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of Biological Chemistry* 249(22): 7130-7139.
- Halliwell, B. and C. Foyer (1978). "Properties and Physiological Function of a Glutathione Reductase Purified from Spinach Leaves by Affinity Chromatography." *Planta* 139: 9-17.

- Hillebrand, H., C. D. Dürselen, et al. (1999). "*Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae.*" *Journal of Phycology* 35(2): 403-424.
- Ikenaka, Y., M. Ishizuka, et al. (2006). "*Cytochrome P450 in aquatic crustacean Daphnia magna.*" Direct Submission to NCBI, Yoshinori Ikenaka, Shinshu University, Research and Education Center for Inlandwater Environment; Kogandori 5-2-4, Suwa, Nagano 392-0027, Japan.
- Janknegt, P. J., J. W. Rijstenbil, et al. (2007). "*A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae.*" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87(3): 218-226.
- Joubert, G. (1980). "*A bioassay application for quantitative toxicity measurements, using the green algae Selenastrum capricornutum.*" *Water Research* 14: 1759-1763.
- Juneau, P., D. Dewez, et al. (2001). "*Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry.*" *Chemosphere* 45(4): 589-598.
- Lajeunesse, A. and C. Gagnon (2007). "*Determination of acidic pharmaceutical products and carbamazepine in roughly primary-treated wastewater by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry.*" *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 87(8): 565-578.
- Lajeunesse, A., G. Vernouillet, et al. (2009). "*Determination of carbamazepine in aquatic organisms by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.*" *J Environ Monit* 11(4): 723-725.
- Laville, N., S. Ait-Aissa, et al. (2004). "*Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes.*" *Toxicology* 196(1-2): 41-55.
- Merchant, S. S., S. E. Prochnik, et al. (2007). "*The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions.*" *Science* 318(5848): 245-250.
- Metcalf, C. D., B. G. Koenig, et al. (2003). "*Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants.*" *Environ Toxicol Chem* 22(12): 2872-2880.

- Mittler, R., S. Vanderauwera, et al. (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.
- Nalecz-Jawecki, G. and G. Persoone (2006). "Toxicity of selected pharmaceuticals to the anostracan crustacean *Thamnocephalus platyurus*: comparison of sublethal and lethal effect levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit microbiotests." *Environ Sci Pollut Res Int* 13(1): 22-27.
- Nguyen, D.-L. (2005). "Isolation and characterization of cytochrome P450 genes in barley." Centre for Plant Conservation Genetics, Southern Cross University, PO Box 157, Military Road, Lismore, NSW 2480, Australia.
- Nimrod, A. C. and W. H. Benson (1996). "Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates." *Crit Rev Toxicol* 26(3): 335-364.
- O'Donovan, D. J., J. P. Katkin, et al. (1999). "Gene transfer of mitochondrially targeted glutathione reductase protects H441 cells from t-butyl hydroperoxide-induced oxidant stresses." *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(2): 256-263.
- Peakall, D. B. and C. H. Walker (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment. (3) Vertebrates." *Ecotoxicology* 3(3): 173-179.
- Pearce, R. E., W. Lu, et al. (2008). "Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro. III. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2,3-dihydroxycarbamazepine." *Drug Metab Dispos* 36(8): 1637-1649.
- Pearce, R. E., J. P. Uetrecht, et al. (2005). "Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro: II. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2-hydroxyiminostilbene." *Drug Metab Dispos* 33(12): 1819-1826.
- Pearce, R. E., G. R. Vakkalagadda, et al. (2002). "Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2- and 3-hydroxylated metabolites." *Drug Metab Dispos* 30(11): 1170-1179.
- Persoone, G., C. Janssen, et al. (1994). "Cyst-based toxicity tests X: Comparison of the sensitivity of the acute *Daphnia magna* test and two crustacean microbiotests for chemicals and wastes." *Chemosphere* 29(12): 2701-2710.

- Pirmohamed, M., N. R. Kitteringham, et al. (1992). "*The effect of enzyme induction on the cytochrome P450-mediated bioactivation of carbamazepine by mouse liver microsomes.*" *Biochem Pharmacol* 44(12): 2307-2314.
- Quinn, B., F. Gagne, et al. (2008). "*An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, Hydra attenuata.*" *Sci Total Environ* 389(2-3): 306-314.
- Quinn, B., F. Gagné, et al. (2004). "*Oxydative metabolism activity in Hydra attenuata exposed to carbamazepine.*" *Fresenius Environ Bull.*
- Ralph, P. J., R. A. Smith, et al. (2007). "*Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review.*" *Toxicological and Environmental Chemistry* 89(4): 589-607.
- Rivera, M. A. J., F. G. Howarth, et al. (1999). "*Direct Submission.*" Division of Insect Biology, Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California Berkeley, 201 Wellman Hall, Berkeley, CA 94720-3112, USA.
- Schwaiger, J., H. Ferling, et al. (2004). "*Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout.*" *Aquat Toxicol* 68(2): 141-150.
- Seiler, R. L., S. D. Zaugg, et al. (1999). "*Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells.*" *Ground Water* 37(3 United States): 405-410.
- Servos, M. (1999). "*Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates.*" *Water Quality Research Journal of Canada* 34(1): 123-177.
- Smith, I. K., T. L. Vierheller, et al. (1988). "*Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).*" *Analytical Biochemistry* 175: 408-413.

- Spina, E., F. Pisani, et al. (1996). "*Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update.*" Clin Pharmacokinet 31(3): 198-214.
- Stresser, D. M., A. P. Blanchard, et al. (2000). "*Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates.*" Drug Metab Dispos 28(12): 1440-1448.
- Teisseire, H. and G. Vernet (2000). "*Is the "Diuron Effect" Due to a Herbicide strengthening of antioxidative defenses of Lemna minor ?*" Pesticide Biochemistry and Physiology 66: 153-160.
- Teisseire, H. and G. Vernet (2001). "*Effects of the Fungicide Folpet on the Activities of Antioxidative Enzymes in Duckweed (Lemna minor).*" Pesticide Biochemistry and Physiology 69: 1126117.
- Ternes, T. A. (1998). "*Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.*" Water Research Volume 32,(Issue 11): 3245-3260.
- Thamnotokit, F. (1995). "*Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard operational procedure.*" MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium: 23p.
- Thomas, P. E., D. Ryan, et al. (1976). "*Improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels.*" Anal. Biochem. 75: 168-176.
- Voutsas, E., K. Magoulas, et al. (2002). "*Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs.*" Chemosphere 48(7): 645-651.
- Webb, S. (2001). "*A data bases perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. Aquatic risk characterization.*" Kummerer, K. (Ed.), first edition, Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks, Springer-Verlag, Berlin.: 205-219.
- Zhang, Y., S. U. Geissen, et al. (2008). "*Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies.*" Chemosphere 73(8): 1151-1161.

Zhou, J. L., Z. L. Zhang, et al. (2009). "*Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water.*" *J Hazard Mater* 166(2-3): 655-661.

Zuccato, E., D. Calamari, et al. (2000). "*Presence of therapeutic drugs in the environment.*" *Lancet* 355(9217): 1789-1790.

5.10 Table and Figures

Table 5.1: CBZ concentrations and bioconcentration factors (BAF) for experimental trophic chain organisms. For details, see Material and Method section. * = below quantification limit of the method.

	CBZ (mg/ L)	CBZ (mg/ g biomass)	BAF
<i>P. subcapitata</i>	321.7	10.2	2.2
<i>T. platyurus</i>		128.6	12.6
<i>H. attenuata</i>		trace*	N.D.

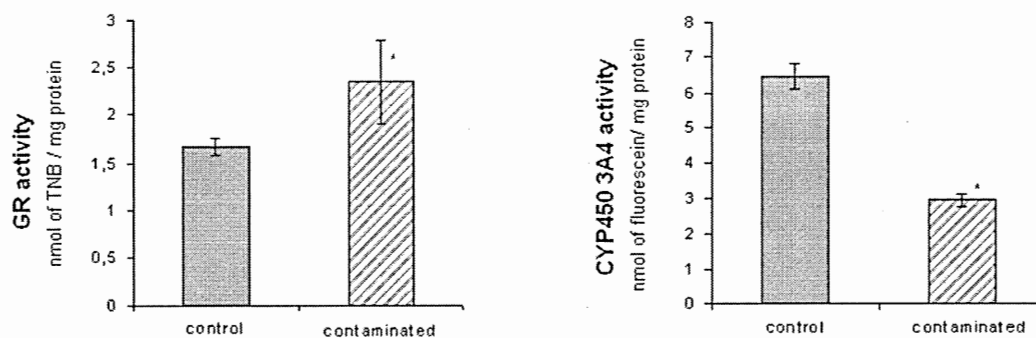


Figure 5.1: GR activity and CYP450 3A4 activity for *P. subcapitata* exposed to CBZ (150 mg/L). Algae were exposed 24h at a cell density of 10^6 cells/mL at 20°C. *indicates significance at $p < 0.05$.

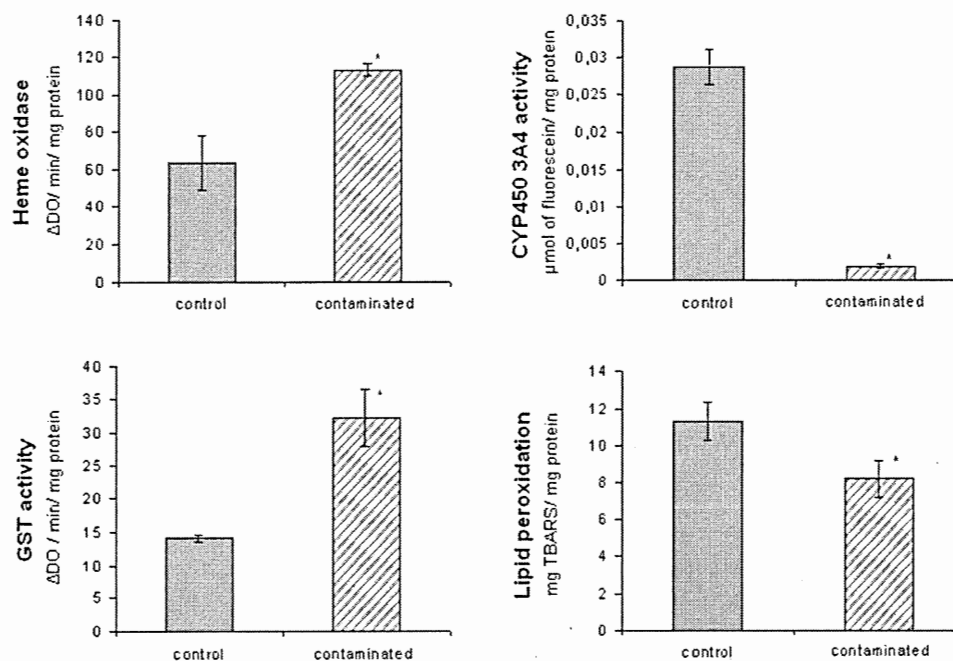


Figure 5.2: Oxidative metabolism enzyme activities in *T. platyurus* fed for 24h with contaminated-CBZ or control algae. Enzymatic activities evaluated were heme oxidase activity (HO), cytochrome P450 3A activity, glutathione-S-transferase (GST) activity, and lipid peroxidation (LPO). For details, see Material and Method section. *indicates significance at $p < 0.05$

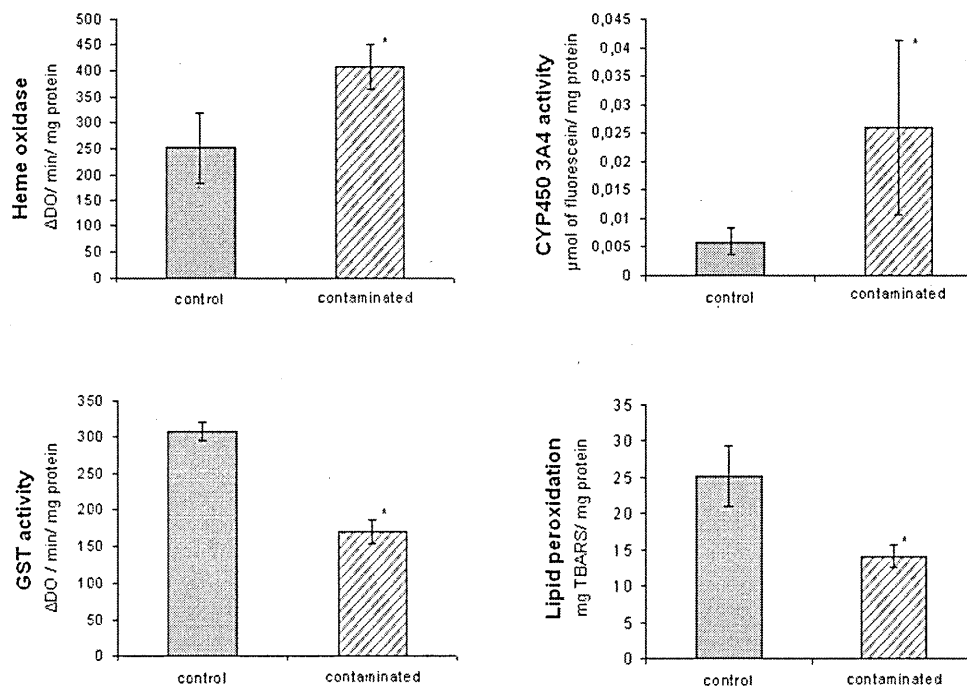


Figure 5.3: Oxidative metabolism enzyme activities in *H. attenuata* fed for 6h with *T. platyurus* exposed to contaminated algae or *T. platyurus* exposed to control algae. Enzymatic activities evaluated were heme oxidase activity (HO), cytochrome P450 3A activity, glutathione-S-transferase (GST) activity, and lipid peroxidation (LPO). For details see Material and Method section. *indicates significance at $p < 0.05$.

DISCUSSION

Les effets de trois PPHB sur la physiologie de deux espèces de phytoplancton d'eau douce ont été évalués selon les modifications des paramètres photosynthétiques des microalgues. Deux espèces de microalgues ont été choisies l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et la diatomée *Fragilaria crotonensis* pour comparer les effets de trois PPHB majeurs : la ciprofloxacine (cipro), le sulfaméthoxazole (SMX), et la carbamazépine (CBZ). *C. reinhardtii* est utilisée depuis une cinquantaine d'année comme modèle d'étude de la photosynthèse (Ralph *et al.*, 2007; Peltier *et al.*, 2010; Pospisii, 2012). *F. crotonensis* est une diatomée qui a montré récemment une plus grande sensibilité de sa photosynthèse que d'autres espèces d'algues à un herbicide cible du PSII, l'atrazine (Deblois et Juneau, 2012).

Nous avons alors mis en évidence chez *C. reinhardtii* que la CBZ pouvait augmenter la dissipation non-photochimique d'énergie sous forme de chaleur, ou de fluorescence (DI_0/RC) et induire la photoinhibition des algues. Chez *F. crotonensis*, les effets de la CBZ sont observés dès 5 mg/L, mais chez ces algues une forte dissipation d'énergie associée à une diminution de la capture (*trapping*) d'électrons (ET_0/RC) peut indiquer une photoinhibition (Force *et al.*, 2003). Dans les deux espèces, on note que la phase JI représentative du niveau de réduction de PQ est fortement augmentée sous l'effet de concentration croissante de CBZ. Cela pourrait être la conséquence du rôle d'antioxydant que les plastoquinones peuvent jouer sous l'effet de stress lumineux, ou d'inhibiteur, en piégeant les formes activées de l'oxygène *in vivo* (Nowicka et Kruk, 2012).

Il est possible en effet que la CBZ induise un stress oxydant chez les algues car nous avons observé dans le chapitre 3, chez *P. subcapitata*, une augmentation de la glutathion réductase de 40% par rapport au contrôle. La GR ne désactive pas les EAO, mais elle est impliquée indirectement dans ce processus en maintenant le glutathion dans son état réduit prédominant (Foyer *et al.*, 1997). De plus, cette augmentation de l'activité de la GR est cohérente avec celle observée chez *S. obliquus* exposé à deux herbicides connus pour induire un stress oxydatif (Geoffroy *et al.*, 2001) et chez *Lemna minor* sous l'effet de pesticides (Teisseire et Vernet, 2000).

Cependant, on ne peut pas exclure qu'une diminution de la phase JI soit aussi le résultat d'une inhibition de transport d'électrons du côté donneur du PSII qui a pour effet d'augmenter le P680⁺ qui affaiblit la fluorescence (Neubauer et Schreiber, 1987 ; Govindjee, 1995)

Les quinolones comme la cipro sont aussi connues pour favoriser la formation de EAO selon un processus impliquant le cytochrome P450 (Arriaga-Alba *et al.*, 2000). Nie *et al.* (2008) ont montré chez l'algue *Chlorella vulgaris* que 96h d'exposition à 12.5 mg/L de cipro stimulait l'activité d'enzymes anti-oxydantes comme la catalase et la glutathion-S-transferase qui augmentent respectivement 8.2 et 1.4 fois.

Alors, il est possible que des différences dans le métabolisme de détoxification chez les deux espèces soient responsables de la variation de sensibilité de la photosynthèse et des paramètres biochimiques aux PPHB (Pinto *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2008; Pospisii, 2012) et des études sur ce point viendraient compléter nos résultats. On notera que le NADPH est une source majeure utilisée dans les mécanismes de protection du stress oxydatif (Martin *et al.*, 1996; Catala *et al.*, 1997; Casano *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 1999) et qu'il est aussi impliqué dans la réduction non-photochimique des plastoquinones via le complexe Ndh (Cuello *et al.*, 1995; Burrows *et al.*, 1998; Corneille *et al.*, 1998; Feild *et al.*, 1998 ; Mus *et al.*, 2005). Ainsi, la diminution du NADPH dans la cellule associée au rôle antioxydant que

peuvent jouer les plastoquinones (Nowicka et Kruk, 2012) peuvent venir expliquer la diminution de la réduction de PQ caractérisée par l'augmentation de l'aire sous la courbe de la phase JI.

Si le SMX induit seulement de faibles arrangements de la taille des antennes et de l'activité de piégeage d'électrons des centres réactionnels chez *C. reinhardtii*, au contraire, chez *F. crotonensis*, il y a une diminution importante du transport d'électrons. Cette limitation s'explique par une inhibition du piégeage d'électrons (TR_0/RC) et une réduction du transport linéaire d'électrons entre PSII (Q_A-Q_B) et le pool de plastoquinone. L'effet du cipro est différent du SMX car chez *C. reinhardtii* on peut voir une petite activation de la proportion de photons utilisés pour la réduction de Q_A (TR_0/RC) qui peut résulter d'une diminution des centres réactionnels actifs d'une transition d'état vers le PSI. Chez *F. crotonensis*, la diminution du ET_0/RC n'est pas le résultat d'une diminution du piégeage d'électrons (TR_0/RC) comme pour le SMX mais de la réduction de la capacité de transport d'électrons (ET_0/TR_0). C'est en amont du piégeage d'électrons que la cipro interagit avec une phéophytine de type quinone du PSII selon Aristilde *et al.* (2010) ce qui a pour effet d'inhiber l'activité catalytique du PSII.

Nos résultats ont montré que les effets des pharmaceutiques induisaient une forte limitation de la réduction de PQ selon une intensité croissante $CBZ < SMX < cipro$ et particulièrement chez *F. crotonensis*, contrairement à *C. reinhardtii* qui est moins sensible. Nous nous sommes alors interrogés sur les différences des processus de réoxydation du pool de PQ chez ces deux espèces.

Nous nous sommes intéressés plus spécifiquement sur les interactions entre les voies alternatives d'électrons et le niveau de réduction du côté donneur du PSI, pour expliquer ces différences dans les paramètres photosynthétiques au noir de ces deux espèces.

La réoxydation du pool de PQ peut se faire par une oxydase terminale chloroplastique (PTOX) chez *C. reinhardtii* conduisant les électrons à l'O₂ comme accepteur final d'électrons (pour une revue voir (Rumeau *et al.*, 2007)), ou bien le pool de PQ peut être préférentiellement réoxydé par le cyt/b6f comme chez *C. meneghiniana* (Grouneva *et al.*, 2009). Ces différentes voies auraient alors des effets différents sur le gradient de pH et le niveau de réduction du PSI en détournant les électrons, puis en modifiant l'activité PSI lors de la transition de lumière.

Nous avons d'ailleurs relevé que chez *F. crotonensis*, en présence de NH₄Cl, un protonophore qui abolit le gradient de protons au niveau de la membrane, il y avait une augmentation de la fluorescence de la phase IP. Or cet usage du NH₄Cl vient diminuer la pente après le maximum de fluorescence (phase P) chez *F. crotonensis* mais pas chez *C. reinhardtii* (Figure 5.1). Ces résultats indiquent qu'un gradient de pH lié au NPQ est présent dans le noir chez *F. crotonensis*, comme cela a été démontré chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* (Antal *et al.*, 2009), et que ce gradient de pH influence le transport d'électrons entre PSII et PSI suite à un flash saturant chez *F. crotonensis* mais pas chez *C. reinhardtii*. Or l'activité chlororespiratoire au noir en plus de réoxyder le pool de PQ est aussi reconnue pour être électrogénique (Joet *et al.*, 2002). Ainsi, nous nous sommes intéressés à la différence des processus de réduction de PQ sur le niveau de la réduction du côté donneur du PSI selon les deux espèces de phytoplancton. Nous avons alors exploré comment des voies alternatives du transport d'électrons peuvent influencer le niveau de réduction du PSI chez *C. reinhardtii* et *F. crotonensis*.

En utilisant une combinaison d'inhibiteurs spécifiques de PTOX et en étudiant les limitations du côté donneur et accepteur au niveau du PSI nous avons montré que la réoxydation du pool de PQ par PTOX n'est pas significative chez *F. crotonensis* contrairement à ce qui a été observé chez *C. reinhardtii*. Ces résultats ont été confirmés par la mesure de la production d'O₂ et l'absence d'activité de l'oxydase

chloroplastique. De plus, l'absence de réoxydation par PTOX chez *F. crotonensis* mène à un haut niveau de réduction du pool de PQ. Nous avons démontré qu'un gradient de pH était formé au noir chez *F. crotonensis* ce qui suggère une activité électrogenique de la NAD(P)H déshydrogénase. Une déshydrogénase de ce type a été observée chez les plantes supérieures (Sazanov *et al.*, 1998), et nous proposons que chez *F. crotonensis* la NAD(P)H déshydrogénase de type I est active et génère un gradient de protons tandis que l'activité de PTOX n'est pas significative. Nous avons proposé un modèle représentant les interactions entre le transport alternatif d'électrons et l'état redox du PSI pour *F. crotonensis*.

De plus, on peut envisager l'implication du cytb559 dans l'oxydation de PQH₂. En effet, il est localisé au voisinage du PSII, et il a été montré qu'un mutant pour le cyt b559 montre une sur-réduction du PQ pool dans le noir sur des plants de tabac (Bondarava *et al.*, 2003) et son implication dans l'oxydation de PQH₂ a été démontrée *in vitro* (Kruk et Strzalka, 2001). Par ailleurs, dans la mesure où, le gradient de pH joue un rôle important dans la régulation du cycle des xanthophylles, et que ceux-ci ont une part importante dans le quenching non-photochimique (Lavaud *et al.*, 2003; Lavaud et Kroth, 2006), il sera intéressant de doser les xanthophylles dans des études ultérieures.

La localisation de PTOX reste à préciser, cependant il est intéressant de noter que de récents travaux montrent qu'il existe chez *C. reinhardtii* un gène codant pour une oxydase chloroplastique de type 2, et que PTOX2, avec une activité enzymatique similaire à PTOX, joue un rôle prédominant au sein du métabolisme chlororespiratoire chez *Chlamydomonas* (Houille-Vernes *et al.*, 2011). Ces travaux suggèrent alors la localisation de PTOX2 au sein de la membrane thylacoïdale de *C. reinhardtii* à proximité des centres du PSII basés entre autre sur la localisation de l'activité réductrice de Nda2 observée par des mesures de fluorescence (Houyoux *et al.*, 2011).

D'autres études ont cherché à démontrer l'influence de l'état redox du NADP⁺ sur l'activité de PTOX et réciproquement, ainsi que sur le contrôle de l'équilibre redox du stroma, suite à une période d'obscurité ou non (Trouillard *et al.*, 2012). Aussi, Alric, *et al.* (2010) et Joliot et Johnson (2011) soutiennent un modèle selon lequel l'état redox du pool des accepteurs d'électrons et plus spécifiquement du NADP⁺ est déterminant pour réguler le rapport entre le transfert cyclique et le transport linéaire d'électrons (Alric *et al.*, 2010; Joliot & Johnson, 2011).

Pour aller plus loin dans l'étude de la fonction chlororespiratoire, il serait intéressant de posséder des mutants de *F. crotonensis* pour PTOX et de les comparer aux mutants, PTOX1 et nouvellement PTOX2 chez *C. reinhardtii* (Houille-Vernes *et al.*, 2011). D'une part, cela constituerait une avancée majeure dans l'étude de ce mécanisme chez les algues vertes et les diatomées. D'autre part, cela éclairerait sur les différences entre les algues vertes et les diatomées et permettrait de les comparer avec les résultats déjà existants chez les plantes supérieures. L'ordre de grandeur des flux chlororespiratoires indique que ce mécanisme aussi est plus prononcé chez les algues que chez les plantes terrestres (Houille-Vernes *et al.*, 2011).

Dans les milieux aquatiques, certains polluants sont susceptibles de s'accumuler dans les organismes à des concentrations très supérieures à celles présentes dans l'eau et cela peut se traduire par une contamination des réseaux trophiques. Dans la dernière partie de mon projet de recherche, nous avons cherché à établir des données sur la toxicité de la CBZ et étudié le transfert de toxicité de la CBZ au travers d'une chaîne trophique expérimentale. La structure de la chaîne trophique a été envisagée comme une succession de compartiments biologiques capables d'ingérer la CBZ par voie trophique. L'élaboration d'un réseau trophique plus complexe n'était pas souhaitable dans le cadre de notre hypothèse de départ : la CBZ peut-elle se bioaccumuler au sein de microorganismes d'eau douce ? Si oui induit-elle une toxicité ?

Nous avons réussi à mettre en place une chaîne trophique fonctionnelle dans laquelle les conditions de la prédation sont respectées. Concernant le choix de nos organismes cibles, nous avons choisi le crustacé *T. platyurus* car c'est un organisme particulièrement utilisé pour l'évaluation de la toxicité aiguë de contaminants dans les écosystèmes d'eau douce. Nous avons choisi cette espèce du fait de sa sensibilité, sa facilité d'élevage, son cycle de vie qui permet d'effectuer un test de 24h et son rôle clé dans la chaîne trophique. En effet, il était particulièrement adapté en raison de sa capacité à ingérer des algues vertes, *P. subcapitata* et d'être apprécié comme nourriture en nombre significativement important par *H. attenuata*. Ce micro-invertébré d'eau douce, quant à lui, était intéressant car c'est un organisme test utilisé dans un bioessai conçu pour détecter le potentiel tératogénique des substances chimiques. Il est souvent utilisé pour évaluer le potentiel toxique des échantillons environnementaux (Blaise et Kusui, 1997; Quinn *et al.*, 2008). Dans la mise en place de la chaîne expérimentale, l'algue verte *P. subcapitata* (anc. *Selenastrum capricornutum*), a été choisie du fait de sa petite taille (en moyenne 5-6 μm), qui permet d'alimenter *T. platyurus* mais aussi car elle a été souvent utilisée pour réaliser des biotests de toxicité (Blaise, 1986; Juneau *et al.*, 2002; Ralph *et al.*, 2007). Ces algues existent sous forme de kit (AlgaltoxkitSelenastrum Microbiotests inc.) incluses dans des billes, ce qui s'adaptait à notre projet de chaîne trophique expérimentale facilement reproductible.

Nous avons montré, pour la première fois, que la CBZ se bioconcentrait avec un facteur de bioconcentration de 2,2 dans le premier maillon de la chaîne en tenant compte de la concentration de CBZ dans les cellules et dans le milieu ainsi que du biovolume des cellules ($74,3\mu\text{m}^3$). Ce facteur est multiplié par 6 et augmente à 12,6 chez *T. platyurus* (128,6 mg/g biomasse) suite à la prédation de *P. subcapitata* (321,7 $\mu\text{g/mL}$) après seulement 24h d'exposition. Les facteurs de bioconcentration dépendent de la lipophilicité et l'état d'ionisation du composé (Voutsas *et al.*, 2002 ; Delepee *et al.*, 2004). Ainsi dans les microalgues *Isochrysis galbana*, après 2h

d'exposition au nonylphénol, on trouve un facteur de bioconcentration de 6940 (Correa-Reyes *et al.*, 2007) tandis que chez les Bryophytes, ils vont être d'un ordre de grandeur en dessous, après 10 jours d'exposition à l'acide oxolonique (250-450), de flumequine (75-140) et oxytétracycline (100-200) (Delepee *et al.*, 2004).

H. attenuata après 6h de prédation et s'étant nourrie en moyenne de 7 crustacés, présentaient une concentration négligeable de CBZ puisque le niveau de CBZ relevé pour 45 Hydres était compris entre 0.2-0.6ng soit entre la limite de détection et quantification. Ceci indiquait soit une faible accumulation de la CBZ soit une forte activité de détoxification comme l'indiquent une élévation de 70% de l'hème oxydase et une très forte activation du CYP450 3A4-like. Ces résultats révèlent aussi la sensibilité des tests enzymatiques.

L'originalité de notre travail a reposé aussi sur l'utilisation de biomarqueurs chez *T. platyurus* alors que seuls des tests de mortalité étaient réalisés sur cet organisme (Blaise, 2000 ; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006). Ainsi, nous avons montré que chez *T. platyurus* la CBZ pouvait altérer l'activité enzymatique du CYP450 3A4-like tout en stimulant l'activité de l'hème oxydase globale (HO) (76%) et de la glutathion S-transferase (GR) (130%). Au contraire chez *H. attenuata*, l'activité enzymatique du CYP450 3A4-like est augmentée en accord avec une étude précédente sur les hydres exposées à la CBZ par le milieu de culture (Quinn *et al.*, 2004). On a suggéré que l'induction très forte de l'enzyme de biotransformation de phase I serait liée à l'atténuation de l'activité de glutathion-S-transferase. Dans les deux espèces, la diminution de la peroxydation des lipides est un indicateur de l'activité redox de la CBZ, possiblement en diminuant l'activité de la cytosolique phospholipase A₂ (Ghelardoni *et al.*, 2004 ; Bazinet *et al.*, 2006) présente chez Hydra (Borelli *et al.*, 1995) et chez les crustacés (Rivera *et al.*, 30-SEP-1999).

Notre méthodologie de détection de la CBZ par chromatographie en phase liquide

couplée à la spectrométrie de masse était la première à doser la CBZ à un niveau aussi faible que le microgramme pour *T. platyurus* et le nanogramme pour *P. subcapitata* et a donné lieu à une publication (Lajeunesse, Vernouillet, *et al.* 2010, Cf Appendice 1). Nous aurions voulu ajouter le dosage du milieu de culture contaminé pour affirmer un facteur de bioaccumulation entre le milieu et les organismes. Cependant la disponibilité du matériel lors de cette collaboration était à durée définie.

Pour l'étude de la bioaccumulation et des effets biologiques de la CBZ chez des organismes aquatiques, nous avons choisi une concentration élevée de CBZ (150 mg/L). Si cette concentration ne se retrouve pas dans l'environnement (Fent *et al.*, 2006), l'objectif était de tester le potentiel de bioaccumulation de la CBZ à travers une contamination par l'alimentation chez des organismes aquatiques. Dans notre hypothèse de travail, nous avons considéré la capacité de bioaccumulation de la CBZ sur une courte durée pour une concentration élevée comme cela se fait lors de tests de toxicité aiguë. Les tests de toxicité aiguë (court temps d'exposition, forte concentration) constituent une étape préliminaire aux études de toxicité chronique (long temps d'exposition, faible concentration). Des tests chroniques vont nécessiter une exposition relative au cycle de génération de l'espèce. L'intérêt des tests de toxicité aiguë est d'orienter la préparation des protocoles et de fournir des données utiles à l'usage en toxicité chronique. Les tests de toxicité aiguë sont réalisés sur une durée très courte relativement au temps de génération de l'organisme. Ils présentent l'avantage d'être rapide et de faible coût, mais ne permettent pas de mettre en évidence des effets à long terme d'un polluant comme sur la reproduction par exemple.

En outre, les interférences de polluants ne doivent pas être négligées car elles peuvent entraîner des modifications physiologiques responsables de variations dans les phénomènes de bioaccumulation. Par exemple, pour la bioaccumulation il y a un effet synergique du cuivre et du cadmium alors que la bioaccumulation du métoxichlore

est diminuée par effet antagoniste du DDT et de la dieldrine (Takakura, et al. 2013). C'est pourquoi l'effet synergique de la CBZ avec d'autres pharmaceutiques ou polluants doit être étudié.

De plus, pour amener à une estimation améliorée des niveaux environnementaux, des tests de dégradabilité associés à des données physicochimiques et de distribution sont nécessaires pour étudier le devenir des polluants. C'est l'analyse de l'ensemble des données qui permettra de fournir des outils de décision d'utilisation de ces composés avec surveillance ou non.

Pour autant, il reste important d'évaluer le transfert de toxicité sur les microorganismes à différentes concentrations. De plus, les faibles doses des PPHB trouvées dans l'environnement sont constantes et peuvent avoir un effet cumulatif, sans compter que des expositions en continu peuvent avoir des effets transgénérationnels, un aspect que la toxicologie classique ne quantifie pas facilement.

Notre chaîne trophique expérimentale est un outil de première évaluation qui permet d'estimer la bioaccumulation d'un polluant. Il pourra être amélioré en augmentant le nombre d'espèces et le nombre de tests. Les étapes suivantes de ce projet, maintenant que la chaîne trophique, les tests enzymatiques, la méthodologie de détection de la CBZ sont en place seraient de :

- Baisser les concentrations de départ et voir selon ces conditions expérimentales à quelle concentration minimale la toxicité de la CBZ peut être transférée d'un organisme à l'autre.
- Développer et automatiser d'autres tests enzymatiques pour améliorer la compréhension du processus de toxicité d'un contaminant comme des tests de fluorescence sur le premier maillon.
- Evaluer la toxicité de contaminants de différentes familles chimiques afin

d'élargir le panel de contaminants évalués, l'interaction entre les micropolluants, et aussi la biodégradabilité des composés.

L'intérêt de cette chaîne trophique expérimentale est que nous avons réalisé un outil facile à la mise en place, qui ne nécessite pas une infrastructure spécifique lourde pour maintenir les organismes cibles en vie, qui permet d'avoir des informations biochimiques et physiologique diversifiées, et enfin qui permet d'obtenir en quelques jours des données sur la toxicité d'un contaminant.

CONCLUSION

Nos résultats montrent que différents biomarqueurs biochimiques sont sensibles à la toxicité induite par le transfert trophique de la CBZ. En effet, nous avons montré qu'il y avait un impact sur les activités des enzymes de biotransformation et la peroxydation des lipides dans les trois organismes étudiés après une exposition directe (*Pseudokirchneriella subcapitata*) ou après l'ingestion de nourriture contaminée (*Thamnocephallus platyurus* et *Hydra attenuata*). Dans ce travail, nous avons donc démontré l'importance de l'usage de biomarqueurs multiparamétriques et d'une chaîne trophique expérimentale pour évaluer le transfert de toxicité de la CBZ. La mise au point et la validation d'outils et de modèles écotoxicologiques d'évaluation des effets de contaminants aquatiques contribue à résoudre les questions de prédiction des effets, et à collaborer avec la communauté scientifique et les instances de réglementation. Nous avons également mis en évidence des différences dans les processus photosynthétiques chez le phytoplancton d'eau douce face à la toxicité des PPHB par l'étude de la dissipation non-photochimique. Nous avons comparé les variations de la réoxydation du pool de plastoquinones par les PPHB. Cette partie du projet met en évidence un aspect physiologique de la toxicité des PPHB sur les processus photosynthétiques et vient compléter l'approche biochimique du premier volet. Nous avons enfin déterminé comment les voies alternatives d'électrons peuvent avoir un effet sur le niveau de réduction du côté donneur du PSI en abolissant le quenching non-photochimique dépendant du pH. Nous avons donc étudié l'effet sur le PSI du niveau d'oxydation du pool de PQ. Les électrons peuvent soit être dirigés vers le cytb6/f, soit vers une oxydase chloroplastique (PTOX). Ces deux voies différentes de détournement des électrons ont des effets différents sur le

niveau de réduction du PSI, et modifient l'activité PSI au noir. Dans ce contexte, nous avons montré comment une activité de chlororespiration *via* PTOX (ou son absence) peut influencer le niveau de réduction PSI sous l'effet de différents inhibiteurs. Le système *in vivo* étant complexe, nos résultats doivent être approfondis pour une meilleure compréhension. Cependant, les différences de processus de réoxydation de PQ au noir chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Fragilaria crotonensis* ont été démontrées. Ces résultats contribuent à ouvrir la voie pour une meilleure compréhension sur le rôle majeur du NADPH dans les interactions entre les chaînes de transport d'électrons photosynthétiques et respiratoires.

REFERENCES

- Adl, S. M., A. G. Simpson, et al. (2005). "*The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.*" *J Eukaryot Microbiol* 52(5): 399-451.
- Ahel, M., J. McEvoy, et al. (1993). "*Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms.*" *Environ Pollut* 79(3): 243-248.
- Al-Ahmad, A., F. D. Daschner and K. Klummerer (1999). "*Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria.*" *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 158-163.
- Allakhverdiev, S. I., Y. Nishiyama, et al. (2005). "*Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in synechocystis.*" *Plant Physiology* 137(1): 263-273.
- Alric, J. (2010). "*Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae.*" *Photosynthesis Research* 106(1-2): 47-56.
- Ambrosio, A. F., P. Soares-Da-Silva, et al. (2002). "*Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024.*" *Neurochem Res* 27(1-2): 121-130.
- Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, et al. (1987). "*Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms.*" *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 106: 73-89.

- Andreozzi, R., R. Marotta, et al. (2002). "*Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity.*" *Water Res* 36(11): 2869-2877.
- Antal, T. K., D. N. Matorin, et al. (2009). "*Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer.*" *Photosynth Res* 102(1): 67-76.
- Applebaum, P. and P. Hunter (2000). "*The fluoroquinolone antibacterial: Past, present and future perspectives.*" *International Journal of Antimicrobial Agents* 16: 5-15.
- Aristilde, L., A. Melis, et al. (2010). "*Inhibition of Photosynthesis by a Fluoroquinolone Antibiotic.*" *Environ. Sci. Technol.* 44: 1444-1450
- Arnon, D. (1955). "*Conversion of light into chemical energy in photosynthesis.*" *Nature* 184 10-21.
- Arnon, D. I. and R. K. Chain (1975). "*Regulation of ferredoxin-catalyzed photosynthetic phosphorylations.*" *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4961-4965.
- Arriaga-Alba, M., R. Rivera-Sánchez, et al. (2000). "*Antimutagenesis of beta-carotene to mutations induced by quinolone on Salmonella typhimurium.*" *Arch Med Res.* 31(2): 156-161.
- Asada, K. (1999). *The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons.*
- Asada, K., K. Kiso, et al. (1974). "*Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination.*" *J Biol Chem* 249(7): 2175-2181.
- Azmitia, E. C. (1999). "*Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue.*" *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl): 33S-45S.
- Badger, M. R. (1985). "*Photosynthetic oxygen exchange.*" *Annu Rev Plant Physiol* 36: 27-53.

- Bagchi, D., J. Balmoori, et al. (2002). "Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice." *Toxicology* 175(1-3): 73-82.
- Bailey, S., A. Melis, et al. (2008). "Alternative photosynthetic electron flow to oxygen in marine *Synechococcus*." *Biochim Biophys Acta* 1777(3): 269-276.
- Bailey, S., N. H. Mann, et al. (2005). "The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in cyanobacteria." *FEBS Letters* 579: 275-280.
- Bazinet, R. P., J. S. Rao, et al. (2006). "Chronic carbamazepine decreases the incorporation rate and turnover of arachidonic acid but not docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat: relevance to bipolar disorder." *Biol Psychiatry* 59(5): 401-407.
- Bendz, D., N. A. Paxous, et al. (2005). "Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden." *Journal of Hazardous Materials* 122(3): 195-204.
- Bennoun, P. (1982). "Evidence for a respiratory chain in the chloroplast." *EProc Natl Acad Sci USA* 79: 4352-4356.
- Bennoun, P. (2001). "Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis." *Biochim Biophys Acta* 1506(2): 133-142.
- Bergmann, T., T. L. Richardson, H. W. Paerl, J. L. Pinckney and O. Schofield (2002). "Synergy of light and nutrients on the photosynthetic efficiency of phytoplankton populations from the Neuse River Estuary, North Carolina." *Journal of Plankton Research* 24(9): 923-933.
- Berkemeyer, M., R. Scheibe and O. Ocheretina (1998). "A Novel, Non-redox-regulated NAD-dependent Malate Dehydrogenase from Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*." *Journal of Biological Chemistry* 273: 27927-27933.
- Bertschy, G., C. Bryois, et al. (1997). "The association carbamazepine-mianserin in opiate withdrawal: a double blind pilot study versus clonidine." *Pharmacol Res* 35(5): 451-456.

- Blaise, C. (1986). "*Micromethod for acute aquatic toxicity assessment using the green alga Selenastrum capricornutum.*" *Toxicity Assessment* 1: 377-385.
- Blaise, C. (2000). "*Canadian Application of Microbiotests to assess the Toxic Potential of Complex Liquid and Solid Media.*" *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring* 1: 3-12.
- Blaise, C. (2006/07/04). "*Des traces de médicaments détectés dans le fleuve.*" *Le Soleil*.
- Blaise, C. and T. Kusui (1997). "*Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based Hydra attenuata assay.*" *Environmental Toxicology and Water Quality* 12(1): 53-60.
- Bohme, H. and K. J. Kunert (1980). "*Photoreactions of cytochromes in algal chloroplasts.*" *Eur J Biochem* 106(1): 329-336.
- Bonaventura, C. and J. Myers (1969). "*Fluorescence and oxygen evolution from Chlorella pyrenoidosa.*" *BBA - Bioenergetics* 189(3): 366-383.
- Bondarava, N., L. De Pascalis, et al. (2003). "*Evidence that cytochrome b559 mediates the oxidation of reduced plastoquinone in the dark.*" *Journal of Biological Chemistry* 278(15): 13554-13560.
- Borelli, L., V. Carginale, et al. (1995). "*Phospholipase A 2 and protein kinase C enzymatic activities and their interactions in Hydra vulgaris.*" *Comp. Biochem. Physiol* 111(2): 211-219.
- Bouges Bocquet, B. (1973). "*Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts.*" *Biochimica et Biophysica Acta* 314(2): 250-256.
- Bound, J. P. and N. Voulvoulis (2006). "*Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: implications for risk assessment.*" *Water Res* 40(15): 2885-2892.
- Boxall, A. B. A., L. A. Fogg, et al. (2004). "*Veterinary medicines in the environment.*" *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180: 1-91.

- Brain, R. A., D. J. Johnson, et al. (2004). "*Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes Lemna gibba and Myriophyllum sibiricum.*" *Aquat Toxicol* 70(1): 23-40.
- Brain, R. A., M. L. Hanson, et al. (2008). "*Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks.*" *Rev Environ Contam Toxicol* 192: 67-115.
- Brain, R., A. Ramirez, et al. (2008). "*Herbicidal effects of sulfamethoxazole in Lemna gibba: using p-aminobenzoic acid as a biomarker of effect.*" *Environ Sci Technol*. 42(23): 8965-8970.
- Brown, K. D., J. Kulis, et al. (2006). "*Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico.*" *Science of the Total Environment* 366(2-3): 772-783.
- Brunet, C., R. Casotti, et al. (2006). "*Picophytoplankton diversity and photoacclimation in the Strait of Sicily (Mediterranean Sea) in summer. I. Mesoscale variations.*" *Aquatic Microbial Ecology* 44(2): 127-141.
- Brunet, C., R. Casotti, et al. (2007). "*Vertical variability and diel dynamics of picophytoplankton in the Strait of Sicily, Mediterranean Sea, in summer.*" *Marine Ecology Progress Series* 346: 15-26.
- Bulte, L., P. Gans, et al. (1990). "*ATP control on state transitions in vivo in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1020(1): 72-80.
- Burrows, P. A., L. A. Sazanov, et al. (1998). "*Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid ndh genes.*" *EMBO Journal* 17(4): 868-876.
- Calamari, D., E. Zucatto, et al. (2003). "*Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy.*" *Environmental Science & Technology* vol. 37(7): 1241-1248.
- Campoli-Richards, D. M., J. P. Monk, et al. (1988). "*Ciprofloxacin. A review of its anti-bacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use.*" *Drugs* 35: 373-447.

- Canaani, O. (1990). "The role of cyclic electron flow around Photosystem I and excitation energy distribution between the photosystems upon acclimation to high ionic stress in *Dunaliella salina*." *Photochemistry and Photobiology* 52: 591-599.
- Cardol, P., B. Bailleul, et al. (2008). "An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(22): 7881-7886.
- Cardol, P., G. Forti, et al. (2011). "Regulation of electron transport in microalgae." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807(8): 912-918.
- Caron, L., C. Berkaloff, et al. (1987). "Chlorophyll fluorescence transients from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: relative rates of cyclic phosphorylation and chlororespiration." *Photosynthesis Research* 11: 131-139.
- Casano, L. M., M. Martin, et al. (1999). "Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress." *Plant Science* 149(1): 13-22.
- Catala, R., B. Sabater, et al. (1997). "Expression of the plastid *ndhF* gene product in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of developing Barley seedlings." *Plant and Cell Physiology* 38(12): 1382-1388.
- Chen, M., K. Ohman, et al. (2006). "Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada." *Water Quality Research Journal of Canada* 41(4): 351-364.
- Choi, K., Y. Kim, et al. (2008). "Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea." *Science of the Total Environment* 405(1-3): 120-128.
- Cillard, J. and P. Cillard (2006). "Lipid peroxidation biomarkers." *Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations*. 13(1): 24-29.
- Clara, M., B. Strenn, et al. (2004). "Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration." *Water Res* 38(4): 947-954.

- Cleland, R. E. and D. S. Bendall (1992). "*Photosystem I cyclic electron transport: Measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity.*" *Photosynthesis Research* 34(3): 409-418.
- Cleuvers, M. (2003). "*Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects.*" *Toxicol Lett* 142(3): 185-194.
- Corneille, S., L. Cournac; et al. (1998). "*Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NADPH in higher plant chloroplasts characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity.*" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1363(1): 59-69.
- Correa-Reyes, G., M. T. Viana, et al. (2007). "*Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain.*" *Chemosphere* 68(4): 662-670.
- Cournac, L. (2002). "*In Vivo Interactions between Photosynthesis, Mitorespiration, and Chlororespiration in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Plant Physiol* 129.
- Cournac, L., È.-M. Josse, et al. (2000). "*Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration.*" *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 355: 1447-1454.
- Cournac, L., G. Latouche, et al. (2002). "*In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Plant Physiology* 129: 1921-1928.
- Cournac, L., K. Redding, et al. (2000). "*Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration.*" *J Biol Chem* 275(23): 17256-17262.
- Cuello, J., M. J. Quiles, et al. (1995). "*Properties of a large complex with NADH dehydrogenase activity from barley thylakoids.*" *Plant and Cell Physiology* 36(2): 265-271.
- DalCorso, G., P. Pesaresi, et al. (2008). "*A Complex Containing PGRL1 and PGR5 Is Involved in the Switch between Linear and ∇ Cyclic Electron Flow in Arabidopsis.*" *Cell* 132(2): 273-285.

- Daughton, C. G. and T. A. Ternes (1999). "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?" *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6: 907-938.
- Day, D. A. and J. T. Wiskich (1995). "Regulation of alternative oxidase activity in higher plants." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27(4): 379-385.
- Deblois, C. P. and P. Juneau (2012). "Comparison of resistance to light stress in toxic and non-toxic strains of *microcystis aeruginosa* (cyanophyta)." *Journal of Phycology* 48(4): 1002-1011.
- Delepee, R., H. Pouliquen, et al. (2004). "The bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. bioaccumulates oxytetracycline, flumequine and oxolinic acid in the freshwater environment." *Sci Total Environ* 322(1-3): 243-253.
- Desplats, C., F. Mus, et al. (2009). "Characterization of *Nda2*, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *chlamydomonas chloroplasts*." *J Biol Chem* 284(7): 4148-4157.
- Dimier, C., F. Corato, et al. (2007). "Photoprotection and xanthophyll-cycle activity in three marine diatoms." *Journal of Phycology* 43(5): 937-947.
- Diner, B. A. and G. T. Babcock (1996). *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. D. R. Ort, and Yocum, C. F, eds pp, Kluwer, Dordrecht: 213-247.
- Douce, R. and M. Neuburger (1989). "The uniqueness of plant mitochondria." *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 371-414.
- Dry, I. B. and J. T. Wiskich (1987). "2-oxoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase activities in plant mitochondria: Interaction via a common coenzyme A pool." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 257(1): 92-99.
- Eguchi, K., H. Nagase, et al. (2004). "Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae." *Chemosphere* 57(11): 1733-1738.
- Eisenstadt, D., I. Ohad, et al. (2008). "Changes in the photosynthetic reaction centre II in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* result in non-photochemical fluorescence quenching." *Environ Microbiol* 10(8): 1997-2007.

- Ekelund, N. G. (2000). "Interactions between photosynthesis and 'light-enhanced dark respiration' (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after irradiation with ultraviolet radiation." *J Photochem Photobiol B* 55(1): 63-69.
- El Jay, A., J.-M. Ducruet, et al. (1997). "A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: Comparison with effect on cell growth." *Archives in Hydrobiology* 140(2): 273-286.
- Emmerson, A. M. and A. M. Jones (2003). "The quinolones: Decades of development and use. ." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(Suppl S1): 13-20.
- Endo, T., T. Shikanai, et al. (1999). "The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection." *FEBS Letters* 457(1): 5-8.
- Endo, T., H. Mi, et al. (1997). "Donation of Electrons to Plastoquinone by NAD(P)H Dehydrogenase and by Ferredoxin-Quinone Reductase in Spinach Chloroplasts." *Plant and Cell Physiology* 38(11): 1272-1277.
- Endo, T., U. Schreiber, et al. (1995). "Suppression of quantum yield of Photosystem II by hyperosmotic stress in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant and Cell Physiology* 36(7): 1253-1258.
- EnvironmentAgency. (2003). "Position statement: Human Pharmaceuticals and their Impact on the Aquatic Environment." Bristol, UK: Environment Agency of England and Wales Final draft 11 August.
- Ercal, N., H. Gurer-Orhan, et al. (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage." *Curr Top Med Chem* 1(6): 529-539.
- Escher, B. I., N. Bramaz, et al. (2005). "In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life." *Environmental Science and Technology* 39(9): 3090-3100.
- Falkowski, P. G., R. T. Barber, et al. (1998). "Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production." *Science* 281(5374): 200-206.

- Falkowski, P. G. and T. G. Owens (1980). "*Light-shade adaptation: Two strategies in marine phytoplankton.*" *Plant Physiology* 66: 592-595.
- Farineau, J. (1990). "*Photochemical alterations of Photosystem II induced by two different photoinhibitory treatments in isolated chloroplasts of pea. A thermoluminescence study.*" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1016(3): 357-363.
- Farre, M. L., I. Ferrer, et al. (2001). "*Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with Vibrio fischeri.*" *J Chromatogr A* 938(1-2): 187-197.
- Feild, T. S., L. Nedbal, et al. (1998). "*Nonphotochemical Reduction of the Plastoquinone Pool in Sunflower Leaves Originates from Chlororespiration.*" *Plant Physiology* 116(4): 1209-1218.
- Ferrari, B., Mons R., et al. (2004). "*Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment ?*" *Environ Toxicol Chem* 23(5): 1344-1354.
- Ferrari, B., N. Paxeus, et al. (2003). "*Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac.*" *Ecotoxicol Environ Saf* 55(3): 359-370.
- Finazzi, G., A. Furia, et al. (1999). "*State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in Chlamydomonas reinhardtii.*" *Biochim Biophys Acta* 1413(3): 117-129.
- Force, L., C. Critchley, et al. (2003). "*New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test.*" *Photosynthesis Research* 78: 17-33.
- Foyer, C. H. and G. Noctor (2005). "*Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses.*" *Plant Cell* 17(7): 1866-1875.
- Foyer, C. H. and G. Noctor (2011). "*Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub.*" *Plant Physiol* 155(1): 2-18.

- Foyer, C. H., H. Lopez-Delgado, et al. (1997). "Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling." *Physiol. Plant.* 100(241).
- Frank, H. A., A. Cua, et al. (1996). "The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: the role of these molecules in excess energy dissipation in algae." *Biochim Biophys Acta* 1277(3): 243-252.
- Frankart, C., P. Eullaffroy, et al. (2003). "Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*." *Environmental and Experimental Botany* 49: 159-168.
- Fufezan, C., C. M. Gross, et al. (2007). "Influence of the redox potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II." *Journal of Biological Chemistry* 282(17): 12492-12502.
- Gagne, F., C. Blaise, et al. (2006). "Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes." *Ecotoxicol Environ Saf* 64(3): 329-336.
- Gans, P. and F. Rebeille (1990). "Control in the dark of the plastoquinone redox state by mitochondrial activity in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1015(1): 150-155.
- Geider, R. J., H. L. MacIntyre, et al. (1997). "Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: Responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a:carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature." *Marine Ecology Progress Series* 148(1-3): 187-200.
- Geoffroy, L., M. Couderchet, et al. (2001). «Effet du diuron, de l'oxyfluorène et du cuivre sur l'activité catalasique de *Scenedesmus obliquus*.» Produits phytosanitaires. Analyse, résidus, métabolites, écotoxicologie, modes d'action, transfert ... M. Couderchet, P. Eullaffroy and G. Vernet. Reims, France, Presses Universitaires de Reims: 157-166.
- Gerloff-Elias, A., E. Spijkerman, et al. (2005). "Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas*

- acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6)." *Plant, Cell and Environment* 28(10): 1218-1229.
- Ghelardoni, S., Y. A. Tomita, et al. (2004). "Chronic carbamazepine selectively downregulates cytosolic phospholipase A2 expression and cyclooxygenase activity in rat brain." *Biol Psychiatry* 56(4): 248-254.
- Gimmler, H. (2001). *Acidophilic and acidotolerant algae. Algal Adaptation to Environmental Stresses Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. L. C. R. J. P. Gaur, Springer Press, Heidelberg, Germany.: 259-290.
- Godde, D. and A. Trebst (1980). "NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Archives of Microbiology* 127(3): 245-252.
- Gomez, M. J., M. J. Martinez Bueno, et al. (2007). "Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast." *Chemosphere* 66(6): 993-1002.
- Goss, R. and G. Garab (2001). "Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching and structural rearrangements induced by low pH in intact cells of *Chlorella fusca* (Chlorophyceae) and *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae)." *Photosynthesis Research* 67(3): 185-197.
- Goss, R. and T. Jakob (2010). "Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae." *Photosynth Res* 106(1-2): 103-122.
- Goss, R., B. Lepetit, et al. (2006). "Evidence for a rebinding of antheraxanthin to the light-harvesting complex during the epoxidation reaction of the violaxanthin cycle." *J Plant Physiol* 163(5): 585-590.
- Goussias, C., A. Boussac, et al. (2002). "Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: An overview." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357(1426): 1369-1381.
- Govindjee (1995). "Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence." *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 131-160.

- Govindjee and R. Govindjee (1974). "The absorption of light in photosynthesis." *Scientific American* 231: 64-82.
- Govindjee, P. Eggenberg, et al. (1992). "Chlorophyll a fluorescence decay in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* and the formate effect." *Biochimica et Biophysica Acta* 1101: 353-358.
- Govindjee and G. Papageorgiou (1971). *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: Fluorescence transients. Photophysiology*. A. C. Giese. New York, NY, USA, Academic Press. VI: 1-46.
- Gray, M. W. and P. H. Boer (1988). "Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences* 319(1193): 135-147.
- Grouneva, I., T. Jakob, et al. (2008). "A new multicomponent NPQ mechanism in the diatom *Cyclotella meneghiniana*." *Plant Cell Physiol* 49(8): 1217-1225.
- Grouneva, I., T. Jakob, et al. (2009). "The regulation of xanthophyll cycle activity and of non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Cyclotella meneghiniana*." *Biochim Biophys Acta* 1787(7): 929-938.
- Hakala, M., I. Tuominen, et al. (2005). "Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1706(1-2): 68-80.
- Haldimann, P. and M. Tsimilli-Michael (2002). "Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise in spinach chloroplasts." *Photosynthesis Research* 74: 37-50.
- Halling-Sørensen, B., N. Nielsen, et al. (1998). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment." *Chemosphere* 36: 357-393.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." *Plant Physiol* 141(2): 312-322.

- Harris, G. C. and U. Heber (1993). "Effects of anaerobiosis on chlorophyll fluorescence yield in spinach (*Spinacia oleracea*) leaf discs." *Plant Physiology* 101(4): 1169-1173.
- Hartmann, A. A., C. Alder, et al. (1998). "Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuc genotoxicity in native hospital wastewater. ." *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 383-393.
- Hawkey, P. (2003). "Mechanisms of quinolone action and microbial response. ." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(Suppl S1): 29-35.
- Heber, U. (2002). "The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants." *Photosynthesis Research* 73(1-3): 223-231.
- Hibino, T., B. H. Lee, et al. (1996). "Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow via NAD(P)H dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*." *Australian Journal of Plant Physiology* 23(3): 321-330.
- Holt, N. E., D. Zigmantas, et al. (2005). "Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting." *Science* 307(5708): 433-436.
- Holtz, S. (2006). "There is no "away." Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances: emerging contaminants detected in water. ." Canadian Institute for Environmental Law and Policy (CIELAP). January: 1-94.
- Horton, P. and A. Hague (1988). "Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching." *BBA - Bioenergetics* 932(C): 107-115.
- Houille-Vernes, L., F. Rappaport, et al. (2011). "Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): 20820-20825.
- Huppe, H. C. and D. H. Turpin (1994). "Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells." *ANNU.REV.PLANT PHYSIOL.PLANT MOL.BIOL.* 45: 577-607.

- Hurry, V., M. Tobiaeson, et al. (1995). "Mitochondria contribute to increased photosynthetic capacity of leaves of winter rye (*Secale cereale* L.) following cold-hardening." *Plant, Cell and Environment* 18(1): 69-76.
- ImsHealthCanada (2009). December data month, Canadian CompuScript, Statistics Canada.
- Isidori, M., M. Lavorgna, et al. (2005). "Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms." *Sci Total Environ* 346(1-3): 87-98.
- Iwai, M., K. Takizawa, et al. (2010). "Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis." *Nature* 464(7292): 1210-1213.
- Jakob, T., R. Goss, et al. (2001). "Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*." *Journal of Plant Physiology* 158: 383-390.
- Jancova, P., P. Anzenbacher, et al. (2010). "Phase II drug metabolizing enzymes." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154(2): 103-116.
- Jans, F., E. Mignolet, et al. (2008). "A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plasto-quinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas* ." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 20546-20551.
- Jeanjean, R., H. C. P. Matthijs, et al. (1993). "Exposure of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis." *Plant and Cell Physiology* 34(7): 1073-1079.
- Jensen, P. E., R. Bassi, et al. (2007). "Structure, function and regulation of plant photosystem " *Biochim. Biophys. Acta.* 1767: 335-352.
- Jjemba, P. K. and B. K. Robertson (2005). " Antimicrobial agents with improved clinical efficacy versus their persistence in the environment: Synthetic 4-quinolone as an example. ." *EcoHealth* 2: 171-182.
- Joet, T. and al. (2002). "Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco." *J Biol Chem* 277(35): 31623-31630.

- Joët, T., L. Cournac, et al. (2001). "Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I." *Plant Physiology* 125: 1919-1929.
- Joliot, P., G. Barbieri, et al. (1969). "Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II." *Photochem. Photobiol.* 10: 309-329.
- Joliot, P. and A. Joliot (1980). "Dependence of delayed luminescence upon adenosine triphosphatase activity in *Chlorella*." *Plant Physiol.* 65: 691-696.
- Joliot, P. and G. N. Johnson (2011). "Regulation of cyclic and linear electron flow in higher Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32): 13317-13322.
- Joliot, P. and B. Kok (1975). "Oxygen evolution in photosynthesis". *Bioenergetics of Photosynthesis*. G. A. P. N. York: 384-413.
- Jones, O. A. H., N. Voulvoulis, et al. (2002). "Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals." *Water Res.* 36: 5013-5022.
- Jos, A., G. Repetto, et al. (2003). "Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints." *Toxicology in Vitro* 17(5-6): 525-532.
- Juneau, P., A. El Berdey, et al. (2002). "PAM-fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 155-164.
- Juneau, P. and R. Popovic (1999). "Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: Importance and future application." *Ecotoxicology* 8(6): 449-455.
- Jung, J., Y. Kim, et al. (2008). "Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*." *Ecotoxicology* 17(1): 37-45.

- Karthikeyan, K. G. and M. T. Meyer (2006). "Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA." *Science of the Total Environment* 361(1-3): 196-207.
- Kilian, O. and P. G. Kroth (2005). "Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids." *Plant Journal* 41(2): 175-183.
- Kim, S. D., J. Cho, et al. (2007). "Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters." *Water Research* 41(5): 1013-1021.
- Klughammer, C. and U. Schreiber (1994). "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of Photosystem I quantum yield via $P700^+$ -absorbance changes at 830 nm." *Planta* 192(2): 261-268.
- Klughammer, C. and U. Schreiber (2008). "Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I." Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany. PAM Application Notes 1: 11-14.
- Knopf, J. A. and M. Shapira (2005). "Degradation of Rubisco SSU during oxidative stress triggers aggregation of Rubisco particles in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta* 222(5): 787-793.
- Kok, B., B. Forbush, et al. (1970). "Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution-I. A linear four step mechanism." *Photochemistry and Photobiology* 11(6): 457-475.
- Kolpin, D. W., E. T. Furlong, et al. (2002). "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999-2000; a national reconnaissance. ." *Environmental Science and Technology* 36: 1202-1211.
- Krause, G. H. and P. Jahns (2004). *Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. . Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis.* G. GC Papageorgiou. Dordrecht, The Netherlands., Kluwer Academic: 463-495.
- Kromer, S. (1995). "Respiration during photosynthesis." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 45-70.

- Kruk, J. and K. Strzalka (2001). "Redox changes of cytochrome b559 in the presence of plastoquinones." *Journal of Biological Chemistry* 276(1): 86-91.
- Kudoh, A., H. Ishihara, et al. (1998). "Effect of carbamazepine on pain scores of unipolar depressed patients with chronic pain: a trial of off-on-off-on design." *Clin J Pain* 14(1): 61-65.
- Lacuesta, M., A. Muñoz-Rueda, et al. (1992). "Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and chlorophyll fluorescence emission by barley leaves illuminated under photorespiratory and non-photorespiratory conditions." *J. Exp. Bot.* 43: 159-165.
- Lagadic, L., T. Caquet, et al. (1997). *Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux.* C. T. Lagadic L., Amiard J.C. Ramade F., Masson: 1-9.
- Lavaud, J. and P. G. Kroth (2006). "In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle." *Plant Cell Physiol* 47(7): 1010-1016.
- Lavaud, J., B. Rousseau, et al. (2002). "In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching." *FEBS Letters* 523: 163-166.
- Lavaud, J., B. Rousseau, et al. (2002). "Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*." *Plant Physiology* 129: 1398-1406.
- Lavaud, J., B. Rousseau, et al. (2003). "Enrichment of light-harvesting complex in diadinoxanthin and implications for the nonphotochemical fluorescence quenching in diatoms." *Biochemistry* 42: 5802-5808.
- Lavaud, J., R. F. Strzepak, et al. (2007). "Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate." *Limnology and Oceanography* 52(3): 1188-1194.
- Leclercq, M., O. Mathieu, et al. (2009). "Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment

- plants." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 56(3): 408-415.
- Lennon, A. M., P. Prommeeate, et al. (2003). "Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, *Ndh* and *IMMUTANS*, in higher-plant plastids." *Planta* 218(2): 254-260.
- Li, X. P., O. Bjorkman, et al. (2000). "A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting." *Nature* 403(6768): 391-395.
- Li, X. P., A. M. Gilmore, et al. (2002). "Molecular and global time-resolved analysis of a *psbS* gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II." *J Biol Chem* 277(37): 33590-33597.
- Lin, A. Y. C., T. H. Yu, et al. (2009). "Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan." *Journal of Hazardous Materials* 167(1-3): 1163-1169.
- Lindberg, R. H., P. Wennberg, et al. (2005). "Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden." *Environ. Sci. Technol.* 39 3421-3429.
- Lippemeier, S., P. Hartig, et al. (1999). "Direct impact of silicate on the photosynthetic performance of the diatom *Thalassiosira weissflogii* assessed by on- and off-line PAM fluorescence measurements." *Journal of Plankton Research* 21(2): 269-283.
- Lorimer, G. H. and T. J. Andrews (1981). "The C chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle2." *The Biochemistry of Plants* 8: 329-374.
- Lynnes, J. A. and H. G. Weger (1996). "Azide-stimulated oxygen consumption by the green alga *Selenastrum minutum*." *Physiologia Plantarum* 97(1): 132-138.
- Macintyre, H. L., T. M. Kana, et al. (2000). "The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton." *Trends in Plant Science* 5(1): 12-17.

- Mackey, K., A. Paytan, et al. (2008). "*A photosynthetic strategy for coping in a high-light, low-nutrient environment.*" *Limnol Oceanog* 53(900-913).
- Malkin, R. and R. K. Chain (1980). "*The relationship of the cyclic and non-cyclic electron transport pathways in chloroplasts.*" *Biochim Biophys Acta* 591: 381-390.
- Marchetti, A., D. M. Schrutha, S. Durkina, M. S. Parkera, C. T. Kodnera, R. Berthiaumea, A. Moralesa, E. Allenb and V. Armbrusta (2012). "*Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability.*" *PNAS* 109(6): 1-9.
- Martin, M., L. M. Casaa, et al. (1996). "*Identification of the product of ndhA gene as a thylakoid protein synthesized in response to photooxidative treatment.*" *Plant and Cell Physiology* 37(3): 293-298.
- Marutani, Y., Y. Yamauchi, et al. (2012). "*Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: Involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes.*" *Planta* 236(2): 753-761.
- Maul, J. E., J. W. Lilly, et al. (2002). "*The Chlamydomonas reinhardtii plastid chromosome: Islands of genes in a sea of repeats.*" *Plant Cell* 14(11): 2659-2679.
- Mehler, A. H. (1951). "*Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents.*" *Arch Biochem Biophys* 33(1): 65-77.
- Metcalf, C. D., B. G. Koenig, et al. (2003). "*Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants.*" *Environ Toxicol Chem* 22(12): 2872-2880.
- Meunier, P. C. and R. Popovic (1990). "*Control of misses in oxygen evolution by the oxido-reduction state of plastoquinone in Dunaliella tertiolecta.*" *Photosynthesis Research* 23(2): 213-221.
- Miao, X.-S., F. Bishay, M. Chen and C. D. Metcalfe (2004). "*Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada.*" *Environ. Sci. Technol.* 38: 3533-3541.

- Michaelis, G., C. Vahrenholz, et al. (1990). "Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: The gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA." *Molecular and General Genetics* 223(2): 211-216.
- Mills, J., D. Crowther, et al. (1979). "Electron transport pathways in spinach chloroplasts. Reduction of the primary acceptor of photosystem II by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in the dark. ." *Biochim Biophys Acta* 547: 127-137.
- Miloslavina, Y., I. Grouneva, et al. (2009). "Ultrafast fluorescence study on the location and mechanism of non-photochemical quenching in diatoms." *Biochim Biophys Acta* 1787(10): 1189-1197.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, et al. (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends Plant Sci* 9(10): 490-498.
- Miyake, C. (2010). "Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions." *Plant Cell Physiol* 51(12): 1951-1963.
- Mohapatra, P. K., R. Khillar, B. Hansdah and R. C. Mohanty (2010). "Photosynthetic and fluorescence responses of *Solanum melangena* L. to field application of dimethoate." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(1): 78-83.
- Moldovan, Z. (2006). "Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania." *Chemosphere* 64(11): 1808-1817.
- Molstad, S., C. S. Lundborg, et al. (2002). "Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries." *Scand J Infect Dis* 34(5): 366-371.
- Morgan S., McMahon M., Lam J., Mooney D., Raymond C. (2005). *The Canadian Rx Atlas Vancouver: Centre for Health Services and Policy Research*; 77.
- Muller, P., X. P. Li, et al. (2001). "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy." *Plant Physiology* 125(4): 1558-1566.
- Munekage, Y. N., F. Eymery, et al. (2010). "Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in *C4* flaveria species." *Plant Cell Physiol* 51(4): 664-668.

- Munekage, Y., M. Hashimoto, et al. (2004). "Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis." *Nature* 429(6991): 579-582.
- Munekage, Y., M. Hojo, et al. (2002). "PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*." *Cell* 110(3): 361-371.
- Murata, N., S. Takahashi, et al. (2007). "Photoinhibition of photosystem II under environmental stress." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767(6): 414-421.
- Murphy, A. M. and T. J. Cowles (1997). "Effects of darkness on multi-excitation in vivo fluorescence and survival in a marine diatom. ." *Limnol Oceanogr* 42: 1444-1453.
- Mus, F., L. Cournac, et al. (2005). "Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1708: 322-332.
- Nalecz-Jawecki, G. and G. Persoone (2006). "Toxicity of selected pharmaceuticals to the anostracan crustacean *Thamnocephalus platyurus*: comparison of sublethal and lethal effect levels with the 1h Rapidtookit and the 24h Thamnotokit microbiotests." *Environ Sci Pollut Res Int* 13(1): 22-27.
- Nandha, B., G. Finazzi, et al. (2007). "The role of PGR5 in the redox poisoning of photosynthetic electron transport." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767(10): 1252-1259.
- Narbonne, J. F., P. Garrigues, et al. (1991). "Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring : field studies on the french coast of the mediterranean sea. ." *Comp. Biochem. Physiol.*(100): 37-42.
- Nentwig, G., M. Oetken, et al. (2004). *Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates - the example of carbamazepine and clofibric acid. Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. K. Kümmerer. Berlin, Germany, Springer: 195-208.
- Neubauer, C. and U. Schreiber (1987). "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation

characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side."
Zeitschrift für Naturforschung 42: 1246-1254.

- Nie, X., X. Wang, et al. (2008). "Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric Acid and ciprofloxacin." *Environ Toxicol Chem* 27(1): 168-173.
- Nimrod, A. C. and W. H. Benson (1996). "Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates." *Crit Rev Toxicol* 26(3): 335-364.
- Nishiyama, Y., H. Yamamoto, et al. (2001). "Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery." *EMBO Journal* 20(20): 5587-5594.
- Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman (1997). "The roles of specific xanthophylls in photoprotection." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 14162-14167.
- Niyogi, K. K. (1999). "Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 333-359.
- Niyogi, K. K. (2000). "Safety valves for photosynthesis." *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455-460.
- Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman (1997). "The roles of specific xanthophylls in photoprotection." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 14162-14167.
- Noctor, G. and C. H. Foyer (1998). "Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279.
- Nowicka, B. and J. Kruk (2012). "Plastoquinol is more active than α -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(3): 389-394.
- Oetken, M., G. Nentwig, et al. (2005). "Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine." *Arch Environ Contam Toxicol* 49(3): 353-361.

- O'Neill, A. J., J. H. Cove, et al. (2001). "Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in *Staphylococcus aureus*." *J Antimicrob Chemother* 47(5): 647-650.
- Oquist, G., V. M. Hurry, et al. (1993). "The temperature dependence of the redox state of QA and susceptibility of photosynthesis to photoinhibition." *Plant Physiol Biochem* 31: 683-691.
- Oudot-Le Secq, M. P. and B. R. Green (2011). "Complex repeat structures and novel features in the mitochondrial genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*." *Gene* 476(1-2): 20-26.
- Oudot-Le Secq, M. P., J. Grimwood, et al. (2007). "Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage." *Mol Genet Genomics* 277(4): 427-439.
- Pailler, J. Y., A. Krein, et al. (2009). "Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg." *Science of the Total Environment* 407(16): 4736-4743.
- Papageorgiou, G. C. and Govindjee (2004). *Chlorophyll a Fluorescence, A Signature of Photosynthesis.*, Papageorgiou, G. C. Govindjee (eds).
- Peers, G. and K. K. Niyogi (2008). "Pond scum genomics: The genomes of *Chlamydomonas* and *Ostreococcus*." *Plant Cell* 20(3): 502-507.
- Peers, G. and N. M. Price (2006). "Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom." *Nature* 441(7091): 341-344.
- Peers, G., T. B. Truong, et al. (2009). "An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis." *Nature* 462(7272): 518-521.
- Pellerin-Massicote, J. (1994). "Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves." *J. Aquat. Ecosyst. Health.* 3 101-111.
- Peltier, G. and L. Cournac (2002). "Chlororespiration." *Annual Review of Plant Biology* 53: 523-550.

- Peltier, G., J. Ravenel, et al. (1987). "Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas* evidence for a chlororespiration. ." *Biochim Biophys Acta* 893: 83-90.
- Peltier, G., D. Tolleter, et al. (2010). "Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae." *Photosynth Res* 106(1-2): 19-31.
- Pena, A., D. Chmielova, et al. (2007). "Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column." *Journal of Separation Science* 30(17): 2924-2928.
- Peng, L. and T. Shikanai (2011). "Supercomplex formation with photosystem I is required for the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 155(4): 1629-1639.
- Peng, L., H. Shimizu, et al. (2008). "The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*." *J Biol Chem* 283(50): 34873-34879.
- Perkins, R. G., J. L. Mouget, et al. (2006). "Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms." *Marine Biology* 149(4): 703-712.
- Perret, D., A. Gentili, et al. (2006). "Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: A small scale reconnaissance." *Chromatographia* 63(5-6): 225-232.
- Pfannschmidt, T. (2003). "Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes." *Trends in Plant Science* 8(1): 33-41.
- Pinto, E., T. C. S. Sigaud-Kutner, et al. (2003). "Heavy metal-induced oxidative stress in algae." *Journal of Phycology* 39(6): 1008-1018.
- Polimene, L., C. Brunet, et al. (2012). "Modelling xanthophyll photoprotective activity in phytoplankton." *Journal of Plankton Research* 34(3): 196-207.

- Pospisii, P. (2012). "Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(1): 218-231.
- Qian, H., W. Chen, et al. (2008). "Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*." *Aquat Toxicol* 88(4): 301-307.
- Qian, H., G. D. Sheng, et al. (2008). "Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by real-time polymerase chain reaction." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(1): 182-187.
- Queener, S. F. and K. Gutierrez (2003). *Ophthalmic Drugs. Pharmacology for Nursing Practice*. K. Gutierrez, S. F. Queener and Mosby, St. Louis, MO. 1075-1094.
- Quinlivan, E. P., S. Roje, et al. (2003). "The folate precursor *p*-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol." *J Biol Chem* 278(23): 20731-20737.
- Quinn, B., F. Gagné, et al. (2004). "Oxydative metabolism activity in *Hydra attenuata* exposed to carbamazepine." *Fresenius Environ Bull*.
- Quinn, B., F. Gagné, et al. (2008). "An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*." *Sci Total Environ* 389(2-3): 306-314.
- Raghavendra, A. S., K. Padmasree, et al. (1994). "Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: Interactions between chloroplasts and mitochondria." *Plant Science* 97(1): 1-14.
- Ralph, P. J., R. A. Smith, et al. (2007). "Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review." *Toxicological and Environmental Chemistry* 89(4): 589-607.
- Ramade F., 1977 - *Ecotoxicologie* - Masson, Paris, 205 p.

- Ravenel, J., G. Peltier, et al. (1994). "*The cyclic electron pathways around Photosystem I in Chlamydomonas reinhardtii as determined in vivo by photoacoustic measurements of energy storage.*" *Planta* 193(2): 251-259.
- Rebeille, F. and P. Gans (1988). "*Interaction between chloroplasts and mitochondria in microalgae.*" *Plant Physiol.* 88: 973-975.
- Richardson, B. J., P. K. S. Lam, et al. (2005). "*Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China.*" *Mar. Pollut. Bull.* 50: 913-920.
- Richter, M., R. Goss, et al. (1999). "*Characterization of the fast and slow reversible components of non-photochemical quenching in isolated pea thylakoids by picosecond time-resolved chlorophyll fluorescence analysis.*" *Biochemistry* 38(39): 12718-12726.
- Rivera, M. A. J., F. G. Howarth, et al. (30-SEP-1999). "*Direct Submission.*" Division of Insect Biology, Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California Berkeley, 201 Wellman Hall, Berkeley, CA 94720-3112, USA.
- Robinson, A. A., J. B. Belden, et al. (2005). "*Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms.*" *Environ Toxicol Chem* 24(2): 423-430.
- Rohacek, K. and M. Bartak (1999). "*Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications.*" *Photosynthetica* 37(3): 339-363.
- Ruban, A. V., M. P. Johnson, et al. (2012). "*The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna.*" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(1): 167-181.
- Ruban, A., J. Lavaud, et al. (2004). "*The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants.*" *Photosynth Res* 82(2): 165-175.
- Rumeau, D., G. Peltier, et al. (2007). "*Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response.*" *Plant Cell Environ* 30(9): 1041-1051.

- Rutherford, A. W. and A. Krieger-Liszky (2001). "*Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II.*" Trends in Biochemical Sciences 26(11): 648-653.
- Sacher, F., F. T. Lange, et al. (2001). "*Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurtemberg, Germany.*" Journal of Chromatography A 938(1-2): 199-210.
- Sacher, F., M. Ehmann, et al. (2008). "*Pharmaceutical residues in the river Rhine--results of a one-decade monitoring programme.*" J Environ Monit 10(5): 664-670.
- Sanderson, H., R. Brain, et al. (2004). "*Toxicity classification and evaluation of four pharmaceutical classes: Antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones.*" Toxicology 203: 27-40.
- Sanderson, H., D. Johnson, et al. (2003). "*Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals acute toxicity to fish.*" Toxicol. Lett. 144: 383-395.
- Sarmah, A. K., M. T. Meyer, et al. (2006). "*A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment.*" Chemosphere 65: 725-759.
- Sarthou, G., K. R. Timmermans, et al. (2005). "*Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: A review.*" Journal of Sea Research 53(1-2 SPEC. ISS.): 25-42.
- Sauer, H., A. Wild, et al. (1987). "*The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II.*" Z. Naturforsch The causes of inhibition of photosynthesis(42): 270-278.
- Saulnier, I., H. Bouchard, et al. (2007). Rendez-vous Saint-Laurent 2006 - Un bilan partiel encourageant. . Plan Saint-Laurent, Environnement Canada: - Suivi de l'état du Saint-Laurent 2005-2010, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec.
- Sazanov, L. A., P. A. Burrows, et al. (1998). "*The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes.*" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 95: 1319-1324.

- Schansker, G., S. Z. Toth, et al. (2006). "Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: the qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side." *Biochim Biophys Acta* 1757(7): 787-797.
- Scheibe, R. (1987). "NADP⁺-malate dehydrogenase in C3-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme." *Physiol Plant* 71: 393-400.
- Scheibe, R. (1991). "Redox-modulation of chloroplast enzymes: A common principle for individual control." *Plant Physiology* 96(1): 1-3.
- Schreiber, U. (2004). *Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorimetry and saturation pulse method: An overview*. In *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. G. C. a. G. Papageorgiou. Dordrecht, Springer: 279-319.
- Schreiber, U., C. Neubauer, et al. (1993). "PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: A highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research." *Photosynthesis Research* 36: 65-72.
- Schreiber, U., U. Schliwa, et al. (1986). "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." *Photosynthesis Research* 10: 51-62.
- Schreiber, U., W. Bilger, et al. (1994). *Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Ecophysiology of photosynthesis*. Ecological studies. E. D. Schulze and M. M. Caldwell. Berlin, Germany, Springer Verlag. 100: 49-70.
- Schreiber, U., J. F. Müller and R. Gademann (2002). "New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests." *Photosynthesis Research* 74: 317-330.
- Schubert, H. and M. Hagemann (1990). "Salt effects on 77K fluorescence and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *FEMS Microbiology Letters* 71(1-2): 169-172.
- Schumann, A., R. Goss, et al. (2007). "Investigation of the quenching efficiency of diatoxanthin in cells of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) with different pool sizes of xanthophyll cycle pigments. ." *Phycologia* 46: 113-117.

- Schwaiger, J., H. Ferling, et al. (2004). "*Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout.*" *Aquat Toxicol* 68(2): 141-150.
- Seaton, M. J., M. H. Follansbee, et al. (1995). "*Oxidation of 1,2-epoxy-3-butene to 1,2:3,4-diepoxybutane by cDNA-expressed human cytochromes P450 2E1 and 3A4 and human, mouse and rat liver microsomes.*" *Carcinogenesis* 16(10): 2287-2293.
- Segura, P. A., M. Francois, et al. (2009). "*Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters.*" *Environ Health Perspect* 117(5): 675-684.
- Seifrtov, M., A. Pena, et al. (2008). "*Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection.*" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(3): 799-805.
- Serodio, J., S. Cruz, et al. (2005). "*Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the xanthophyll cycle in estuarine microphytobenthos.*" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 326(2): 157-169.
- Servos, M. (1999). "*Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates.*" *Water Quality Research Journal of Canada* 34(1): 123-177.
- Shapira, M., A. Lers, et al. (1997). "*Differential regulation of chloroplast gene expression in Chlamydomonas reinhardtii during photoacclimation: Light stress transiently suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PS II D1 protein.*" *Plant Molecular Biology* 33(6): 1001-1011.
- Shyam, R., A. S. Raghavendra, et al. (1993). "*Role of dark respiration in photoinhibition of photosynthesis and its reactivation in the cyanobacterium Anacystis nidulans.*" *Physiol. Plant.* 88: 446-452.
- Six, C., Z. V. Finkel, et al. (2008). "*Contrasting photoacclimation costs in ecotypes of the marine eukaryotic picoplankter Ostreococcus.*" *Limnology and Oceanography* 53(1): 255-265.

- Smith, B. R. and W. R. Brian (1991). "*The role of metabolism in chemical-induced pulmonary toxicity.*" *Toxicol Pathol* 19(4 Pt 1): 470-481.
- Spencer, M. and P. H. Warren (1996). "*The effects of habitat size and productivity on food web structure in small aquatic microcosms.*" *Oikos* 75: 419-430.
- Srivastava, A., H. Greppin, et al. (1995). "*The steady state chlorophyll a fluorescence exhibits in vivo an optimum as function of light intensity which reflects the physiological state of the plant.*" *Plant Cell Physiology* 36: 839-848.
- Srivastava, A., R. J. Strasser, et al. (1995). "*Polyphasic rise of chlorophyll a fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of Chlamydomonas reinhardtii.*" *Photosynthesis Research* 43: 131-141.
- Stass, H. and D. Kubitzka (1999). "*Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man.*" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43(Suppl. B): 83-90.
- Strasser, B., A. Srivastava, et al. (2000). *The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation.* M. Yunus, Pathre, U., and Mohanty, P. London, Taylor and Francis: 445-483.
- Strasser, R. J., A. Srivastava, et al. (1995). "*Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria.*" *Photobiochemistry and Photobiophysics* 61(1): 32-42.
- Strasser, R. J. and A. D. Stirbet (2001). "*Estimation of the energetic connectivity of PSU centers in plants using the fluorescence rise O-J-I-P fitting of experimental data to three different PSII models.*" *Mathem. Comp. Simul.* 56: 451-446L.
- Sueoka, N., K. S. Chiang, et al. (1967). "*Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of Chlamydomonas reinhardtii. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores.*" *Journal of Molecular Biology* 25: 44-67.
- Streb, P., E. M. Josse, et al. (2005). "*Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species Ranunculus glacialis.*" *Plant, Cell and Environment* 28(9): 1123-1135.

- Takahashi, S. and N. Murata (2006). "*Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II.*" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1757(3): 198-205.
- Takakura, N., P. Sanders, V. Fessard and L. Le Hégarat (2013). "*In vitro combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet.*" *Food and Chemical Toxicology* 52: 153-162.
- Teisseire, H. and G. Vernet (2000). "*Is the "Diuron Effect" Due to a Herbicide strengthening of antioxidative defenses of Lemna minor ?*" *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66: 153-160.
- Ternes, T. A. (1998). "*Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.*" *Water Research* Volume 32,(Issue 11): 3245-3260.
- Thacker, P. D. (2005). "*Pharmaceutical data elude researchers.*" *Environ Sci Technol* 39(9): 193A-194A.
- Thomas, P. E., D. Ryan, et al. (1976). "*An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels.*" *Anal Biochem* 75(1): 168-176.
- Thompson, R. J. and G. Mosig (1985). "*An ATP-dependent supercoiling topoisomerase of Chlamydomonas reinhardtii affects accumulation of specific chloroplast transcripts.*" *Nucleic Acids Res* 13(3): 873-891.
- Ting, C. S. and T. G. Owens (1993). "*Photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching processes in diatom Phaeodactylum tricorutum.*" *Plant Physiology* 101: 1323-1330.
- Torres, M. A., M. P. Barros, et al. (2008). "*Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review.*" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(1): 1-15.
- Trebst, A. (2007). "*Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system.*" *Photosynthesis Research* 92(2): 217-224.

- Trebst, A. (2007). "Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system." *Photosynthesis Research* 92(2): 217-224.
- Trebst, A. and S. Reimer (1973). "Energy conservation in photoreductions by photosystem II. Reversal of dibromothymoquinone inhibition of Hill-reactions by phenylenediamines." *Zeitschrift für Naturforschung* 28c: 710-716.
- Trottier, S., C. Blaise, et al. (1997). "Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay." *Environmental Toxicology and Water Quality* 12(3): 265-271.
- Trouillard, M., M. Shahbazi, et al. (2012). "Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(12): 2140-2148.
- Uniacke, J. and W. Zerges (2008). "Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of Cell Biology* 182(4): 641-644.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh (1997). "Alternative oxidase: From Gene to Function." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 703-734.
- Veith, T. and C. Buchel (2007). "The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes." *Biochim Biophys Acta* 1767(12): 1428-1435.
- Velthuys, B. R. (1981). "Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II." *FEBS Letters* 126(2): 277-281.
- Vieno, N. M., T. Tuhkanen, et al. (2006). "Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection." *Journal of Chromatography A* 1134(1-2): 101-111.
- Volmer, D. A., B. Mansoori, et al. (1997). "Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry* 69: 4143-4155.

- Voutsas, E., K. Magoulas, et al. (2002). "Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs." *Chemosphere* 48(7): 645-651.
- Vredenberg, W. J. (2000). "A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination." *Biophys J* 79(1): 26-38.
- Wall, M. K., L. A. Mitchenall, et al. (2004). "Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 101: 7821-7826.
- Wentworth, M., A. V. Ruban, et al. (2003). "Thermodynamic investigation into the mechanism of the chlorophyll fluorescence quenching in isolated photosystem II light-harvesting complexes." *J Biol Chem* 278(24): 21845-21850.
- Wiese, C., L. B. Shi, et al. (1998). "Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation." *Physiologia Plantarum* 102(3): 437-446.
- Wilhelm, C. and J. C. Duval (1990). "Fluorescence induction kinetics as a tool to detect a chlororespiratory activity in the prasinophycean alga, *Mantoniella squamata*." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1016(2): 197-202.
- Wilhelm, C., C. Büchel, et al. (2006). "The Regulation of Carbon and Nutrient Assimilation in Diatoms is Significantly Different from Green Algae." *Protist* 157(2): 91-124.
- Wilson, B. A., V. H. Smith, et al. (2003). "Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages." *Environ Sci Technol* 37(9): 1713-1719.
- Wise, A. (2002). "Antimicrobial resistance: Priorities for action. ." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 585-560.
- Xue, X., D. A. Gauthier, et al. (1996). "Interactions between photosynthesis and respiration in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Characterization of light-enhanced dark respiration." *Plant Physiology* 112(3): 1005-1014.

- Yamamoto, H. Y., R. C. Bugos, et al. (1999). *Biochemistry and molecular biology of the xanthophyll cycle. The Photochemistry of Carotenoids*. Frank HA, Britton G, Cogdell RJ. Dordrecht, Kluwer Academic 293-303.
- Zuccato, E., D. Calamari, et al. (2000). "Presence of therapeutic drugs in the environment." *Lancet* 355(9217): 1789-1790.
- Zuccato, E., S. Castiglioni, et al. (2004). Risks related to the discharge of pharmaceuticals in the environment: further research is needed. . *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Second Edition. . e. B. Kümmerer K, Springer, Germany: 431-437.

APPENDICE

DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE IN AQUATIC ORGANISMS BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

*Andre Lajeunesse,^{*a} Gabrielle Vernouillet,^b Philippe Eullaffroy,^a Christian Gagnon,^a
Philippe Juneau^b and Sébastien Sauvé^c*

*Received 12th November 2008, Accepted 18th February 2009 First published as an
Advance Article on the web 6th March 2009 DOI: 10.1039/b820302b*

*^a Environment Canada, Fluvial Ecosystem Research, Science and Technology
Branch, 105 McGill St., Montreal, Quebec, Canada H2Y 2E7. E-mail:
andre.lajeunesse@ec.gc.ca; Fax: +1 514-496-7398 ; ^b University of Québec in
Montréal, Department of Biological Sciences, Canada Research Chair on
Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, P.O. 8888 Downtown, Montreal, Quebec,
Canada H3C 3P8 ; ^c University of Montréal, Chemistry Department, P.O. 6128
Downtown, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*

*Cet article a été publié le 06 mars 2009 dans la revue *Journal of Environmental
Monitoring*.*

Dans cet article, j'ai fourni les échantillons biologiques sur lesquels ont été effectués les dosages de CBZ. J'ai également participé à l'extraction pour dosage de la CBZ avec André Lajeunse. André Lajeunse a mis au point la technique de dosage de la CBZ, réalisé les dosages et écrit la version initiale de l'article. J'ai participé à la version finale de l'article avec André Lajeunse. Philippe Eullaffroy, Christian Gagnon, Philippe Juneau et Sébastien Sauvé.

Determination of carbamazepine in aquatic organisms by liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry

André Lajeunesse,^{*a} Gabrielle Vernouillet,^b Philippe Eullaffroy,^a Christian Gagnon,^a Philippe Juneau^b and Sébastien Sauvé^c

Received 12th November 2008, Accepted 18th February 2009

First published as an Advance Article on the web 6th March 2009

DOI: 10.1039/b820302b

A sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method has been developed for the determination of carbamazepine in microgram quantities of crustacean *Thamnocephalus platyurus* and the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* at the ng L⁻¹ level. This fully validated method applied to a bio-accumulation study was found suitable for the detection of carbamazepine in small aquatic tissues.

Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) coming from human and veterinary uses are continuously discharged in large quantities into sewage treatment plants, surface water and sediments.¹ Due to their polar structure, most PPCPs are not significantly removed by wastewater treatment plants.^{2–4} The antiepileptic drug carbamazepine (CBZ) is among the most likely persistent substances usually found.^{5–7} Although this molecule has been traditionally used against epileptic seizure disorders, carbamazepine has also been introduced in clinical psychiatry for the treatment of schizophrenia and bipolar disorder.⁸ Thus, CBZ is increasingly released in the environment *via* anthropogenic activities; its presence may therefore become harmful to aquatic organisms. Until now, the occurrence and fate of CBZ in wastewaters have been investigated by some authors,^{9,10} however bio-concentration in aquatic organisms resulting from tissue absorption levels exceeding the rate of metabolism and excretion, has not yet been extensively documented. The only existing methods available are for large biological tissue samples of significant mass, such as fish.¹¹ Unfortunately, more sensitive analytical methods are required to detect CBZ at trace levels (ppb or lower) in tiny aquatic organisms. The main objective of this project is to develop a new ultra sensitive analytical method for the quantification of CBZ in microgram quantities of the crustacean *Thamnocephalus platyurus* and the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* by LC–MS/MS with positive-mode electrospray (+ESI) and selected reaction monitoring (SRM) transitions.

Among the different detection techniques that can be coupled to liquid chromatography (LC), mass spectrometry (MS) is recognized to be the most suitable tool for environmental determinations due to its high specificity and sensitivity. To get the best detection signal for CBZ, positive electrospray ionization (+ESI) was chosen as mass

spectrometer interface.† Since no concentration factor could be gained from liquid–liquid extraction, we have chosen to use an alternate mobile phase to get the best instrumental sensitivity. The alkaline mobile phase significantly improved the overall sensitivity relative to common +ESI acidic mobile phase.¹² This mobile phase, made of ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8/acetonitrile (1 : 1, v/v) gave an impressive signal improvement up to 5-fold compared to traditional acidic solution of formic acid 0.1% in methanol (1 : 1, v/v).¹³ Furthermore, the basic mobile phase has ensured sufficient resolution and led to satisfactory chromatography as shown in Fig. 1.

Various validation parameters were examined and optimized for CBZ and bupropion-d9 to provide a rugged analytical method using cis-tramadol¹³-d3 as an internal standard. Linearity was evaluated by triplicate analysis of CBZ and bupropion-d9 standard solutions made up to five different concentrations (0.100, 10.0, 20.0, 100, and 200 µg L⁻¹). The calibration plots obtained were highly linear over the tested concentration range with correlation coefficient $r^2 > 0.9998$. The limit of detection in real matrix (based on 20 µL injected) was 0.2 ng L⁻¹ for CBZ, and was defined as the lowest concentration of analyte having a minimum S/N ratio of 3 for a spiked sample containing ~0.0021 mg of crushed *T. platyurus*.

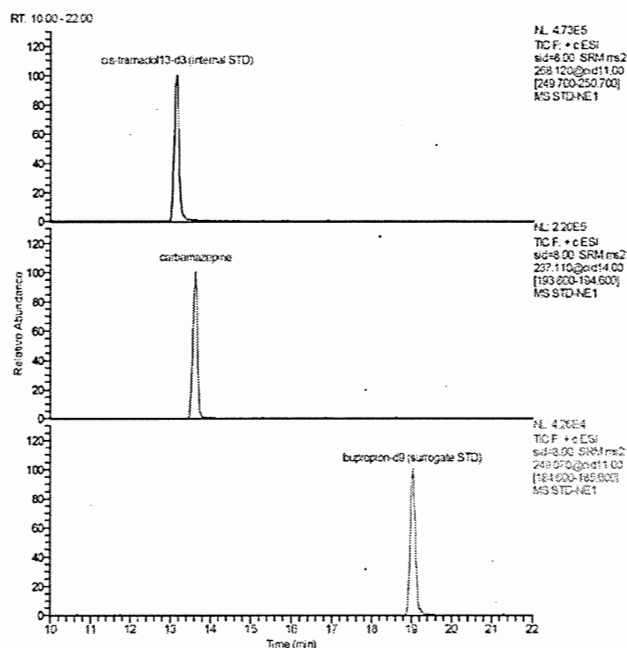


Fig. 1 Representative LC–MS/MS chromatograms of a 500 ng L⁻¹ standard solution.

^aEnvironment Canada, Fluvial Ecosystem Research, Science and Technology Branch, 105 McGill St., Montreal, Quebec, Canada H2Y 2E7. E-mail: andre.lajeunesse@ec.gc.ca; Fax: +1 514-496-7398

^bUniversity of Québec in Montréal, Department of Biological Sciences, Canada Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, P.O. 8888 Downtown, Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8

^cUniversity of Montréal, Chemistry Department, P.O. 6128 Downtown, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Recoveries were determined by triplicate analysis for two concentration levels (125 and 500 ng L⁻¹) using accurate known amounts of CBZ and bupropion-d9. Mean recoveries at nominal concentrations of 125 and 500 ng L⁻¹ were 86.0 ± 5.5% and 89.6 ± 2.7% for CBZ, respectively, and 95.6 ± 2.4% and 103.2 ± 2.9% for bupropion-d9. Mean recoveries in matrix were also completed by triplicate analysis. Yet again, satisfactory percentages of recovery were obtained for CBZ (92.9 ± 4.4) and bupropion-d9 (77.6 ± 1.9) in 500 ng L⁻¹ spiked extracts. These results indicated the method was accurate and precise. Additional validation tests related to matrix effects revealed limited signal inhibition for triplicate analysis of CBZ (<6%). However, despite its constant recovery, bupropion-d9 was much more affected by matrix effects showing ~65% of signal inhibition *versus* pure non-extracted standard solutions of 500 ng L⁻¹.

Precision was assessed by analysis on two different days of 2 and 3 injections of a 500 ng L⁻¹ standard solution spiked with both CBZ and bupropion-d9. Intra-day and Inter-day precision was <8.0% RSD, thus suggesting that the method was stable and reproducible.

The validated method was successfully applied to the analysis of CBZ in crustacean *T. platyurus* previously fed with contaminated algae *P. subcapitata*. Mean CBZ concentration of 129 ± 57 µg mg⁻¹ of dried matter was found after duplicate analysis using an external standard solution. Although that trace amount of CBZ was detected in biota samples, tandem mass spectrometry proved its usefulness by enhancing the specificity and sensitivity of each analysis (Fig. 2).

To our knowledge, this is the first time that an LC-MS/MS method has been developed for the analysis of CBZ in small aquatic organisms. The method was proven sufficiently sensitive, precise, and specific to enable the quantitative detection of CBZ in such species. This method is an excellent tool for bioaccumulation studies in

a variety of biological tissues, especially where the mass of tissues is limited.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Canadian Foundation for Innovation and the St. Lawrence Action Plan for their financial support.

Notes and references

† Analyte separations were conducted with a Thermo Finnigan HPLC Surveyor System on a Gemini C18 column (150 × 2.0 mm id × 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA). The flow rate was set at 200 µL min⁻¹. A binary gradient made of (A) ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8, and (B) acetonitrile was used to achieve chromatographic separation. Volume injection was 20 µL for extracted samples. Mass spectrometry was performed using a TSQ Quantum Ultra triple quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc.) equipped with an electrospray ionization source. The capillary was held at 5.0 kV and the cone was operated at an optimized voltage for each analyte in positive-ion mode (+ESI). Additional instrumental parameters: capillary temperature 300 °C; gas collision pressure 1.5 mTorr; ion sweep gas pressure 1 mTorr; sheath gas 20 mTorr; skimmer offset 8; micro scans 1. The Xcalibur 1.2 software (Thermo Fisher Scientific) was used for data acquisition and processing. SRM transitions: CBZ: 237.1 → 194.1, cis-tramadol¹³C-d3: 268.1 → 250.2, bupropion-d9: 249.1 → 185.1.

‡ *T. platyurus* larvae were hatched from cysts after 20–22 h of incubation at 25 °C in reconstituted freshwater (EPA medium) under continuous illumination of 75 µE according to manufacturer's instructions (MicroBio Test). *T. platyurus* were incubated 24 h at 18 °C in Petri dishes with CBZ-contaminated or non-contaminated algae (*P. subcapitata*) at a concentration of 1 × 10⁶ cells mL⁻¹. After exposure, *T. platyurus* were washed 4 times with sterile and deionized water then homogenized in water at 4 °C using a Teflon pestle tissue grinder. The homogenate was then centrifuged at 15 000 × g. Crushed freeze-dried crustacean residues (equivalent to ~250 *T. platyurus* sample⁻¹), were transferred to glass conical tubes prior to adding 750 µL of Milli-Q water and 150 µL of methanolic surrogate standard solution (bupropion-d9: 0.0025 mg L⁻¹). The pH was increased ~11–12 with 1 mL of NaOH (0.1 M). After pH adjustment, a liquid–liquid extraction was performed using ethyl acetate (2 × 3 mL) on capped tubes. To avoid possible emulsion, a 5 min centrifugation was completed at 820 × g after each vortexed extraction. Combined fractions were passed through 6.5 g of anhydrous sodium sulfate, and 100 µL of cis-tramadol¹³C-d3 (1 mg L⁻¹) in methanol was added as the internal standard. Anhydrous samples were dried under a gentle stream of nitrogen gas prior to final dilution in 750 µL of mobile phase solution. To overcome possible weighting variation, data were generated using an average weight of 0.0021 mg sample⁻¹.

P. subcapitata was obtained from Algaltookit, MicroBioTest (Gent, Belgium), as "algal beads". Algae were demobilised and transferred into the algal culturing medium from MicroBioTest, pH = 7.5. The algal inoculate was taken from an exponentially growing culture and added into an Erlenmeyer flask containing some CBZ (250 mg L⁻¹) to obtain an initial cell density of 1 × 10⁶ cells mL⁻¹. The Erlenmeyer was then placed in a growth chamber at 25 °C under continuous illumination of 50 ml ms⁻¹. The light/dark cycle was set to 16/8 h.

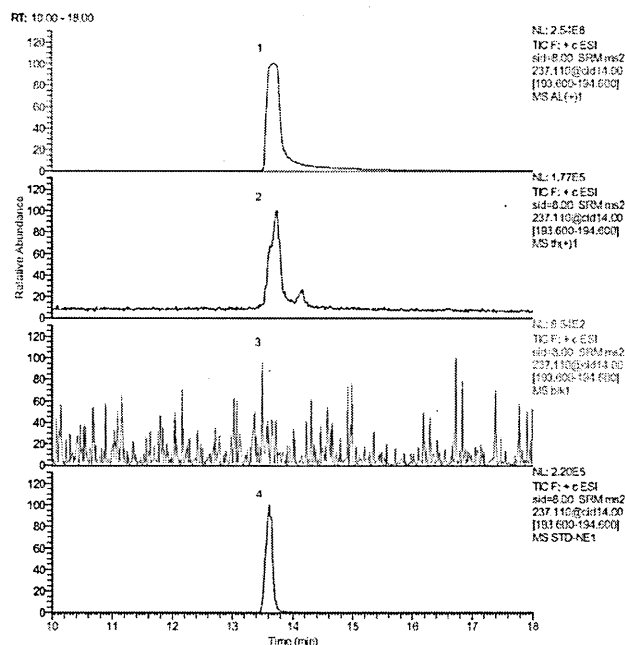


Fig. 2 Representative LC-MS/MS chromatograms of: (1) contaminated algae extract, (2) *T. platyurus* fed with contaminated algae extract, (3) *T. platyurus* fed with non-contaminated algae extract, (4) CBZ standard solution.

- 1 M. O. Chen, K. Ohman, C. Metcalfe, M. G. Ikonou, P. L. Amatya and J. Wilson, *Water Qual. Res. J. Can.*, 2006, **41**, 351–364.
- 2 T. A. Ternes, *Water Res.*, 1998, **32**(11), 3245–3260.
- 3 H. B. Lee, K. Sarafin, T. E. Peart and M. L. Svoboda, *Water Qual. Res. J. Can.*, 2003, **38**, 667–682.
- 4 A. Lajeunesse and C. Gagnon, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2007, **87**, 565–578.
- 5 B. Ferrari, N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio and J. Garric, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, **55**, 359–370.
- 6 X. S. Miao and C. D. Metcalfe, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 3731–3738.
- 7 A. Togola and H. Budzinski, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1177**, 150–158.

- 8 G. F. Van Rooyen, D. Badenhorst, K. J. Swart, H. K. L. Hundt, T. Scanes and A. F. Hundt, *J. Chromatogr., B*, 2002, **769**, 1–7.
- 9 C. D. Metcalfe, X. S. Miao, B. G. Koenig and J. Struger, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, **22**, 2881–2889.
- 10 T. A. Ternes, M. Meisenheimer, D. McDowell, F. Sacher, H. J. Brauch, B. Haist-Gulde, G. Preuss, U. Wilme and N. Zulei-Seibert, *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36**, 3855–3863.
- 11 B. W. Brooks, C. K. Chambliss, J. K. Stanley, A. Ramirez, K. E. Banks, R. D. Johnson and R. J. Lewis, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, **24**, 464–469.
- 12 A. Lajeunesse, C. Gagnon and S. Sauvé, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 5325–5333.
- 13 A. J. Ramirez, M. A. Mottaleb, B. W. Brooks and C. K. Chambliss, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 3155–3163.