

Université de Montréal

**La production de thiols biogéniques par les
microorganismes aquatiques**

par

Maxime Leclerc

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biologiques

Mai 2015

© Maxime Leclerc, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

La production de thiols biogéniques par les microorganismes aquatiques

Présenté par :
Maxime Leclerc

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Antonella Cattaneo, présidente-rapporteur
Marc Amyot, directeur de recherche
Dolors Planas, co-directrice
Kevin Wilkinson, membre du jury

Résumé

Les thiols à faible masse moléculaire (FMM) peuvent affecter la biodisponibilité du mercure et mener à une plus grande production de méthylmercure par les microorganismes méthylants. Les résultats d'une étude réalisée au sein de la matrice extracellulaire du périphyton de la zone littorale d'un lac des Laurentides ont démontré que les concentrations en thiols à FMM retrouvées dans cette matrice sont jusqu'à 1000 fois supérieures à celles de la colonne d'eau avoisinante. Ces thiols sont significativement corrélés à la chlorophylle a du périphyton, suggérant une production par les algues. Le mercure de la matrice extracellulaire, plus spécifiquement dans la fraction colloïdale mobile, est aussi corrélé aux thiols d'origine algale. Ces résultats suggèrent qu'une accumulation de thiols s'opère dans l'espace extracellulaire du périphyton et qu'ils peuvent favoriser le transfert du mercure vers les microorganismes produisant le méthylmercure. Les résultats d'une seconde étude menée sur les méthodes de préservation d'échantillons d'eau pour la conservation des thiols à FMM ont démontré que la température optimale d'entreposage était de -80 °C et que la lyophilisation menait à une sous-estimation des concentrations mesurées. Les taux de dégradation étaient plus rapides lors de la conservation à -20 °C et variables selon la chimie de l'eau utilisée et les espèces de thiols observées. Suivant ces résultats, nous proposons un cadre de recherche pour de futures études sur la spéciation du mercure dans le périphyton et nous suggérons des précautions lors de la manipulation et de la conservation des thiols à FMM d'échantillons naturels.

Mots-clés : Thiols, glutathion, biofilms, périphyton, mercure, soufre, lacs, méthylation,

Abstract

Low molecular weight (LMW) thiols can affect the bioavailability of mercury and by enhancing methylmercury production by methylating microorganisms. Results of a study conducted within periphyton extracellular matrix in the littoral zone of a lake of the Laurentians have shown that LMW thiol concentrations found in this matrix are up to 1000 fold higher than those in the water column of surrounding waters. Relationships between these thiols and periphyton chlorophyll *a* were significant, suggesting production by algae. Mercury in the extracellular matrix, especially in the mobile colloidal fraction, was also correlated to thiols from algal sources. These results suggest thiol accumulation in the periphyton extracellular space, and that thiols likely promote mercury transfer to methylating microorganisms. A second study on preservation methods of natural water samples for LMW thiols conservation showed that a storage temperature of -80 °C was optimal and that freeze-drying led to an under-estimation of measured concentrations. Degradation rates were faster with storage at -20 °C and varied substantially depending on the chemistry of the water used as depending on thiol species observed. In regards of these results, we propose a research framework for future studies on mercury speciation processes in periphyton. We also suggest precautions on handling and storing natural samples for LMW thiol analyses.

Keywords : Thiol, glutathione, mercury, methylmercury, periphyton, biofilm, degradation, preservation, lake, methods.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et des abréviations	ix
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction générale	1
1.1. Organisation de l'introduction	1
1.2. Les thiols	2
1.2.1. Le cycle du soufre et les thiols.....	3
1.2.2. Rôles biologiques chez les microorganismes	8
1.2.3. La présence de thiols en eaux douces	14
1.3. Le mercure	17
1.3.1. Le cycle du mercure.....	17
1.3.2. La méthylation du mercure	19
1.3.3. Les thiols et le mercure	21
1.3.4. La méthylation du Hg chez les phototrophes.....	23
1.4. Les biofilms	24
1.4.1. Définition et importance des biofilms.....	24
1.4.2. Composition, structure et dynamisme des biofilms périphytiques	25
1.5. Les défis méthodologiques	27
1.5.1. Détection des thiols.....	27
1.5.2. L'oxydation des thiols.....	29
1.5.3. Préservation et dégradation des thiols.....	30
1.6. Objectifs de l'étude	32

1.7. Organisation du mémoire.....	34
Chapitre 2 : Relationship between extracellular low molecular weight thiols and mercury species in natural lake periphytic biofilms.....	36
2.1. Résumé.....	37
2.2. Abstract.....	38
2.3. Introduction.....	38
2.4. Materials and Methods.....	41
2.4.1. Experimental approach and sampling.....	41
2.4.2. Colloidal and capsular EPS fractions extraction.....	42
2.4.3. LMW thiol, MeHg, and total Hg analysis.....	43
2.4.4. Statistical Analyses.....	45
2.5. Results and Discussion.....	45
2.5.1. Spatial and temporal biofilm composition.....	45
2.5.2 Thiol concentrations in the water column and biofilm EPS fractions.....	47
2.5.3 Thiol sources in biofilms.....	51
2.5.4 Hg and thiols in the extracellular portion of biofilms.....	52
2.6. Acknowledgment.....	59
Chapitre 3 : Preservation and degradation of low molecular weight thiols from freshwater samples.....	60
3.1. Résumé.....	61
3.2. Abstract.....	62
3.3. Introduction.....	63
3.4. Materials and Methods.....	65
3.4.1. Materials and instruments.....	65
3.4.2. Sampled sites.....	66
3.4.3. Experimental design.....	67
3.4.4. Thiol analyses.....	69
3.4.5 Thiol degradation rates.....	70
3.4.6. Statistical analyses.....	71
3.5. Results.....	71

3.5.1. Effect of storage temperature on thiol degradation.....	71
3.5.2. Thiol degradation through different water matrices	73
3.5.3. Production of thiols through GSH degradation	74
3.5.4. Effect of thiol concentrations on degradation	77
3.5.5. Effect of freeze-drying and light exposure on thiols.....	77
3.6. Discussion	80
3.6.1. Storage temperature	80
3.6.2. Water matrix effects and GSH degradation	81
3.6.3. Effects of initial concentrations, light exposure and freeze-drying	83
3.7. Conclusion	84
3.8. Acknowledgment	85
Chapitre 4 : Conclusion	86
Bibliographie.....	93
Annexe A : Informations supplémentaires du chapitre 2.....	i
Annexe B : Tableaux des concentrations en thiols du lac Saint-Pierre de l'été 2012 et de l'été 2013.....	vii

Liste des tableaux

Table III.I. General characteristics of the natural water matrices used.....	67
Table III.II. Thiol degradation rate constants (k_D ; Means \pm Standard error) for control and natural water matrices stored at different temperatures.....	73
Table III.III. Thiol degradation rate constants (k_D ; Means \pm Standard error) for a natural water matrix initially amended with different concentrations of thiol solutions.....	78
Table A.I. MeHg and THg concentrations measured in both dissolved (0.45 μ m filtered) and total (unfiltered) water fractions for the different zones of Lake Croche on years 2012 and 2013.....	ii
Tableau B.I : Concentrations des thiols (moyenne \pm écart type) mesurées dans la phase dissoute des grands herbiers du lac Saint-Pierre en juin 2012 pour la γ -glutamylcystéine (γ -EC), l'acide thioglycolique (AT) la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) selon le temps de conservation à -20°C.....	viii
Tableau B.II : Concentrations des thiols (moyenne \pm écart type) mesurées dans la phase dissoute des grands herbiers du lac Saint-Pierre en août 2012 pour la γ -glutamylcystéine (γ -EC), l'acide thioglycolique (AT) la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) selon le temps de conservation à -20°C.....	x
Tableau B.III : Concentrations des thiols (moyenne \pm écart type) mesurées dans la phase dissoute des grands herbiers du lac Saint-Pierre en août 2013 pour la cystéine (CYS), l'acide thioglycolique (AT) la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) selon le temps de conservation à -20°C.....	xii

Liste des figures

Figure 1.1. Schéma simplifié du cycle du soufre conduisant à la formation de thiols (RSH) dans un lac non stratifié..	7
Figure 1.2. Biosynthèse du GSH à partir d'acides aminés et ses principales fonctions au sein d'une cellule algale.	10
Figure 1.3. Cycle biogéochimique simplifié du mercure pour un système aquatique..	19
Figure 2.1. Relationship between DW (a) and Chl a (b) as a function of AFDW in biofilms where samples were collected through three different times in summer.	46
Figure 2.2. Thiol concentrations (mean \pm SD) in water column (a) and in the extracellular portion of biofilms (b) for the different sampled months..	50
Figure 2.3. Relationships between Chl a concentrations measured in the biofilms and thiol concentrations of their extracellular portions.	53
Figure 2.4. Relationships between THg and thiol concentrations from the extracellular portion of biofilms.	55
Figure 2.5. Schematic representation of the hypothetical implication of biogenic LMW thiols (R-SH) on Hg cycling inside biofilms.	58
Figure 3.1. Summarized experimental design showing water matrices used, amended thiol concentrations, storage conditions, melting methods and light exposure for every experiment before thiol analysis.	69
Figure 3.2. Thiol concentrations in Lake Croche and control water spiked with 100 nM thiol solutions shown as a percentage of initial concentration (t_0) over time after storage in the dark at -20 and -80 °C.	72
Figure 3.3. Natural logarithm of thiol concentrations (nM) over time and k_D slopes (all significant; $p < 0.05$) from two natural water matrices initially spiked with 100 nM thiol solutions (t_0) and kept in the dark at -20 °C.	75
Figure 3.4. Thiol concentrations plotted over storage time from A. LSP and B. Lake Croche water matrices initially spiked with 100 nM GSH solutions and kept in the dark at -20 °C....	76
Figure 3.5. Thiol concentrations of Lake Croche water matrix amended with 10 nM thiol solutions after freeze-drying treatment (grey bars) and untreated samples (white bars).	79

Figure A.I. A bathymetric map of the middle basin of Lake Croche (St-Hippolyte, QC, Canada) showing the location of the different sampling sites (A to F).. iii

Figure A.II. Effect of different concentrations of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution in natural lake water (filtered at 0.45 μm) on the recovery of GSH from the capsular fraction of EPS after a first extraction of the colloidal fraction..... iv

Figure A.III. Boxplot of the main biofilm descriptors including DW, AFDW, and Chl*a* for sampled summer months..... v

Figure A.IV. Relationships between MeHg and thiol concentrations from the extracellular portion of biofilms vi

Liste des sigles et des abréviations

~ : about (*environ*)

-SH : sulfhydryl (*sulfhydrile*)

3-AMP : acide 3-mercaptopropionique

Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A

AFDW : ash free dry weight

ANCOVA : analysis of covariance

ANOVA : analysis of variance

APS : 5'-adénylsulfate

CH₃Hg : méthylmercure

Chla : chlorophyll *a* (*chlorophylle a*)

CYS (*Cys*) : cysteine (*cystéine*)

CYS-GLY : L-cysteine-L-glycine (*L-cystéine-L-glycine*)

DMS : diméthylsulfure

DOC (*COD*) : dissolved organic carbon (*carbone organique dissous*)

DOM : dissolved organic matter

DW : dry weight

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EPS (*SEP*) : exopolymeric substances (*substances exopolymériques*)

EROs : espèces réactives d'oxygènes

Fe²⁺ : ion ferreux

G S an⁻¹ : grammes de soufre par an

Glu : glutamate

Gly : glycine

GSH : glutathione (*glutathion*)

GSSG : oxydized glutathione (*glutathion sous forme oxydée*)

H₂S : sulfure d'hydrogène

Hcys : homocystéine

HDPE : high-density polyethylene
Hg : mercury (*mercure*)
Hg⁰ : mercure élémentaire
Hg²⁺ : mercure divalent
HPLC : high performance liquid chromatography (*chromatographie liquide haute performance*)
 k_D : degradation rate
KOH : potassium hydroxide
LMW (*FPM*) : low molecular weight (*faible poids moléculaire*)
LSP : Lake St. Pierre
MBrB : monobromobimane
MeHg : methylmercury (*méthylmercure*)
Mét : méthionine
MOD : matière organique dissoute
MSA : methanesulfonic acid
 p : p-value
 R^2_{adjusted} : coefficient of determination adjusted
RSH : reduced thiol (*thiol sous forme réduite*)
R-S-S⁻ : sulfures
R-S-SO₃ : sulfites
RSSR : oxydized thiol (*thiol sous forme oxydée*)
SBD-F : 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt
SI : supplementary information
SO₄²⁻ : ion sulfate
S-S : pont disulfure
 t_0 : time zero
TA (*AT*) : thioglycolic acid (*acide thioglycolique*)
TCEP : tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
THg : total mercury
UV : ultraviolet
 γ -EC : γ -glutamylcystéine

Remerciements

Ce mémoire a été réalisé grâce au support et à la guidance de mes deux directeurs de recherche, Marc Amyot et Dolors Planas. Je les remercie de m'avoir offert la possibilité de travailler au sein de leur équipe, de m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à l'accomplissement de ma maîtrise et d'avoir pris le temps, à chacune des étapes, de m'enrichir par leurs conseils et leurs commentaires. On m'avait déjà dit qu'ils formaient un tandem exceptionnel de superviseurs. Dolors et Marc, vous avez su ne pas faire mentir ces gens et je vous remercie une seconde fois pour ces belles années de collaboration.

J'ai eu la chance d'être accueilli pour quelque temps dans le laboratoire de Philippe Constant pour effectuer des tests en microscopie avec l'aide de Jessy Tremblay. Je les remercie tous deux pour leur très grande générosité et pour le partage de leur passion microbienne. Je remercie également l'équipe du GRIL, tout particulièrement Morgan Botrel et Stéphanie Massé, pour avoir mené avec brio les multiples campagnes d'échantillonnages et je remercie le personnel de la station de biologie des Laurentides de l'Université de Montréal pour leur aide et leur accueil chaleureux.

Je n'aurais pu réaliser ce mémoire sans la précieuse aide, en laboratoire comme sur le terrain, de plusieurs autres personnes dont Dominic Bélanger, Serge Paquet, Valérie René et tous les membres, anciens et actuels, du laboratoire Amyot.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leur soutien quotidien. Je remercie plus particulièrement ma copine pour son support, sa patience et surtout sa tolérance. Amélie, tu connais ça les thiols ? Et bien les v'là !

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1. Organisation de l'introduction

Le présent mémoire porte sur les thiols à faible poids moléculaire (FPM) retrouvés dans les environnements aquatiques, des molécules ubiquitaires chez le vivant et produites en grandes quantités par les organismes phototrophes. De récentes études en laboratoire ont démontré un effet positif de la présence de thiols à FPM sur les taux d'acquisition du mercure et la production de méthylmercure par certaines bactéries. Parallèlement à ces découvertes, plusieurs recherches ont identifié les biofilms périphytiques comme des sites actifs pour la méthylation du mercure dans les environnements lacustres. De ces études en milieu naturel, certaines ont observé une production de méthylmercure attribuable à des organismes photosynthétiques tels que les algues, alors que ce processus est *a priori* majoritairement lié à des procaryotes anaérobies. Le rôle joué par ces algues quant à la production de méthylmercure reste incertain à ce jour, mais une action indirecte par la production de composés organiques a été suggérée. C'est dans cette optique que les thiols à FPM, plus précisément ceux présents dans la portion extracellulaire des eaux douces, ont été choisis comme sujets d'étude. Ce mémoire s'attardera donc principalement aux liens entre la production de thiols à FPM et à la méthylation du mercure au sein de biofilms périphytiques.

Il sera question, en première partie d'introduction, de faire une revue de littérature sommaire exposant les connaissances actuelles sur les thiols à FPM des environnements dulcicoles quant à leurs fonctions, leur répartition et leurs origines. L'affinité de liaison des

thiols à FPM pour différents métaux, mais plus particulièrement pour le mercure, sera mise de l'avant et discutée brièvement. Ayant le potentiel de jouer un rôle important au niveau du cycle biogéochimique du mercure, les thiols seront par la suite couverts dans un contexte de molécules modulatrices de la production de méthylmercure par les microorganismes aquatiques faisant partie du périphyton. Ensuite, ces biofilms périphytiques seront présentés comme des consortiums microbiens actifs ayant des caractéristiques métaboliques et physicochimiques uniques, rendant possibles des interactions soutenues entre les microorganismes étroitement liés entre eux dans des environnements microscopiques hétérogènes. Finalement, les limites, les problématiques et les avancées liées à l'analyse et à l'échantillonnage des thiols à FPM sous formes dissoutes seront soulignées.

1.2. Les thiols

Les thiols forment un ensemble de molécules organosulfurées possédant un groupement sulfhydryle (-SH) lié à un atome de carbone. Ce groupement -SH qui les caractérise leur permet d'agir au sein de plusieurs transformations chimiques de natures abiotiques (Koval 2005), mais aussi au niveau de différentes voies cellulaires, tant chez les organismes unicellulaires que chez les organismes de niveaux organisationnels plus complexes (Noctor and Foyer 1998; Fahey 2001). Les thiols peuvent être présents en tant que groupements fonctionnels pour des macromolécules telles que les protéines, mais aussi « libres » sous forme de petits peptides, non liés à des macromolécules, dans l'espace cytoplasmique des cellules et dans les environnements aquatiques. Ces thiols sont alors appelés thiols non protéiques ou thiols à faible poids moléculaire (FPM). Il sera

essentiellement question de cette classe distinctive de thiols à FPM lors du présent travail. Ces thiols à FPM jouent un rôle clé dans le cycle biogéochimique du soufre, permettant une transition du soufre sous des formes inorganiques à des formes organiques (Andreae and Jaeschke 1992).

1.2.1. Le cycle du soufre et les thiols

Élément essentiel chez les plantes, les animaux et les microorganismes, le soufre est acquis sous plusieurs formes et est activement transformé par le vivant (Andreae and Jaeschke 1992; Canfield and Raiswell 1999; Giordano et al 2005). Le cycle biogéochimique du soufre est complexe : le soufre passe par différentes formes organiques et inorganiques et ses sources d'émission peuvent être d'origines naturelles ou liées à l'activité humaine. À l'échelle globale, on estime que les émissions dues aux processus biologiques des océans (embruns marins) contribuent pour environ 144×10^{12} grammes de soufre par an (g S an^{-1}) desquels moins de 10% atteignent la côte et les écosystèmes terrestres, créant ainsi une boucle d'émission et de déposition restant en milieu océanique (Whelpdale 1992; Schlesinger and Bernhardt 2013). Les volcans comptent aussi pour des sources de soufre naturelles considérables, éjectant environ 10×10^{12} g S an^{-1} dans l'atmosphère. Lors d'épisodes volcaniques violents, en présence d'éruptions majeures, ces émissions peuvent atteindre des niveaux jusqu'à 5 fois supérieurs (Bluth et al 1993). Moins importantes, les autres sources d'émission naturelles incluent le soulèvement de particules par le vent, la production biogénique côtière et terrestre, les feux de forêts et la production par les plantes. La quantification de ces émissions naturels reste encore aujourd'hui difficile à faire (Whelpdale 1992; Schlesinger and Bernhardt 2013).

L'activité humaine est néanmoins responsable des plus grandes émissions de soufre qui sont estimées à $50 \text{ à } 70 \times 10^{12} \text{ g S an}^{-1}$ (Schlesinger and Bernhardt 2013). L'utilisation de combustibles fossiles et les activités industrielles en sont les principales causes et sont majoritairement localisées dans l'hémisphère nord, où la pression anthropique est la plus soutenue (Whelpdale 1992; Giordano et al 2005). Par contre, grâce à des politiques de contrôle de la pollution de l'air, l'Europe et les États-Unis ont réussi à nettement diminuer leurs émissions atmosphériques de soufre, sous forme de dioxyde de soufre, depuis les années 1970 (Likens et al 2005).

Les connaissances associées aux cycles biogéochimiques continentaux du soufre sont limitées. Ces limitations sont principalement dues aux nombreuses sources biogéniques et à leur grande hétérogénéité, rendant difficile l'établissement de bilans globaux (Whelpdale 1992). Sommairement, ce manque à combler est lié à la grande diversité des écosystèmes terrestres, à la dispersion de ces écosystèmes couvrant différentes régions, à la difficulté de calculer les flux de soufre gazeux des différents sites et à la pluralité des espèces sulfurées émises (Cook and Kelly 1992). Ces bilans mériteraient cependant une actualisation du portrait global, par une révision complète des sources et des réservoirs, suite à une amélioration des estimés de la déposition des émissions atmosphériques par exemple (Schlesinger and Bernhardt 2013). Toujours est-il que l'amélioration sans cesse croissante de techniques d'imagerie par satellite permet aujourd'hui de meilleures cartographies de l'émission de différents éléments dont le soufre (Lee et al 2011; Streets et al 2013). Les suivis de la pollution atmosphérique sont de plus en plus précis et accessibles, la compréhension du cycle du soufre pourrait alors en bénéficier et être améliorée dans un futur rapproché.

Au niveau du continent, le soufre d'origine atmosphérique déposé à la surface des eaux peut subir différentes transformations le long de la colonne d'eau (Cook and Kelly 1992). En milieu lacustre, les apports de soufre sont majoritairement d'origine anthropique et principalement sous la forme d'ions sulfates (SO_4^{2-}), atteignant les lacs par déposition atmosphérique ou par le lessivage et le déversement des bassins versants. La figure 1.1 représente un schéma conceptuel des grandes étapes du cycle du soufre d'un lac; de l'entrée des sulfates dans le système à la biosynthèse des thiols et d'autres métabolites sulfurés. Brièvement, une fois à la surface d'un lac non stratifié, les sulfates migrent le long de la colonne d'eau jusqu'aux sédiments, traversant la zone oxygène des sédiments pour finir dans les zones anoxiques par diffusion ou bioturbation. Tout au long de cette descente, les sulfates sont soumis à des transformations chimiques et biologiques. À chacune des strates du lac, telles que la colonne d'eau oxygénée, la zone oxygène et la zone anoxique des sédiments, les sulfates sont assimilés par des microorganismes aquatiques comme les algues et les bactéries et sont intégrés à des composés organiques. Ainsi sont formés les premiers thiols et les organosulfates (Cook and Kelly 1992). Au niveau de la colonne d'eau, le plancton acquiert directement le soufre sous la forme de SO_4^{2-} par des transporteurs transmembranaires spécialisés (Giordano et al 2005). Lorsque les sulfates atteignent les zones anoxiques des lacs, ils pourront être réduits en sulfures, dont le sulfure d'hydrogène (H_2S), par l'activité de certaines bactéries réductrices (Holmer and Storkholm 2001). Les sulfates et les sulfures des zones anoxiques sont alors assimilés par les microorganismes les colonisant. Le soufre inorganique non consommé par les microorganismes sédimente au fond des lacs suite à une complexation avec de la matière organique ou avec des métaux sous formes réduites, tels que le fer (Fe^{2+}). Finalement, le soufre peut être remis en circulation dans le système par plusieurs mécanismes,

dont la production de gaz sulfureux, l'exsudation de molécules organosulfurées par les microorganismes ou l'oxydation des sulfures séquestrés dans les sédiments (Cook and Kelly 1992).

Les thiols peuvent être synthétisés par des réactions chimiques survenant majoritairement au niveau des sédiments des lacs. Le soufre inorganique, présent sous diverses formes réduites comme le H_2S , peut réagir avec des composés organiques tels que les substances humiques pour former des molécules organosulfurées, dont les thiols (Cook and Kelly 1992). Ces processus de formation abiotiques, se produisant surtout en zone anoxique, sont peu connus et ne représenteraient qu'une faible portion de la synthèse globale des thiols, lorsque comparés à la production venant du métabolisme d'organismes vivants (Koval 2005). Cette voie métabolique biologique est sommairement illustrée à la figure 1.1. Suite à son assimilation par la cellule, le SO_4^{2-} est d'abord changé en 5'-adénylsulfate (APS) avant d'être intégré à des polysaccharides ou des lipides pour former des polysaccharides sulfurés et des sulfolipides. L'APS peut aussi être réduit en sulfites (R-S-SO_3), puis en sulfures (R-S-S^-), deux étapes permettant la formation du premier thiol, la cystéine (CYS). La cystéine pourra être intégrée à des protéines ou mener à la biosynthèse d'autres thiols tels que le glutathion (GSH) et l'homocystéine (HCys), qui à son tour conduit à la synthèse de la méthionine (Mét) puis ultimement, à la formation de diméthylsulfure (DMS) (Andreae and Jaeschke 1992). Cette voie métabolique est typique des algues vertes d'eau douce, mais reste aussi très similaire à celle de plantes de niveaux organisationnels supérieurs (Giordano et al 2005).

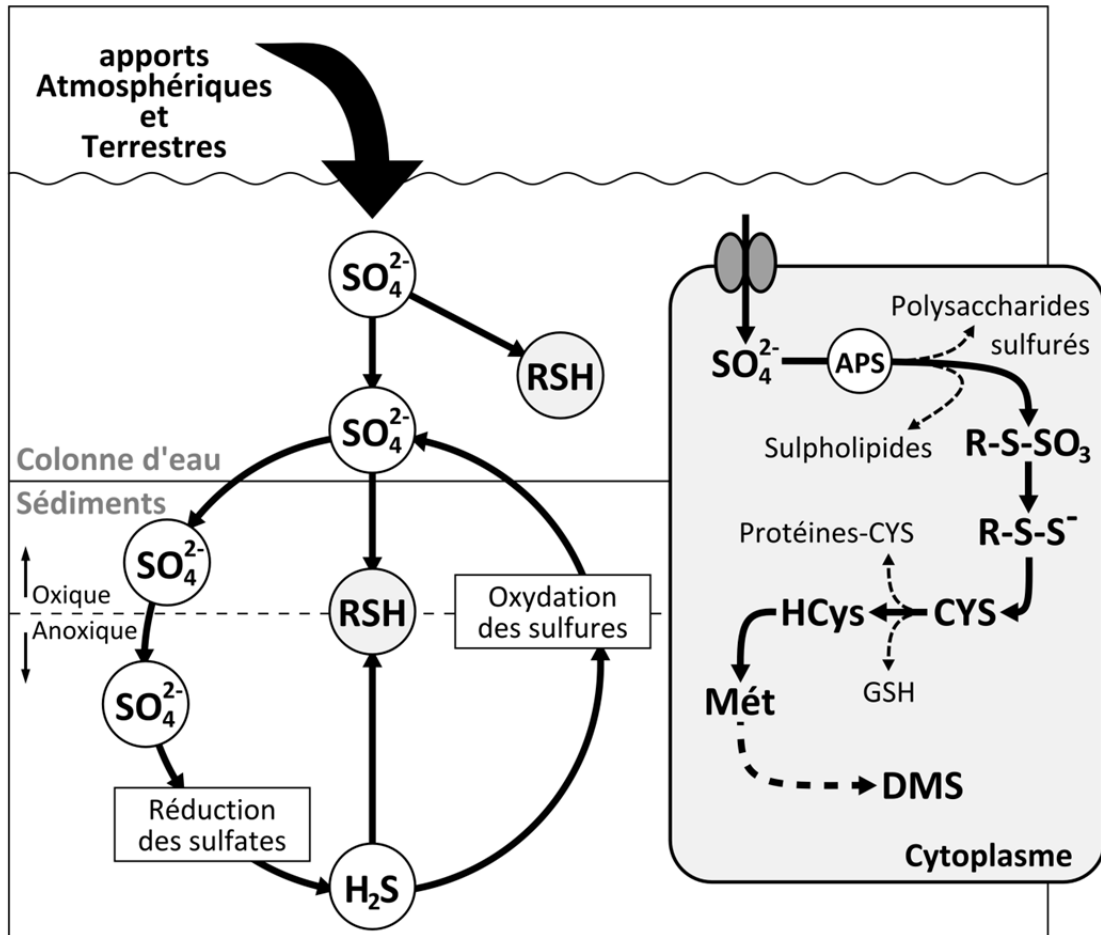


Figure 1.1. Schéma simplifié du cycle du soufre conduisant à la formation de thiols (RSH) dans un lac non stratifié. Le cycle biogéochimique (gauche) et les étapes allant de l'acquisition du SO_4^{2-} à la biosynthèse de composés organosulfurés au sein d'une cellule algale dulcicole (encadré gris de droite) y sont illustrés. La description de la figure et des abréviations se trouve dans le texte de la section 1.2.1. (modifiée de Andreae and Jaeschke 1992 et Holmer and Storkholm 2001).

1.2.2. Rôles biologiques chez les microorganismes

Les thiols sont ubiquitaires chez l'ensemble des organismes vivants (Fahey 2001) et occupent plusieurs rôles essentiels au sein de différentes cellules. Par exemple, l'acide aminé cystéine, lorsqu'associé aux protéines, permet le changement de conformation de la structure tertiaire et quaternaire de ces molécules par l'établissement de ponts disulfures (S-S), activant ou inactivant ainsi certains enzymes (Kadokura et al 2003). Outre ces fonctions enzymatiques indispensables que confèrent les groupements thiol aux protéines, plusieurs espèces de thiols situés dans l'espace intracellulaire répondent à différentes fonctions biologiques importantes lorsqu'ils sont retrouvés sous la forme de petits peptides. Chez les microorganismes, ces thiols à FPM, plus particulièrement le GSH, jouent essentiellement des rôles de protection cellulaire contre les stress oxydatifs (Polle and Rennenberg 1992) et participent à la régulation des concentrations d'ions métalliques (Satoh et al 2002) en plus de réduire les effets toxiques de certains métaux (Cobbett 2000).

1.2.2.1. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide formé d'un glutamate (Glu), d'une cystéine et d'une glycine (Gly) et peut se retrouver sous sa forme de base réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). De tous les thiols à FPM connus, il est le plus largement étudié. Son abondance et sa large distribution en font un thiol ayant un rôle d'antioxydant central chez plusieurs organismes. En fait, le GSH est retrouvé dans la presque totalité des espèces eucaryotes et est présent chez plusieurs procaryotes (Fahey 2001; Allocati et al 2009). Plus précisément, le GSH est absent chez la plupart des procaryotes anaérobies, mais se retrouve chez des bactéries

aérobiques telles que des cyanobactéries oxygéniques et certaines bactéries pourpres (Fahey 2001). La voie de biosynthèse du GSH se serait développé pendant ou peu après l'origine de la photosynthèse oxygénique et aurait été conservée dans l'ensemble des microorganismes capables de le produire (Fahey et al 1987) : passant d'abord par l'action d'une γ -glutamylcystéine synthétase, liant cystéine et glutamate pour produire la γ -glutamylcystéine (γ -EC) puis une GSH synthétase agit en second lieu, ajoutant une glycine à la γ -EC nouvellement formée (Meister and Anderson 1983; Noctor and Foyer 1998) (biosynthèse illustrée à la figure 1.2).

Le principal rôle du GSH est de protéger les cellules de la toxicité de l'oxygène, lequel est présent sous forme d'espèces réactives d'oxygène (EROs) produites lors de la respiration cellulaire ou de la photosynthèse (Noctor and Foyer 1998). La distribution du GSH au sein de différents groupes de microorganismes phototrophes et son absence chez les anaérobies strictes suppose une évolution conjointe entre l'acquisition de la photosynthèse oxygénique et la biosynthèse du GSH (Fahey et al 1987). Chez les algues, le GSH est typiquement retrouvé à des concentrations de l'ordre du millimolaire (mM) et peut représenter jusqu'à 90% de l'ensemble des thiols à FPM de l'espace intracellulaire. En plus de contrer les stress oxydatifs, le GSH est un acteur central au sein du cytoplasme. Les différents rôles du GSH sont illustrés à la figure 1.2. Il peut agir comme réserve de cystéine, mener à la production de plus longs peptides tels que les phytochélatines ou encore prévenir directement les effets néfastes de différents stress cellulaires, incluant des stress conférés par des ions métalliques (Cobbett 2000; Ahner et al 2002; Kawakami et al 2006b). Le GSH et conséquemment les phytochélatines ne sont cependant pas synthétisés par tous les microorganismes et sont donc absents chez plusieurs groupes procaryotiques.

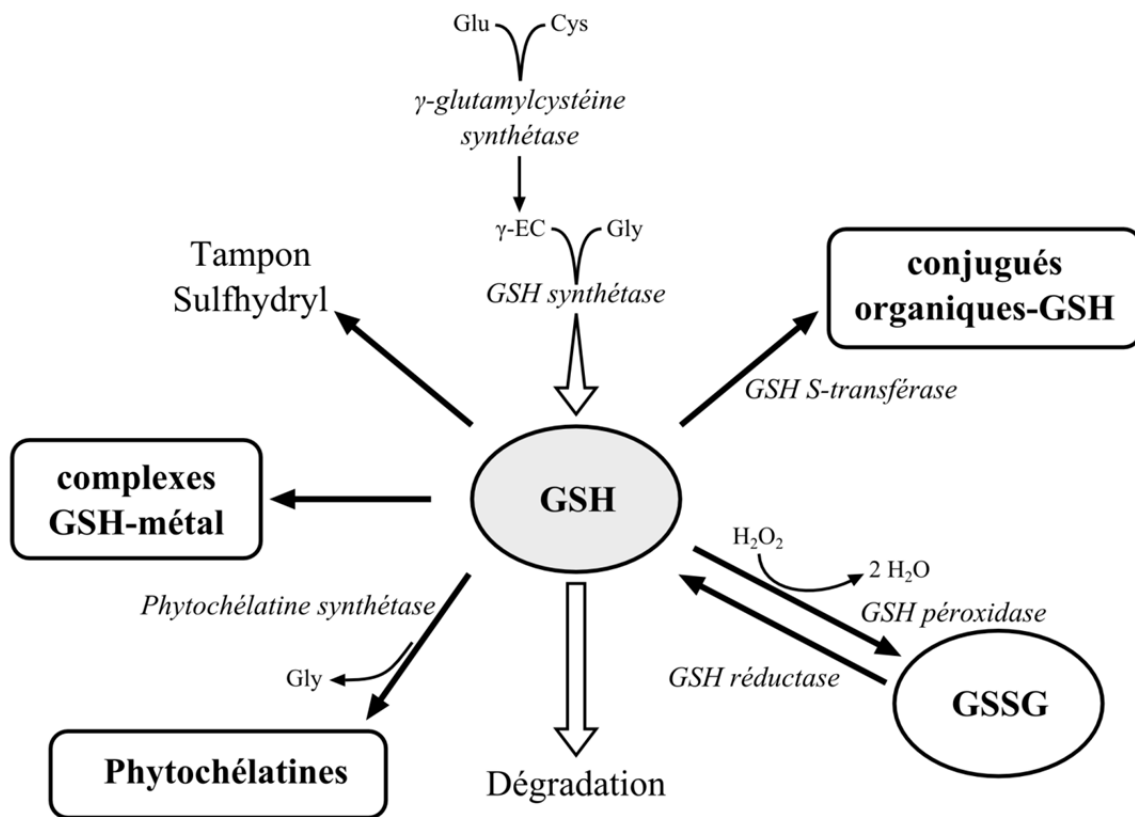


Figure 1.2. Biosynthèse du GSH à partir d'acides aminés et ses principales fonctions au sein d'une cellule algale (modifiée de Noctor and Foyer 1998, Ahner et al. 2002 et Kawakami et al. 2006).

1.2.2.2. Les thiols chez les procaryotes

Bien que présent dans l'ensemble du domaine eucaryote, à l'exception de quelques protistes ne possédant ni mitochondrie ni chloroplaste, le GSH est beaucoup moins répandu chez les procaryotes, surtout chez les bactéries à gram positif (Fahey 2001). Alors que certaines cyanobactéries et bactéries pourpres ont acquis la capacité de synthétiser le GSH, quelques genres de bactéries gram positifs, comme *Streptococci* et *Lactobacilli*, procèdent plutôt à l'importation du GSH provenant de leur environnement (Wiederholt and Steele 1994; Sherrill and Fahey 1998). Hormis ces procaryotes utilisant le GSH, un système de régulation impliquant des thiols à FPM autres que le GSH est indispensable à la survie de ceux incapables de le synthétiser. Plusieurs « nouveaux » thiols, désignés ainsi par Fahey (2001), ont été identifiés chez différents groupes procaryotiques. L'appellation de « nouveaux » thiols signifie, au sens large, les thiols intracellulaires différents du GSH. On assume alors une substitution du GSH par ces thiols pour assurer un rôle d'antioxydant (Fahey 2001). Ainsi, certains microorganismes utilisent plutôt des espèces de thiols analogues au GSH. Par exemple, le GSH amide, légèrement différent du GSH, est produit par *Chromatium*, un genre de bactérie anaérobie photosynthétique pourpre (Bartsch et al 1996). Un autre exemple est la γ -EC, substrat du GSH, qui est retrouvée en grandes quantités chez les halobactéries, des archaebactéries vivant dans des conditions d'hyper salinité, sans que le GSH y soit pour autant synthétisé (Newton and Javor 1985). Ces thiols serviront des fonctions similaires au GSH au sein des cycles intracellulaires impliquant les sulfures, permettant principalement de gérer les différents stress oxydatifs. Cependant, certains microorganismes tels que les méthanogènes et les mycobactéries n'utilisent pas de systèmes de régulation thiol liés au GSH. Ils exploitent plutôt des espèces de thiols s'éloignant de cette voie métabolique. Chez les méthanogènes, ce

serait le coenzyme M, nécessaire à la production du méthane, qui serait le thiol le plus important (Fahey 2001). Pour les Actinomycètes, le mycothiol, retrouvé à des concentrations intracellulaires de l'ordre du mM, fut identifié comme principal thiol antioxydant chez ces bactéries gram positif (Newton et al 1993; Newton et al 1996). Finalement, étant donné que le groupement -SH soit indispensable au fonctionnement cellulaire, il resterait à ce jour plusieurs espèces de ces « nouveaux » thiols à découvrir, identifier et caractériser chez une grande partie de microorganismes procaryotes (Fahey 2001). De plus, leurs implications possibles au sein de différents mécanismes de protection contre des stress oxydatifs sont encore un axe de recherche à explorer.

1.2.2.3. Les thiols chez les algues

Tel que mentionné précédemment, les thiols à FPM ont des fonctions de protection essentielles chez les microorganismes aérobies contre les effets potentiellement néfastes de la présence d'EROs. Qu'elles proviennent de l'environnement, de la respiration cellulaire ou de la photosynthèse, les EROs peuvent entraîner des dommages importants au niveau des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Pinto et al 2003). C'est pourquoi de nombreux organismes ont développé différents systèmes de protection intracellulaire où la production de thiols y opère un rôle central.

En ce qui a trait aux microorganismes phototrophes tels que les algues, les thiols agissent indirectement sur les EROs produites dans le milieu intracellulaire en grands nombres sous la forme de peroxyde d'hydrogène et de radicaux superoxydes lors de la photosynthèse. Ces EROs sont prises en charge par la cellule et réduites en molécules d'H₂O par le cycle ascorbate-glutathion. Ce cycle implique l'action de la GSH réductase, faisant passer le GSSG

à sa forme réduite, qui est ensuite utilisée comme substrat réducteur par d'autres enzymes afin de neutraliser les EROs (Noctor and Foyer 1998). Bien que cette utilisation du GSH soit cyclique et que les molécules de GSH soient conservées lors de son utilisation en boucle, les niveaux d'expression du GSH peuvent fluctuer selon l'intensité d'exposition de la cellule aux stress oxydatifs. Les concentrations intracellulaires de GSH varient donc d'une condition oxydative à l'autre (Polle and Rennenberg 1992). Les microorganismes photosynthétiques produisent une grande quantité de thiols liés à la biosynthèse du GSH pour contrer les dommages attribuables aux EROs comparativement aux microorganismes hétérotrophes aérobies qui doivent gérer de plus faibles concentrations d'EROs.

Chez les algues, les thiols sont également impliqués dans la gestion et le contrôle des concentrations intracellulaires d'ions métalliques. Ils permettent une tolérance à certaines concentrations de métaux par la séquestration de ces ions libres (Cobbett 2000). Plusieurs études en laboratoire ont pu démontrer une augmentation de la production de différentes espèces de thiols suite à l'exposition d'algues à des stress métalliques (Ahner et al 1994; Ahner et al 2002; Kawakami et al 2006b). La biosynthèse de ces thiols est une réponse rapide des microorganismes qui produisent la cystéine, le GSH et les phytochélatines, respectivement substrats les uns des autres. La réponse aux stress métalliques peut varier d'un organisme à l'autre et les concentrations de thiols produits dépendent de la nature du métal présent. Par exemple, chez *Thalassiosira weissflogii*, une diatomée marine, le cadmium est l'ion induisant la biosynthèse la plus rapide et la plus grande de phytochélatines (Ahner and Morel 1995), alors que chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une chlorophyte d'eau douce, l'exposition au mercure inorganique sous sa forme divalente mène principalement à la production de GSH (Howe and Merchant 1992).

Une fois synthétisées, les différentes espèces de thiols peuvent être recyclées pour une gestion des effectifs en molécules sulfurées au sein de la cellule. Ainsi, les phytochélatines sont dégradées en GSH, puis en cystéine. De plus, les thiols pourront, une fois le complexe thiol-métal formé, être exsudés par la membrane cellulaire et être relâchés dans l'environnement (Dupont and Ahner 2005).

1.2.3. La présence de thiols en eaux douces

À ce jour, bien que plusieurs recherches se soient penchées sur les thiols intracellulaires des organismes, peu d'études se sont attardées aux thiols retrouvés dans les milieux aquatiques naturels. Ce manque de recherches est d'autant plus marqué pour les thiols des environnements dulcicoles. En effet, alors que des études en laboratoire ont pu rapporter la production de thiols à FPM chez différentes espèces d'algues, peu ont observé les thiols de la phase dissoute, c'est-à-dire à l'extérieur des cellules, des milieux naturels d'eau douce (Zhang et al 2004; Hu et al 2006; Labonté-David 2012; Liem-Nguyen et al 2015).

Une fois produits par des microorganismes, les thiols d'origine biologique, comme le GSH et les phytochélatines, peuvent être largués dans l'environnement par exsudation ou lors de la lyse des cellules (Owens and Hartman 1986; Leal et al 1999; Dupont and Ahner 2005; Dupont et al 2006). Des études environnementales menées, tant en eau douce qu'en milieux marins, ont été en mesure de rapporter des relations entre les concentrations de certaines espèces de thiols dissoutes et des indices de biomasse algale telle que la chlorophylle *a* (Chl *a*) (Al-Farawati and van den Berg 2001; Hu et al 2006). Outre les thiols synthétisés par les microorganismes, certains sont formés dans l'environnement suite à la dégradation de

molécules organiques. De tels processus, souvent attribués à une activité bactérienne, ont été observés dans les zones anoxiques des sédiments. Le GSH est dégradé en cystéine, qui est subséquemment transformée en 3-mercaptopyruvate, en acide thioglycolique (AT) puis en mercaptoéthanol qui sera biologiquement consommé (Kiene et al 1990). De plus, le diméthylsulfoniopropionate, un composé organosulfuré largement répandu chez les algues d'environnements salins, peut mener à la formation d'acide 3-mercaptopropionique (3-AMP) suite à sa dégradation par les microorganismes des sédiments (Kiene and Taylor 1988). Selon Hu et al. (2006), une dégradation similaire de composés organosulfurés serait envisageable dans les zones aérobiques de la colonne d'eau. Des corrélations négatives ont été trouvées entre les concentrations de 3-AMP dissous et de carbone organique dissous (COD) de la colonne d'eau, où l'accumulation de 3-AMP était associée à de faibles niveaux de COD pour un site donné (Hu et al 2006). Ces auteurs suggèrent que la consommation du COD par les microorganismes et la production de 3-AMP puissent être deux processus liés. De plus, des expérimentations en laboratoire utilisant ces mêmes eaux naturelles ont pu conclure qu'un ajout de méthionine stimulait la production de 3-AMP; un indice supplémentaire de la production de thiols par la dégradation microbienne en zones oxygénées (Hu et al 2006).

Bien que le rôle joué par les bactéries aérobiques des eaux douces sur la production de thiols par la dégradation de molécules organiques mérite des recherches plus approfondies, les processus rapportés à ce jour dans les zones sédimentaires indiquent une importance certaine de ces microorganismes dans le cycle naturel des thiols. Les différentes espèces de thiols à FPM présentes sous formes dissoutes en eaux douces pourraient alors être classées en deux catégories selon leur origine : soit une biosynthèse directe, soit un produit de dégradation. Dans ces deux cas, les origines restent néanmoins à caractère biologique, où une participation

du vivant est nécessaire. Alors que des processus abiotiques peuvent aussi mener à la formation de différentes espèces de thiols, les processus biologiques représentent la majeure source de thiols dissous dans les environnements aquatiques (Koval 2005; Wei and Ahner 2005), tel que discuté précédemment.

La présence de thiols extracellulaires à FPM rapportée en eaux douces est généralement distribuée à différentes profondeurs le long de la colonne d'eau. Certaines espèces de thiol comme le 3-AMP ont des maximums de concentration à l'interface eau-sédiments, des zones peu oxygénées, alors que d'autres thiols tels que le GSH sont situés dans la zone photique de la colonne d'eau, au même niveau que la biomasse algale maximale (Zhang et al 2004; Hu et al 2006; Labonté-David 2012). Les quelques études couvrant les milieux dulcicoles ont mesuré des concentrations allant du nanomolaire (nM) au sub-micromolaire, dépendamment des espèces de thiols ciblées. Ces concentrations sont relativement faibles par rapport à l'ensemble des molécules et d'autres ligands organiques pouvant se lier aux métaux, dont le mercure pour lequel les thiols ont une forte affinité. Leur impact sur la spéciation de ces métaux dans l'environnement reste encore incertain (Ravichandran 2004).

La capacité des thiols à agir sur la biodisponibilité de certains métaux comme le mercure (section 1.3.3.) et leur importance au niveau du cycle du soufre (section 1.2.1.) justifient une recherche et un suivi plus approfondis. Une meilleure compréhension de leur comportement en milieu naturel et une connaissance plus accrue de leur répartition pour la phase dissoute des eaux douces sont alors souhaitables.

1.3. Le mercure

Le mercure (Hg) est un élément suscitant l'attention de la communauté internationale pour la menace qu'il pose sur la santé humaine et celle des écosystèmes (UNEP 2013). Son passage à différentes formes organiques et inorganiques est attribuable à des processus physiques, chimiques et biologiques. Les microorganismes sont les principaux responsables de la conversion du Hg inorganique en sa forme organique dite méthylée par un processus de méthylation du Hg. Une seule voie métabolique, dépendante du cycle de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), a été identifiée et décrite jusqu'à aujourd'hui (Choi et al 1994a; Choi et al 1994b). Cependant, il est maintenant reconnu que des voies indépendantes du cycle de l'acétyl-CoA existent (Ekstrom et al 2003; Lin et al 2013) et que différents groupes microbiens ont une incidence directe ou indirecte sur la méthylation du Hg. Les façons dont ils y participent et les voies indépendantes du cycle de l'acétyl-CoA restent toutefois toujours incertaines ou inconnues.

1.3.1. Le cycle du mercure

Par sa capacité à voyager sur de longues distances et ses effets néfastes sur la santé humaine, le Hg est un contaminant d'intérêt mondial. Alors que certaines sources d'émissions sont naturelles, telles que les éruptions volcaniques (Pyle and Mather 2003), les sources géothermales et l'érosion des sols (Pirrone et al 2010), l'activité humaine est responsable de sources considérables de Hg dans l'environnement. L'utilisation de combustibles fossiles compte parmi les sources anthropiques les plus importantes (environ 35%), mais les activités

d'orpaillage de certaines régions du globe et la combustion de déchets sont aussi responsables d'un apport abondant de Hg dans l'atmosphère (Pirrone et al 2010; Pacyna and Keeler 1995).

Le Hg possède un cycle biogéochimique relativement complexe, pouvant se trouver sous des formes organiques et inorganiques, telles qu'illustrées à la figure 1.3. De façon très sommaire, pour des milieux aquatiques lacustres, le mercure élémentaire (Hg^0) présent dans l'atmosphère est en partie oxydé pour se retrouver sous sa forme divalente (Hg^{2+}). Le Hg^{2+} est la principale forme de Hg qui se dépose à la surface des eaux sous des complexes solubles (*e.g.* lié à un ion chlorure ou hydroxyde) ou adsorbés à des particules et qui traverse la colonne d'eau jusqu'aux sédiments (Fitzgerald and Lamborg 2003). Dans l'eau, le Hg^{2+} peut être réduit en Hg^0 , principalement par des réactions de photoréduction (Amyot et al 1997), ou être transformé en méthylmercure (CH_3Hg ; MeHg) par des processus biologiques associés aux sédiments, aux biofilms périphtiques ou à la colonne d'eau (Furutani and Rudd 1980; Krabbenhoft et al 1998; Eckley et al 2005; Desrosiers et al 2006; Hamelin et al 2011). Ces différents changements d'état du Hg sont réversibles par des processus physiques, chimiques et biologiques et permettent un retour à sa forme élémentaire, puis ultimement à une volatilisation du Hg^0 de l'eau à l'atmosphère (Fitzgerald and Lamborg 2003).

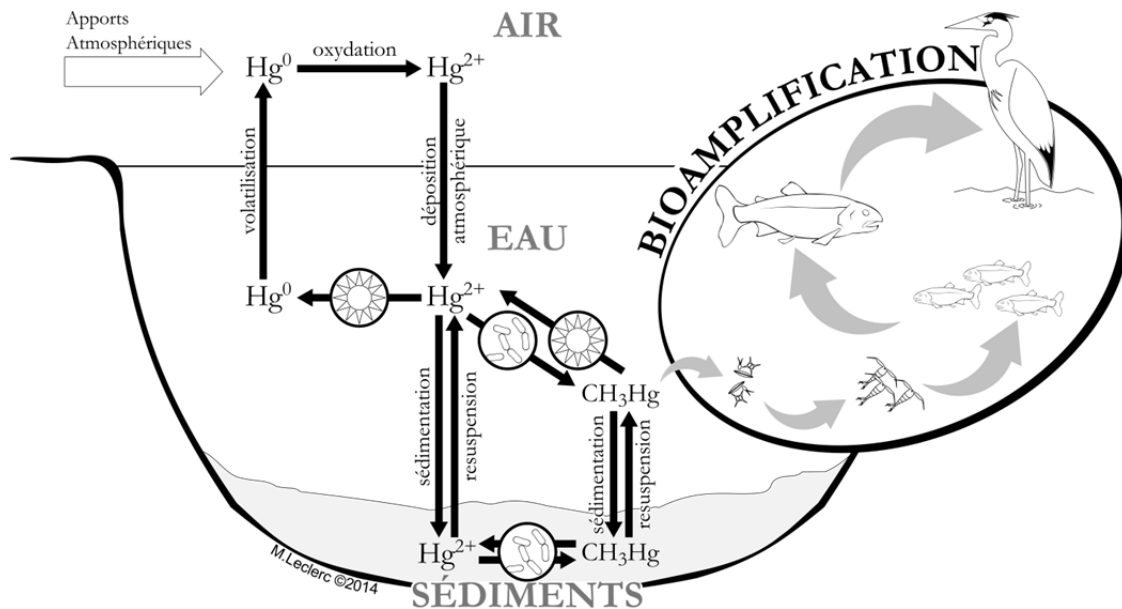


Figure 1.3. Cycle biogéochimique simplifié du mercure pour un système aquatique. Les processus de photoréduction et de photodéméthylation (soleil), de méthylation et de déméthylation microbiologiques (bâtonnets) ainsi que la bioamplification du méthylmercure (CH_3Hg) y sont illustrés.

1.3.2. La méthylation du mercure

Le MeHg, une neurotoxine bioaccumulable et bioamplifiable le long des niveaux trophiques, est certainement la forme de Hg posant le plus de problèmes toxicologiques pour la santé humaine et celle des organismes aquatiques à l'échelle mondiale (Fitzgerald and Lamborg 2003; Mergler et al 2007). Sa production, ou la méthylation du Hg^{2+} , est principalement résultante de processus biologiques conduits par des microorganismes d'environnements pauvres en oxygène tels que ceux occupant les zones sédimentaires (Furutani and Rudd 1980), certaines zones anaérobiques de la colonne d'eau (Eckley et al 2005) et les biofilms périphtiques colonisant la surface des macrophytes et des roches

submergées (Guimaraes et al 1998; Desrosiers et al 2006; Huguet et al 2010; Hamelin et al 2011; Achá et al 2012).

La paire de gènes *hgcA* et *hgcB* (complexe *hgcAB*) a récemment été identifiée responsable de la méthylation du Hg chez plusieurs microorganismes (Parks et al 2013). La découverte de ce complexe a mené à l'identification de nouvelles espèces microbiennes capables de méthyler le Hg. Les bactéries syntrophiques, les acétogéniques et les *Firmicutes* se sont alors ajoutées à la liste de microorganismes capables de produire du MeHg, dont les bactéries sulfato-réductrices (Gilmour et al 1992; Gilmour et al 2013), les bactéries ferro-réductrices (Fleming et al 2006) et les méthanogènes (Hamelin et al 2011) étaient les principales représentantes.

L'acquisition du Hg^{2+} chez les procaryotes est l'étape limitant la quantité de MeHg produit. Ainsi, la biodisponibilité du Hg serait le facteur affectant le plus grandement les taux de méthylation biologique. Alors que l'importation du Hg par les microorganismes était décrite comme un transport passif (Benoit et al 2003), des études plus récentes suggèrent une acquisition par transport actif du Hg^{2+} au travers de la membrane cellulaire (Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014). Plusieurs études se sont intéressées aux effets des composés sulfurés, tels que les thiols, sur la méthylation du Hg par différents microorganismes (Benoit et al 2001c; Benoit et al 2001a; Jay et al 2002; Schaefer and Morel 2009; Gilmour et al 2011). Bien que l'action des thiols sur la production de MeHg reste un sujet peu connu, des recherches ont été en mesure de relever un impact certain de leur présence lors d'expériences en laboratoire (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014). Les thiols et les sulfures, de par leur grande affinité pour le Hg et leur capacité à moduler la production de méthylmercure, seraient donc des ligands importants à considérer.

1.3.3. Les thiols et le mercure

Le soufre est un élément mineur de la matière organique dissoute (MOD), représentant de 0,5 à 2% de sa masse totale et est présent sous des formes oxydées et réduites, dont les thiols. Malgré les faibles concentrations en thiols compris dans la MOD, par rapport aux acides carboxyliques et aux autres groupes fonctionnels trouvés en abondance, le Hg a tendance à s'y lier préférentiellement (Ravichandran 2004). D'abord appelés mercaptans, du latin *mercurius captans* pour « capteurs de mercure », les thiols possèdent un groupement -SH leur conférant une forte affinité pour différents ions métalliques tels que l'argent et le cadmium. Cette affinité est d'autant plus grande avec le Hg (Hsu-Kim 2007). En plus d'observer une tendance à la formation de complexes thiol-Hg, des études en laboratoire ont pu constater l'effet de la présence de certaines espèces de thiols sur la production de MeHg par des bactéries ferro-réductrices (*Geobacter sulfurreducens*), des bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans* ND132) et des diatomées (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Deng et al 2012; Schaefer et al 2014). La modulation des taux de méthylation du Hg par les thiols serait essentiellement due à une altération de la biodisponibilité du Hg, l'effet intracellulaire des thiols sur la méthylation du Hg n'est pas encore très bien connu. De plus, les effets sur la production de MeHg semblent être différents dépendamment de l'espèce de thiol utilisée et de l'espèce microbienne étudiée. Par exemple, pour la ferro-réductrice *G. sulfurreducens*, la taille du complexe thiol-Hg dicte le taux de son acquisition, où les petites molécules telles que la cystéine et le 2-mercaptopropionate l'accélèrent alors que les plus grosses molécules comme le GSH le diminuent (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011). Chez *D. desulfuricans* ND132, le GSH a l'effet inverse sur la vitesse d'acquisition du Hg, augmentant les taux de méthylation (Schaefer et al 2011). En plus des différences

observées entre ces deux modèles bactériens, la concentration des thiols doit être considérée. Des essais en laboratoire ont démontré qu'un taux maximal de méthylation était observé chez *G. sulfurreducens* pour des concentrations en cystéine de 10 nM, après quoi de plus grandes concentrations conduisaient à un déclin progressif de ces taux (Schaefer and Morel 2009). L'impact des thiols sur la production de MeHg serait donc complexe : les espèces de thiols présentes, leur concentration dans le milieu et l'espèce microbienne visée sont à prendre en considération. La présence de certains métaux tels que le zinc et le cadmium peuvent aussi interférer avec la spéciation du Hg par compétition de liaison (Schaefer et al 2014).

Les thiols auraient aussi une influence sur des processus de déméthylation du MeHg, la réaction inverse à la méthylation du Hg, faisant passer le MeHg au Hg^{2+} (voir la figure 1.3). La déméthylation du MeHg peut être induite par une dégradation microbienne (Oremland et al 1991), mais dans les zones photiques des lacs, la voie de dégradation la plus importante est de nature abiotique, liée à l'action des rayons ultra-violet (Sellers et al 1996; Lehnerr and St. Louis 2009). Il est alors question de photodéméthylation. Différents ligands, comme la MOD ou les ions chlorures, peuvent influencer ce processus de photodéméthylation en modulant les taux de dégradation du MeHg (Zhang and Hsu-Kim 2010; Black et al 2012). Les thiols faisant partie de la MOD, avec une grande affinité pour le Hg, leur effet sur la photodéméthylation du MeHg fut étudié en laboratoire. Il a été rapporté qu'en présence de GSH, la formation d'un complexe thiol-MeHg menait à une plus grande susceptibilité de dégradation du MeHg par l'action des rayons ultra-violet (Zhang and Hsu-Kim 2010).

Malgré ces caractères potentiellement importants des thiols sur le cycle biogéochimique du Hg, soit la formation de forts complexes, l'altération de la biodisponibilité du Hg, la production de MeHg et sa déméthylation, leur implication n'a pu être confirmée à ce

jour en milieu naturel. Alors que des prédictions théoriques prévoient une liaison préférentielle du Hg aux thiols, au détriment du reste de la MOD et d'autres ligands inorganiques, leur présence rapportée à l'état de traces serait insuffisante pour mener à une spéciation dominée par les thiols (Ravichandran 2004).

1.3.4. La méthylation du Hg chez les phototrophes

Les microorganismes phototrophes tels que les algues et les cyanobactéries sont généralement associés à des mécanismes de réduction du Hg. Cependant, des études indiquent qu'ils puissent jouer un rôle de manière directe ou indirecte au niveau de la production de MeHg (Grégoire and Poulain 2014). En effet, des expériences en laboratoire ont permis d'observer une méthylation du Hg par certaines espèces algales. Le mécanisme associé à cette méthylation est cependant encore incertain et mérite de s'y intéresser davantage (Pongratz and Heumann 1998; Deng et al 2012).

Les phototrophes pourraient, d'une autre part, contribuer indirectement à la méthylation du Hg par la création d'un environnement propice à la production de MeHg. L'excrétion de substrats organiques par le phytoplancton, la mort massive d'algues suite à une fleur d'eau ou la présence de périphyton sur les roches et les macrophytes peuvent engendrer une stimulation de la production de MeHg par les microorganismes méthylants en fournissant des environnements pauvres en oxygène et riches en nutriments (Desrosiers et al 2006; Grégoire and Poulain 2014). Des expériences utilisant des inhibiteurs de la photosynthèse sur les algues du périphyton ont montré une diminution significative du taux de méthylation du Hg par ces consortiums microbiens (Desrosiers et al 2006; Hamelin et al 2011). L'une des

hypothèses apportées par ces auteurs était que les organismes photosynthétiques produisent des molécules capables d'augmenter le taux d'acquisition du Hg inorganique chez les procaryotes méthylants et donc, de promouvoir la production de MeHg au sein du périphyton. Étant massivement produits par les algues, les thiols pourraient faire partie de ces molécules promotrices de la méthylation périphytique.

1.4. Les biofilms

1.4.1. Définition et importance des biofilms

Le périphyton, ou biofilm périphytique, consiste en un regroupement de microorganismes aquatiques étant fixés à un substrat submergé pouvant être de nature biologique ou abiotique. Dépendamment du type de substrat sur lequel il repose, le biofilm périphytique sera désigné par différents noms tels qu'« épilithon » et « épiphyton », faisant référence à la colonisation de roches ou de macrophytes, respectivement (Wetzel 2001). Bien que ces distinctions puissent avoir une grande importance sur la composition et le dynamisme du biofilm périphytique, soit par sa hauteur dans la colonne d'eau ou par les différents échanges possibles avec le substrat, le terme « biofilm » sera employé à des fins de généralisation.

Les biofilms sont présents dans tout écosystème aquatique ayant un apport en nutriments suffisant, ne restreignant pas les microorganismes à vivre sous leur forme planctonique plus efficace dans les milieux limités (Costerton et al 1995). Lorsque ces conditions favorables à la formation de biofilms sont présentes, l'activité microbienne totale

d'un écosystème donné peut être représentée jusqu'à 99% par des microorganismes attachés à des surfaces ou sous la forme de biofilms (Potera 1996). Les microorganismes phototrophes pourront participer à la colonisation et à l'expansion du biofilm, à condition que celui-ci prenne forme à une profondeur comprise à l'intérieur de la zone photique. Cette zone est représentée par la profondeur où au moins 1% de la lumière pénètre les eaux. La turbidité de la colonne d'eau et la composition intrinsèque du biofilm peuvent affecter la portée de cette zone photique (Hill 1996). Une fois sous forme de biofilm, suite à une colonisation du substrat, une organisation s'opère au sein de la communauté microbienne et certaines voies métaboliques alors absentes chez les formes planctoniques s'activent (Lin et al 2013). La considération et la compréhension de la mécanique des biofilms sont alors souhaitables pour plusieurs sphères de recherche se rapportant à l'écologie aquatique, dont les processus de spéciation, d'acquisition et de modification des métaux.

1.4.2. Composition, structure et dynamisme des biofilms périphtiques

Les biofilms périphtiques sont composés d'algues, de bactéries, de champignons, et de micro-invertébrés occupant différentes zones et étant étroitement liés les uns aux autres au sein de ce consortium (Wetzel 2001; Hagerthey et al 2011). Les biofilms contiennent de la matière organique et inorganique provenant de la mort cellulaire et de la déposition de la matière en suspension en provenance de la colonne d'eau. La matrice extracellulaire des biofilms peut contenir jusqu'à 97% d'eau en plus des substances exopolymériques (SEP) et de divers composés d'origine cellulaire. L'architecture des biofilms est assurée par l'établissement d'un réseau de SEP ayant plusieurs fonctions, tant pour les microorganismes

les produisant que pour l'écosystème (Wotton 2011). Au niveau des microorganismes, les SEP leur confèrent la capacité de s'ancrer et de se déplacer en plus de les protéger de la dessiccation, d'offrir une résistance aux toxines et de permettre la séquestration de nutriments présents dans le milieu (Gerbersdorf et al 2009). En ce qui a trait aux implications écosystémiques, les SEP stabilisent les sédiments, altèrent l'adsorption des contaminants, agissent comme source importante de nourriture pour les invertébrés benthiques et participent à l'introduction de contaminants dans la chaîne trophique (Bhaskar and Bhosle 2006; Gerbersdorf et al 2009).

Les SEP possèdent plusieurs caractéristiques capables de modifier les conditions environnementales ambiantes du biofilm (Buffle et al 2009). Ces SEP sont principalement constituées de polysaccharides, de 40 à 95%, de protéines, jusqu'à 60%, et de façon moins importante de lipides, d'acides nucléiques et de biopolymères (Gerbersdorf et al 2009). La présence de plusieurs groupes fonctionnels sur les SEP a une grande influence sur la distribution des ions métalliques et exerce donc une action sur la rétention et la biodisponibilité des métaux. Par exemple, les SEP de faible masse moléculaire ont plus d'affinité pour des métaux comme le calcium et le cadmium alors que celles de plus grande masse moléculaire se lient préférentiellement au plomb (Alasonati et al 2010). Cela a pour incidence que le plomb est, au final, moins mobile que les deux autres métaux à l'intérieur du biofilm (Alasonati et al 2010). Une étude a observé des concentrations en fer plus élevées dans les SEP qu'à l'intérieur des cellules, suggérant que l'accumulation du fer dans le périphyton se produit dans la matrice extracellulaire du biofilm et non par son acquisition dans les cellules (Letovsky et al 2011). Des résultats similaires ont été observés pour la distribution du Hg, où une grande portion était associée aux SEP, induisant une sédimentation du Hg pour certains

types bactériens, se qui pourrait être un mécanisme de protection adopté par ces cellules (François et al 2012). D'autres catégories de microorganismes capturent plutôt le Hg dans l'espace extracellulaire, par des processus de biosorption liés aux SEP, limitant ainsi son acquisition (François et al 2012). Ces deux stratégies de résistance ou de tolérance au mercure témoignent de l'importance de l'étude de la matrice extracellulaire des biofilms.

1.5. Les défis méthodologiques

L'étude des thiols à FPM en milieux naturels implique plusieurs contraintes liées à leur sensibilité redox, à leur susceptibilité à la dégradation et à leur détection pour des concentrations peu élevées (Kawakami et al 2006b). Ces défis méthodologiques pourraient expliquer la faible quantité de recherches publiées à ce jour sur les thiols à FPM dissous, malgré leur importance certaine au niveau du cycle du soufre, des cycles biogéochimiques de plusieurs métaux et de la vie microbienne aquatique de façon plus générale.

1.5.1. Détection des thiols

Différentes méthodes analytiques ont été élaborées afin de détecter la présence de thiols à FPM dans la portion dissoute des eaux. L'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par fluorescence est la technique la plus répandue pour l'identification et la quantification de différentes espèces de thiols. Les analyses par HPLC impliquent l'utilisation de marqueurs spécifiques aux groupements –SH. Des différents marqueurs utilisés, le monobromobimane (MBrB) (Dupont and Ahner 2005; Kawakami et al

2006b; Dupont et al 2006) et l'ammonium 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonate (SBD-F) (Tang et al 2000; Zhang et al 2004; Hu et al 2006; Labonté-David 2012) sont les plus fréquemment retrouvés dans la littérature. Bien que ces deux marqueurs aient une grande affinité pour le groupement –SH des thiols, le SBD-F serait le plus hautement spécifique, n'induisant pas la détection d'autres groupes fonctionnels tels que les amines, les phosphates et les carboxylates, contrairement au MBrB (Kawakami et al 2006b). Malgré la grande sensibilité du SBD-F aux thiols, Hu et al ont rapporté que la matière organique pouvait causer de l'interférence avec la fluorescence liée à la cystéine. Ces auteurs n'ont pas été en mesure d'isoler convenablement le signal induit par la cystéine (Hu et al 2006). Des contrôles devraient donc être effectués sur les échantillons d'eau étudiés avant la quantification des concentrations naturelles afin d'isoler ces interférences potentiellement induites par l'utilisation de l'un ou l'autre des marqueurs. Des méthodes de voltampérométrie ont aussi été utilisées en milieux côtiers et estuariens pour détecter les concentrations en thiols (Al-Farawati and van den Berg 2001). Cependant, cette approche ne permet que de quantifier l'ensemble global des thiols, sans pouvoir discriminer une espèce de l'autre, contrairement aux techniques employant la HPLC par fluorescence.

De plus, les concentrations naturelles en thiols dissous étant habituellement faibles, la technique de détection utilisée doit mener à des limites de détection relativement basses. Les méthodes analytiques liées à la l'utilisation de la HPLC peuvent être problématiques pour la détection de plus petites concentrations en thiols. Pour contourner ce problème, certaines études effectuent d'abord un traitement de préconcentration des échantillons (Zhang et al 2004; Dupont et al 2006), mais l'impact de telles manipulations sur les concentrations initiales n'a pas été rapporté. Des efforts plus récents ont apporté de nouvelles méthodes analytiques pour la quantification des différentes espèces de thiols retrouvés dans la portion dissoute des

eaux naturelles. La pseudopolarographie cathodique, une technique améliorée de la voltampérométrie inversée cathodique classique (Laglera et al 2014) et le couplage de la chromatographie en phase liquide à l'ionisation par électronébulisation et spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS/MS) (Liem-Nguyen et al 2015) ont été suggérés pour l'analyse des thiols à FPM en eau salée et en eau douce respectivement. Ces nouvelles techniques améliorent les limites de détection et l'identification des différentes espèces de thiols à FPM.

1.5.2. L'oxydation des thiols

Tel que mentionné précédemment, les thiols à FPM peuvent être présents sous leur forme réduite (RSH) ou oxydée (RSSR). D'ordre général, les concentrations de ces deux formes sont obtenues par l'analyse successive de deux aliquotes. L'un est soumis à l'action d'un réducteur, faisant passer tous les thiols à leur forme RSH, alors que le second aliquote n'est pas réduit pour quantifier les thiols sous la forme RSH seulement. Il est alors possible de connaître la concentration de thiols sous leur forme RSSR en prenant la moitié (car la forme RSSR est constituée de $2 \times$ RSH) de la différence des concentrations mesurées avec l'ajout de l'agent réducteur ($[RSH + RSSR]$) par les concentrations mesurées sans ajout ($[RSH]$) (équation 1.1). Un ratio redox peut aussi être calculé par une division des RSH sur les thiols totaux ($RSH + RSSR$) afin de connaître le niveau d'oxydation (équation 1.2) (Rijstenbil and Wijnholds 1996; Kawakami et al 2006b).

$$[RSSR] = 0.5 \times ([RSH + RSSR] - [RSH]) \quad \text{équation 1.1}$$

$$\text{Ratio redox} = [RSH] / ([RSH] + [RSSR]) \quad \text{équation 1.2}$$

Une telle spécification entre les concentrations réduites et oxydées peut être importante pour des études de spéciation métallique car les molécules sous forme disulfure (RSSR) sont moins enclines à se lier ou à réagir avec les métaux (Zheng et al 2013; Schaefer et al 2014). Malgré cela, la majorité des études environnementales se contente de mesurer la totalité des thiols, sans discriminer les formes RSH des RSSR, en analysant chaque site une seule fois avec l'utilisation d'un réducteur (Tang et al 2000; Zhang et al 2004; Dupont and Ahner 2005; Dupont et al 2006). Les quelques études ayant comparé les ratios redox des thiols en milieu naturel ont rapporté des ratios allant de 0 à 1, dépendamment de la profondeur échantillonnée et des conditions redox de l'environnement (Mopper and Taylor 1986; Dupont et al 2006; Liem-Nguyen et al 2015). Les thiols présents dans les eaux porales des sédiments seraient préférentiellement sous la forme RSH alors que ceux dans les eaux en surface seraient plutôt sous la forme RSSR.

1.5.3. Préservation et dégradation des thiols

Étant sensibles à l'oxydation et à la dégradation, les échantillons d'eau destinés à l'analyse des thiols doivent être traités avec certaines précautions. Premièrement, les prélèvements devraient être réalisés à l'aide d'équipement préalablement lavé à l'acide afin d'éviter toute dégradation induite par une contamination de métaux traces ou de composés organiques (Kawakami et al 2006b). Pour l'échantillonnage d'environnements anoxiques comme l'eau porale des sédiments, une désoxygénation par saturation à gaz inerte devrait être appliquée à certains équipements, aux échantillons prélevés et aux réactifs utilisés (Carignan et al 1994; Simmons et al 2009). De plus, les manipulations analytiques devraient être

conduites en environnement exempt d'oxygène (Fahey and Newton 1987; Zhang et al 2004; Liem-Nguyen et al 2015). Néanmoins, une telle purge n'est habituellement pas appliquée lors de l'étude des zones oxiques de la colonne d'eau, mais l'utilisation de l'argon serait favorable à la stabilité des plus gros thiols tels que les phytochélatines (Simmons et al 2009).

Deuxièmement, étant sensibles à la photodégradation (Laglera and van den Berg 2006; Moingt et al 2010), les échantillons devraient être conservés à l'abri de la lumière durant le processus de conservation. Une fois la dérivation complétée, les thiols liés au SBD-F ou au MBrB sont stables pour une certaine période, allant d'une dizaine de jours à plusieurs mois, s'ils sont conservés au noir à des températures inférieures ou égales à 4 °C (Fahey and Newton 1987; Zhang et al 2004; England and Wilkinson 2011; Laglera et al 2014).

Finalement, la préservation des thiols pour la période précédant la dérivation est moins certaine, soit le moment entre l'échantillonnage et les manipulations en laboratoire. Alors que la majorité des études spécifient des analyses complétées au maximum 48 heures après l'échantillonnage initial, une telle vitesse d'exécution n'est peut-être pas réalisable pour des échantillonnages de grande envergure, dans des sites éloignés ou nécessitant une préconcentration des échantillons. Le temps et la température d'entreposage pourraient alors avoir des effets sur les concentrations en thiols mesurés (England and Wilkinson 2011). De plus, alors que certains protocoles spécifient l'étape d'une acidification *in situ* dès le prélèvement d'eau (Tang et al 2000), d'autres n'acidifient les échantillons qu'à la fin de la dérivation (Moingt et al 2010). Une standardisation est alors souhaitable quant aux méthodes de conservation et de préservation utilisées pour l'analyse des thiols à FPM des milieux dulcicoles.

1.6. Objectifs de l'étude

L'objectif général de ce projet est d'améliorer les connaissances sur la présence et la répartition des thiols à FPM de la phase dissoute pour différents environnements dulcicoles. Plus précisément, cette étude vise à savoir si les thiols à FPM sont des ligands importants à considérer lors de processus de spéciation pouvant influencer le cycle biogéochimique du mercure. Les travaux précédemment discutés en introduction ont été capables de démontrer l'importance des thiols pour les microorganismes aquatiques, le cycle du soufre et celui de certains métaux. Cependant, peu d'études se sont attardées aux thiols présents en eaux douces et leur potentiel à influencer la biodisponibilité du mercure n'a pu être démontré qu'en laboratoire. Ce mémoire tente de fournir de nouvelles données sur ces thiols au sein des biofilms périphytiques, soit dans l'espace extracellulaire du périphyton, à proximité des microorganismes. Nous tenterons de faire le lien entre les observations faites en milieu naturel quant à l'implication des algues dans la production de méthylmercure et les observations faites en laboratoire quant aux effets des thiols sur les taux d'acquisition du mercure par les microorganismes méthylants. De plus, nous suggérerons des précautions pour la préservation des thiols échantillonnés en eaux naturelles afin de standardiser les méthodes d'entreposage.

Ainsi, le premier objectif du mémoire est *de mesurer les thiols à FPM au niveau de la matrice extracellulaire de biofilms périphytiques et d'établir des relations entre ces thiols et le Hg au sein des biofilms dans une optique de formation de complexes thiols-Hg* (chapitre 2). Des substrats artificiels ont été utilisés dans un lac des Laurentides pour recueillir les biofilms et ainsi explorer les différentes portions du biofilm, dont la matrice extracellulaire, une approche novatrice. Nous nous sommes attardés aux concentrations en thiols extracellulaires, en Hg total et en MeHg, en plus de mesurer des descripteurs du biofilm

tels que la masse sèche, la masse sèche sans cendre et la Chl *a*. L'investigation de ces constituants du biofilm a pour but d'établir des corrélations entre les concentrations de différentes espèces de thiols à FPM et les descripteurs de masse afin de connaître la provenance des thiols de la matrice extracellulaire du biofilm. La capacité de rétention des thiols du biofilm y est examinée en comparant les concentrations de la matrice extracellulaire à celles de la colonne d'eau avoisinant les biofilms. Toujours dans un contexte de spéciation au Hg, la découverte de concentrations plus importantes en thiols libres à proximité des microorganismes du biofilm pourra servir d'argument supplémentaire quant à l'implication probable des thiols sur le cycle biogéochimique du Hg. Notre hypothèse de départ est que, dans les biofilms périphytiques capables de produire du MeHg, les algues participent de façon indirecte à la méthylation du Hg via la production et l'exsudation de thiols à FPM qui augmenteront la biodisponibilité du Hg dans l'espace extracellulaire, ce qui engendrera une plus grande méthylation par les procaryotes.

Le deuxième objectif est ***d'établir un protocole de conservation et de manipulation d'échantillons naturels pour une conservation et une analyse optimales des thiols à FPM de la phase dissoute provenant de milieux dulcicoles oxygénés*** (chapitre 3). Nous nous pencherons sur les différentes conditions pouvant affecter la vitesse de dégradation des thiols, considérant la température et le temps d'entreposage, les traitements post-prélèvement et la nature des échantillons d'eau. La détermination des meilleures conditions pour la manipulation des thiols pourra améliorer les méthodes de prélèvement et d'entreposage d'échantillons naturels.

Par ailleurs, nous avons aussi participé à une étude de grande envergure avec le GRIL (Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique) dans les

grands herbiers du lac Saint-Pierre. Brièvement, plusieurs espèces de thiols à FPM de la portion dissoute de la colonne d'eau y ont été identifiées et quantifiées lors de campagnes d'échantillonnage ayant eu lieu en 2012 et 2013, pendant la période estivale. Plusieurs facteurs biologiques et physicochimiques ont parallèlement été mesurés le long d'un gradient amont-aval influencé par la présence d'importants tributaires agricoles. Cependant, ces données ne seront pas proprement intégrées ni discutées dans ce mémoire, mais plutôt ajoutées en annexes. Des ajustements supplémentaires restent toujours à être apportés.

1.7. Organisation du mémoire

Les résultats obtenus dans ce projet de maîtrise sont présentés sous forme d'articles scientifiques dans les deux prochains chapitres. Le premier article (chapitre 2) porte sur les thiols à FPM présents dans la matrice extracellulaire des biofilms périphytiques lacustres. Leur probable incidence au niveau du cycle biogéochimique du Hg, par la modulation de la biodisponibilité de ce dernier, y est discutée. Le second article (chapitre 3) traite de la dégradation des thiols à FPM dans des échantillons naturels conservés sous différentes conditions. Les effets des conditions de conservation, de la concentration par lyophilisation et de l'origine des échantillons naturels y sont entre autres traités. Finalement, un dernier chapitre de conclusions générales (chapitre 4) couvrira les résultats obtenus et les perspectives futures quant à l'étude des thiols à FPM des milieux aquatiques d'eau douce. De plus, tel que mentionné précédemment, les résultats concernant les thiols du lac Saint-Pierre sont présentés en annexe du mémoire (annexe B).

Les articles des chapitres 2 et 3 de ce mémoire ont été réalisés grâce à la participation de différents auteurs, leur participation est la suivante :

Chapitre 2. Leclerc, M., Planas, D. and Amyot, M. Relationship between extracellular low molecular weight thiols and mercury species in natural lake periphytic biofilms. *Environmental Science & Technology*. Présentement soumis.

M. Leclerc : Conception du projet d'étude; échantillonnage; analyses en laboratoire; traitements des données; rédaction initiale et finale.

D. Planas : Conception du projet d'étude; rédaction finale.

M. Amyot : Conception du projet d'étude; rédaction finale.

Chapitre 3. Leclerc, M., Planas, D. and Amyot, M. Preservation and degradation of low molecular weight thiols from natural freshwater samples. *PLoS ONE*. En préparation, prochainement soumis.

M. Leclerc : Conception du projet d'étude; échantillonnage; analyses en laboratoire; traitements des données; rédaction initiale et finale.

D. Planas : Conception du projet d'étude; rédaction finale.

M. Amyot : Conception du projet d'étude; rédaction finale.

Chapitre 2 : Relationship between extracellular low molecular weight thiols and mercury species in natural lake periphytic biofilms

Auteurs : Maxime Leclerc, Dolors Planas et Marc Amyot

Article publié dans la revue *Environmental Science & Technology* :

Environ. Sci. Technol., 2015, 49 (13), pp 7709–7716

DOI: 10.1021/es505952x

2.1. Résumé

L'acquisition du mercure est l'étape clé de la production par les microorganismes de la toxine bioamplifiable qu'est le méthylmercure. La complexation du mercure aux thiols à faible poids moléculaire (FPM) peut influencer sa biodisponibilité et par conséquent la production de méthylmercure. Des biofilms périphytiques ont été échantillonnés en été à l'aide de substrats artificiels laissés submergés pendant plus d'un an afin de permettre la colonisation d'une communauté microbienne naturelle dans la zone littorale d'un lac du bouclier boréal. Les concentrations en thiols (acide thioglycolique, L-cystéine-L-glycine, cystéine et glutathion) mesurées dans l'espace extracellulaire des biofilms étaient jusqu'à trois ordres de magnitude supérieures à celles retrouvées dans les eaux avoisinantes. Dans les biofilms, ces thiols ont le potentiel de contrôler la spéciation du mercure vu leur concentration élevée, contrairement à ce qui a été mesuré au niveau de la colonne d'eau. À l'exception de l'acide thioglycolique, les thiols du biofilm étaient fortement corrélés à la concentration en chlorophylle *a*, suggérant une origine algale. Le mercure total mesuré dans la matrice extracellulaire représentait $3 \pm 1\%$ du mercure retrouvé dans la totalité du biofilm et se situait en plus grandes quantités dans la fraction capsulaire de la matrice.

Nous proposons que des microorganismes phototrophes du périphyton tels que les algues puissent influencer la biodisponibilité du mercure par l'exsudation de thiols à FPM et donc, qu'ils puissent jouer un rôle important dans la production de méthylmercure au sein des biofilms.

2.2. Abstract

The uptake of mercury by microorganisms is a key step in the production of methylmercury, a biomagnifiable toxin. Mercury complexation by low molecular weight (LMW) thiols can affect its bioavailability and thus the production of methylmercury. Freshwater biofilms were sampled in the summer using artificial Teflon substrates submerged for over a year to allow natural community colonization in the littoral zone of a Boreal Shield lake. Inside biofilms, concentrations of different extracellular thiol species (thioglycolic acid, L-cysteine-L-glycine, cysteine, and glutathione) were up to three orders of magnitude greater than in the surrounding water column, potentially more readily controlling mercury speciation than in the water column. All biofilm thiols except thioglycolic acid were highly correlated to chlorophyll *a*, likely indicating an algal origin. Extracellular total mercury represented $3 \pm 1\%$ of all biofilm mercury and was preferentially found in the capsular fraction. Levels of LMW thiols of presumed algal origins were highly correlated with total mercury in the mobile colloidal fraction of biofilms. We propose that periphytic phototrophic microorganisms such as algae likely affect the bioavailability of mercury through the exudation of LMW thiols, and thus they may play a key role in the production of methylmercury in biofilms.

2.3. Introduction

The production of toxic methylmercury (MeHg) is a major area of concern in the global mercury (Hg) biogeochemical cycle. Biotic MeHg production has previously been identified in methanogens (Hamelin et al 2011), as well as in sulfate- (Gilmour et al 1992) and iron-reducing bacteria (Fleming et al 2006). However the recent identification of the gene

cluster *hgcAB* (Parks et al 2013), responsible for Hg methylation, and its occurrence in other microbial taxa (Gilmour et al 2013) indicates that a large variety of prokaryotes are also capable of MeHg production. In freshwater environments, methylation of inorganic Hg (*i.e.* Hg(II)) can occur in anoxic environments, such as lake sediments or hypolimnia (Furutani and Rudd 1980; Krabbenhoft et al 1998; Eckley et al 2005), as well as inside periphyton (biofilms) bound to rocks or macrophytes (Guimaraes et al 1998; Desrosiers et al 2006; Huguet et al 2010; Hamelin et al 2011; Achá et al 2012), where strong oxygen gradients are observed at a microscopic scale depending on, for instance, the balance between autotrophs and heterotrophs (Hagerthey et al 2011). Field studies in the Northern Hemisphere have shown that biofilms have the capacity to methylate Hg via methylating prokaryotes, and also that the inhibition of photosynthesis can lead to significant decreases in methylation rates, suggesting a role of algae in biofilm MeHg production (Desrosiers et al 2006; Hamelin et al 2011). Algae are dominant organisms colonizing biofilms and their role in the methylation process remains largely unknown (Grégoire and Poulain 2014). Whereas some laboratory evidence has shown the potential for direct methylation by algae (Pongratz and Heumann 1998), the effects may be indirect through the release of metabolites affecting inorganic Hg bioavailability. This study focused on this second hypothesis and examines low molecular weight (LMW) thiols as intermediates influencing MeHg production in natural biofilms.

The uptake of Hg by methylating organisms is the limiting step for microbial MeHg production (Schaefer and Morel 2009) and this uptake can occur passively through cell membranes (Benoit et al 2003) but also through active transport in the presence of organic ligands (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014). Laboratory studies have demonstrated the capacity of LMW thiols (*e.g.* cysteine) to affect the

bioavailability of Hg on methylating strains (Schaefer and Morel 2009) where the formation of a Hg-thiol complex, mainly in the form $\text{Hg}(\text{thiol})_2$ (Cardiano et al 2011), led directly to an increase in MeHg production. Thiols are ubiquitous molecules in living organisms with many biological functions (Fahey 2001; Kadokura et al 2003). In algae, LMW thiols essentially act through the ascorbate-glutathione cycle as antioxidants against reactive oxygen species, products of photosynthesis (Noctor and Foyer 1998). They are also involved in detoxification processes against metallic ion stress (Knauer et al 1998). Once produced, thiols can be found in the extracellular environment after algal exudation or cell lysis (Dupont and Ahner 2005; Dupont et al 2006). The few studies that have investigated the presence of dissolved LMW thiols in freshwater habitats have reported concentrations in the nanomolar range (Zhang et al 2004; Hu et al 2006; Labonté-David 2012) which are likely too low to efficiently compete with other organic ligands for complexation with Hg. However, no study has yet investigated extracellular thiols in aquatic biofilms, which are known to methylate Hg. We hypothesize that microorganisms in biofilms produce extracellular thiols and that those thiols accumulate to far higher concentrations than in the surrounding waters. If this is the case, thiols could compete with other ligands for Hg complexation and act as shuttles for Hg across the membranes of methylating microorganisms.

Lake biofilms are consortiums of substrate-attached microbes such as algae, bacteria, and fungi interrelated to each other (Hagerthey et al 2011). The biofilm matrix, constituting the extracellular space, is composed by exopolymeric substances (EPS) originating from pro- and eukaryote microorganisms in the biofilm and contains up to 97% of water (Flemming and Wingender 2001; Sutherland 2001). These EPS are roughly a mix of polysaccharides, proteins, and cellular debris and they affect the diffusion of substances in the aqueous phase

(Zhang et al 2011) in addition to providing the overall architecture of the biofilm (Flemming and Wingender 2001). They can be operationally divided between capsular EPS, a fraction tightly bound to cellular membranes, and colloidal EPS, a more loosely-bound fraction (Underwood et al 1995; Cyr and Morton 2006). It is likely that EPS will affect the distribution of Hg and thiols species in the biofilm matrix.

Considering the lack of data on the interactions between Hg species and LMW thiols in Hg methylating biofilms, the overall aim of this study was to characterize the distribution of these compounds in freshwater biofilm matrices and in surrounding waters. We sampled autotrophic biofilm grown on Teflon substrates settled in the littoral zone of a Precambrian Shield lake (Quebec, Canada). Previous studies have reported MeHg production in the biofilms in this same lake (Desrosiers et al 2006). We further characterize Hg partitioning between capsular and colloidal EPS fractions inside biofilms. Field studies such as this one are currently needed in order to assess how recent discoveries done in laboratory settings (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014) on the role of thiols on Hg cycling can be scaled up to natural ecosystems.

2.4. Materials and Methods

2.4.1. Experimental approach and sampling

Biofilms were grown *in situ* on Teflon artificial substrates in Lake Croche (0.18 km²; 45°59'N, 74°01'W), an oligotrophic Precambrian Shield lake, as a proxy for the natural rock biofilm community. Teflon mesh disks (9.6 cm² surface area; 70 μm pore size) were setup as described by Desrosiers et al. (2006) and submerged for 1 year (sites A to E) and 10 years (site F), anchored with a clay brick at 1 m depth in the littoral zone (see Supporting Information, SI,

Figure A.I). Three substrate setups were deposited at each site and one–set-up/month was sampled from June to August. Biofilms on disks from a given site were brushed, pooled, and suspended with filtered (0.45 μm) lake water from the sampling site in a 2 L glass bottle. Bottles were kept cold and in the dark during sampling. In the laboratory, biofilm samples were stirred until homogenization of the suspension and during subsampling. For EPS partitioning, 30 mL was transferred in Teflon tubes, stored at low temperature (4 °C) in the dark, and the fractions were extracted the following days. In addition, 20 mL of biofilm samples (or 15 mL when samples were very dense) were filtered on GF/F filters for algal biomass (Chl a) and on pre-combusted filters for total dry weight (DW) and ash-free dry weight (AFDW). All measurements were done in triplicate. The analysis of Chl a , DW, and AFDW are described in detail in Desrosiers (2005). Each month, triplicate water samples (~30 mL) were collected at 1 m depth (near artificial substrates) in 30 mL HDPE bottles, using a peristaltic pump with Teflon and Norprene tubing cleaned with 10% HCl solution and rinsed with lake water before sampling each site. Samples were filtered with a high capacity GWV groundwater sample filter (0.45 μm pore size; Pall). Plasticware was acid-washed (10% HCl) overnight as well as glassware (45% HNO $_3$; 5% HCl), then rinsed three times with Milli-Q water (18.2 M Ω •cm) and three times with filtered (0.45 μm) lake water. “Clean hands, dirty hands” protocol appropriate for trace metal sampling (St. Louis et al 1994) was used in the field.

2.4.2. Colloidal and capsular EPS fractions extraction

The two extracellular biofilm EPS fractions, colloidal and capsular (Underwood et al 1995), were extracted following the procedure used by Cyr and Morton (Cyr and Morton

2006). However, unlike Cyr and Morton, we used the entire extraction fractions instead of isolating EPS through precipitation. The resulting operationally-defined capsular fraction included Hg and thiols adsorbed both to capsular EPS and cell membranes, whereas the colloidal fraction included Hg and thiols adsorbed to EPS or dissolved in the matrix.

The colloidal fraction was first extracted using 30 mL of biofilm subsample. Samples were centrifuged at 20 000g for 20 min in a refrigerated (10 °C) centrifuge. The supernatant was decanted in Teflon tubes and put aside for thiol and Hg (*i.e.* total Hg and MeHg) analysis. The capsular fraction was extracted with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Fisher Scientific) using the centrifugation pellets. A 10 mmol L⁻¹ EDTA solution (considered optimal to avoid osmotic stress and lysis risks (Platt et al 1985; Cyr and Morton 2006); see SI, Figure A.II) was prepared with filtered natural water from Lake Croche. The extraction was performed by adding 30 mL of EDTA solution to the pellet, mixing, and incubating at room temperature on a shaker for 5 h. Samples were centrifuged and put aside as described for the colloidal fraction. Resulting pellets were freeze-dried (Freeze Dry System, Labconco, Kansas City, MO) and kept for Hg analysis.

2.4.3. LMW thiol, MeHg, and total Hg analysis

For thiol analysis, the protocol was mainly based on previous work conducted by Zhang et al. (Zhang et al 2004) To improve detection limits for thiols in water, filtered water samples were pre-concentrated 10-fold by freeze drying and diluted with 3 mL of Milli-Q water (Zhang et al 2004). For thiols in the EPS fractions, samples were measured without pre-concentration. Water samples, colloidal and capsular EPS fractions were analyzed separately by transferring 500 μ L into chromatographic vials. Every sample was buffered to pH 10.5

adding 200 μL of potassium borate buffer (boric acid 1 M, pH adjusted with KOH). Thiols were reduced adding 25 μL of 10% tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP; Fisher Scientific) and left for 15 min at room temperature. Oxidized and reduced thiols were all measured at once as total thiol concentration after TCEP disulfide reduction (Kawakami et al 2006b). Derivatization was achieved by adding 100 μL of 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F; Sigma-Aldrich) and heating in the dark at 60 °C for 1 h. The solution was stabilized after derivatization with 100 μL of 1 M methanesulfonic acid (MSA; Fisher Scientific). The vials were stored in the dark at 4 °C until HPLC analysis within 24 h after derivatization (Zhang et al 2004).

Total thiols were analyzed by HPLC-fluorescence (HPLC 1200 system, Agilent, Santa Clara, CA) equipped with an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm \times 100 mm \times 3.5 μm) and fluorescent detector operating at 385 nm excitation and 515 nm emission. Acetate buffer (0.1 M, pH 5.0) was used as solvent A and methanol (HPLC grade; Fisher Scientific) as solvent B at 1.0 mL min^{-1} . The flow of the gradient was: 10–15 min 0–20% B; 15–25 min, 20–100% B; 25–30 min, 100% B; 30–35 min, 100–0% B for a total run time of 40 min. Calibration curves were done using thioglycolic acid (TA), L-cysteine-L-glycine (CYS-GLY), cysteine (CYS) and glutathione (GSH) standards (Fisher Scientific and Sigma-Aldrich; $\geq 98\%$ except for CYS-GLY $\geq 85\%$) diluted in acetate buffer. The detection limit was defined as three times the standard deviation of 10 low concentration standards ($< 5 \text{ nmol L}^{-1}$) for every thiol species, giving 1.0 nmol L^{-1} for CYS, 1.1 nmol L^{-1} for TA, 0.4 nmol L^{-1} for CYS-GLY, and 1.0 nmol L^{-1} for GSH. EPS fractions results shown in volume units (*i.e.* nmol L^{-1}) have been calculated considering the volume of the biofilm (sampling area \times maximum estimated thickness) to allow comparison with the water column. The rest of the data is

expressed relative to the sampled biofilm surface area or DW (*i.e.* nmol cm⁻² or g⁻¹ DW of biofilm).

Total Hg (THg) and MeHg were measured in both colloidal and capsular EPS fractions and THg was measured in addition inside pellets (see SI for detailed descriptions of Hg analysis).

2.4.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with R software (R Development Core Team R 2011) ($\alpha = 0.05$). A two-way ANOVA test was used to compare thiols, MeHg, and THg concentrations between sites, EPS fractions, and sampling months. A post-hoc Tukey's test followed significant ANOVA tests (*anova()*, *aov()*, and *TukeyHSD()* functions were used). The *lm()* function was used for linear regressions.

2.5. Results and Discussion

2.5.1. Spatial and temporal biofilm composition

Biofilm descriptors (DW, AFDW and Chl*a*) were used as mass and algal biomass indicators. Total biofilm dry mass (DW; organic + inorganic components) ranged from 2.3 ± 0.1 to 13 ± 0.2 mg cm⁻². The organic dry mass of the biofilm (AFDW; microorganisms + organic detritus) ranged from 1.5 ± 0.1 to 7.2 ± 0.1 mg cm⁻² and the Chl*a*, representing algal biomass, fluctuated from 1.0 ± 0.1 to 11 ± 0.5 μ g cm⁻² throughout the summer. Differences in these indicators were significant between either sampling months and between sites (both $p < 0.05$; SI, Figure A.III). The general temporal trend indicated a maximum of DW, AFDW, and

Chl a in late summer. Linear regressions between descriptors showed a close positive relationship between DW and AFDW as well as between Chl a and AFDW, with R^2_{adj} of 0.95 and 0.89 respectively ($p < 0.001$; Figure 2.1).

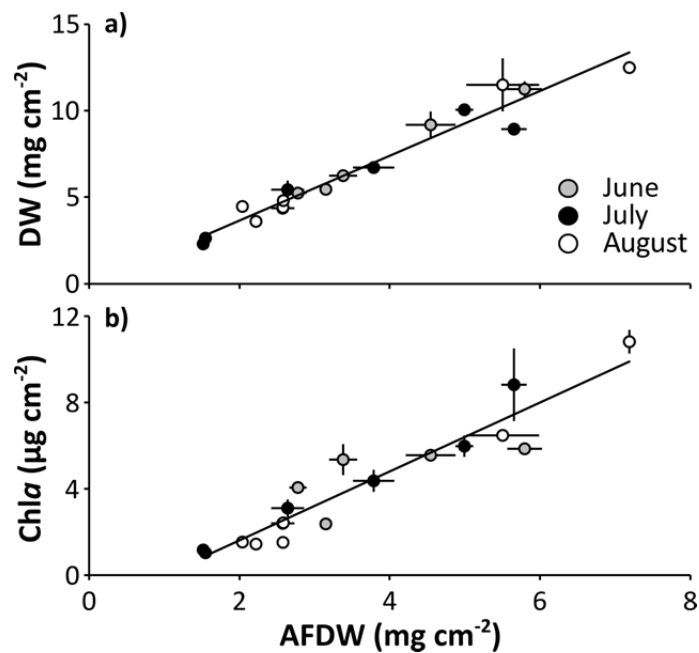


Figure 2.1. Relationship between DW (a) and Chl a (b) as a function of AFDW in biofilms where samples were collected through three different times in summer ($R^2_{\text{adj}} = 0.95$ and $R^2_{\text{adj}} = 0.89$ respectively; $p < 0.001$).

Spatial and temporal differences in biofilm mass likely reflect the heterogeneity of growth in different locations around the littoral zone and over the summer. Light and wind exposure, nutrient inputs, and grazing pressure may affect the spatial heterogeneity of biofilms in a lake. Thus, the sites A and B, isolated from the middle basin in a small bay, differed from the others and had the lowest DW, AFDW, and Chl*a* of all sites (SI, Figures A.I and A.IIIB). Moreover, the older substrates (colonized for 10 years) had the highest mass and algal biomass reflecting the effect of time on the accumulation of organic matter and biofilm growth. Furthermore, the composition of the biofilm mat varies throughout the summer with greatest values in August (SI, Figure A.IIIA). Biofilms keep expanding and accumulating living organisms, detritus, and organic matter through the summer (Lowe 1996). The relationship between DW and AFDW (Figure 2.1a) implies that there is a constant proportion of organic matter, including microorganisms, to total biofilm composition, with AFDW representing $55 \pm 6\%$ of the total biofilm mass over the summer. Furthermore, the strong relationship between Chl*a* and AFDW (Figure 2.1b) suggests a constant and proportional representation of algae over heterotrophic organisms in the biofilm. It may also indicate that organic matter is mainly derived from algal production and growth (Biggs and Close 1989). In any case, algae seems to play an important role in biofilm development in Lake Croche as previously reported in lake microcosms (Le Faucheur et al 2005) and freshwater sediments (Gerbersdorf et al 2009).

2.5.2 Thiol concentrations in the water column and biofilm EPS fractions

Concentrations of thiol species in the littoral water were $\leq 2.4 \text{ nmol L}^{-1}$. The dominant thiol species was TA (1.3 to 2.4 nmol L^{-1}), followed by CYS (0.25 to 0.94 nmol L^{-1}), GSH

(0.21 to 0.38 nmol L⁻¹), and CYS-GLY (0.14 to 0.35 nmol L⁻¹) (Figure 2.2a). Significant differences were observed between sampling periods for every thiol species, with greater concentrations in July and a decline in August, whereas no differences were found between sites. Thiol concentrations in the extracellular portion (colloidal + capsular EPS fractions) of the biofilm reached levels up to ~400 nmol L⁻¹ with a range of 23.4 to 412 nmol L⁻¹ for TA, 122 to 407 nmol L⁻¹ for GSH, 40.1 to 247 nmol L⁻¹ for CYS, and 45.7 to 121 nmol L⁻¹ for CYS-GLY (Figure 2.2b). Thiol concentrations measured in the extracellular portion of biofilms were approximately three orders of magnitude greater than in the surrounding water column. Thiol concentrations in capsular EPS fractions were generally greater than those in the colloidal fraction, except for TA where no significant difference was found between EPS fractions. Significant differences ($p < 0.05$) were observed between both sampling times and site locations, with higher concentrations found in late summer.

This is, to our knowledge, the first published data on extracellular thiols in aquatic biofilms and therefore, the first study to report greater concentrations in the extracellular portion of biofilms when compared to the surrounding water column. These high thiol levels likely result from an accumulation of thiols produced by microorganisms (*e.g.* algae and bacteria) in the biofilm (Fahey et al 1987; Dupont and Ahner 2005). It is unlikely that thiols diffused from the water column to the biofilm considering the concentration gradient in place. In fact, thiol production in the water column was not tightly coupled to biofilm processes. For example, no significant spatial differences in water thiol concentrations were observed in the littoral zone whereas there were significant differences in thiol levels in the extracellular portion of biofilms from the different sites (Figure 2.2). It should be noted that the method used to calculate extracellular thiol concentrations per unit of volume (data expressed in nmol

L⁻¹) is conservative and may be an underestimation. First, we assumed that the extracellular volume was equal to the total biofilm volume, even though part of the biofilm volume was occupied by cells and detritus. Secondly, we used maximum biomass thickness (ranging from 2 to 7 mm, depending of sampled sites) in volume calculations, even though the thickness of the biofilm may vary substantially. Nonetheless, our estimates still show that the extracellular biofilm matrix has the ability to retain some of the thiols produced.

Periphytic biofilms are often characterized by strong redox gradients and it is conceivable that both oxidized and reduced thiols are present. In this study, total thiols were measured without differentiating reduced from oxidized forms even though oxidized thiols might be less inclined to bind to Hg ions. However, we anticipate that a significant fraction of thiols will remain in the reduced state in oxic environment, since metallic ions can hamper thiol oxidation (Hsu-Kim 2007).

Nevertheless, since thiols are three orders of magnitude more concentrated in the biofilm matrices than in the water, it is likely that they play an important role in chalcophile metal complexation. It is indeed possible that they outcompete dissolved organic carbon (DOC), mainly formed of humic and fulvic acids in lake water, which is usually thought to be a key metal complexing agent in lakes (Ravichandran 2004). Further, studies should examine if these high levels of LMW thiols can outcompete other large molecular weight ligands found in the DOC pool of extracellular portion of biofilms. This DOC pool is very poorly characterized in terms of concentration and main functional groups in the literature.

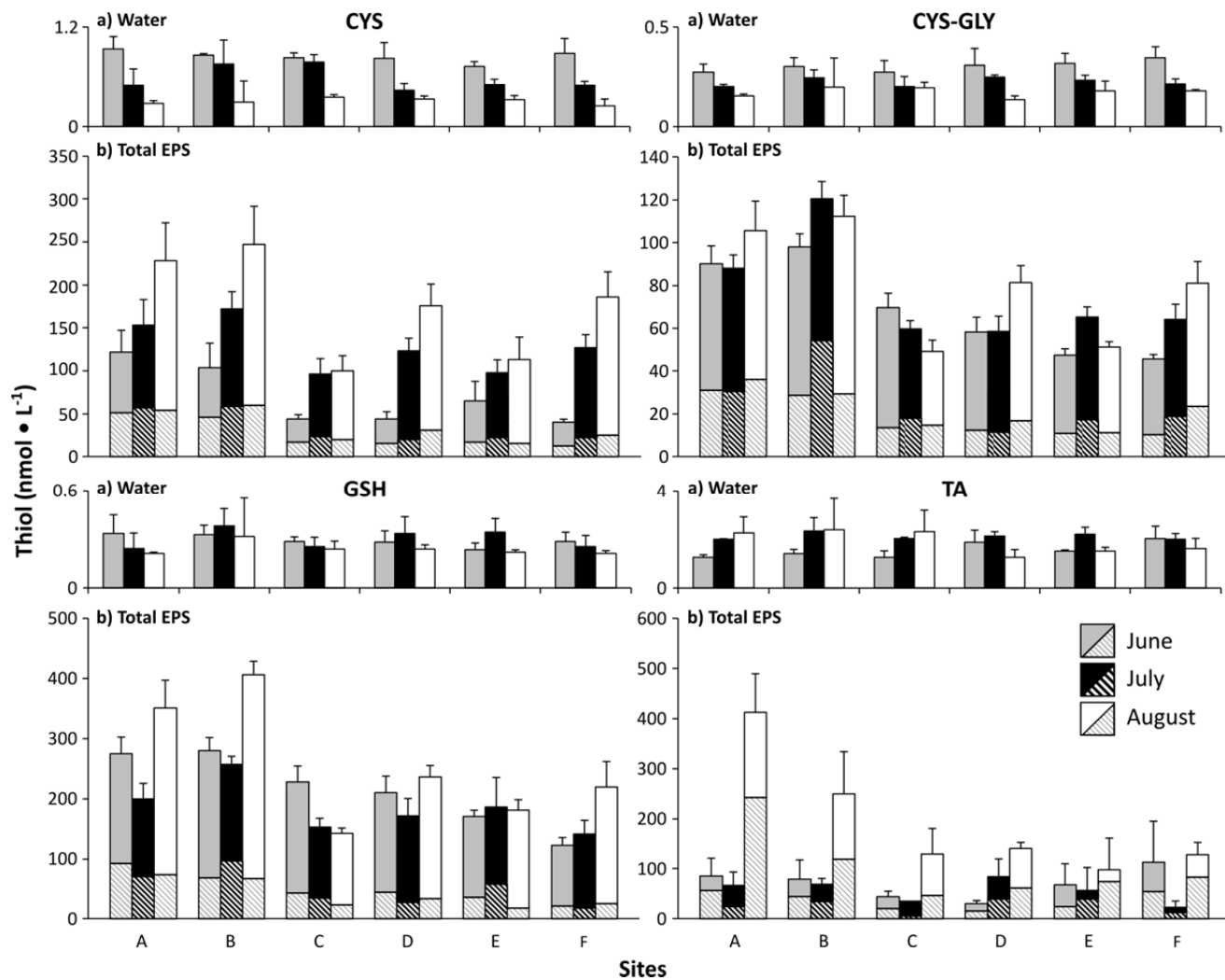


Figure 2.2. Thiol concentrations (mean \pm SD) in water column (a) and in the extracellular portion of biofilms (b) for the different sampled months. The height of the columns represents the total extracellular concentrations and is the addition of colloidal (cross-hatched bars) and capsular (filled bars) EPS fractions.

2.5.3 Thiol sources in biofilms

Many previous studies have shown that *Chla* is the best explanatory variable for the dissolved and particulate thiol species concentration in the water column (Tang et al 2000; Al-Farawati and van den Berg 2001; Hu et al 2006; Dupont et al 2006). Yet these studies have also found that the proportion of variance explained (R^2) by *Chla* is typically low, especially for dissolved thiols (*i.e.* thiols outside cells) (Tang et al 2000; Dupont et al 2006). In contrast, our study found that the relationship between thiol species and biofilm *Chla* (Figure 2.3) yielded significant and strong positive relationships with CYS, CYS-GLY, and GSH ($R^2_{\text{adj}} = 0.43, 0.72, \text{ and } 0.85$ respectively; $p < 0.01$) except for TA which was never significant ($p > 0.05$).

These different relationships between *Chla* and thiol species likely indicate that different thiols come from different biotic or abiotic sources. The correlations between the group of GSH-related thiols (*i.e.* CYS, CYS-GLY, and GSH) and *Chla* suggest an algal source. Both GSH and CYS-GLY, which is a GSH substrate, had close relationship to *Chla*, indicating a similar path of production (Noctor and Foyer 1998). Algae are known to synthesize GSH as a detoxification mechanism to decrease intracellular oxidative stress (Howe and Merchant 1992; Noctor and Foyer 1998). Once produced, algae can release these biosynthesized thiols into the environment through exudation or cell lysis (Dupont et al 2004). The subsequent degradation of extracellular GSH through biotic and abiotic processes can lead to other species formation such as CYS and CYS-GLY (Kiene et al 1990). Dupont et al. have previously hypothesized that microbial degradation of exuded GSH was a source of smaller thiol species via peptidase or protease actions in marine environments (Dupont et al 2006). While GSH is present in the majority of eukaryotic organisms (Meister and Anderson 1983;

Fahey et al 1987), its presence in prokaryotes is uncommon, unlike CYS which may play an important detoxification role in such microorganisms (Fahey 2001) in addition to being found in many proteins (Kadokura et al 2003). The weaker relationship of CYS with Chl a compared to CYS-GLY may reflect the fact that CYS is ubiquitous in bacteria and algae, whereas CYS-GLY is mainly linked to GSH algae production.

The lack of relationship between TA and Chl a suggests that TA is not directly produced by algae. A study using anoxic coastal sediments has shown that TA appears in bacterial degradation of larger peptides (Kiene et al 1990). Other small thiol species, such as 3-mercaptopropionic acid, have also been reported as by-products of bacterial degradation of large sulfur-containing organic molecules (Kiene et al 1990; Tang et al 2000). We could therefore expect a similar pathway of TA production in biofilms. Overall, our results and the current literature suggest that the GSH-related compounds measured in the extracellular matrix of freshwater lake biofilms are of algal origin, whereas TA is of bacterial origin.

2.5.4 Hg and thiols in the extracellular portion of biofilms

THg concentrations varied between 82.8 and 182 ng g⁻¹ DW for total biofilm (biofilm pellet + both EPS fractions; results not shown), 0.721 to 3.55 ng g⁻¹ DW for colloidal, and 1.08 to 4.86 ng g⁻¹ DW for capsular EPS fraction (Figure 2.4). In the extracellular portion, significant differences were observed for THg concentrations between sites, months ($p < 0.001$) and EPS fractions ($p < 0.05$). MeHg concentrations ranged from 0.01 to 0.08 ng g⁻¹ DW for the colloidal fraction and 0.01 to 0.09 ng g⁻¹ DW for capsular fraction (SI, Figure A.IV). The differences were significant for both sites and months ($p < 0.001$) but not between EPS fractions ($p > 0.05$).

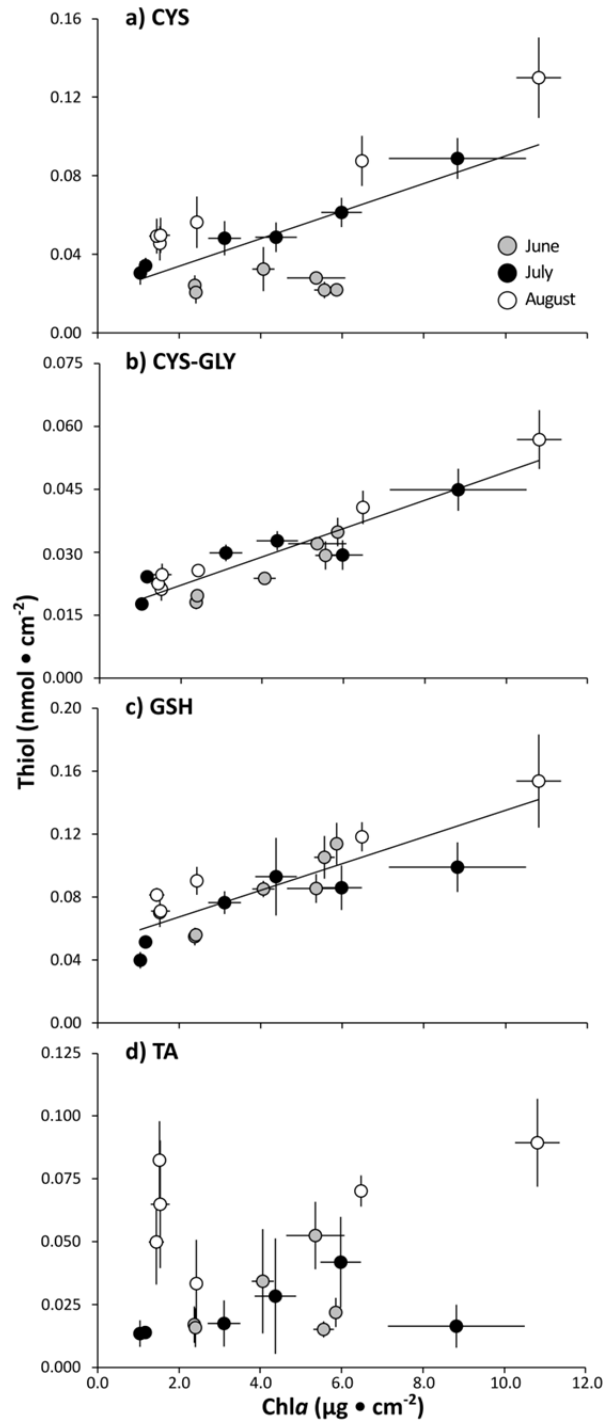


Figure 2.3. Relationships between Chla concentrations measured in the biofilms and thiol concentrations of their extracellular portions: a) CYS ($p < 0.01$; $R^2_{adj} = 0.43$), b) CYS-GLY ($p < 0.001$; $R^2_{adj} = 0.85$), c) GSH ($p < 0.001$; $R^2_{adj} = 0.72$), and d) TA ($p > 0.05$; $R^2_{adj} = 0.01$).

About $3 \pm 1\%$ of THg in biofilm was found in the extracellular colloidal and capsular EPS fractions. The balance (*i.e.* approx. 97% of THg), measured in the fraction operationally collected as pellets, should be found either inside cells or adsorbed to detritus (Pedrero et al 2012; François et al 2012; Chen et al 2014). For the extracellular portion, THg concentrations were higher in capsular than colloidal EPS fractions, likely indicating that Hg was tightly bound to the cell membranes of biofilm microorganisms. Cell membranes harbor many functional groups that offer good metal-binding sites (Vijayaraghavan and Yun 2008). Indeed, strong associations with Hg passively occur within EPS in the biofilm matrix (Chen et al 2014). Studies have reported that microbial EPS are important compounds participating to the biosorption of Hg and may be involved in detoxification processes used by bacteria to counter metals such as Hg through their redistribution on these extracellular compounds (Baker-Austin et al 2006; François et al 2012). However, thiols are molecules with high affinity towards Hg and thereby have the possibility of hampering this redistribution. MeHg concentrations measured by Desrosiers et al. in biofilms of Lake Croche ($3.61 \pm 0.08 \text{ ng g}^{-1} \text{ DW}$) (Desrosiers et al 2006), compared to our results, indicate that the extracellular portion represents $2.3 \pm 1\%$ of total biofilm MeHg concentrations. These authors observed a MeHg production of $0.051 \pm 0.008 \text{ ng h}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, using biofilms from the exact same experimental setup in Lake Croche (Desrosiers et al 2006). Moreover, in periphyton of a neighboring aquatic system, it has recently been established that there was a positive relationship between rates of methylation (as measured by stable isotope techniques) and levels of MeHg in biofilms (Hamelin et al 2015). Therefore, it is likely that our biofilms are capable of Hg methylation. MeHg found in the extracellular portion, especially for the more mobile colloidal fraction, may be available for other microorganism through diffusion in the biofilm matrix (Sutherland 2001). Previous

studies have shown that biofilms and EPS are also a significant source of MeHg to upper trophic levels via invertebrate grazing (Dominique et al 2007; Cremona et al 2009). This source of MeHg may be particularly important in the littoral zone, since aqueous levels of MeHg in this zone of Lake Croche are low (0.07 to 0.09 ng L⁻¹; SI, Table A.I). Indeed, this littoral zone is not stratified and is well oxygenated, and therefore not prone to Hg methylation (Perron et al 2014).

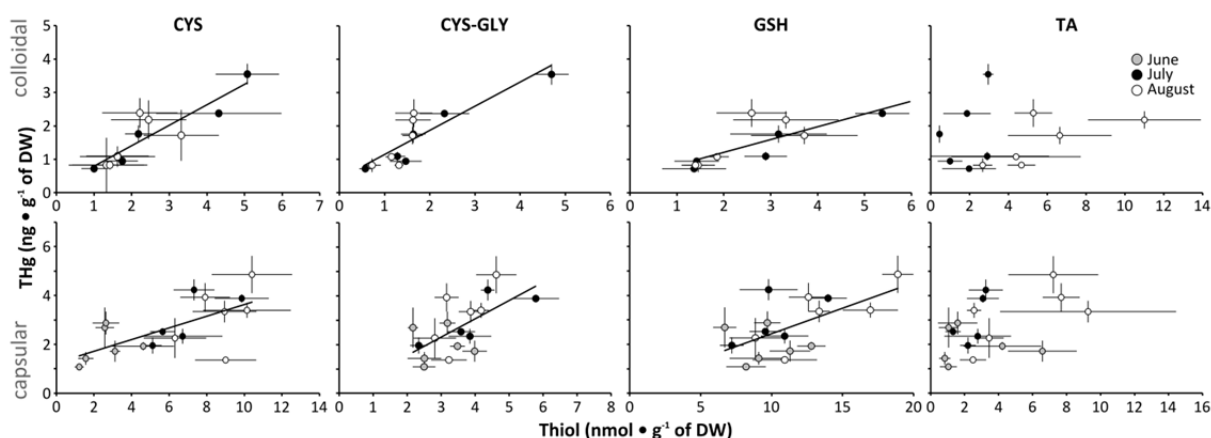


Figure 2.4. Relationships between THg and thiol concentrations from the extracellular portion of biofilms, where top row represents the colloidal and bottom row the capsular EPS fraction: CYS ($p < 0.001$; $R2_{adj} = 0.77$ and $p < 0.05$; $R2_{adj} = 0.41$), CYS-GLY ($p < 0.001$; $R2_{adj} = 0.76$ and $p < 0.01$; $R2_{adj} = 0.37$), GSH ($p < 0.001$; $R2_{adj} = 0.70$ and $p < 0.01$; $R2_{adj} = 0.34$), and TA (both $p > 0.05$) for colloidal and capsular EPS fractions respectively.

The relationship between THg and GSH-related thiol species was stronger in the colloidal fraction of the EPS than in the capsular one. No significant relationship was found between THg and TA in both EPS fractions ($p > 0.05$; Figure 2.4). Unlike THg, the relationship between MeHg and thiol species (SI, Figure A.IV) was not significant for the

capsular fraction ($p > 0.05$). However, significant relationships were found in the colloidal fraction with GSH-related thiols ($R^2_{\text{adj}} = 0.47, 0.31, \text{ and } 0.56$ for CYS, CYS-GLY, and GSH, respectively). For both EPS fractions, TA had no significant relationship with MeHg ($p > 0.05$).

Colloidal EPS are mostly produced by algae colonizing the biofilm, while capsular EPS may originate from bacteria, as reported by Gerbersdorf et al. (Gerbersdorf et al 2009). This supports our hypothesis of the importance of algal thiol production in Hg cycling, where strong relationships were found between thiols and both MeHg and THg in the more mobile colloidal fractions of the EPS (Cyr and Morton 2006; Gerbersdorf et al 2009). Moreover, as the closest relationships were between GSH-related thiols and THg concentrations, we hypothesize that autotrophic microorganisms are important producers of Hg ligands in the extracellular matrix of biofilms. This may affect Hg bioavailability for the methylating microorganisms in the biofilm consortium.

There are currently no published studies on thermodynamic analysis of Hg speciation in natural biofilms, due to a lack of data on key ligands. Our study partly fills this gap of knowledge, providing concentrations of four thiol species in colloidal and capsular fractions of biofilms. There is still a clear need for additional information on the measurements and distribution of potential metal ligands in natural biofilms for relevant thermodynamic analysis. One study conducted in sediment pore waters in a neighboring aquatic system has emphasized the role of thiols on Hg speciation (Zhang et al 2004). However, their conclusions are difficult to apply to the present study as the calculations intentionally did not include the entire dissolved organic matter (DOM) pool and only took into account GSH concentrations (leaving aside other thiol species). Furthermore, the extracellular portion of periphytic biofilms in our

data and the sediment interstitial waters studied by Zhang et al. differ with respect to important parameters, such as pH and dissolved oxygen concentrations (Hagerthey et al 2011), which affect speciation.

In this study, the location of both Hg and high thiol concentrations in the different EPS fractions, and the close relationships between THg and thiols lead us to believe that Hg-thiol complexation can occur in the dynamic extracellular fractions of biofilms. This alleged algal-driven complexation can lead to two outcomes: either the thiol-Hg complex will be stabilized and sequestered in the extracellular matrix or the complex will be readily available for biological uptake; the latter outcome is clearly supported by recent laboratory experiments on Hg bacterial uptake (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2014) and by field studies linking algal photosynthesis to Hg methylation in freshwater biofilms (Desrosiers et al 2006; Hamelin et al 2011). In summary, we propose the following model for the interactions between LMW thiols and Hg in natural lake biofilms (Figure 2.5; numbers mentioned hereafter refer to numbers in the figure): thiols are produced by microorganisms such as algae (1), then exuded in the extracellular space (2), where they can form complexes with inorganic Hg (3). The Hg-thiol complexes (4) may reach methylating microbes in anaerobic microzones through biofilm diffusion (5) and affect the uptake rate of Hg (6); this may lead to a higher MeHg production (7) and, eventually, to an increased MeHg exudation in the extracellular matrix (8). Clearly, much work remains to be done in order to fully validate this hypothesis including a characterization of the DOM pool in biofilms (Graham et al 2012; Graham et al 2013), the identification and measurement of alternate Hg ligands (including proteins, sulfide and sulfide-alike compounds) (Benoit et al 2001b; Benoit et al 2001a; Hsu-Kim and Sedlak 2005; Zhang et al 2010), complete thermodynamic calculations, and precise localization of

thiols through the biofilm matrix using, for instance, labeling technique coupled with confocal microscopy. Further, it would be important to understand changes in the redox state of thiols within the biofilms on different temporal scales, as this will affect the ability of thiols to bind Hg. Also, it would be important to clearly address the impact of changes of thiol levels on Hg availability. Finally, thiols are found as mixtures in natural environment, and it would be useful to understand how this diversity of thiols interacts to modulate Hg uptake in different species of methylating microorganisms. Nevertheless, this study is a first step that brings forth new evidence that thiol production by phototrophic microorganisms may affect the production of MeHg in freshwater natural biofilms.

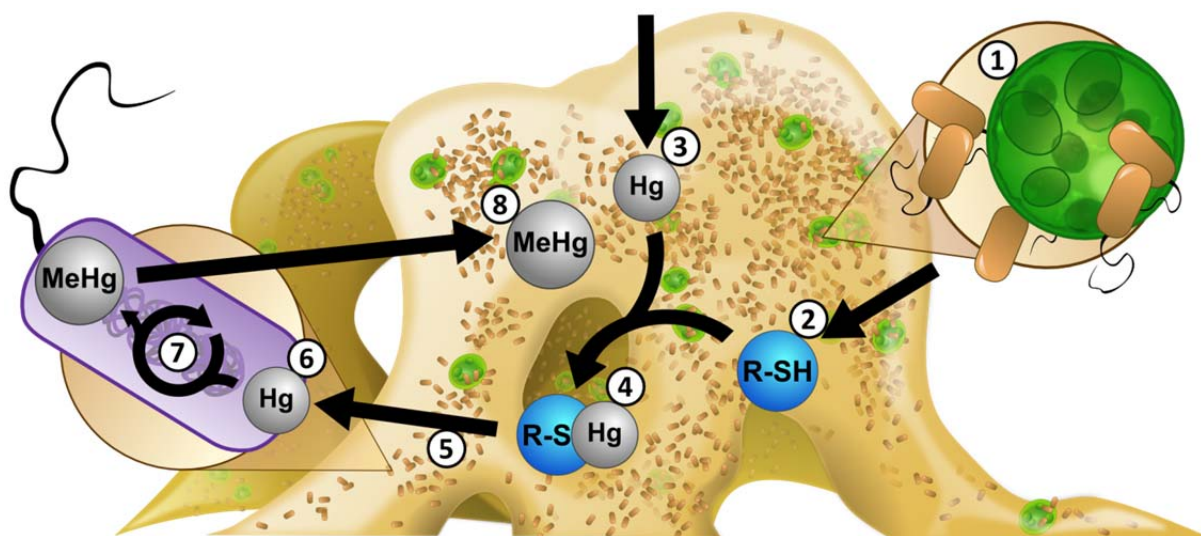


Figure 2.5. Schematic representation of the hypothetical implication of biogenic LMW thiols (R-SH) on Hg cycling inside biofilms (see text for details).

2.6. Acknowledgment

This project was financially supported by NSERC Discovery grants to MA and DP. ML received scholarships from the FRQ-NT/GRIL strategic network. We acknowledge laboratory assistance from Dominic Bélanger and Serge Paquet, field assistance from Valérie René, Stéphanie Massé and Mathieu Trudel, guidance from Stéphanie Hamelin, and comments and corrections on the manuscript by Gwyneth MacMillan. We thank Tania Perron for data on Hg in water. We acknowledge the staff of Station de biologie des Laurentides (U. de Montréal) for housing and equipment.

Chapitre 3 : Preservation and degradation of low molecular weight thiols from freshwater samples

Auteurs : Maxime Leclerc, Dolors Planas et Marc Amyot

3.1. Résumé

Les thiols à faible poids moléculaire (FPM) sont des molécules organiques sulfurées importantes au niveau du cycle biogéochimique du soufre et de la spéciation avec certains métaux traces. Ces thiols à FPM sont sensibles à l'oxydation et à la dégradation et les échantillons d'eau analysés devraient être conservés et manipulés adéquatement entre le moment de l'échantillonnage et l'analyse en laboratoire. Nous avons établi la température de congélation à utiliser pour la préservation des thiols d'échantillons naturels. Les résultats obtenus montrent des taux de dégradation (k_D) significativement plus faibles pour des échantillons conservés à $-80\text{ }^\circ\text{C}$, comparativement à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. De l'eau provenant de deux milieux différents fut utilisée comme matrice naturelle : l'une provenant d'un lac fluvial mésotrophe et l'autre d'un lac oligotrophe. Le k_D du glutathion (GSH) était de $3.0 \pm 0.5 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ pour la matrice mésotrophe et de $2.2 \pm 0.3 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ pour l'eau provenant du milieu oligotrophe lorsque conservé à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Cette dégradation du GSH pourrait mener à la formation de plus petits thiols à FPM tels que la cystéine (CYS) et la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY). La technique de préconcentration par lyophilisation a mené à des pertes significatives pour toutes les espèces de thiol testées (acide thioglycolique, CYS, CYS-GLY et GSH), allant jusqu'à 50% des concentrations initiales et devrait être évitée.

En plus de suggérer des méthodes convenables de conservation et de manipulation des échantillons naturels, nous proposons un cadre expérimental pouvant servir à corriger les concentrations de thiols à FPM mesurées. Suite à un entreposage, les concentrations en thiols pourront être corrigées en fonction du temps de conservation en utilisant les k_D spécifiques aux différentes matrices d'eau pour ainsi améliorer la justesse de la représentativité des concentrations de thiols en eaux douces.

3.2. Abstract

Low molecular weight (LMW) thiols are organosulfur peptides involved in biogeochemical sulfur cycle and act as key ligands for some trace metals. These LMW thiols are highly sensitive to oxidation and degradation processes. As a result, natural water samples should be stored appropriately to reduce thiol loss between sampling time and analysis, although very few studies have tested proper handling procedures. Freezing storage temperatures were investigated for optimal preservation of LMW thiols in natural samples. Results showed significantly lower thiol degradation rates (k_D) for samples stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ compared to $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Two natural freshwater matrices were tested, one from a mesotrophic fluvial lake and one from an oligotrophic lake. Glutathione (GSH) k_D were of $3.0 \pm 0.5 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ in mesotrophic water and $2.2 \pm 0.3 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ in oligotrophic water stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. GSH degradation likely resulted in the production of smaller LMW thiols such as cysteine (CYS) and L-cysteine-L-glycine (CYS-GLY). Pre-concentration by freeze-drying techniques led to significant losses (up to 50%) for all LMW thiol species tested (thioglycolic acid, CYS, CYS-GLY, and GSH) and should be avoided.

In addition to proper storage conditions and handling procedures, we propose an experimental design to compute thiol k_D . These water-matrix-specific k_D should be used to correct thiol concentrations submitted to degradation through time for better measurements in freshwater environments.

3.3. Introduction

Thiols are ubiquitous cellular compounds associated with protein structures (Kadokura et al 2003) or found as low molecular weight (LMW) peptides involved in several intracellular pathways. For most microorganisms, LMW thiols mainly play detoxifying roles against reactive oxygen species (Noctor and Foyer 1998; Fahey 2001) and metallic stress (Ahner et al 2002; Kawakami et al 2006a). While intracellular thiol concentrations are usually reported at micromolar levels, LMW thiols are found under lower concentrations (1 to 1000 nM) in extracellular aquatic environments (Tang et al 2000; Zhang et al 2004; Hu et al 2006) and are produced mostly from cell lysis or exudation by microorganisms (Leal et al 1999; Dupont and Ahner 2005).

Once in the environment, dissolved thiols are important compounds for sulfur biogeochemical cycle and metal complexation, as they are transition molecules between inorganic and organic sulfur forms (Andreae and Jaeschke 1992) and prime ligands for chalcophilic metal speciation, capable of affecting metal bioavailability (Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014). In spite of their presumed important role in element cycling, dissolved LMW thiols have rarely been studied in freshwater natural environments. This lack of scientific literature on LMW thiols in natural environments may result from several constraints related to the detection of low concentrations, especially in surface waters, to the complexity of analytical procedures, to the redox sensitivity of thiols, and to their susceptibility to degradation, as stated by Kawakami et al. (Kawakami et al 2006b).

Recent analytical advances, basically based on voltammetric methods, are now allowing distinctions between some thiol species at fine resolutions (Laglera et al 2014). However, analytical methods using derivatization steps with fluorescent probes, followed by

separation through liquid chromatography are still suitable for greater sensitivity and selectivity analyses (Tang et al 2000; Zhang et al 2004; Hu et al 2006; Labonté-David 2012). These liquid chromatography methods allow a computation of thiols under their reduced and oxidized forms through the addition of a reducing agent (Rijstenbil and Wijnholds 1996; Kawakami et al 2006b; Dupont et al 2006; Liem-Nguyen et al 2015), which may be data of interest for metal speciation or oxidative stress studies.

LMW thiol sensitivity to oxidative stress and degradation over a short period of time are probably the most important constraint for natural environment studies. While sampling from anoxic environments is usually performed with caution using equipment and reagent solutions free of oxygen (through saturation with inert gas) (Carignan et al 1994; Zhang et al 2004; Simmons et al 2009), such attention is neither possible nor desirable for samples from oxic environments. In those cases, the samples are treated as soon as possible after sampling (Hu et al 2006). Once the derivatization process is completed (for analysis with fluorescent liquid chromatography techniques), it is assumed that thiols remain stable over a week when stored in the dark (Fahey and Newton 1987; Kawakami et al 2006b). However, large-scale sampling campaigns conducted in remote areas do not always allow rapid analysis within a reasonable time. Therefore sample storage conditions must be optimized. Beside keeping the samples away from light, as thiols are sensitive to photodegradation by ultraviolet (UV) radiation (Laglera and van den Berg 2006; Moingt et al 2010), storage temperatures should be taken into account as it can influence the degradation of thiols over time (England and Wilkinson 2011). Also, thiol strong binding capacity to metal ions and their susceptibility to enzymatic activities are factors to be considered for the degradation rates of preserved thiols

(Kawakami et al 2006b; Dupont et al 2006). Further, the chemistry of the water from which thiols are sampled should be considered.

Considering the limited data on the preservation of LMW thiols in natural water samples, the overall aim of this study was to establish optimum storage conditions. We specifically tested the effect of freezing temperature and the impact of freeze-drying as a pre-concentration treatment on thiol loss. Moreover, we tested the hypotheses that contrasted water chemistry of sampled lakes could modify thiol degradation rates during storage. We used water matrices from two natural freshwater environments, one from an oligotrophic lake and one from a mesotrophic fluvial lake, to which we added different concentrations of thiol solutions containing four LMW thiol species. Studies using contrasting natural water matrices such as this one are needed to reflect potentially complex chemical processes that are not observed in artificial water matrices. We now suggest proper storage and manipulation of natural water samples for suitable dissolved LMW thiol analyses using liquid chromatography techniques.

3.4. Materials and Methods

3.4.1. Materials and instruments

Thioglycolic acid (TA), L-cysteine-L-glycine (CYS-GLY), L-glutathione (GSH), and 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F) were purchased from Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$ except for CYS-GLY $\geq 85\%$). L-cysteine (CYS; 99.5%), tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP; 98%), methanesulfonic acid (MSA; 70%), sodium acetate,

boric acid, EDTA, potassium hydroxide (KOH), acetic acid, and methanol (HPLC grade) were obtained from Fisher Scientific. Every solution was prepared using Milli-Q water (ultra-pure 18.2 M Ω cm filtered water, EMD Millipore). All glassware used for preparation were acid washed (45% HNO₃; 5% HCl) overnight then rinsed three times with Milli-Q water.

HPLC 1200 system (Agilent, Santa Clara, CA) equipped with fluorescent detector (operating at 385 nm excitation and 515 nm emission) and an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm \times 100 mm \times 3.5 μ m) was used for HPLC-fluorescence detection of thiols with acetate buffer (0.1 M, pH 5.0) and methanol as solvents. Freezon 6 freeze-dry system (Labconco, Kansas City, MO) was used for the pre-concentration experiments and a Jaz spectrometer (Ocean Optics, Dunedin, FL) was used for light measurements.

3.4.2. Sampled sites

Experiments were conducted using water from two different freshwater sites in Québec (Canada): Lake St. Pierre (LSP) and Lake Croche. LSP (46°09'36"N, 72°49'25"W) is a 375 km² widening of the St. Lawrence River and the water was collected in late summer within dense beds of submerged vegetation located in the eutrophic south shore of this fluvial lake. Lake Croche (45°59'34"N, 74°00'26"W) is a 0.19 km² oligotrophic Precambrian Shield lake where summer and winter sampling occurred (general water characteristics are shown in Table III.I for both sampling sites).

All Teflon and glassware was carefully acid washed (45% HNO₃; 5% HCl) overnight as was plasticware (10% HCl), then rinsed three times with Milli-Q water. The water samples were collected at 1 m depth using a peristaltic pump with Norprene and Teflon tubing cleaned

with 10% HCl solution and rinsed with site water. Summer samples were filtered on the field with a high capacity GWV groundwater sample filter (0.45 μm pore size; Pall) whereas winter samples were collected under ice and filtered back in the laboratory with cellulose nitrate filters of 47 mm diameter and 0.45 μm pore size (Whatman). Milli-Q water was also used for various controls as it is free of organic matter or any other potential ligands that likely affect the preservation of LMW thiols.

Table III.I. General characteristics of the natural water matrices used.

Water Matrix	DOC (mg C L⁻¹)	Total Phosphorus ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH
Lake St. Pierre ^a	7.91 \pm na	12.1 \pm 0.6	1.00 \pm 0.23	8.7 \pm 0.1
Lake Croche ^b	4.43 \pm 0.27	3.6 \pm 0.9	1.17 \pm 0.43	6.6 \pm 0.4

^a: data from GRIL (2013)

^b: data from Vachon and del Giorgio (2014)

3.4.3. Experimental design

Most experiments were conducted using natural water amended with thiol solutions diluted in acetate buffer containing 10, 50 or 100 nM each of TA, CYS, CYS-GLY, and GSH in 1 L Teflon bottles. After thiol addition and homogenization, samples were aliquoted in 30 mL high-density polyethylene (HDPE) bottles. Thiol analyses were then immediately conducted on a subset of bottles (time zero, t_0 samples) while the remaining aliquots were

stored under different conditions until withdrawn for analysis. Once removed from storage, frozen samples were left in warm water to melt in the dark for 30 min before derivatization.

First, the effect of storage freezing temperature was investigated using water from Lake Croche spiked with 100 nM thiol solutions. Samples were kept in the dark at -20 °C or -80 °C up to 15 days. As a control, Milli-Q water was spiked with the same thiol solutions and stored at -20 C°.

Second, LSP and Lake Croche water were amended with 100 nM thiol solutions to check the potential impact of the water chemistry on the loss of thiols. At the same time, we tested whether the degradation of GSH can lead to the formation of other thiol species using both LSP and Lake Croche water spiked with a 100 nM GSH only solution. Samples were kept in the dark at -20 °C up to 52 days of storage.

Effects of laboratory light and initial thiol concentrations were also tested using Lake Croche water. For the light effect experiment, samples with initial thiol concentrations of 100 nM were kept at room temperature up to 5 hours for different ambient light exposure. A series of bottles was kept in the dark until derivatization, another under normal laboratory light for the whole experiment, and a last one was conserved in the dark with every derivatization steps conducted with caution under green light. The absolute irradiance spectrum was measured for all treatments. For the effect of initial thiol concentrations, Lake Croche water was amended with different thiol solutions to obtain concentrations of 10, 50 or 100 nM. Samples were stored in the dark at -20 °C up to 12 days.

Finally, the effect of lyophilisation was tested with Lake Croche water spiked with 10 nM thiol solutions. Samples were immediately frozen and stored in the dark at -80 °C. Five replicates were freeze-dried until complete drying (48 h), then diluted in Milli-Q water for a

10-fold concentration, or kept in the freezer at -80 °C as a control. The experimental design is summarized in Figure 3.1.

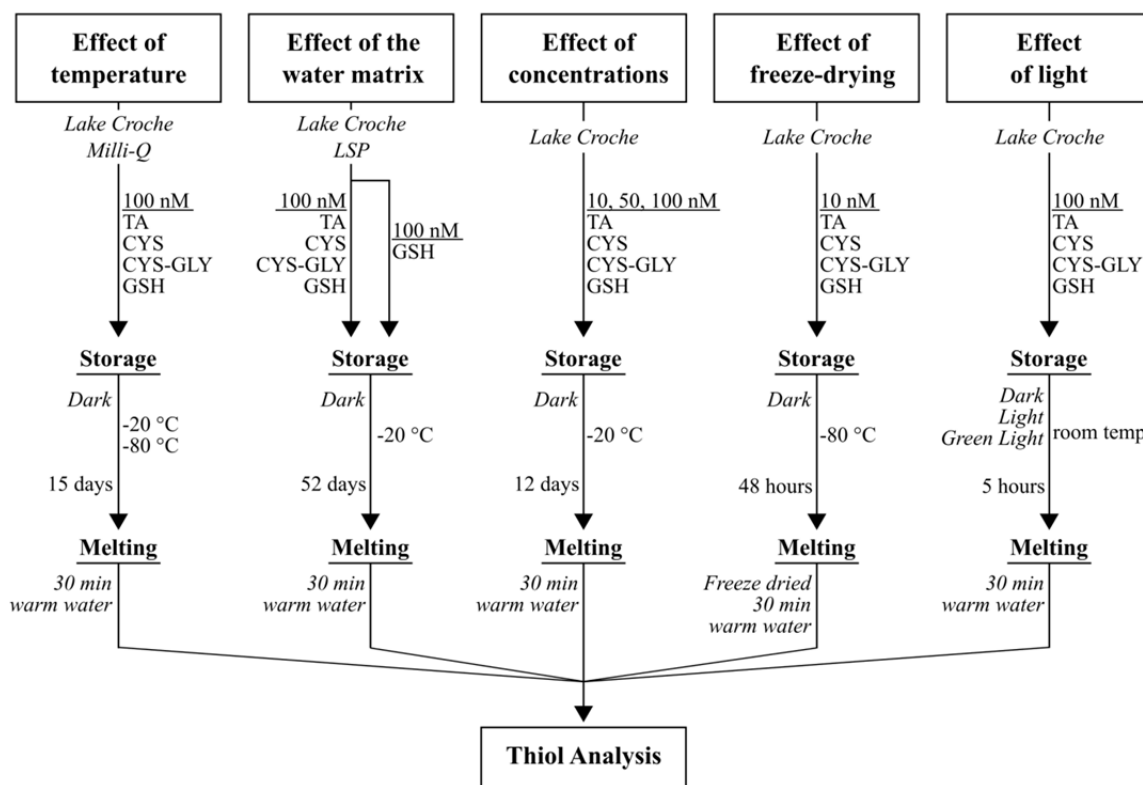


Figure 3.1. Summarized experimental design showing water matrices used, amended thiol concentrations, storage conditions, melting methods and light exposure for every experiment before thiol analysis.

3.4.4. Thiol analyses

LMW thiol analytical protocol was based on the method used by Zhang et al. to measure concentrations of total LMW thiols in freshwater environments (Zhang et al 2004). This method uses TCEP as reducing agent for oxidized or metal-bound thiols. Therefore, it measures total thiols (including oxidized and reduced forms) (Kawakami et al 2006b). Briefly,

500 μL of samples were analyzed in chromatographic glass vials. Samples were buffered to pH 10.5 through the addition of 200 μL of potassium borate buffer (boric acid 1 M, pH adjusted with KOH). Reduction of thiols was then performed by adding 25 μL of 10% TCEP which was allowed to react for 15 min at room temperature. Derivatization was then achieved by adding 100 μL of SBD-F (1 g of SBD-F dissolved in 2 mL of potassium borate buffer) followed by a heating step (60 $^{\circ}\text{C}$ in the dark for 1 h). After SBD-F derivatization, the solution was stabilized with 100 μL of 1 M MSA. Derivatized samples were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ in the dark for less than 24 h before HPLC analyses.

Total thiols were analyzed through HPLC-fluorescence where solvent A was acetate buffer and methanol was used as solvent B with a flow rate of the solvent pump of 1.0 mL min^{-1} . The flow of the gradient was: 10–15 min 0–20% B; 15–25 min, 20–100% B; 25–30 min, 100% B; 30–35 min, 100–0% B for a total run time of 40 min. All measurements were done in triplicate. Calibration curves were performed using spiked thiol solutions diluted in acetate buffer (5 mM pH 4.0, with 0.1 mM EDTA). The detection limit was defined as three times the standard deviation of 10 low concentration standards (< 5 nM) for every thiol species giving 1.1 nM for TA, 1.0 nM for CYS, 0.4 nM for CYS-GLY, and 1.0 nM GSH.

3.4.5 Thiol degradation rates

Degradation rates (k_D) were computed following the different thiol species concentrations decline through time of storage with kinetics of apparent first-order reaction:

$$\ln[\text{thiol}]_t = \ln[\text{thiol}]_0 - k_D t \quad \text{eq. 1.}$$

where $[\text{thiol}]_0$ is the initial thiol concentration of a single thiol species, $[\text{thiol}]_t$ is the concentration after time t of storage, and k_D is the rate constant of degradation.

3.4.6. Statistical analyses

Statistical analyses were computed with R software (R Development Core Team R 2011) ($\alpha = 0.05$). Treatments were compared using analysis of variance (ANOVA) paired with post-hoc Tukey's test and Kruskal-Wallis and analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare significant k_D slopes, with Bonferonni's correction for multiple comparisons (*anova()*, *aov()*, *TukeyHSD()*, and *kruskal.test()* functions were used). The *lm()* function was used for linear regressions to calculate k_D and means were compared with Student's t-test (*t.test()*).

3.5. Results

3.5.1. Effect of storage temperature on thiol degradation

A preservation test was conducted at different storage temperatures using water from Lake Croche and Milli-Q water as control matrix. For the whole experiment, the concentration of thiols in control water stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ and Lake Croche water stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ were the least affected: TA, CYS, CYS-GLY, and GSH lost respectively $9 \pm 3\%$, $21 \pm 5\%$, $22 \pm 3\%$, and $7 \pm 4\%$ of their initial concentrations (t_0) in control water and $11 \pm 11\%$, $24 \pm 4\%$, $13 \pm 4\%$, and $13 \pm 5\%$ in Lake Croche water (Figure 3.2). Still, computed k_D were significantly different ($p < 0.05$) between natural water stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ and control water for every thiol tested. The

degradation was slower in the control matrix, except for CYS-GLY, for which concentrations were slightly better preserved at -80 °C (Table III.II). For Lake Croche water kept at -20 °C, thiol concentrations decreased more rapidly with final losses of $49 \pm 3\%$ for TA, $64 \pm 2\%$ for CYS, $39 \pm 1\%$ for CYS-GLY, and $41 \pm 1\%$ for GSH after the 15 storage days (Figure 3.2). Compared to the other treatments, the natural water matrix stored at -20 °C was significantly different ($p < 0.05$), with greater degradation of the four thiol species (Table III.II).

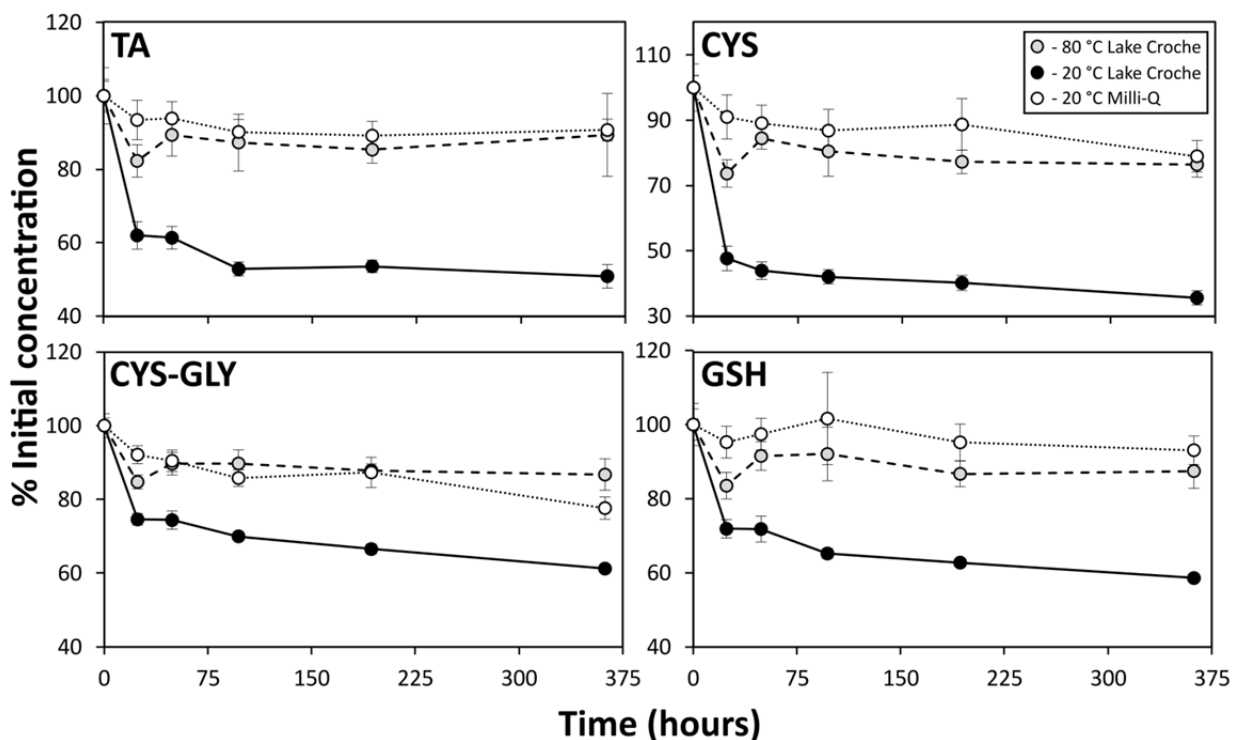


Figure 3.2. Thiol concentrations in Lake Croche and control water spiked with 100 nM thiol solutions shown as a percentage of initial concentration (t_0) over time after storage in the dark at -20 and -80 °C, where points are averaged values from triplicate and error bars represent standard deviation.

Table III.II. Thiol degradation rate constants (k_D ; Means \pm Standard error) for control and natural water matrices stored at different temperatures.

Water matrices	Thiol species	k_D (10^{-3} h^{-1})	R^2_{adjusted} (%)	p -value
control (-20 °C)	TA	0.9 \pm 0.2	56.1	< 0.005
	CYS	1.3 \pm 0.3	55.6	< 0.005
	CYS-GLY	1.5 \pm 0.2	83.0	< 0.005
	GSH	-0.3 \pm 0.4	-	not significant
Lake Croche (-80 °C)	TA	1.4 \pm 0.4	63.5	< 0.05
	CYS	2.3 \pm 0.4	75.3	< 0.005
	CYS-GLY	1.1 \pm 0.3	63.8	< 0.05
	GSH	0.9 \pm 0.3	41.2	< 0.05
Lake Croche (-20 °C)	TA	5.6 \pm 1.2	67.5	< 0.005
	CYS	7.5 \pm 2.0	53.7	< 0.005
	CYS-GLY	3.1 \pm 0.7	59.5	< 0.005
	GSH	3.8 \pm 0.8	64.6	< 0.005

3.5.2. Thiol degradation through different water matrices

To compare the effect of the water matrix chemistry on thiol degradation, experiments were conducted on LSP and Lake Croche samples. A quick degradation of thiols occurred in LSP water after the first 6 days (143 h) of storage (Figure 3.3A); then concentrations tended to stabilise until the end of the experiment. GSH was the thiol species that was most rapidly degraded with a k_D of $3.0 \pm 0.5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Indeed, after 6 days of storage GSH lost $39 \pm 5\%$ of its initial concentration and ended with loss of $49 \pm 4\%$ after 52 days of storage (results not shown). The other thiol species also underwent rapid loss but to a lesser extent (Figure 3.3A). LSP water displayed losses of $17 \pm 7\%$, $14 \pm 6\%$ and $25 \pm 5\%$ of the initial concentrations for

TA, CYS, and CYS-GLY, respectively, after 6 days of storage. At the end of the 52 days, losses were of $27 \pm 8\%$, $28 \pm 8\%$, and $36 \pm 4\%$ for TA, CYS, and CYS-GLY, respectively (results not shown). The computed k_D of these three thiol species are shown in Figure 3.3 description.

The degradation trends in Lake Croche water were slightly different: CYS-GLY was the most easily degraded thiol and GSH was the least affected (Figure 3.3B). Lake Croche water matrix induced k_D of $2.2 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ for GSH, which is significantly different ($p < 0.05$) from k_D from LSP. As in LSP water, the largest thiol losses occurred in the first 6 days, followed by a slower decrease until the end of experiment. TA, CYS, CYS-GLY, and GSH lost $32 \pm 5\%$, $48 \pm 4\%$, $58 \pm 3\%$, and $29 \pm 7\%$ of initial concentrations after 6 days and $38 \pm 5\%$, $58 \pm 2\%$, $66 \pm 1\%$, and $32 \pm 1\%$ after 52 days, respectively (results not shown). Degradation rates were significantly different ($p < 0.05$) between LSP and Lake Croche water, except for TA ($p > 0.05$) where no differences were observed.

3.5.3. Production of thiols through GSH degradation

The degradation of GSH as a potential source for other thiol species was further investigated using LSP and Lake Croche water amended with a 100 nM GSH solution. As previously observed, GSH concentration dropped rapidly in the first 6 days of storage for both water matrix. Briefly, GSH in LSP water went from $72.5 \pm 1.0 \text{ nM}$ at t_0 to $32.6 \pm 2.2 \text{ nM}$ after 6 days of storage (Figure 3.4A) with a k_D of $4.5 \pm 1.2 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($R^2_{\text{adjusted}} = 49.5\%$, $p < 0.005$). GSH in Lake Croche water went from $79.2 \pm 0.2 \text{ nM}$ at t_0 to $43.1 \pm 1.5 \text{ nM}$ after 6 days (Figure 3.4B) with a k_D of $3.7 \pm 0.9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($R^2_{\text{adjusted}} = 55.9\%$, $p < 0.005$) and no significant

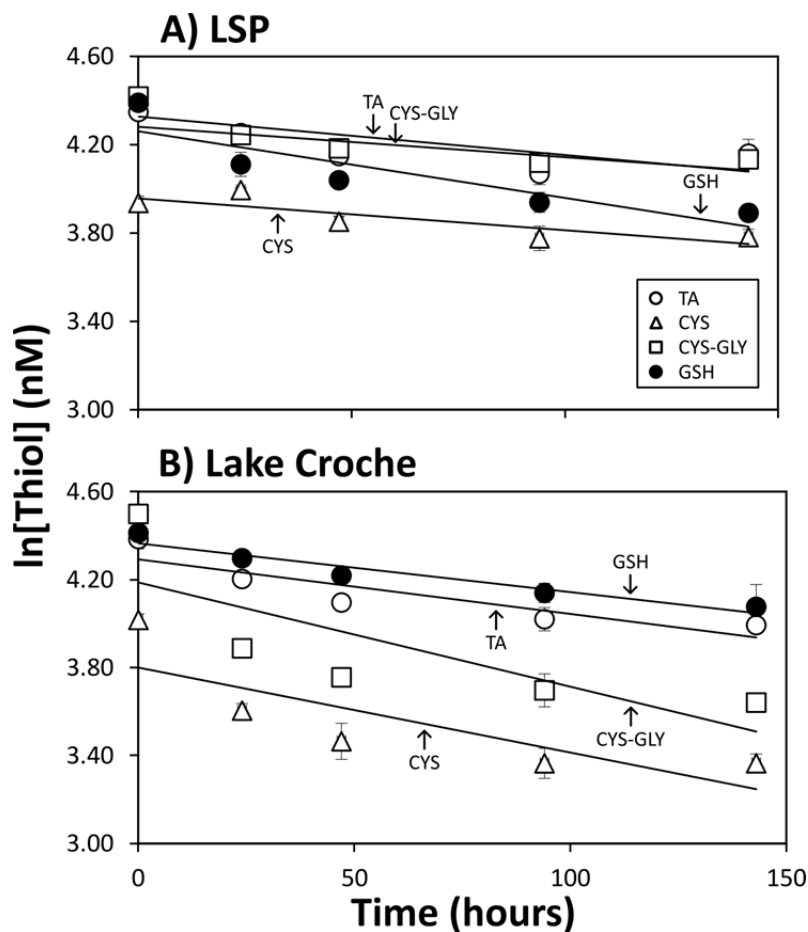


Figure 3.3. Natural logarithm of thiol concentrations (nM) over time and k_D slopes (all significant; $p < 0.05$) from two natural water matrices initially spiked with 100 nM thiol solutions (t_0) and kept in the dark at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Points are averaged values from triplicate and error bars represent standard deviation. **A.** LSP water lead to a k_D of $1.4 \pm 0.4 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for TA ($R^2_{\text{adjusted}} = 44.5\%$), $1.4 \pm 0.3 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for CYS ($R^2_{\text{adjusted}} = 62.7\%$), $1.7 \pm 0.3 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for CYS-GLY ($R^2_{\text{adjusted}} = 63.3\%$), and $3.0 \pm 0.5 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for GSH ($R^2_{\text{adjusted}} = 73.1\%$). **B.** Lake Croche water lead to a k_D of $2.5 \pm 0.4 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for TA ($R^2_{\text{adjusted}} = 74.3\%$), $3.9 \pm 0.8 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for CYS ($R^2_{\text{adjusted}} = 61.1\%$), $4.7 \pm 1.1 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for CYS-GLY ($R^2_{\text{adjusted}} = 56.2\%$), and $2.2 \pm 0.3 \times 10^{-3}\text{ h}^{-1}$ for GSH ($R^2_{\text{adjusted}} = 79.9\%$).

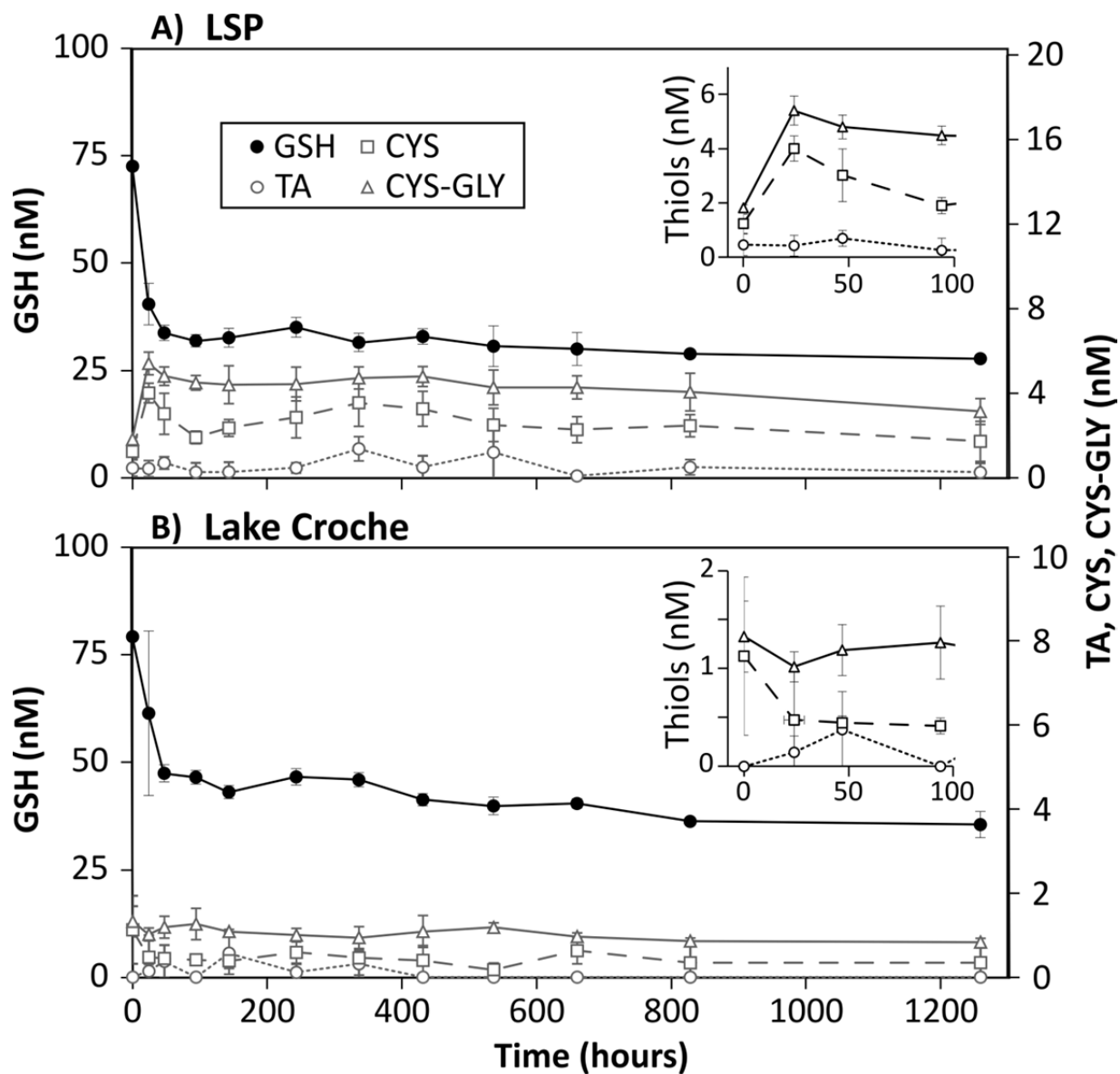


Figure 3.4. Thiol concentrations (nM) plotted over storage time from **A.** LSP and **B.** Lake Croche water matrices initially spiked with 100 nM GSH solutions (t_0) and kept in the dark at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, where points are averaged values from triplicate and error bars represent standard deviation. Insets: first 4 days of storage close up of TA, CYS, and CYS-GLY concentrations.

loss was observed in Milli-Q control water (results not shown, k_D not significant). After 24 h of storage, a net increase of 2.8 ± 0.6 nM for CYS and of 3.6 ± 0.6 nM for CYS-GLY was observed in LSP water while TA concentrations stayed under the detection limit. Such increases were not observed either in Lake Croche (Figure 3.4B) or in control water (results not shown).

3.5.4. Effect of thiol concentrations on degradation

Thiol solutions of 10, 50 and 100 nM were added to Lake Croche water to find out if thiol degradation was a function of initial thiol concentrations. In order to compare the different treatments, thiol concentrations were computed as a ratio over t_0 concentrations. For the three solution concentrations no significant differences ($p > 0.05$) were found between k_D of the four thiol species. Every thiol degradation slopes were significant, except for 10 nM TA k_D (Table III.III). This is probably due to an analytical problem on the first two days of storage. As previously mentioned, thiol concentrations reached a plateau at the end of storage time.

3.5.5. Effect of freeze-drying and light exposure on thiols

Thiols in natural aquatic environments are typically found at low concentrations, especially for the dissolved portion of the water column. In order to better detect these low concentrations, a concentration step using freeze-drying was suggested by Zhang et al. (Zhang et al 2004). We tested the impact of such method on Lake Croche water amended with 10 nM thiol solutions. Measured concentrations of untreated vs. freeze-dried samples were of $8.0 \pm$

0.4 nM vs. 6.3 ± 0.3 nM for TA, 3.5 ± 0.2 nM vs. 1.7 ± 0.1 nM for CYS, 10.6 ± 0.2 nM vs. 6.7 ± 0.1 nM for CYS-GLY, and 5.0 ± 0.3 nM vs. 3.8 ± 0.1 nM for GSH (Figure 3.5). Thiol species seemed to be affected at different intensity but all concentrations were significantly reduced after treatment ($p < 0.001$). TA and GSH were the least affected with loss of 20.5% and 23.1% respectively. CYS-GLY had 37.0% lower concentration than untreated samples and CYS was the most affected species with loss going up to 50.8%.

Table III.III. Thiol degradation rate constants (k_D ; Means \pm Standard error) for a natural water matrix initially amended with different concentrations of thiol solutions and stored in the dark at -20 °C.

Thiol concentrations	Thiol species	k_D (10^{-3} h^{-1})	R^2_{adjusted} (%)	p -value
10nM	TA	1.0 ± 0.6	-	not significant
	CYS	3.1 ± 0.6	57.7	< 0.005
	CYS-GLY	1.8 ± 0.6	31.3	< 0.05
	GSH	1.3 ± 0.3	49.9	< 0.005
50nM	TA	0.8 ± 0.3	26.9	< 0.05
	CYS	1.5 ± 0.5	29.7	< 0.05
	CYS-GLY	1.6 ± 0.6	28.4	< 0.05
	GSH	0.7 ± 0.3	27.1	< 0.05
100nM	TA	1.2 ± 0.3	54.3	< 0.005
	CYS	2.2 ± 0.5	55.1	< 0.005
	CYS-GLY	1.8 ± 0.5	35.4	< 0.05
	GSH	1.3 ± 0.4	40.5	< 0.005

As thiols are sensitive to photodegradation, we conducted experiments under different light exposure conditions. Lake Croche water amended with 100 nM thiol solutions was used for this section. Samples were incubated at room temperature for 5 hours (where derivatization process should take about 3 hours, including incubation and manipulation time). The absolute irradiance spectrum measured for ambient laboratory light was > 400 nm (between ~ 500 nm to 600 nm) for the green light exposure during the whole process (incubation + derivatization). For the dark light treatment, the light was assumed to be completely blocked during incubation and the samples were exposed at ambient laboratory light during derivatization. For all treatments, no significant ($p > 0.05$) degradation was observed after 5 hours and no differences were observed between treatments ($p > 0.05$) (results not shown).

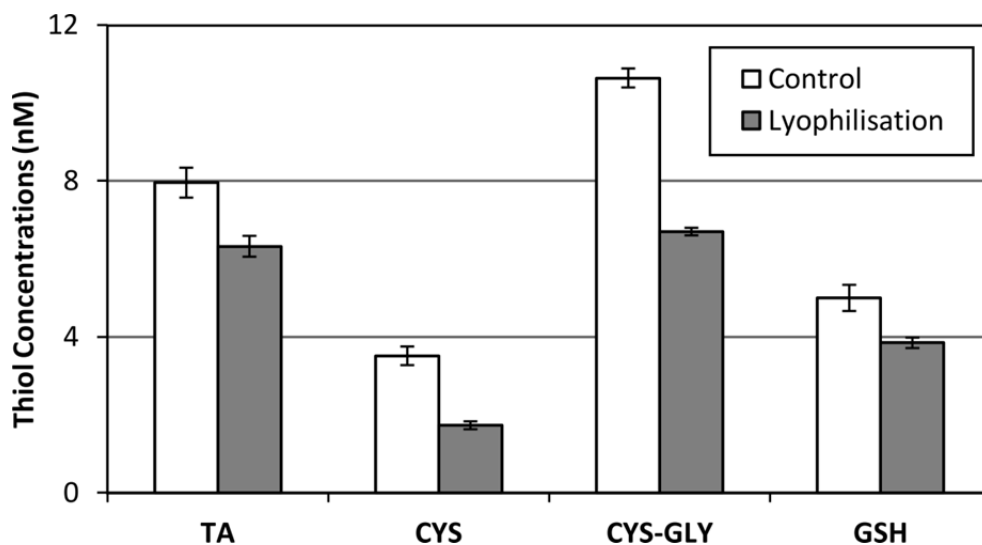


Figure 3.5. Thiol concentrations (nM) of Lake Croche water matrix amended with 10 nM thiol solutions after freeze-drying treatment (grey bars) and untreated samples (white bars). Values were computed with 5 sample replicates and error bars represent standard deviation.

3.6. Discussion

3.6.1. Storage temperature

The differences observed in degradation rates clearly indicate an effect of freezing temperature on preservation of thiols (Figure 3.2). Indeed, since a storage temperature of -80 °C prevent significant loss of thiols over -20 °C storage in Lake Croche water matrices, deep-freezing natural samples should be the favored conservation technique. Such effects of storage temperature on the preservation of thiols have already been reported for phytochelatins, larger thiols molecules produced by plants and algae (England and Wilkinson 2011). However, this study reported the best storage temperatures were above 0 °C. A physical degradation caused by ice formation was suggested as an explanation for increased degradation with storage at -20 °C. As we have not measured the conservation of thiols in warmer temperature, the two studies are not directly comparable. Nevertheless, in order to perform freeze-drying pre-concentration, samples must be in solid state and it is likely that faster freezing at -80 °C can prevent degradation through such process associated with ice crystal formation.

Furthermore, degradation observed for stored natural samples could be attributed to thiol binding with trace metals (Kawakami et al 2006b) or to an enzymatic activity promoting thiol degradation (Kiene and Taylor 1988; Visscher et al 1994). These potential degradation factors should not be discarded, but they seems to have been partially prevented with a storage temperature of -80 °C as the concentration of thiols in natural water matrix kept at -80 °C were closer to the control treatment. Thiols from -20 °C Lake Croche water suffered significant losses at faster rates than -80 °C storage for all four thiol species. Despite lower k_D , substantial losses were noticed after 15 days of storage in control and -80 °C natural water matrices (up to

22 ± 3% and 24 ± 4%, for control and Lake Croche respectively) where CYS and CYS-GLY were the most affected thiol species. These losses could come from interaction with oxygen species, a likely explanation especially for the control water matrix which is free of potential catalytic ligands or proteins. The oxidative effect of reactive oxygen species can lead to thiol degradation. An exclusion of oxygen through argon saturation have been shown to induce better thiol preservation in water samples (Simmons et al 2009). In the present study, we deliberately ignored this step to observe the degradation of natural water from oxic zones as such bubbling installations are not always promptly available after sampling.

3.6.2. Water matrix effects and GSH degradation

Overall, the comparison of LSP and Lake Croche water indicates that degradation did not occur at the same rate in the two matrices, depending of the thiol species and the water matrix used (Figure 3.3.). Indeed, GSH degradation rate was greater in LSP (k_D of $3.0 \pm 0.5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) than Lake Croche water (k_D of $2.2 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Differences in the water chemistry (eutrophic waters in LSP compared to oligotrophic in Lake Croche) could explain these differences. For instance, some trace metal such as copper and nickel can promote the degradation of GSH through oxidation whereas the formation of mercury-GSH complex can prevent such loss (Krezel et al 2003; Moingt et al 2010). In addition to metal effects, the presence of different organic ligands may also induce a GSH degradation (Kawakami et al 2006b) through the production, for instance, of reactive oxygen species for instance (Latch and McNeill 2006). Moreover, although the water samples were pre-filtered through 0.45 μm membranes, the action of some catalytic enzymes could be a cause of observed degradation.

Such eutrophic water as LSP water matrix would be more likely to contain higher concentrations of these potential degradation promoters and may likely explain k_D differences between LSP and Lake Croche matrices.

On the other hand, the degradation rates observed for CYS and CYS-GLY in natural matrices are lower in LSP than Lake Croche water (no significant differences observed for TA). Since CYS and CYS-GLY are GSH substrates, it is likely that degradation of GSH act as a source for these thiol species. The loss of the glutamate group of GSH could lead to CYS-GLY formation and a further cleavage of the glycine peptide bond to CYS. This remains an untested hypothesis and further investigation is needed. Nevertheless, such assumption could explain the greater loss of CYS and CYS-GLY in Lake Croche water as they get a lesser input of new degradation compounds.

As a first step in this direction, we measured concentrations of TA, CYS, and CYS-GLY from natural water matrices amended with a GSH solution (Figure 3.4.). As previously suggested, we observed a rapid increase of CYS and CYS-GLY in LSP while no such increases were observed in Lake Croche water, neither TA for both matrices. The detected concentrations were low (2.8 ± 0.6 nM for CYS and 3.6 ± 0.6 nM for CYS-GLY) and only happen after the first day of storage. We would have expected a balanced thiol pool, where the sum of CYS, CYS-GLY and GSH concentrations would be equivalent to GSH concentration initially measured at t_0 , which was not the case. We therefore assume that CYS and CYS-GLY are subject to constant degradation during storage and that GSH is lost in the form of other undetected compounds. However, as we have not done an exhaustive monitoring of sulfur balance, it is not possible at this point to confirm such cascading degradation process

involving LMW thiols. Such studies are still needed, especially in natural environments to enhance the understanding of thiol cycle in the dissolved phase.

3.6.3. Effects of initial concentrations, light exposure and freeze-drying

No matter the concentration initially added to samples (*i.e.* 10, 50, and 100 nM), k_D of the four thiol species were not significantly different for all tested concentrations (Table III.III). Therefore, thiol degradation rate from -20 °C storage would be the same, for a specific thiol species, independently of its initial concentrations. In this regard, from a practical point of view, a correction factor could be applied regardless of the initial concentration for thiol undergoing storage degradation over time. Predicted concentrations could be improved using preservation test considering the water matrix studied to compute k_D of different thiol species (eq. 1.). In the event of being unable to proceed with rapid analysis or to store samples at -80 °C, thiol concentrations could be therefore corrected.

Since most significant thiol degradation was observed after the first day of storage (Figure 3.2 and 3.4), we tested whether degradation occurred within hours at room temperature during the handling of samples in the laboratory. Manipulations were performed under different light exposure conditions as thiols are sensitive to photodegradation (Laglera and van den Berg 2006; Moingt et al 2010). No significant degradation was noted for the three treatments (*i.e.* in the dark, ambient laboratory light, and green light exposure) after 5 hours of incubation at room temperature. We therefore conclude that special attention over ambient light is not necessary for indoor manipulations. However, spectrometer measurements revealed the absence of UVs (< 400 nm) for tested conditions, which is the light spectrum

fraction attributed to thiol photodegradation (Moingt et al 2010). Thus, samples still should be handled with caution for environments with potential UV emissions such as on the field, where samples should be kept away from light.

Finally, we observed freeze-drying effects over thiol concentrations for natural samples using Lake Croche water matrix. As previously reported by few studies (Zhang et al 2004; Hu et al 2006; Labonté-David 2012; Liem-Nguyen et al 2015), dissolved LMW thiols are usually found at low concentration levels in freshwater environment and such pre-concentration process may be necessary for accurate detection (Zhang et al 2004). After a 10-fold concentration through freeze-drying, TA, CYS, CYS-GLY, and GSH concentrations were all significantly lower than untreated samples (Figure 3.5). CYS was the most sensitive tested species to freeze-drying, losing half of its initial concentration. Therefore, using freeze-drying techniques to concentrate natural samples can lead to an underestimation of the actual concentrations and it should be taken into account especially for concentrations near the analytical detection limit, which could be erroneous.

3.7. Conclusion

Analysis of dissolved LMW thiols through methods requiring a conservation of water samples, such as liquid chromatography contrary to direct voltammetry, is to be performed with caution. The various processes leading to the degradation of thiols are complex, involving the action of reactive oxygen species, metal ion oxidation and the organic matter pool found in natural water samples. Samples for thiol analysis should be analyzed as soon as possible within hours after sampling. If this is impossible, suitable storage conditions should

be applied. A deep-freezing at -80 °C or below should be done using ultra-low freezer (or liquid nitrogen) and samples should be kept in conditions avoiding exposure to UVs. Otherwise, if stored at warmer freezing temperatures (*e.g.* -20 °C), a site-specific correction factor can be applied. Degradation rates of each thiol species should be computed in regard of the water matrix chemistry and the storage time using conservation pre-test such as those described in this study.

3.8. Acknowledgment

This project was financially supported by NSERC Discovery grants to MA and DP. ML received scholarships from the FRQ-NT/GRIL strategic network. We acknowledge laboratory assistance from Dominic Bélanger and sampling assistance from Valérie René, Stéphanie Massé and Melissa Khadra. We acknowledge the staff of Station de biologie des Laurentides (U. de Montréal) for housing and equipment.

Chapitre 4 : Conclusion

L'objectif général de ce projet était d'améliorer les connaissances sur la présence et la répartition des thiols à faible poids moléculaire (FPM) de la phase dissoute pour différents environnements dulcicoles. Nous nous sommes attardés aux thiols à FPM compris dans la matrice extracellulaire des biofilms périphytiques, une zone pour laquelle, au meilleur de nos connaissances, aucune étude n'a encore été portée. De plus, nous avons pu déterminer certaines précautions à adopter quant à l'entreposage et à la manipulation des échantillons naturels d'eau douce, proposant ainsi de nouvelles dispositions pour l'étude des thiols à FPM dissous provenant de zones oxiques.

Le premier objectif du mémoire, traité au chapitre 2, était *de mesurer les thiols à FPM au niveau de la matrice extracellulaire de biofilms périphytiques et d'établir des relations entre ces thiols et le mercure (Hg) au sein des biofilms dans une optique de formation de complexes thiols-Hg*. Tout d'abord, nous avons pu détecter de grandes concentrations de thiols dans la matrice extracellulaire des biofilms. L'acide thioglycolique (AT), la cystéine, la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) étaient les quatre espèces de thiols à FPM ciblées et ont toutes été mesurées à des concentrations étant jusqu'à 1000 fois supérieures aux concentrations retrouvées dans la colonne d'eau à proximité du biofilm. Ces résultats suggèrent une production et une exportation active de thiols à FPM par les microorganismes colonisant le biofilm en plus d'une capacité de rétention de ces thiols au sein de la matrice extracellulaire. En effet, la présence de corrélations entre les concentrations de cystéine, de CYS-GLY et de GSH et les concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*) des biofilms nous laisse supposer que ces trois espèces de thiols sont principalement synthétisées, puis

exsudées, par des microorganismes photosynthétiques. Les algues seraient, comme dans la colonne d'eau (Dupont and Ahner 2005; Hu et al 2006), d'importants producteurs de thiols au niveau des biofilms périphytiques. Par contre, de telles corrélations avec la Chl *a* n'ont pu être établies pour les concentrations extracellulaires d'AT. Nous supposons alors une source différente de l'AT au sein de la matrice extracellulaire. Tel que suggéré par des études précédentes, l'AT retrouvée dans l'espace extracellulaire des biofilms pourrait provenir de la libération de groupements thiols contenus dans la matière organique par l'action de microorganismes (Kiene et al 1990; Hu et al 2006). Nous constatons donc deux sources potentielles de thiols à FPM dans le biofilm : l'une étant directement attribuable à la biosynthèse des algues et une seconde provenant potentiellement d'une dégradation microbienne de la matière organique.

De plus, les concentrations extracellulaires en thiols des biofilms ne suivant pas les tendances temporelles et spatiales observées dans la colonne d'eau, les thiols mesurés au sein de la matrice du biofilm ne seraient pas la conséquence d'une adsorption ou d'une rétention de thiols provenant de l'environnement extérieur au biofilm. Effectivement, les concentrations en thiols étant jusqu'à trois ordres de grandeur plus élevées dans les biofilms, une diffusion allant de la colonne d'eau vers le biofilm serait improbable. Les biofilms périphytiques seraient donc, dans l'ensemble, d'importants producteurs de thiols à FPM.

En ce qui à trait à la seconde partie de l'objectif du chapitre 2, soit *d'établir des relations entre les thiols et le Hg au sein des biofilms*, nous avons pu observer des corrélations significatives entre la présence de thiols d'une origine algale présumée et le Hg total de la matrice extracellulaire des biofilms périphytiques. Les plus fortes corrélations entre ces thiols et le Hg total furent observées dans la portion colloïdale de la matrice des biofilms, la fraction

la plus mobile. Nous suggérons alors l'hypothèse que les algues sont d'importants producteurs de thiols pouvant se lier au Hg de la portion extracellulaire des biofilms périphytiques et que la formation d'un complexe thiol-Hg pourra éventuellement affecter la biodisponibilité du Hg chez les microorganismes méthylants (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014).

Cependant, n'étant pas en mesure de confirmer une formation préférentielle d'un tel complexe thiol-Hg, plusieurs informations supplémentaires sont nécessaires afin de valider cette supposition. Premièrement, un bilan exhaustif des différents ligands potentiels du Hg et de la chimie complète de la matrice extracellulaire des biofilms devrait être mené dans des recherches futures. En effet, comme les thiols à FPM ont été retrouvés à de très fortes concentrations, il est tout à fait envisageable qu'une production active d'autres composés organiques, pouvant se lier au Hg, s'opère aussi au sein de la matrice. Des informations additionnelles sur la composition de l'ensemble de la matière organique dissoute, sur la présence de macromolécules telles que des protéines, sur les ligands inorganiques comme les sulfures et sur les autres molécules sulfurées sont alors nécessaires pour des calculs thermodynamiques complets (Benoit et al 2001b; Benoit et al 2001a; Hsu-Kim and Sedlak 2005; Graham et al 2013). Également, les biofilms périphytiques peuvent contenir différentes conditions environnementales à des échelles microscopiques en termes de concentration en oxygène dissous ou de potentiel hydrogène, par exemple. Ces microzones devront être mieux définies, localisées et caractérisées au sein des biofilms étudiés car les processus de spéciation sont sensibles à de telles variations (Benoit et al 1999).

Ensuite, nous avons supposé que les complexes thiol-Hg puissent atteindre les microorganismes produisant le méthylmercure (MeHg) sans pouvoir le confirmer. Les algues

se retrouvant généralement dans les zones oxiques du biofilm, tandis que les processus de méthylation du Hg sont associés à des zones anoxiques, il n'est pas certain que les thiols à FPM produits par les algues puissent transiter d'une zone à l'autre par diffusion dans l'espace extracellulaire. Une localisation précise des thiols à FPM dans la matrice des biofilms pourrait être réalisée dans de prochaines études par des techniques de marquage moléculaire couplées à des observations en microscopie confocale. De telles données d'imagerie microscopique pour différentes profondeurs du biofilm pourront révéler si les thiols à FPM sont dispersés dans l'ensemble de l'espace extracellulaire ou s'ils sont plutôt séquestrés dans les zones adjacentes aux algues. De plus, des captations à très haute résolution pourraient observer les thiols en périphérie des microorganismes et localiser du même coup le Hg et d'autres métaux dans l'espace extracellulaire des biofilms (Hu et al 2005; Lin et al 2010; François et al 2012).

Néanmoins, les résultats présentés dans le chapitre 2 de ce mémoire sont des observations nouvelles, laissant envisager une implication des thiols à FPM d'origine algale sur la production de MeHg des biofilms périphytiques. Outre les manques à combler précédemment énumérés, certains travaux en laboratoire devraient s'attarder à des aspects concernant les liens entre la présence des thiols à FPM et la production de MeHg par les microorganismes. Par exemple, il serait pertinent de connaître l'effet des différentes espèces de thiols à FPM retrouvées dans les environnements aquatiques sur la biodisponibilité du Hg. En effets, les travaux conduits par le groupe de Schaefer et al. (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014) n'ont rapporté les effets que de quelques espèces de thiols (l'acide mercaptopropionique, la cystéine, le GSH et le dithioérythritol) sur les taux d'acquisition du Hg par les microorganismes. Les espèces de thiols à FPM retrouvées dans l'environnement étant diversifiées et sachant que les espèces de thiols peuvent agir

différemment sur les taux d'acquisition du Hg, l'effet des espèces de thiols les plus abondantes serait une information importante à obtenir. Subséquemment, il serait intéressant de savoir si la présence de plusieurs espèces de thiols à FPM dans un même milieu a des effets synergiques ou compétitifs pour une spéciation au Hg. De plus, seulement deux espèces bactériennes ont été étudiées pour des effets des thiols sur la biodisponibilité du Hg, soit la ferro-réductrice *G. sulfurreducens* (Schaefer and Morel 2009; Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014) et la sulfato-réductrice *D. desulfuricans* ND132 (Schaefer et al 2011; Schaefer et al 2014). Des expérimentations similaires devraient être conduites considérant des représentants d'autres groupes microbiens telles que les méthanogènes, récemment identifiées responsables de la production d'une grande proportion de MeHg retrouvé dans les biofilms périphytiques (Hamelin et al 2011).

Le deuxième objectif du mémoire, traité au chapitre 3, était *d'établir un protocole de conservation et de manipulation d'échantillons naturels pour une conservation et une analyse optimale des thiols à FPM de la phase dissoute provenant de milieux dulcicoles oxygénés*. L'utilisation d'échantillons provenant de milieux naturels nous a permis d'observer les effets de la conservation à moyen et à long terme sur la dégradation des thiols à FPM. Les résultats obtenus nous permettent de déterminer que la température de congélation optimale pour la conservation des échantillons est de -80 °C. En effet, comparativement à un entreposage à -20 °C, les concentrations de thiols étaient beaucoup plus stables lorsque la conservation était faite à -80 °C, dans un congélateur à très basse température. De plus, nous avons observé que la chimie de l'eau, intrinsèque aux matrices utilisées, pouvait affecter les taux de dégradation des thiols à FPM. L'eau d'un lac fluvial mésotrophe a induit des pertes plus rapides pour le GSH, comparativement à l'eau provenant d'un lac oligotrophe.

Nous suggérons qu'une telle dégradation du GSH puisse être la source de plus petits thiols comme la cystéine et la CYS-GLY, qui sont des substrats du GSH (Meister and Anderson 1983). De futures études devraient s'attarder à cette source potentielle de plus petits thiols liée à la dégradation du GSH. Alors qu'une telle production a été rapportée par une dégradation microbienne (Kiene and Taylor 1988; Hu et al 2006; Dupont et al 2006), l'implication de facteurs physico-chimiques pour une production d'origine abiotique reste encore incertaine. De tels résultats pourraient non seulement contribuer à une mesure plus juste des échantillons préservés par une amélioration des méthodes analytiques, mais aussi ajouter des informations importantes quant au cycle des thiols en milieux naturels.

Dans ce travail, nous avons pu observer qu'une manipulation d'échantillons en laboratoire, pendant 5 heures à température pièce, n'affectait pas les concentrations en thiols à FPM. Les thiols étant essentiellement sensibles à des processus de photodégradation liés à l'action des rayons ultraviolets (Moingt et al 2010), les échantillons devraient néanmoins être gardés au noir lors d'une possible exposition à cette gamme de radiation.

Des techniques de lyophilisation furent utilisées dans le passé pour concentrer les échantillons provenant de milieux habituellement pauvres en thiols afin d'améliorer la détection de faibles concentrations (Zhang et al 2004). Suite aux résultats obtenus au chapitre 3, des pertes significatives de concentrations en thiols ont été constatées lors de la soumission des échantillons à cette technique de concentration. Effectivement, les quatre espèces de thiols testées, soit l'AT, la cystéine, la CYS-GLY et le GSH, ont été affectées par la lyophilisation et l'espèce de thiol la plus touchée était la cystéine, qui perdit jusqu'à la moitié de sa concentration. Nous suggérons donc d'éviter l'utilisation de cette technique de concentration, si possible. De nouvelles méthodes analytiques ont récemment été proposées (Laglera et al

2014; Liem-Nguyen et al 2015), améliorant les limites de détection des thiols à FPM dissous par rapport à des analyses par chromatographie liquide plus classiques. Dans l'impossibilité d'éviter des procédés de lyophilisation, des tests préliminaires pourraient fournir des facteurs de correction pour une meilleure prédiction des concentrations en thiols à FPM.

Finalement, nos résultats nous indiquent, tel que précédemment mentionné par la littérature, que l'analyse des thiols à FPM, pour des échantillons d'eau naturelle, devrait être effectuée le plus rapidement possible écourtant au maximum le temps entre l'échantillonnage et l'analyse par chromatographie liquide (Fahey and Newton 1987; Hu et al 2006; Kawakami et al 2006b). Les échantillons devraient être gardés à l'abri de la lumière, plus particulièrement des rayons ultraviolets (Moingt et al 2010) et être rapidement bullés par des gaz inertes afin de diminuer le plus possible le risque d'oxydation par l'oxygène (Simmons et al 2009). Ces dispositions devraient minimiser les pertes de thiols induites par des processus d'oxydation et de dégradation. Néanmoins, l'adoption de ces précautions n'est pas toujours envisageable, lors d'échantillonnages volumineux ou en milieux reculés. Pour cette raison, nous suggérons une méthode de correction applicable aux échantillons naturels devant être entreposés pour un certain temps avant d'être analysés en laboratoire. Cette méthode consiste à déterminer les taux de dégradation des thiols pour de l'eau provenant de chaque site d'échantillonnage et pour chacune des espèces de thiols à FPM afin de calculer les concentrations réelles selon le temps d'entreposage. L'application d'une telle méthode de correction pourrait aider à une mesure plus représentative des concentrations en thiols retrouvées sous formes dissoutes dans les eaux douces des zones oxiques ne permettant pas des précautions exemplaires.

Bibliographie

- Achá D, Pabón CA, Hintelmann H (2012) Mercury methylation and hydrogen sulfide production among unexpected strains isolated from periphyton of two macrophytes of the Amazon. *FEMS Microbiol Ecol* 80:637–645.
- Ahner B a, Price NM, Morel FM (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8433–8436.
- Ahner BA, Morel FMM (1995) Phytochelatin Production in Marine-Algae .2. Induction by Various Metals. *Limnol Oceanogr* 40:658–665.
- Ahner BA, Wei L, Oleson JR, Ogura N (2002) Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Mar Ecol Prog Ser* 232:93–103.
- Alasonati E, Dubascoux S, Lespes G, Slaveykova VI (2010) Assessment of metal–extracellular polymeric substances interactions by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ Chem* 7:215–223.
- Al-Farawati R, van den Berg CMG (2001) Thiols in Coastal Waters of the Western North Sea and English Channel. *Environ Sci Technol* 35:1902–1911.
- Allocati N, Federici L, Masulli M, Di Ilio C (2009) Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J* 276:58–75.
- Amyot M, Lean D, Mierle G (1997) Photochemical formation of volatile mercury in high Arctic lakes. *Environ Toxicol Chem* 16:2054–2063.
- Andreae MO, Jaeschke WA (1992) Exchange of Sulphur between Biosphere and Atmosphere over Temperate and Tropical Regions. *Sulphur Cycl. Cont. Wetl. Terr. Ecosyst. Assoc. Water Bodies*.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur J V (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14:176–182.
- Bartsch RG, Newton GL, Sherrill C, Fahey RC (1996) Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. *J Bacteriol* 178:4742–4746.
- Benoit JM, Gilmour CC, Heyes A, et al (2003) Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic ecosystems. In: Cai Y, Braids OC

- (eds) Biogeochem. Environ. Important Trace Met., American C. American Chemical Society, Washington, DC, pp 262–297
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP (2001a) The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). Environ Sci Technol 35:127–132.
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP (2001b) Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). Appl Environ Microbiol 67:51–58.
- Benoit JM, Mason RP, Gilmour CC (1999) Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol-water partitioning and implications for availability to methylating bacteria. Environ Toxicol Chem 18:2138–2141.
- Benoit JM, Mason RP, Gilmour CC, Aiken GR (2001c) Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades. Geochim Cosmochim Acta 65:4445–4451.
- Bhaskar PV, Bhosle NB (2006) Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. Environ Int 32:191–198.
- Biggs BJB, Close ME (1989) Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flows and nutrients. Freshw Biol 22:209–231.
- Black FJ, Poulin BA, Flegal AR (2012) Factors controlling the abiotic photo-degradation of monomethylmercury in surface waters. Geochim Cosmochim Acta 84:492–507.
- Bluth GJS, Schnetzler CC, Krueger AJ, Walter LS (1993) The contribution of explosive volcanism to global atmospheric sulphur dioxide concentrations. Nature 366:327–329.
- Buffle J, Wilkinson KJ, Van Leeuwen HP (2009) Chemodynamics and bioavailability in natural waters. Environ Sci Technol 43:7170–7174.
- Canfield DE, Raiswell R (1999) The evolution of the sulfur cycle. Am J Sci 299:697–723.
- Cardiano P, Falcone G, Foti C, Sammartano S (2011) Sequestration of Hg²⁺ by Some Biologically Important Thiols. J Chem Eng data 56:4741–4750.
- Carignan R, St-Pierre S, Gächter R (1994) Use of diffusion samplers in oligotrophic lake sediments: Effects of free oxygen in sampler material. Limnol Oceanogr 39:468–474.
- Chen H-W, Huang W-J, Wu T-H, Hon C-L (2014) Effects of extracellular polymeric substances on the bioaccumulation of mercury and its toxicity toward the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J Environ Sci Heal Part A 49:1370–1379.

- Choi SC, Chase T, Bartha R (1994a) Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 60:4072–4077.
- Choi SC, Chase T, Bartha R (1994b) Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 60:1342–1346.
- Cobbett CS (2000) Update on Heavy Metal Stress Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Soil* 123:825–832.
- Cook RB, Kelly CA (1992) Sulphur Cycling and Fluxes in Temperate Dimictic Lakes. *Sulphur Cycl. Cont. Wetl. Terr. Ecosyst. Assoc. Water Bodies*.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745.
- Cremona F, Hamelin S, Planas D, Lucotte M (2009) Sources of organic matter and methylmercury in littoral macroinvertebrates: a stable isotope approach. *Biogeochemistry* 94:81–94.
- Cyr H, Morton KE (2006) Distribution of biofilm exopolymeric substances in littoral sediments of Canadian Shield lakes : the effects of light and substrate. *Can J Fish Aquat Sci* 63:1763–1776.
- Deng G, Zhang T, Yang L, Wang Q (2012) Studies of biouptake and transformation of mercury by a typical unicellular diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Chinese Sci Bull* 58:256–265.
- Desrosiers M (2005) Influence des coupes forestières sur la zone littorale des lacs boréaux et évaluation du rôle du biofilm périphytique dans l'accumulation et la production de méthylmercure. Ph.D. Thesis. Université du Québec à Montréal
- Desrosiers M, Planas D, Mucci A (2006) Mercury methylation in the epilithon of boreal shield aquatic ecosystems. *Environ Sci Technol* 40:1540–1546.
- Dominique Y, Maury-Brachet R, Muresan B, et al (2007) Biofilm and mercury availability as key factors for mercury accumulation in fish (*Curimata cyprinoides*) from a disturbed Amazonian freshwater system. *Environ Toxicol Chem* 26:45–52.
- Dupont CL, Ahner BA (2005) Effects of copper, cadmium, and zinc on the production and exudation of thiols by *Emiliana huxleyi*. *Limnol Oceanogr* 50:508–515.
- Dupont CL, Moffett JW, Bidigare RR, Ahner BA (2006) Distributions of dissolved and particulate biogenic thiols in the subarctic Pacific Ocean. *Deep Sea Res I* 53:1961–1974.

- Dupont CL, Nelson RK, Bashir S, et al (2004) Novel copper-binding and nitrogen-rich thiols produced and exuded by *Emiliana huxleyi*. *Limnol Oceanogr* 49:1754–1762.
- Eckley CS, Watras CJ, Hintelmann H, et al (2005) Mercury methylation in the hypolimnetic waters of lakes with and without connection to wetlands in northern Wisconsin. *Can J Fish Aquat Sci* 62:400–411.
- Ekstrom EB, Morel MM, Benoit JM (2003) Mercury Methylation Independent of the Acetyl-Coenzyme A Pathway in Sulfate-Reducing Bacteria. *69:5414–5422*.
- England R, Wilkinson KJ (2011) Determination of phytochelatin in algal samples using LC-MS. *Int J Environ Anal Chem* 91:185–196.
- Fahey RC (2001) Novel thiols of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* 55:333–56.
- Fahey RC, Buschbacher RM, Newton GL (1987) The Evolution of Glutathione Metabolism in Phototrophic Microorganisms. *J Mol Evol* 25:81–88.
- Fahey RC, Newton GL (1987) Determination of Low-Molecular-Weight Thiols Using Monobromobimane Fluorescent Labeling and High-Performance Liquid Chromatography. *Methods Enzymol* 143:85–96.
- Fitzgerald WF, Lamborg CH (2003) Geochemistry of Mercury in the Environment. *Treatise on Geochemistry*, BS Lollar. Elsevier, New York, pp 107–148
- Fleming EJ, Mack EE, Green PG, Nelson DC (2006) Mercury Methylation from Unexpected Sources: Molybdate-Inhibited Freshwater Sediments and an Iron-Reducing Bacterium. *Appl Env Microbiol* 72:457–464.
- Flemming HC, Wingender J (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* 43:1–8.
- François F, Lombard C, Guigner J-M, et al (2012) Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl Environ Microbiol* 78:1097–1106.
- Furutani A, Rudd JWM (1980) Measurement of Mercury Methylation in Lake Water and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol* 40:770–776.
- Gerbersdorf SU, Westrich B, Paterson DM (2009) Microbial extracellular polymeric substances (EPS) in fresh water sediments. *Microb Ecol* 58:334–349.
- Gilmour CC, Elias DA, Kucken AM, et al (2011) Sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation. *Appl Environ Microbiol* 77:3938–3951.

- Gilmour CC, Henry EA, Mitchell R (1992) Sulfate Stimulation of Mercury Methylation in Freshwater Sediments. *Environ Sci Technol* 26:2281–2287.
- Gilmour CC, Podar M, Bullock AL, et al (2013) Mercury Methylation by Novel Microorganisms from New Environments. *Environ Sci Technol* 47:11810–11820.
- Giordano M, Norici A, Hell R (2005) Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New Phytol* 166:371–382.
- Graham AM, Aiken GR, Gilmour CC (2012) Dissolved organic matter enhances microbial mercury methylation under sulfidic conditions. *Environ Sci Technol* 46:2715–2723.
- Graham AM, Aiken GR, Gilmour CC (2013) Effect of Dissolved Organic Matter Source and Character on Microbial Hg Methylation in Hg-S-DOM Solutions. *Environ Sci Technol* 47:5746–5754.
- Grégoire DS, Poulain AJ (2014) A little bit of light goes a long way: the role of phototrophs on mercury cycling. *Metallomics* 6:396–407.
- Guimaraes JRD, Meili M, Malm O, Brito EMS (1998) Hg methylation in sediments and floating meadows of a tropical lake in the Pantanal floodplain, Brazil. *Sci Total Environ* 213:165–175.
- Hagerthey SE, Bellinger BJ, Wheeler K, et al (2011) Everglades Periphyton: A Biogeochemical Perspective. *Crit Rev Environ Sci Technol* 41:309–343.
- Hamelin S, Amyot M, Barkay T, et al (2011) Methanogens: principal methylators of mercury in lake periphyton. *Environ Sci Technol* 45:7693–7700.
- Hamelin S, Planas D, Amyot M (2015) Mercury methylation and demethylation by periphyton biofilms and their host in a fluvial wetland of the St. Lawrence River (QC, Canada). *Sci Total Environ* 512-513:464–471.
- Hill W (1996) Effects of Light. In: Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL (eds) *Algal Ecol. Freshw. Benthic Ecosyst.* San Diego, pp 121–148
- Holmer M, Storkholm P (2001) Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. *Freshw Biol* 46:431–451.
- Howe G, Merchant S (1992) Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 98:127–136.
- Hsu-Kim H (2007) Stability of metal-glutathione complexes during oxidation by hydrogen peroxide and Cu(II)-catalysis. *Environ Sci Technol* 41:2338–2342.

- Hsu-Kim H, Sedlak DL (2005) Similarities between inorganic sulfide and the strong Hg(II)-complexing ligands in municipal wastewater effluent. *Environ Sci Technol* 39:4035–4041.
- Hu H, Mylon SE, Benoit G (2006) Distribution of the thiols glutathione and 3-mercaptopropionic acid in Connecticut lakes. *Limnol Oceanogr* 51:2763–2774.
- Hu Z, Hidalgo G, Houston PL, et al (2005) Determination of Spatial Distributions of Zinc and Active Biomass in Microbial Biofilms by Two-Photon Laser Scanning Microscopy. *Appl Environ Microbiol* 71:4014–4021.
- Huguet L, Castelle S, Schäfer J, et al (2010) Mercury methylation rates of biofilm and plankton microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana. *Sci Total Environ* 408:1338–1348.
- Jay JA, Murray KJ, Gilmour CC, et al (2002) Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 in the Presence of Polysulfides. *Appl Environ Microbiol* 68:5741–5745.
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J (2003) Protein Disulfide Bond Formation in Prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 72:111–135.
- Kawakami S, Gledhill M, Achterberg E (2006a) Effects of Metal Combinations on the Production of Phytochelatins and Glutathione by the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *BioMetals* 19:51–60.
- Kawakami SK, Gledhill M, Achterberg EP (2006b) Determination of phytochelatins and glutathione in phytoplankton from natural waters using HPLC with fluorescence detection. *Trac-Trends Anal Chem* 25:133–142.
- Kiene RP, Malloy KD, Taylor BF (1990) Sulfur-Containing Amino Acids as Precursors of Thiols in Anoxic Coastal Sediments. *Appl Environ Microbiol* 56:156–161.
- Kiene RP, Taylor BF (1988) Demethylation of dimethylsulfoniopropionate and production of thiols in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 54:2208–2212.
- Knauer K, Ahner B, Xue HB, Sigg L (1998) Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ Toxicol Chem* 17:2444–2452.
- Koval IV (2005) Synthesis, Structure, and Physicochemical Characteristics of Thiols. *Russ J Org Chem* 41:647–664.
- Krabbenhoft DP, Gilmour CC, Benoit JM, et al (1998) Methyl mercury dynamics in littoral sediments of a temperate seepage lake. *Can J Fish Aquat Sci* 55:835–844.

- Krezel A, Szczepanik W, Sokołowska M, et al (2003) Correlations between complexation modes and redox activities of Ni(II)-GSH complexes. *Chem Res Toxicol* 16:855–864.
- Labonté-David É (2012) Relation entre les espèces de mercure, le sélénium et les thiols dans les eaux de surface du parc national du Mont-Tremblant (Laurentides, Québec). M.S. Thesis. Université de Montréal
- Laglera LM, Downes J, Tovar-Sánchez A, Monticelli D (2014) Cathodic pseudopolarography: A new tool for the identification and quantification of cysteine, cystine and other low molecular weight thiols in seawater. *Anal Chim Acta* 836:24–33.
- Laglera LM, van den Berg CMG (2006) Photochemical oxidation of thiols and copper complexing ligands in estuarine waters. *Mar Chem* 101:130–140.
- Latch DE, Mcneill K (2006) Microheterogeneity of Singlet Oxygen Distribution in Irradiated Humic Acid Solutions. *Science* (80-) 311:1743–1747.
- Le Faucheur S, Behra R, Sigg L (2005) Thiol and metal contents in periphyton exposed to elevated copper and zinc concentrations: a field and microcosm study. *Environ Sci Technol* 39:8099–8107.
- Leal MFC, Vasconcelos M, van den Berg CMG (1999) Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliana huxleyi* in seawater cultures. *Limnol Oceanogr* 44:1750–1762.
- Lee C, Martin RV, van Donkelaar A, et al (2011) SO₂ emissions and lifetimes: Estimates from inverse modeling using in situ and global, space-based (SCIAMACHY and OMI) observations. *J Geophys Res Atmos* 116:1–13.
- Lehnerr I, St. Louis VL (2009) Importance of Ultraviolet Radiation in the Photodemethylation of Methylmercury in Freshwater Ecosystems. *Environ Sci Technol* 43:5692–5698.
- Letovsky E, Heal KV, Carvalho L, Spears BM (2011) Intracellular Versus Extracellular Iron Accumulation in Freshwater Periphytic Mats Across a Mine Water Treatment Lagoon. *Water, Air, Soil Pollut* 223:1519–1530.
- Liem-Nguyen V, Bouchet S, Björn E (2015) Determination of Sub-Nanomolar Levels of Low Molecular Mass Thiols in Natural Waters by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry after Derivatization with p-(Hydroxymercuri) Benzoate and Online Preconcentration. *Anal Chem* 87:1089–1096.
- Likens GE, Buso DC, Butler TJ (2005) Long-term relationships between SO₂ and NO_x emissions and SO₄²⁻ and NO₃⁻ concentration in bulk deposition at the Hubbard Brook Experimental Forest, NH. *J Environ Monit* 7:964–968.

- Lin TY, Kampalath RA, Lin C, et al (2013) Investigation of Mercury Methylation Pathways in Biofilm versus Planktonic Cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Environ Sci Technol* 47:5695–5702.
- Lin W, Cao X, Ding Y, et al (2010) A reversible fluorescent Hg²⁺ chemosensor based on a receptor composed of a thiol atom and an alkene moiety for living cell fluorescence imaging. *Org Biomol Chem* 8:3618–3620.
- Lowe RL (1996) Periphyton Patterns in Lakes. In: Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL (eds) *Algal Ecol. Freshw. Benthic Ecosyst.* Academic Press, San Diego, pp 57–76
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711–760.
- Mergler D, Anderson HA, Chan LHM, et al (2007) Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 36:3–11.
- Moingt M, Bressac M, Bélanger D, Amyot M (2010) Role of ultra-violet radiation, mercury and copper on the stability of dissolved glutathione in natural and artificial freshwater and saltwater. *Chemosphere* 80:1314–1320.
- Mopper K, Taylor BF (1986) Biogeochemical cycling of sulfur: Thiols in coastal marine sediments. In: Sohn ML (ed) *Org. Mar. geochemistry*, ACS Symp. pp 324–339
- Newton GL, Arnold K, Price MS, et al (1996) Distribution of thiols in microorganisms: Mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol* 178:1990–1995.
- Newton GL, Fahey RC, Cohen G, Aharonowitz Y (1993) Low-molecular-weight thiols in streptomycetes and their potential role as antioxidants. *J Bacteriol* 175:2734–2742.
- Newton GL, Javor B (1985) γ -Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria. *J Bacteriol* 161:438–441.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascobate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279.
- Oremland RS, Culbertson CW, Winfrey MR (1991) Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation. *Appl Environ Microbiol* 57:130–137.
- Owens RA, Hartman PE (1986) Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 168:109–114.
- Pacyna JM, Keeler GJ (1995) Sources of Mercury in the Arctic. *Water Air Soil Pollut* 80:621–632.

- Parks JM, Johns A, Podar M, et al (2013) The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science* (80-) 339:1332–1335.
- Pedrero Z, Bridou R, Mounicou S, et al (2012) Transformation, Localization, and Biomolecular Binding of Hg Species at Subcellular Level in Methylating and Nonmethylating Sulfate-Reducing Bacteria. *Environ Sci Technol* 46:11744–11751.
- Perron T, Chételat J, Gunn J, et al (2014) Effects of experimental thermocline and oxycline deepening on methylmercury bioaccumulation in a Canadian Shield lake. *Environ Sci Technol* 48:2626–2634.
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitao MAS, et al (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 39:1008–1018.
- Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, et al (2010) Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmos Chem Phys* 10:5951–5964.
- Platt RM, Geesey GG, Davis JD, White DC (1985) Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Can J Microbiol* 31:675–680.
- Polle A, Rennenberg H (1992) Field studies on Norway spruce trees at high altitudes : II . Defence systems against oxidative stress in needles. *New Phytol* 121:635–642.
- Pongratz R, Heumann KG (1998) Production of Methylated Mercury and Lead by Polar Macroalgae - a Significant Natural Source for Atmospheric Heavy Metals in Clean Room Compartments. *Chemosphere* 36:1935–1946.
- Potera C (1996) Biofilms Invade Microbiology. *Science* (80-) 273:1795–1797.
- Pyle DM, Mather T a. (2003) The importance of volcanic emissions for the global atmospheric mercury cycle. *Atmos Environ* 37:5115–5124.
- R Development Core Team R (2011) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing
- Ravichandran M (2004) Interactions between mercury and dissolved organic matter - a review. *Chemosphere* 55:319–331.
- Rijstenbil JW, Wijnholds JA (1996) HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms : pool size , redox state and response to copper and cadmium exposure. *Mar Biol* 127:45–54.

- Satoh M, Hirachi Y, Yoshioka A, et al (2002) Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. *J Phycol* 38:983–990.
- Schaefer JK, Morel FMM (2009) High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*. *Nat Geosci* 2:123–126.
- Schaefer JK, Rocks SS, Zheng W, et al (2011) Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8714–8719.
- Schaefer KJ, Szczuka A, Morel FMM (2014) Effect of Divalent Metals on Hg(II) Uptake and Methylation by Bacteria. *Environ Sci Technol* 48:3007–3013.
- Schlesinger WH, Bernhardt ES (2013) *Biogeochemistry: An analysis of global change*, 3rd edn. Academic Press
- Sellers P, Kelly CA, Rudd JWM, MacHutchon AR (1996) Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature* 380:694–697.
- Sherrill C, Fahey RC (1998) Import and metabolism of glutathione by *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 180:1454–1459.
- Simmons DBD, Hayward AR, Hutchinson TC, Emery RJN (2009) Identification and quantification of glutathione and phytochelatin from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free extraction. *Anal Bioanal Chem* 395:809–817.
- St. Louis VL, Rudd JWM, Kelly CA, et al (1994) Importance of Wetlands as Sources of Methyl Mercury to Boreal Forest Ecosystems. *Can J Fish Aquat Sci* 51:1065–1076.
- Streets DG, Canty T, Carmichael GR, et al (2013) Emissions estimation from satellite retrievals: A review of current capability. *Atmos Environ* 77:1011–1042.
- Sutherland IW (2001) The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227.
- Tang D, Hung C-C, Warnken KW, Santschi PH (2000) The distribution of biogenic thiols in surface waters of Galveston Bay. *Limnol Oceanogr* 45:1289–1297.
- Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnol Oceanogr* 40:1243–1253.
- UNEP (2013) *Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport*. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland

- Vachon D, del Giorgio PA. (2014) Whole-Lake CO₂ Dynamics in Response to Storm Events in Two Morphologically Different Lakes. *Ecosystems* 1338–1353.
- Vijayaraghavan K, Yun Y-S (2008) Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol Adv* 26:266–291.
- Visscher PT, Kiene RP, Taylor BF (1994) Demethylation and cleavage of dimethylsulfoniopropionate in marine intertidal sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 14:179–189.
- Wei LP, Ahner BA (2005) Sources and sinks of dissolved phytochelatin in natural seawater. *Limnol Oceanogr* 50:13–22.
- Wetzel RG (2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems*, 3rd edn. Academic Press
- Whelpdale DM (1992) An Overview of the Atmospheric Sulphur Cycle. *Sulphur Cycl. Cont. Wetl. Terr. Ecosyst. Assoc. Water Bodies*.
- Wiederholt KM, Steele JL (1994) Glutathione Accumulation in Lactococci. *J Dairy Sci* 77:1183–1188.
- Wotton RS (2011) EPS (Extracellular Polymeric Substances), silk, and chitin: vitally important exudates in aquatic ecosystems. *J North Am Benthol Soc* 30:762–769.
- Zhang D, Pan X, Mostofa KMG, et al (2010) Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: an application of fluorescence spectroscopy. *J Hazard Mater* 175:359–365.
- Zhang J, Wang F, House JD, Page B (2004) Thiols in wetland interstitial waters and their role in mercury and methylmercury speciation. *Limnol Oceanogr* 49:2276–2286.
- Zhang T, Hsu-Kim H (2010) Photolytic degradation of methylmercury enhanced by binding to natural organic ligands. *Nat Geosci* 3:473–476.
- Zhang Z, Nadezhina E, Wilkinson KJ (2011) Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1075–1081.
- Zheng W, Lin H, Mann BF, et al (2013) Oxidation of Dissolved Elemental Mercury by Thiol Compounds under Anoxic Conditions. *Environ Sci Technol* 47:12827–12834.

Annexe A : Informations supplémentaires du chapitre 2

Total Hg and MeHg analysis

THg measurements in EPS fractions were performed following US EPA method 1631 using cold vapor atomic fluorescence spectrophotometry (CVAFS, Tekran 2600, Toronto, Canada). Samples were first oxidized with BrCl, reduced with SnCl₂, than pre-concentrated on a gold amalgamator (detection limit: 0.04 ng L⁻¹). A run of new standards (0.5 ng L⁻¹) followed each set of 12 samples for analytical stability control. For THg in biofilm pellets, samples were freeze-dried before analysis with a direct Hg analyzer (DMA-80, Milestone, Sorisole, Italy). Cold vapor atomic absorption spectrometry was conducted after samples were burned at 750 °C and Hg vapors were captured on gold traps (US EPA 7473 method; detection limit: 0.05 ng sample⁻¹). THg measurements in colloidal EPS fraction are not available for the month of June, thus only July and August data are considered for THg values in total biofilm and extracellular colloidal fraction.

MeHg was measured for colloidal and capsular EPS fractions using US EPA method 1630 on CVAFS Tekran 2700 (Toronto, Canada) with a detection limit of 0.01 ng L⁻¹. Initial distillation was done using 45 mL of diluted samples under nitrogen flow at 130 °C then 40 µL of 2.5% (w/v) ascorbic acid was added and the distillate was left for 15 min. Ethylation was done using sodium tetraethylborate (NaBEt₄) with 30 mL of distillate. MeHg was trapped on Tenax and separated through gas chromatography before measurement. Certified reference materials were used for quality control (National Research Council, Canada; TORT-2 and DORM-3). Mean recovery was 96 ± 13% (*n* = 19) for MeHg TORT-2 measurements on Tekran2700 and it was 103 ± 4% (*n* = 21) and 102 ± 3% (*n* = 14) for THg TORT-2 and

DORM-3 respectively on DMA-80. The Hg analyses met the Canadian Association for Laboratory Accreditation (CALA) inter-calibration criteria.

Table A.I. MeHg and THg concentrations measured in both dissolved (0.45 μm filtered) and total (unfiltered) water fractions for the different zones of Lake Croche on years 2012 and 2013.

	Dissolved		Total	
	MeHg (ng L ⁻¹)	THg (ng L ⁻¹)	MeHg (ng L ⁻¹)	THg (ng L ⁻¹)
June 2012				
Epilimnion	0.03 ± 0.01	0.54 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.84 ± 0.09
Metalimnion	0.02 ± 0.00	0.49 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.94 ± 0.08
Hypolimnion	0.71 ± 0.12	1.00 ± 0.06	0.77 ± 0.04	2.26 ± 0.10
Littoral zone	0.08 ± 0.01	0.65 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.87 ± 0.07
November 2013				
Epilimnion	0.02 ± 0.00	0.61 ± 0.09	0.03 ± 0.00	0.90 ± 0.06
Hypolimnion	0.62 ± 0.02	1.05 ± 0.04	0.70 ± 0.02	2.10 ± 0.04

These results have been shared by Perron et al. via personal communication. Refer to Perron et al. 2014. Environ. Sci. Technol. 48 (5): 2626-2634. for sampling design and analysis.

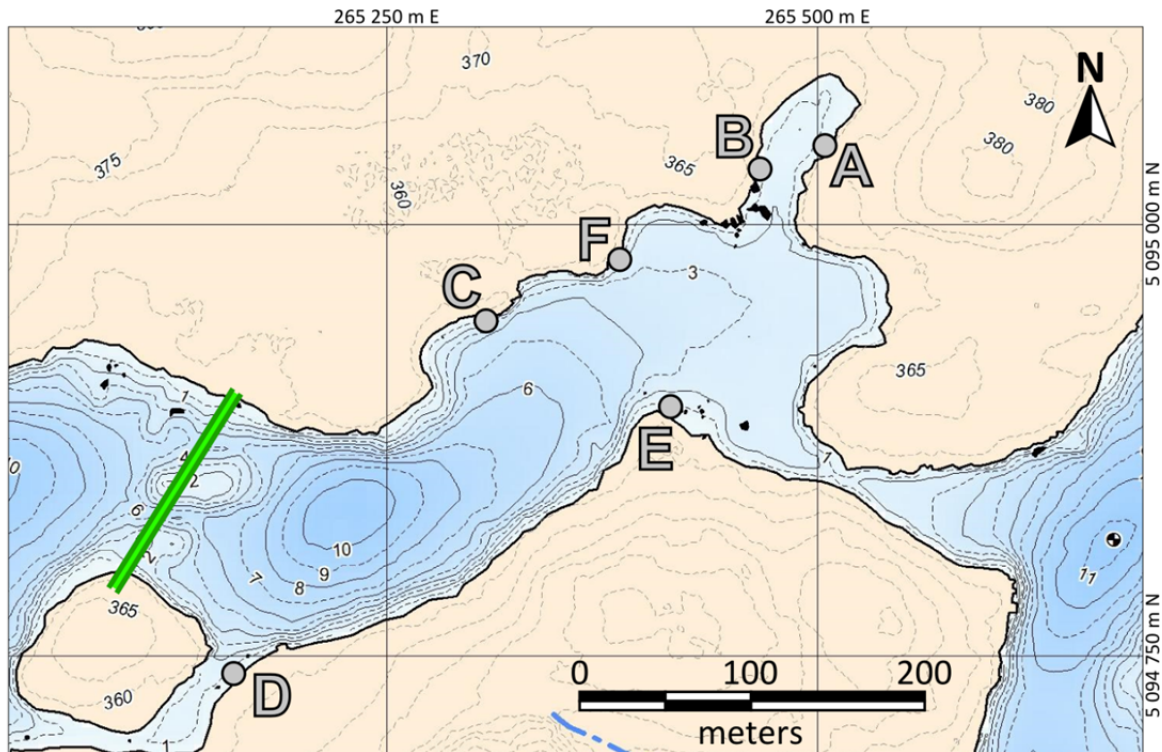


Figure A.I. A bathymetric map of the middle basin of Lake Croche (St-Hippolyte, QC, Canada) showing the location of the different sampling sites (A to F). The double green line represents the polyethylene curtain (120 m x 6 m) installed since 2007 to isolate western basin from the middle one. The map is modified from a bathymetric map created by R. Carignan (University of Montreal, 2013).

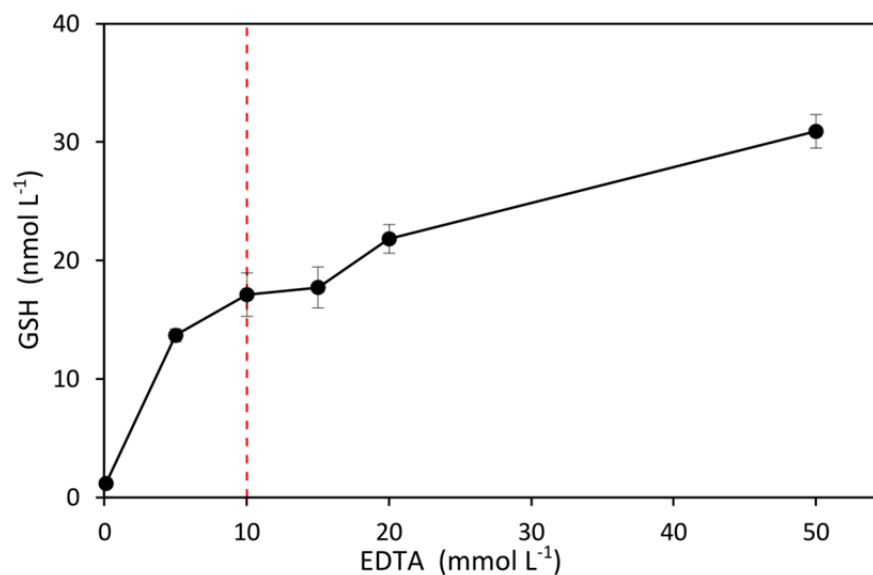


Figure A.II. Effect of different concentrations of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution in natural lake water (filtered at 0.45 μm) on the recovery of GSH from the capsular fraction of EPS after a first extraction of the colloidal fraction. The EDTA concentration (10 mmol L^{-1}) used for capsular fraction extraction was determined to be optimal and to prevent cell lysis (represented by the red broken line). Measurements were done in triplicates.

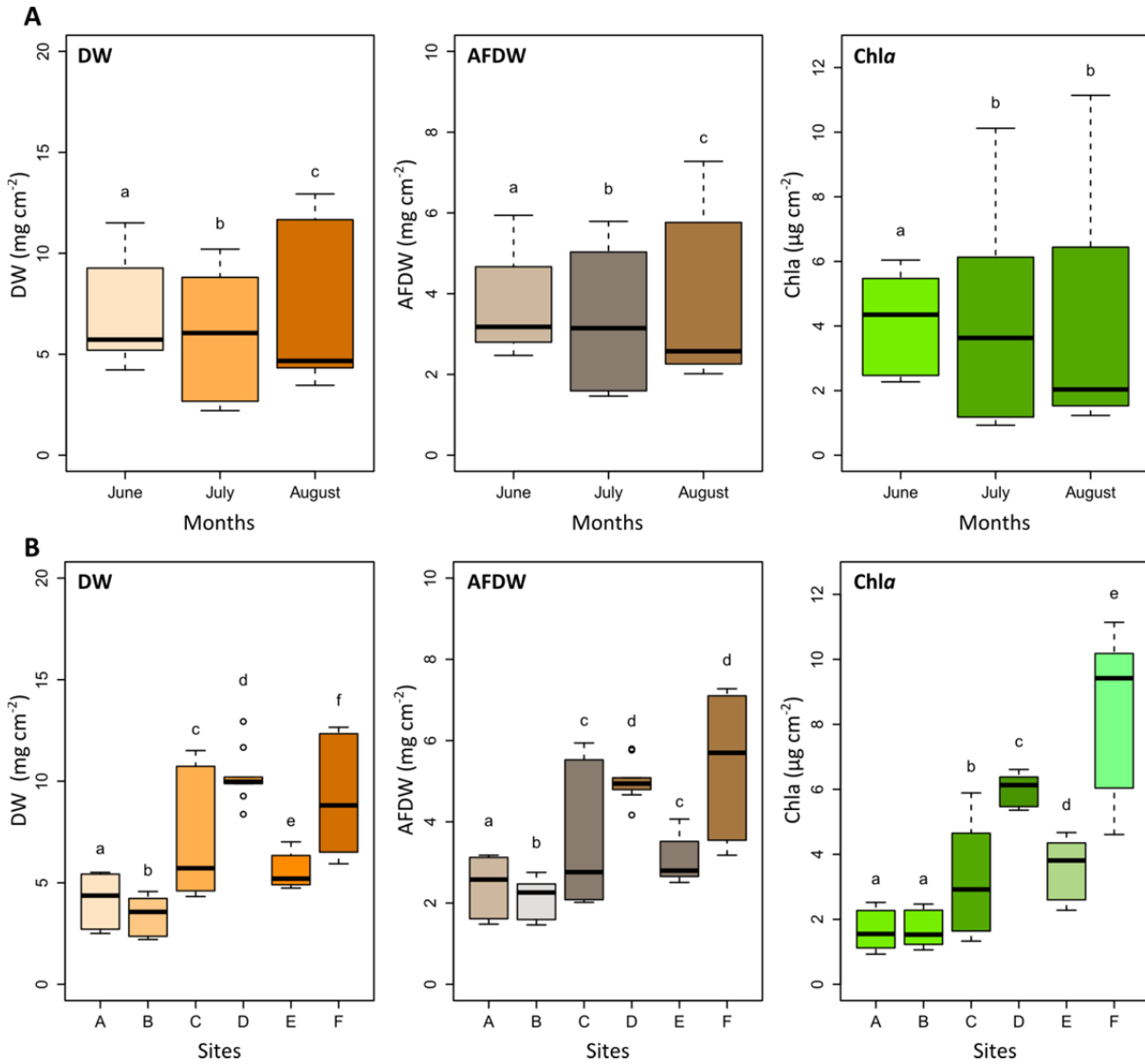


Figure A.III. Boxplot of the main biofilm descriptors including DW, AFDW, and Chla for sampled summer months. Significant differences between months (A) and sites (B) are indicated by different letters. Measurements were done in triplicates.

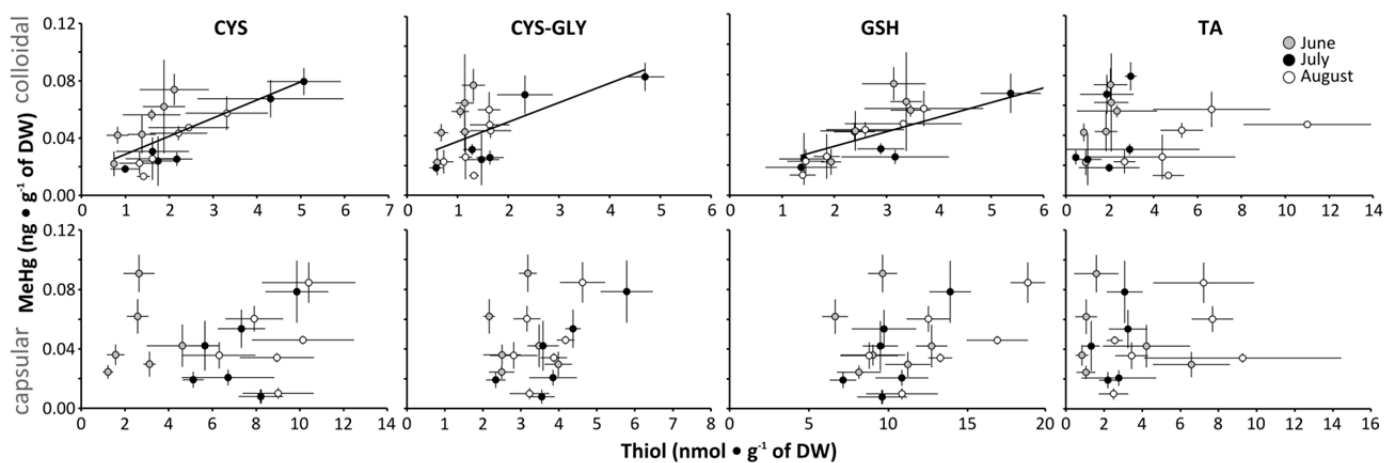


Figure A.IV. Relationships between MeHg and thiol concentrations from the extracellular portion of biofilms, where top row represents the colloidal and bottom row the capsular fraction of the EPS: CYS ($p < 0.01$; $R^2_{\text{adj}} = 0.47$ and $p > 0.05$), CYS-GLY ($p < 0.05$; $R^2_{\text{adj}} = 0.31$ and $p > 0.05$), GSH ($p < 0.001$; $R^2_{\text{adj}} = 0.56$ and $p > 0.05$), and TA (both $p > 0.05$) for colloidal and capsular EPS fractions respectively.

**Annexe B : Tableaux des concentrations en thiols du lac
Saint-Pierre de l'été 2012 et de l'été 2013**

Tableau B.I : Concentrations des thiols (moyenne \pm écart type) mesurées dans la phase dissoute des grands herbiers du lac Saint-Pierre en juin 2012 pour la γ -glutamylcystéine (γ -EC), l'acide thioglycolique (AT) la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) selon le temps de conservation à -20°C . Les échantillons ont été traités en duplicas.

Sites	Temps (jours)	Coordonnées		Thiols (nM)							
		X WGS84	Y WGS84	γ -EC		AT		CYS-GLY		GSH	
1.5a	13	-72.9196	46.1376	0.22	\pm 0.03	1.07	\pm 0.01	0.71	\pm 0.02	0.13	\pm 0.07
1a	9	-72.9215	46.1393	0.28	\pm 0.39	0.34	\pm 0.01	0.55	\pm 0.28	0.12	\pm 0.17
1c	9	-72.9112	46.1445	-		0.84	\pm 0.40	0.71	\pm 0.06	-	
1d	9	-72.9054	46.1471	-		0.85	\pm NA	0.68	\pm NA	0.15	\pm NA
1g	15	-72.8898	46.1549	-		0.34	\pm 0.09	0.54	\pm 0.13	-	
1i	15	-72.8793	46.1601	-		0.38	\pm 0.00	0.63	\pm 0.01	0.15	\pm 0.04
1k	15	-72.8687	46.1653	-		0.37	\pm 0.04	0.67	\pm 0.01	0.10	\pm 0.01
2c	9	-72.9072	46.1416	0.25	\pm NA	1.18	\pm NA	0.83	\pm NA	0.38	\pm NA
2d	9	-72.9021	46.1433	-		0.27	\pm NA	0.61	\pm NA	-	
2e	15	-72.8967	46.1461	0.29	\pm 0.06	1.53	\pm 0.01	0.93	\pm 0.18	0.17	\pm 0.02
2f	15	-72.8914	46.1487	-		0.92	\pm 0.21	0.77	\pm 0.03	0.13	\pm 0.09
2j	15	-72.8702	46.1590	-		0.43	\pm 0.15	0.72	\pm 0.07	0.18	\pm 0.11
3c	9	-72.9035	46.1372	-		1.31	\pm 0.18	0.79	\pm 0.15	-	
3e	13	-72.8929	46.1424	-		0.85	\pm 0.07	0.93	\pm 0.27	0.13	\pm 0.18
3g	15	-72.8824	46.1476	0.24	\pm 0.07	0.83	\pm 0.02	0.82	\pm 0.01	0.13	\pm 0.01
3i	15	-72.8718	46.1528	-		0.40	\pm 0.21	0.77	\pm 0.00	0.12	\pm 0.02
3k	15	-72.8612	46.1582	-		0.36	\pm 0.04	0.63	\pm 0.02	0.19	\pm 0.10
3m	13	-72.8506	46.1633	-		0.17	\pm 0.24	0.36	\pm 0.22	0.16	\pm 0.02
4d	12	-72.8945	46.1361	-		1.30	\pm 0.63	0.80	\pm 0.18	0.10	\pm 0.00
4e	12	-72.8892	46.1387	0.26	\pm 0.08	0.98	\pm 0.64	0.74	\pm 0.16	0.49	\pm 0.09
4f	12	-72.8839	46.1413	-		0.93	\pm 0.02	0.73	\pm 0.02	0.18	\pm 0.01
4h	15	-72.8733	46.1465	-		0.89	\pm 0.07	0.94	\pm 0.01	0.15	\pm 0.02
4j	15	-72.8628	46.1517	-		0.24	\pm 0.13	0.74	\pm 0.03	0.22	\pm 0.20
5d	14	-72.8908	46.1325	0.24	\pm 0.09	0.82	\pm 0.04	0.68	\pm 0.01	0.17	\pm 0.06
5f	9	-72.8800	46.1376	0.23	\pm NA	1.04	\pm NA	0.77	\pm NA	0.39	\pm NA
5h	12	-72.8696	46.1428	-		0.59	\pm 0.80	0.62	\pm 0.29	0.35	\pm 0.32
5j	8	-72.8590	46.1480	-		0.63	\pm 0.18	0.58	\pm 0.05	0.15	\pm 0.02
5l	16	-72.8483	46.1532	-		0.35	\pm 0.02	0.81	\pm 0.02	0.32	\pm 0.30
5m	13	-72.8432	46.1558	-		-		0.51	\pm 0.00	0.11	\pm 0.01
5o	15	-72.8326	46.1610	0.19	\pm 0.03	0.14	\pm 0.19	0.67	\pm 0.24	0.51	\pm 0.57
6b	14	-72.8968	46.1249	0.21	\pm 0.13	1.13	\pm 0.04	0.56	\pm 0.04	0.18	\pm 0.06
6f	12	-72.8765	46.1347	0.43	\pm 0.06	1.06	\pm 0.88	0.63	\pm 0.33	0.17	\pm 0.07
6h	13	-72.8659	46.1391	0.29	\pm 0.03	1.70	\pm 0.26	0.79	\pm 0.15	0.19	\pm 0.03
6i	14	-72.8606	46.1418	0.30	\pm 0.05	0.40	\pm 0.33	0.51	\pm 0.08	0.14	\pm 0.01
6j	9	-72.8553	46.1443	-		1.18	\pm 0.49	0.72	\pm 0.05	0.30	\pm 0.27

(suite du tableau B.I)

Sites	Temps (jours)	Coordonnées		Thiols (nM)							
		X WGS84	Y WGS84	γ -EC		AT		CYS-GLY		GSH	
6k	14	-72.8500	46.1469	0.21	± 0.14	0.29	± 0.23	0.61	± 0.19	0.14	± 0.02
6l	13	-72.8448	46.1495	0.22	± 0.11	0.91	± 0.06	0.74	± 0.07	0.17	± 0.09
6n	14	-72.8342	46.1547	-		-		0.60	± 0.20	0.12	± 0.02
6p	14	-72.8236	46.1599	0.29	± 0.06	-		0.67	± 0.08	0.15	± 0.01
7h	14	-72.8621	46.1355	0.20	± 0.11	0.36	± 0.06	0.57	± 0.05	-	
7j	12	-72.8516	46.1407	0.21	± 0.02	0.98	± 0.97	0.68	± 0.30	-	
7l	12	-72.8410	46.1458	0.30	± 0.10	0.91	± 1.06	0.71	± 0.23	0.34	± 0.21
7n	9	-72.8304	46.1511	0.19	± 0.00	1.15	± 0.37	0.64	± 0.22	0.55	± 0.20
7p	9	-72.8198	46.1562	-		0.65	± NA	0.28	± NA	0.21	± NA
8n	15	-72.8267	46.1474	-		0.44	± 0.12	0.53	± 0.09	0.24	± 0.06
8p	12	-72.8169	46.1524	0.20	± 0.09	0.81	± 0.77	0.51	± 0.11	0.52	± 0.10
AMO	9	-72.9383	46.1292	-		0.42	± NA	0.54	± NA	-	
STF	9	-72.9271	46.1253	0.25	± 0.17	1.03	± 0.42	0.45	± 0.16	0.10	± 0.02
YAM	9	-72.9289	46.1251	0.37	± 0.17	1.91	± 0.72	0.85	± 0.33	0.16	± NA

(-), sous la limite de détection; NA, aucun réplica

Les échantillons recueillis sur le lac Saint-Pierre ont été filtrés la journée même de retour au laboratoire de terrain à l'aide de tours de filtration et de membranes de polycarbonate (74 mm de diamètre, 0.45 μ m de taille de pores). Ils ont par la suite été conservés au noir dans des bouteilles HDPE de 30 mL à -20°C jusqu'à l'analyse des thiols. Le temps de conservation, entre la prise de l'échantillon sur le terrain et l'analyse au HPLC, figure dans la colonne « Temps » du tableau B.I.

Tableau B.II : Concentrations des thiols (moyenne \pm écart type) mesurées dans la phase dissoute des grands herbiers du lac Saint-Pierre en août 2012 pour la γ -glutamylcystéine (γ -EC), l'acide thioglycolique (AT) la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) selon le temps de conservation à -20°C . Les échantillons ont été traités en triplics.

Sites	Temps (jours)	Coordonnées		Thiols (nM)							
		X WGS84	Y WGS84	γ -EC		AT		CYS-GLY		GSH	
1a	8	-72.9215	46.1393	-		0.14 \pm 0.01		0.61 \pm 0.09		0.17 \pm 0.07	
1b	20	-72.9169	46.1439	-		0.33 \pm 0.02		0.98 \pm 0.09		0.29 \pm 0.19	
1c	7	-72.9110	46.1445	0.24 \pm 0.1		-		0.46 \pm 0.04		0.26 \pm 0.06	
1d	15	-72.9057	46.1471	-		0.16 \pm 0.01		0.57 \pm 0.15		0.20 \pm 0.07	
1g	19	-72.8890	46.1553	-		0.17 \pm 0.15		0.92 \pm 0.66		0.11 \pm 0.06	
1i	19	-72.8685	46.1656	-		0.17 \pm 0.12		0.98 \pm 0.74		0.31 \pm 0.22	
1k	19	-72.8687	46.1653	-		0.36 \pm 0.05		1.81 \pm 0.17		0.31 \pm 0.04	
2b	20	-72.9129	46.1402	-		0.32 \pm 0.02		1.06 \pm 0.02		0.41 \pm 0.25	
2c	20	-72.9076	46.1429	0.19 \pm 0.0		0.25 \pm 0.02		0.76 \pm 0.04		0.24 \pm 0.05	
2d	20	-72.9022	46.1454	-		0.39 \pm 0.03		1.93 \pm 0.09		0.27 \pm 0.04	
2e	20	-72.8967	46.1461	0.25 \pm 0.04		-		0.59 \pm 0.04		0.15 \pm 0.03	
2f	16	-72.8914	46.1487	-		0.22 \pm 0.01		0.72 \pm 0.01		0.29 \pm 0.08	
2j	19	-72.8702	46.1592	-		0.22 \pm 0.14		1.17 \pm 0.70		0.19 \pm 0.10	
3b	18	-72.9108	46.1388	0.23 \pm 0.08		0.55 \pm 0.02		2.28 \pm 0.11		0.41 \pm 0.05	
3e	8	-72.8929	46.1424	0.26 \pm 0.08		-		0.53 \pm 0.05		0.14 \pm 0.01	
3g	16	-72.8825	46.1476	-		0.22 \pm 0.02		0.69 \pm 0.08		0.23 \pm 0.06	
3h	16	-72.8932	46.1424	-		0.14 \pm 0.03		0.57 \pm 0.05		0.12 \pm 0.01	
3i	26	-72.8715	46.1526	-		0.17 \pm 0.01		0.63 \pm 0.05		0.22 \pm 0.01	
3k	16	-72.8612	46.1580	-		0.15 \pm 0.03		0.48 \pm 0.11		0.13 \pm 0.05	
4c	25	-72.9000	46.1366	-		0.31 \pm 0.02		0.78 \pm 0.03		0.23 \pm 0.03	
4d	20	-72.8922	46.1396	-		0.28 \pm 0.01		0.75 \pm 0.02		0.21 \pm 0.07	
4e	8	-72.8892	46.1387	-		0.20 \pm 0.05		0.55 \pm 0.04		0.19 \pm 0.04	
4f	8	-72.8839	46.1413	0.20 \pm 0.05		-		0.42 \pm 0.02		0.16 \pm 0.06	
4h	26	-72.8734	46.1465	-		0.19 \pm 0.01		0.69 \pm 0.12		0.10 \pm 0.03	
4j	26	-72.8625	46.1517	-		0.14 \pm 0.01		0.64 \pm 0.09		0.14 \pm 0.03	
5d	8	-72.8907	46.1324	-		-		0.47 \pm 0.04		0.14 \pm 0.04	
5f	17	-72.8803	46.1378	-		0.29 \pm 0.02		0.57 \pm 0.01		0.18 \pm 0.06	
5h	16	-72.8696	46.1428	-		0.15 \pm 0.01		0.61 \pm 0.03		0.21 \pm 0.04	
5j	26	-72.8590	46.1478	-		0.12 \pm 0.01		0.60 \pm 0.03		0.12 \pm 0.04	
5l	16	-72.8485	46.1531	-		0.17 \pm 0.02		0.62 \pm 0.03		0.28 \pm 0.03	
5o	26	-72.8326	46.1609	-		0.13 \pm 0.00		0.65 \pm 0.10		0.17 \pm 0.04	
6b	8	-72.8975	46.1235	0.31 \pm 0.12		0.19 \pm 0.04		0.66 \pm 0.09		0.45 \pm 0.06	
6f	8	-72.8764	46.1340	0.41 \pm 0.11		-		0.41 \pm 0.04		0.19 \pm 0.04	
6h	8	-72.8659	46.1392	0.32 \pm 0.04		0.12 \pm 0.01		0.51 \pm 0.03		0.26 \pm 0.04	
6i	8	-72.8606	46.1418	-		-		0.43 \pm 0.04		0.24 \pm 0.07	

(suite du tableau B.II)

Sites	Temps (jours)	Coordonnées		Thiols (nM)							
		X WGS84	Y WGS84	γ -EC	AT		CYS-GLY		GSH		
6j	15	-72.8553	46.1443	-	0.20	± 0.01	0.61	± 0.11	0.22	± 0.09	
6k	15	-72.8500	46.1469	-	0.17	± 0.02	0.62	± 0.08	0.29	± 0.28	
6l	8	-72.8447	46.1495	-	-		0.58	± 0.02	0.16	± 0.03	
6n	19	-72.8343	46.1545	-	0.39	± 0.04	1.73	± 0.02	0.36	± 0.05	
6p	21	-72.8235	46.1600	-	0.15	± 0.01	0.62	± 0.01	0.35	± 0.15	
7h	8	-72.8620	46.1354	0.59	± 0.18	-	0.40	± 0.03	0.31	± 0.07	
7j	15	-72.8516	46.1407	-	0.19	± 0.03	0.52	± 0.09	0.22	± 0.04	
7l	15	-72.8410	46.1459	-	0.26	± 0.02	0.59	± 0.19	0.28	± 0.10	
7n	17	-72.8304	46.1511	-	0.24	± 0.01	0.58	± 0.04	0.19	± 0.01	
7p	15	-72.8198	46.1562	-	0.13	± 0.00	0.60	± 0.01	0.42	± 0.07	
8n	8	-72.8267	46.1474	0.21	± 0.05	-	0.30	± 0.06	0.22	± 0.07	
8o	18	-72.8207	46.1518	-	0.47	± 0.01	1.55	± 0.09	0.35	± 0.06	
AMO	15	-72.9381	46.1303	-	0.16	± 0.04	0.59	± 0.09	0.19	± 0.05	
STF	15	-72.9273	46.1252	-	0.23	± 0.04	0.77	± 0.16	0.39	± 0.21	
YAM	15	-72.9290	46.1255	-	0.20	± 0.02	0.73	± 0.15	0.38	± 0.35	

(-), sous la limite de détection

Les échantillons recueillis sur le lac Saint-Pierre ont été filtrés la journée même de retour au laboratoire de terrain à l'aide de tours de filtration et de membranes de polycarbonate (74 mm de diamètre, 0.45 μ m de taille de pores). Ils ont par la suite été conservés au noir dans des bouteilles HDPE de 30 mL à -20°C jusqu'à l'analyse des thiols. Le temps de conservation, entre la prise de l'échantillon sur le terrain et l'analyse au HPLC, figure dans la colonne « Temps » du tableau B.II.

Tableau B.III : Concentrations des thiols (moyenne \pm écart type) mesurées dans la phase dissoute des grands herbiers du lac Saint-Pierre en août 2013 pour la cystéine (CYS), l'acide thioglycolique (AT) la L-cystéine-L-glycine (CYS-GLY) et le glutathion (GSH) selon le temps de conservation à -20°C. Les échantillons ont été traités en triplicas.

Sites	Temps (jours)	Coordonnées		Thiols (nM)							
		X WGS84	Y WGS84	CYS		AT		CYS-GLY		GSH	
1.5a	40	-72.9195	46.1376	0.23	\pm 0.07	2.12	\pm 0.14	1.13	\pm 0.02	0.27	\pm 0.08
1a	14	-72.9207	46.1396	0.37	\pm 0.13	2.65	\pm 0.47	1.18	\pm 0.14	0.20	\pm 0.15
1c	38	-72.9109	46.1448	0.40	\pm 0.17	1.98	\pm 0.43	0.90	\pm 0.16	0.23	\pm 0.10
1d	38	-72.9057	46.1473	0.40	\pm 0.16	1.91	\pm 0.18	0.90	\pm 0.03	0.17	\pm 0.02
1g	33	-72.8887	46.1556	0.40	\pm 0.31	1.25	\pm 0.15	0.84	\pm 0.14	0.26	\pm 0.20
1i	13	-72.8792	46.1600	0.31	\pm 0.17	1.16	\pm 0.36	0.68	\pm 0.06	0.17	\pm 0.01
1k	23	-72.8680	46.1713	0.33	\pm 0.13	1.35	\pm 0.56	0.92	\pm 0.30	0.17	\pm 0.07
2c	40	-72.9072	46.1412	0.23	\pm 0.03	1.55	\pm 0.18	0.96	\pm 0.10	0.16	\pm 0.05
2d	40	-72.9019	46.1436	0.31	\pm 0.04	2.18	\pm 0.56	1.26	\pm 0.31	0.23	\pm 0.02
2e	38	-72.8967	46.1460	0.23	\pm 0.07	1.94	\pm 0.76	1.02	\pm 0.36	0.16	\pm 0.03
2f	33	-72.8915	24.1487	0.29	\pm 0.08	1.19	\pm 0.66	0.76	\pm 0.25	0.21	\pm 0.10
2j	23	-72.8699	46.1591	0.27	\pm 0.10	1.35	\pm 0.37	0.67	\pm 0.07	0.23	\pm 0.05
3c	10	-72.9037	46.1372	0.32	\pm 0.03	1.97	\pm 0.52	0.88	\pm 0.13	0.31	\pm 0.14
3e	40	-72.8925	46.1422	0.23	\pm 0.01	1.77	\pm 0.03	0.83	\pm 0.01	0.22	\pm 0.05
3g	23	-72.8825	46.1475	0.23	\pm 0.05	1.28	\pm 0.21	0.78	\pm 0.09	-	
3k	23	-72.8613	46.1579	0.28	\pm 0.07	0.69	\pm 0.25	0.58	\pm 0.09	0.24	\pm 0.04
3m	33	-72.8502	46.1630	0.34	\pm 0.13	0.67	\pm 0.05	0.63	\pm 0.12	0.20	\pm 0.10
4d	10	-72.8948	46.1367	0.35	\pm 0.21	1.88	\pm 0.28	0.81	\pm 0.10	0.20	\pm 0.05
4e	15	-72.8889	46.1381	0.28	\pm 0.17	1.97	\pm 0.10	0.74	\pm 0.04	-	
4f	34	-72.8837	46.1413	0.26	\pm 0.10	2.50	\pm 0.35	1.16	\pm 0.34	0.15	\pm 0.09
4h	23	-72.8735	46.1465	0.27	\pm 0.12	1.81	\pm 0.01	0.96	\pm 0.01	0.15	\pm 0.05
4j	33	-72.1007	46.1517	0.24	\pm 0.03	1.01	\pm 0.03	0.68	\pm 0.02	0.13	\pm 0.04
5d	10	-72.8903	46.1325	-		1.76	\pm 0.42	0.60	\pm 0.09	0.22	\pm 0.07
5f	40	-72.8798	46.1377	0.25	\pm 0.05	1.70	\pm 0.21	0.79	\pm 0.15	0.16	\pm 0.03
5h	34	-72.8696	46.1429	0.26	\pm 0.04	1.57	\pm 0.37	0.72	\pm 0.16	0.22	\pm 0.08
5j	34	-72.0921	46.1485	0.26	\pm 0.06	1.28	\pm 0.07	0.66	\pm 0.08	0.15	\pm 0.03
5l	38	-72.8479	46.1535	0.28	\pm 0.05	1.49	\pm 0.14	0.97	\pm 0.08	-	
5m	23	-72.8427	46.1559	0.26	\pm 0.04	0.99	\pm 0.09	0.69	\pm 0.02	0.20	\pm 0.02
5o	23	-72.8324	46.1612	0.30	\pm 0.09	1.02	\pm 0.04	0.65	\pm 0.06	0.23	\pm 0.03
6b	10	-72.8974	46.1240	0.30	\pm 0.22	2.62	\pm 0.63	0.86	\pm 0.22	-	
6f	10	-72.8779	46.1340	0.33	\pm 0.08	2.26	\pm 0.25	0.86	\pm 0.17	0.16	\pm 0.06
6h	40	-72.8660	46.1395	0.30	\pm 0.15	1.81	\pm 0.73	0.78	\pm 0.27	0.25	\pm 0.13
6i	34	-72.8603	46.1420	0.30	\pm 0.10	2.04	\pm 0.11	0.94	\pm 0.12	0.19	\pm 0.05
6j	40	-72.8553	46.1436	0.27	\pm 0.08	1.75	\pm 0.22	0.75	\pm 0.20	0.19	\pm 0.05
6k	38	-72.8496	46.1471	0.19	\pm 0.07	1.55	\pm 0.17	0.85	\pm 0.15	0.17	\pm 0.04

(suite du tableau B.III)

Sites	Temps (jours)	Coordonnées		Thiols (nM)							
		X WGS84	Y WGS84	CYS		AT		CYS-GLY		GSH	
6l	40	-72.8446	46.1498	0.22 ± 0.03	1.71 ± 0.49	0.82 ± 0.23	0.20 ± 0.03				
6n	38	-72.8340	46.1548	0.19 ± 0.06	1.76 ± 0.40	0.75 ± 0.18	0.56 ± 0.53				
6p	38	-72.8233	46.1600	0.22 ± 0.06	1.88 ± 0.02	1.04 ± 0.07	0.35 ± 0.23				
7h	10	-72.8629	46.1356	0.60 ± 0.74	3.05 ± 2.14	1.05 ± 0.43	-				
7j	10	-72.8515	46.1073	-	1.67 ± 0.57	0.57 ± 0.11	0.12 ± 0.07				
7l	10	-72.8414	46.1458	0.29 ± 0.26	2.62 ± 1.64	0.79 ± 0.19	0.21 ± 0.14				
7p	40	-72.8200	46.1563	0.28 ± 0.27	1.73 ± 0.30	0.86 ± 0.27	0.25 ± 0.12				
8n	10	-72.8282	46.1475	0.15 ± 0.02	1.29 ± 0.27	0.61 ± 0.04	0.17 ± 0.08				
8p	9	-72.8172	46.1527	0.41 ± 0.42	1.66 ± 0.31	0.77 ± 0.18	0.22 ± 0.11				
AMO	40	-72.9371	46.1317	0.28 ± 0.04	0.84 ± 0.14	0.63 ± 0.07	0.11 ± 0.01				
STF	40	-72.9273	46.1252	0.20 ± 0.07	2.31 ± 0.13	1.28 ± 0.12	0.18 ± 0.03				
YAM	40	-72.9295	46.1245	0.25 ± 0.04	1.00 ± 0.26	0.65 ± 0.21	0.21 ± 0.06				

(-), sous la limite de détection

Les échantillons recueillis sur le lac Saint-Pierre ont été filtrés à même le site d'échantillonnage à l'aide d'une pompe péristaltique reliée à une cartouche de filtration (0.45 μm de taille de pores). Ils ont par la suite été conservés au noir dans des bouteilles HDPE de 30 mL à -20°C dès le retour au laboratoire, le jour même, jusqu'à l'analyse des thiols. Le temps de conservation, entre la prise de l'échantillon sur le terrain et l'analyse au HPLC, figure dans la colonne « Temps » du tableau B.III.