

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉTERMINATION DES BIOMARQUEURS D'EXPOSITION ET DE TOXICITÉ  
SUITE À UNE CONTAMINATION AU PALLADIUM CHEZ LA LENTILLE  
D'EAU *Lemna minor*

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
SOULEIMEN JMII

DÉCEMBRE 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs (SDU-522 - Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier de tout cœur, ma mère Brigitte et mon père Brahim, mon public numéro 1 depuis 24 ans. Je leur suis infiniment reconnaissant de m'avoir tout donné pour en arriver là. Je les remercie pour leur patience et leurs conseils précieux, d'avoir bercé mon enfance de termes scientifiques et de m'avoir autorisé étant petit à regarder les documentaires animaliers au lieu de faire la sieste.

Je remercie ma sœur Selma, pour sa présence et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

Je souhaite remercier Madame Caroline Anselme, Mr Eric Husson, M. Annas Cherqui et Madame Pau Roblot, quatre professeurs de l'Université de Picardie Jules Verne à Amiens en France auprès de qui j'ai beaucoup appris et qui ont soutenu ma décision de poursuivre mes études à l'Université du Québec à Montréal.

Je souhaite remercier Mme Giselle Molina Fernandez, Mme Claire Chabrol, Mme Mélanie Chow Shi Yee et surtout M. Jean-Philippe Bourgouin pour leurs temps et leur aide précieuse. Sans oublier Ximena Zottig qui m'a beaucoup soutenu dans mes choix...

Enfin j'aimerais remercier M. David Dewez pour la confiance qu'il a placée en moi, ainsi que l'aide et l'autonomie qu'il m'a offertes.

DÉDICACE

À ma grand-mère Réjane Bayeul  
et mon grand-père Bouzayane Jmii

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	x
RÉSUMÉ.....	xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
CHAPITRE I État de l'ART .....	3
1.1 Les métaux, des polluants de l'environnement.....	3
1.1.1 Les métaux .....	3
1.1.2 La bioaccumulation .....	4
1.2 L'utilisation de biomarqueurs dans l'évaluation toxicologique .....	5
1.3 Les éléments du groupe du platine (EGP), des polluants toxiques.....	6
1.3.1 Le palladium un métal actif.....	6
1.3.2 Le palladium, un polluant émergent.....	8
1.3.3 Le palladium, biodisponible et toxique.....	10
1.4 La croissance végétale .....	11
1.4.1 Matériel biologique : <i>Lemna minor</i> .....	11
1.4.2 Développement de <i>Lemna minor</i> .....	12
1.5 La photosynthèse .....	13
1.5.1 Le chloroplaste et les thylakoïdes .....	14
1.5.2 Les pigments photosynthétiques .....	15
1.5.3 Les photosystèmes .....	17
1.5.4 La phase claire ou photochimique.....	20
1.5.5 Biophysique du transfert des électrons .....	21
1.5.6 La phase sombre.....	22
1.5.7 Excitation de la chlorophylle et cinétique rapide .....	24
1.5.8 Cinétique rapide et polyphasique de la Chl <i>a</i> .....	25

1.6	Le stress oxydatif.....	28
1.6.1	Les principales formes d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	28
1.6.2	Origine des ERO .....	29
1.6.3	Indicateurs de stress .....	34
1.7	Problématique générale .....	37
1.8	Objectifs généraux et spécifiques .....	38
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		39
2.1	Préalable et incubation de <i>Lemna minor</i> .....	39
2.1.1	Préparation du milieu de culture SIS .....	39
2.1.2	Entretien de la culture mère des <i>Lemna minor</i> .....	40
2.1.3	Solution stock de Palladium.....	40
2.1.4	Préparation des milieux de cultures contaminés.....	41
2.1.5	Incubation et condition d'essais.....	41
2.2	Expérimentations .....	42
2.2.1	Concentration en palladium disponible.....	42
2.2.2	Spéciation du Pd dans le milieu SIS .....	43
2.2.3	Bioaccumulation du Pd et son impact.....	43
2.2.4	Mécanisme de défense .....	45
2.2.5	Impact sur la photosynthèse .....	46
2.3	Analyse statistique .....	48
CHAPITRE III RÉSULTATS.....		49
3.1	Spéciation du Pd dans le milieu SIS .....	49
3.2	Effet du Pd sur le phénotype de <i>Lemna minor</i> .....	50
3.3	Effet du Pd sur la croissance.....	52
3.4	Absorption et adsorption de Pd.....	52
3.5	Effet du Pd sur la production de ERO .....	53
3.6	Effet du Pd sur le contenu en pigments .....	54
3.7	Effet du Pd sur les paramètres photosynthétiques .....	57
3.8	Effet du Pd sur les mécanismes de défense .....	59
CHAPITRE IV DISCUSSION .....		61
CONCLUSION.....		71
BIBLIOGRAPHIE .....		75

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Bioaccumulation (A) et Bioamplification (B) des contaminants au sein des organismes et de la chaîne alimentaire. ....	5
1.2	Schéma d'une voiture vue du dessous et photographie d'un pot catalytique. (A) moteur, (B) pot catalytique et (C) pot d'échappement.	8
1.3	Photographies de <i>Lemna minor</i> . ....	12
1.4	Schéma de la reproduction de <i>Lemna minor</i> par bourgeonnement.....	13
1.5	Schéma de l'ultrastructure d'un chloroplaste (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	15
1.6	Spectres d'absorptions des pigments photosynthétiques (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	16
1.7	Structure de la Chl <i>a</i> et <i>b</i> (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	17
1.8	Structure du photosystème II (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	18
1.9	Schéma des états S (Buchanan <i>et al.</i> , 2015). ....	20
1.10	Transport cyclique et acyclique des électrons (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	21
1.11	Schéma en Z (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	23
1.12	Cycle de Calvin-Benson (Karp <i>et al.</i> , 2018). ....	23

1.13	Courbe cinétique de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> (Strasser et <i>al.</i> , 2004). .....	27
1.14	Structure d'un monomère de glutathion formant la structure de la phytochélatine. ....	35
1.15	Mécanisme de réduction des ERO par la voie enzymatique.....	36
2.1	Schéma expérimental de l'incubation en milieu contaminé. ....	42
3.1	Effet inhibiteur du Pd sur la croissance de <i>Lemna minor</i> (%).. .....	51
3.2	Photographies des racines de <i>Lemna minor</i> du témoin (gauche) et après 7 jours d'exposition à 50 µM de Pd (droite). ....	53
3.3	Production des ERO dans le cytoplasme (noir) et dans les organites à ADN (gris) chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd.....	54
3.4	Variation du contenu en chlorophylle a (A), b (B) et caroténoïdes (C) (µg/mgMF) chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd.....	56
3.5	Diminution de l'intensité de la cinétique rapide et polyphasique de fluorescence de la Chl a, chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd.....	58
3.6	Augmentation des protéines totales (µg/g MF), chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ....	59
3.7	Augmentation des composés thiols totaux (µmol/g MF), chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd.. .....	60
3.8	Diminution de l'activité spécifique de la Catalase (U/mg Protéines), chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd.....	60

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Effets des métaux chez <i>Lemna</i> .....	33
3.1	Spéciation du Pd (%) dans le milieu SIS à pH 6,5 et obtenue grâce au logiciel Visual MINTEQ (3.1). T, témoin. ....	50
3.2	Diminution du poids frais (mg), de la longueur des racines (cm) et du nombre de frondes, après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd chez <i>Lemna minor</i> ( $p < 0,05$ )* et ( $p < 0,01$ )** . T, témoin.....	51
3.3	Augmentation de la concentration en Pd absorbée et adsorbée chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ....	53
3.4	Variation de différents paramètres photosynthétiques chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )* et ( $p < 0,01$ )** . T, témoin.....	58
4.1	Sensibilité des biomarqueurs étudiés chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations de Pd. ....	70

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AA :	Acide L-ascorbique
ADP :	Adénosine diphosphate
APX :	Ascorbate peroxidase
ATP :	Adénosine triphosphate
ATPase :	Adénosine triphosphatase
BSA :	Albumine sérique bovine
Chl <i>a</i> :	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i> :	Chlorophylle <i>b</i>
CR :	Centre réactionnel
Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> :	Complexe du cytochrome <i>b<sub>6</sub>f</i>
DAA :	Acide L-déshydroascorbique
DTNB :	Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzène
EC50 :	Concentration efficace médiane
EGP :	Élément du groupe du platine
ERO :	Espèce réactive de l'oxygène

F :	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F <sub>M</sub> :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant, après une adaptation à l'obscurité
F <sub>O</sub> :	Fluorescence de base mesurée par une lumière analytique modulée, après une adaptation à l'obscurité
G3P :	Glycéraldéhyde-3-Phosphate
GPX :	Glutathion peroxydase
GR :	Glutathion réductase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
GST :	Glutathion S-transférase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
ICP-EOS :	Plasma à couplage inductif - Spectrométrie d'émission optique
Ir :	Iridium
MDAA :	Acide monodéshydroascorbique
MF	Masse fraîche
NADP :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADP <sup>+</sup> :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

$^1\text{O}_2^*$ :	Oxygène singulet
$\text{O}_2^-$ :	Ion superoxyde
$\text{O}_3$ :	Ozone
$\text{OH}^\cdot$ :	Radical hydroxyl
Os :	Osmium
P680 :	Centre réactionnel du PS II à l'état fondamental
P680* :	Centre réactionnel du PS II à l'état excité
PC :	Phytochélatine
Pd :	Palladium
PGA :	Acide-3-Phosphoglycérique
Phéo :	Phéophytine
PQ :	Plastoquinone
PS I :	Photosystème I
PS II :	Photosystème II
Pt :	Platine
$\text{Q}_\text{A}$ :	Quinone A
$\text{Q}_\text{B}$ :	Quinone B
Re :	Rhénium

Ru :	Ruthénium
Rh :	Rhodium
RuBisCo :	Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase Oxygénase
RuBP :	Ribulose 1,5-Bisphosphate
SOD :	Superoxyde dismutase
TNB :	Acide 5-thio-2-nitrobenzène

## RÉSUMÉ

Les éléments du groupe du platine (EGP), sont des métaux traces, identifiés comme polluants émergents. Dans l'industrie automobile, trois d'entre eux, le Platine (Pt), le Rhodium (Rh) et le Palladium (Pd) entrent dans la fabrication des pots catalytiques depuis le début des années 70 afin de catalyser la conversion des gaz d'échappements toxiques des véhicules en gaz non polluants. Parmi les trois métaux actifs utilisés, c'est le Pd qui se place comme polluant principal à risque, car celui-ci est devenu majoritaire dans la composition du catalyseur depuis les années 90. De plus, l'usure de ce dernier, libère progressivement le métal dans l'environnement le long des routes. C'est également le EGP le plus soluble, ce qui le rend fortement mobile dans les écosystèmes aquatiques après lessivage des routes par les eaux de pluie. *Lemna minor* est un modèle adéquat pour étudier la toxicité des contaminants. En effet, ce modèle simple, s'avère être un très bon bioindicateur de la qualité environnementale et un organisme à la base de plusieurs chaînes alimentaires permettant d'étudier les phénomènes de bioaccumulation et bioamplification. L'objectif principal de cette étude est de discriminer des biomarqueurs sensibles à la présence et à la toxicité du Pd chez un producteur primaire végétal aquatique. Pour cela nous avons quantifié la bioaccumulation du métal dans les tissus par ICP-EOS, et étudié quelques biomarqueurs capables de caractériser sa toxicité cellulaire. Le métal s'est avéré être fortement bioaccumulé, entraînant un stress métallique sévère qui se traduit par trois niveaux de toxicité. Un premier, dans lequel *Lemna minor* met en place des biomarqueurs de présence qui jouent également le rôle de défense. Un deuxième niveau, qui entraîne des perturbations biochimiques, notamment sur la photosynthèse et enfin un troisième niveau de déclin généralisé de la croissance.

Mots clés : Palladium, Photosynthèse, Biomarqueurs, Fluorescence, PGE, Bioaccumulation, métaux, *Lemna minor*, Chlorophylles, ABS/RC, cinétique rapide, Chl *a*

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis le début de l'ère industrielle au XVII<sup>ème</sup> siècle, les actions anthropiques n'ont cessé de croître, menant au relargage dans l'environnement de contaminants nocifs pour les écosystèmes. L'air, les sols et les eaux se retrouvent contaminés par un cocktail de polluants d'origine diverse (Corella *et al.*, 2018). L'agriculture, les moyens de transport, les industries minières...sont les principales sources de ces polluants environnementaux (Schwartz, 1994; Li *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2019; Mahyon *et al.*, 2019). Ils peuvent s'accumuler au sein des tissus des organismes unicellulaires ou pluricellulaires et sont l'une des nombreuses causes à l'origine de la perturbation des processus biochimiques majeurs du monde du vivant, tels que la respiration et la photosynthèse (Belyaeva *et al.*, 2008; Vannini *et al.*, 2011).

Dans les années 70, le Plomb a inscrit les moyens de transports dont la voiture, comme polluants majeurs de l'air des zones urbaines (Thomas, 1995; Needleman, 2000; Whitehead *et al.*, 2019). En parallèle, la pollution de l'air des villes par les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>), les oxydes de carbone (CO) et les hydrocarbures (C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>), a rendu obligatoire l'utilisation d'un pot catalytique pour tous les véhicules motorisés à essence, permettant ainsi de catalyser la transformation des gaz nocifs en composés moins toxiques, tels que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), l'eau (H<sub>2</sub>O) ou le diazote (N<sub>2</sub>) (Zechmeister *et al.*, 2006; Vannini *et al.*, 2011; Mahyon *et al.*, 2019). Le plomb a été retiré de l'essence non pas à cause de sa forte toxicité et son caractère polluant systémique, mais car celui-ci entraînait une usure précoce des pots catalytiques par inhibition de son pouvoir de catalyse (Thomas, 1995; Von Storch *et al.*, 2003). Aujourd'hui encore ces éléments catalytiques dépolluants, ne cessent d'être

perfectionnés. Ils sont formés d'un support essentiellement en céramique, et lient des métaux actifs de la famille du platine, appelés éléments du groupe du platine ou EGP. Les EGP sont au nombre de six, mais seulement 3 d'entre eux sont retrouvés dans l'industrie automobile, (dans des ratios variables selon le constructeur automobile), pour endiguer l'élimination des composés toxiques (Zechmeister *et al.*, 2006; Vannini *et al.*, 2011; Aruguete *et al.*, 2019; Mahyon *et al.*, 2019). Néanmoins, un mauvais entretien de l'automobile, une mauvaise utilisation, ou encore les additifs de l'essence utilisés, accélèrent l'usure du catalyseur, et entraînent la libération des EGP, devenant des polluants potentiels pour les organismes vivants et les écosystèmes (Ely *et al.*, 2001; Zechmeister *et al.*, 2006; Vannini *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015; Kińska *et al.*, 2019), d'où l'importance d'étudier leur impact chez des producteurs primaires à la base de la chaîne alimentaire. Il est donc pertinent de réaliser une étude à ce niveau, afin de distinguer un ensemble de biomarqueurs physiologique et biochimiques pour mieux comprendre la toxicité du palladium au niveau cellulaire en mettant un accent sur son impacte au niveau de la phase claire de la photosynthèse. Et ainsi déterminer leur niveau de sensibilité suite à la contamination du métal, pour comprendre le comportement et l'affinité du métal au niveau cellulaire.

## CHAPITRE I

### ÉTAT DE L'ART

#### 1.1 Les métaux, des polluants de l'environnement

##### 1.1.1 Les métaux

On distingue deux classes d'éléments, les macro-minéraux dits "essentiels" qui jouent un rôle dans les réactions biochimiques et le métabolisme cellulaire, par exemple le Fe, Cu, Zn, *etc.* et les "non essentiels" dans lequel on retrouve les «éléments traces», qui n'interviennent dans aucun processus biologique et beaucoup plus rares (Mertz, 1981; Mašić *et al.*, 2018). Les métaux lourds font partis des éléments traces. Ils sont naturellement présents dans l'environnement et s'y répartissent selon des cycles biogéochimiques. Lorsque l'environnement ne permet plus le déplacement de ces éléments, ils se déposent et l'érosion, constitue l'un des facteurs qui les libèrent naturellement dans l'environnement par remaniement de la croûte terrestre (Duffus, 2002; Artemieva *et al.*, 2019). Néanmoins, les différentes actions anthropiques augmentent la libération dans l'environnement des métaux essentiels et non essentiels, et leurs concentrations croient de manière fulgurante, atteignant des concentrations nuisibles à la santé des organismes (Corella *et al.*, 2018; Mašić *et al.*, 2018; Ozaki *et al.*, 2019). Le trafic routier constitue une source importante de contaminants dans l'environnement, dont des métaux lourds de la famille du platine nécessaires afin de catalyser la conversion des gaz nocifs en gaz moins toxique, libérés suite à l'usure du

véhicule (Zechmeister *et al.*, 2006; Vannini *et al.*, 2011; Mahyon *et al.*, 2019). De manière générale, en milieu aquatique, les métaux existent sous formes physiques (dissoutes, particulières et colloïdales) ainsi que sous formes chimiques (ioniques, complexées ou organiques). La distribution de ces différentes formes ou espèces chimiques d'un métal est appelée spéciation, et dépend de nombreux paramètres physicochimiques comme la température, le pH, le potentiel oxydoréducteur (Kushner, 1993; VanBriesen *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015; Zitoun *et al.*, 2019). Ces différentes formes peuvent pénétrer dans l'organisme *via* des transporteurs. On parle alors de biodisponibilité qui se définit par la possibilité que possède une substance à franchir la barrière physique de l'organisme, de s'y propager, et d'entrer en contact avec les organes. La forme ionique s'illustre comme étant la forme la plus biodisponible d'un métal. Par ailleurs mobile dans l'environnement ce qui la rend encore plus dangereuse pour la santé des organismes vivants. De plus, les métaux non essentiels peuvent entrer en compétition avec les éléments essentiels, influençant leurs entrées au sein de la cellule *etc.* (Kushner, 1993; Nolan *et al.*, 2003; Waldron *et al.*, 2009; Zhao et Wilkinson, 2015).

### 1.1.2 La bioaccumulation

Après avoir pénétrés l'organisme *via* l'alimentation ou le milieu de vie, les contaminants, en l'occurrence les métaux, s'accumulent dans les tissus. On parle de bioaccumulation dès lors où les métaux seront plus vite absorbés par l'organisme vivant qu'ils ne sont éliminés. On distingue deux procédés; la bioaccumulation (Figure 1.1 A) processus par lequel un contaminant s'accumule dans les tissus d'un organisme suite à un contact direct entre l'organisme et le contaminant présent dans son environnement, la bioamplification le long de la chaîne alimentaire (Figure 1.1 B), processus par lequel le contaminant s'accumule dans les tissus d'un organisme, suite à la consommation par un prédateur, de proies ayant bioaccumulé au préalable le dit contaminant (Rychen *et al.*, 2006; Ghannem *et al.*, 2016; Ghemari *et al.*, 2019).

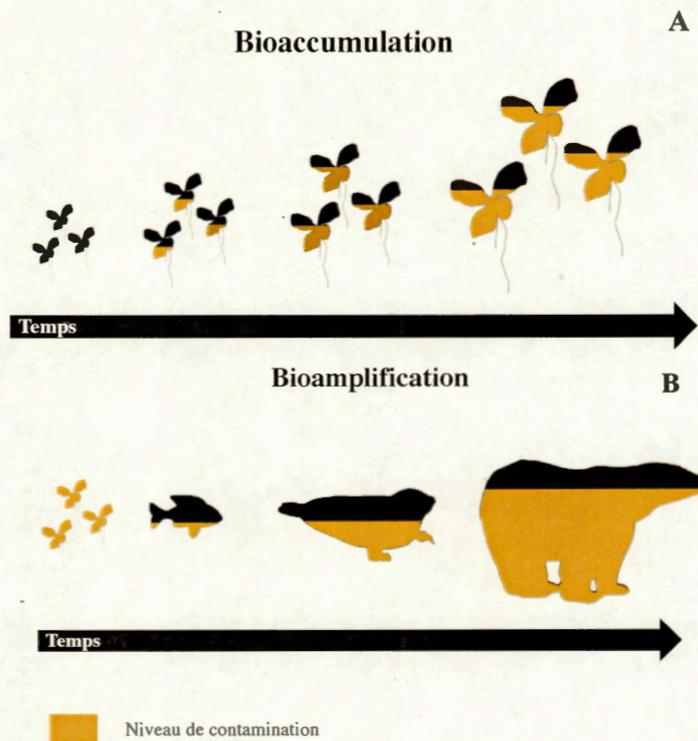


Figure 1.1 Bioaccumulation (A) et Bioamplification (B) des contaminants au sein des organismes et de la chaîne alimentaire.

## 1.2 L'utilisation de biomarqueurs dans l'évaluation toxicologique

Les biomarqueurs en toxicologie, sont des modifications moléculaires, biochimiques physiologiques ou comportementales d'un organisme. Ils témoignent de la présence ou de l'effet toxique direct d'un contaminant dans le milieu de vie de l'organisme. De nature diverse et variée, ils témoignent de la contamination par un xénobiotique. La recherche et la quantification des biomarqueurs, doivent permettre une répétabilité des résultats, il faut donc que ces derniers soient sensibles et fiables. Ces modifications illustrent une affinité ou permettent de donner une idée du lieu d'action des contaminants. On cherche donc à identifier des biomarqueurs sensibles et efficaces, qui permettront de détecter la présence dans l'environnement de contaminant de manière précoce. Et ainsi mieux comprendre le mode d'action de ces

derniers, voir prévenir de potentielles pollutions et désastres écologiques capables d'inhiber le développement d'espèces (Lagadic, 1997; Erraud *et al.*, 2019).

### 1.3 Les éléments du groupe du platine (EGP), des polluants toxiques

Les EGP regroupent 6 métaux lourds (non essentiels au vivant), le Ruthénium (Ru), le Rhodium (Rh), le Palladium (Pd), l'Osmium (Os), l'Iridium (Ir), et le Platine (Pt). Tous ces métaux sont présents à de faibles concentrations dans la croûte terrestre (Barnes *et al.*, 1985). Néanmoins leurs valeurs ne cessent d'augmenter dans les différents biotopes depuis le début de leur utilisation au sein du domaine automobile dans les années 1970 (Beary *et al.*, 1995; Gomez *et al.*, 2002; Vannini *et al.*, 2011). Il a été montré que les EGP, en solution peuvent se solubiliser formant des formes ioniques beaucoup plus biodisponibles et bioaccumulables pour les organismes aquatiques que les formes métalliques. Et, comme tout métal, leur solubilisation dans un milieu acide est beaucoup plus forte. Dans les sols, les EGP se déposent dans la couche supérieure (jusqu'à 4 cm de la surface) et présentent une grande affinité pour les composés organiques, ils peuvent ainsi se lier aux acides organiques telluriques, humiques ou fulviques les rendant biodisponibles et bioaccumulables par les plantes terrestres (Ely *et al.*, 2001; Zhao et Wilkinson, 2015). L'étude de la complexation des EGP est un outil utile pour une meilleure connaissance de leurs disponibilités dans l'environnement (Gomez *et al.*, 2002).

#### 1.3.1 Le palladium un métal actif

Introduit aux États-Unis en 1975, et au Japon en 1976, le pot catalytique a été adopté par l'Union Européenne en 1993 via les normes EURO ainsi que par le reste du monde afin de faire partie de l'équipement standard d'une voiture moderne. Initialement composé d'un mélange de Pt/Rh puis de Pt/Pd, le Pd est devenu progressivement majoritaire dès 1990 (Beary et Paulsen, 1995; Ely *et al.*, 2001; Pan

*et al.*, 2009; Fumagalli *et al.*, 2010). Le Pd est utilisé dans de nombreux domaines d'application, notamment en bijouterie, en odontologie, en connectique, en chirurgie, en musique, en aéronautique, en biotechnologie et surtout en automobile représentant 61% de son utilisation mondiale, au Canada, le Pd représente 70% de la production minière des EGP en 2017. Avec le Pt et le Rh, ils constituent les 3 EGP les plus utilisés et se retrouvent dans les automobiles modernes en circulation au niveau du convertisseur catalytique (Figure 1.2). De plus, entre 1993 et 2002, on relève une augmentation de 1087% de la masse de Pd européen consommé pour les convertisseurs (Ely *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2009; Ressources naturelles Canada, 2018). Ces métaux sont importants, car la combustion du carburant dans le moteur produit un mélange de gaz nocifs : NO<sub>x</sub>, CO et autres hydrocarbures aromatiques polycycliques et composés organiques volatils. Afin d'endiguer l'élimination de ces composés dans la nature, l'utilisation d'un convertisseur catalytique a été rendue obligatoire sur les automobiles. Les gaz émis sont alors convertis en gaz qui le sont moins (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et N<sub>2</sub>) par le biais des 3 métaux actifs précédemment cités, efficace afin de catalyser la conversion en question (Melber *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2017; Mahyon *et al.*, 2019).

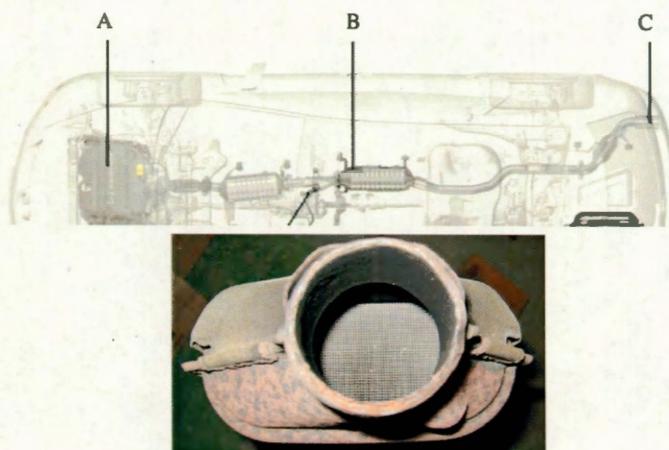


Figure 1.2 Schéma d'une voiture vue du dessous et photographie d'un pot catalytique. (A) moteur, (B) pot catalytique et (C) pot d'échappement.

### 1.3.2 Le palladium, un polluant émergent

Des études ont mis en lumière l'augmentation significative des concentrations des EGP dans l'air, l'eau et les sols des milieux urbains depuis 1970, fortement corrélées à l'introduction des convertisseurs catalytiques. Les automobiles, dont le nombre en circulation ne cesse d'augmenter depuis 1965, sont un outil indispensable de la vie quotidienne. Leur moteur à combustion est une source de pollution grave pour l'environnement, faisant du trafic routier la cause principale de rejet des EGP. Un grand nombre de facteurs joue un rôle dans l'usure normale et prématurée du moteur et de son convertisseur catalytique, tels que l'âge, le type de véhicule, du moteur, le kilométrage, la vitesse, la température, le type d'additif ajouté au carburant, *etc.* (Ely *et al.*, 2001; Vannini *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2017). Tous ces facteurs entraînent une usure par abrasion de la surface du pot catalytique. Les gaz éliminés contiennent ainsi des EGP liés ou non au support du catalyseur (fragment de céramique, d'aluminium), formant des particules, dont la taille variable, influence leurs distributions spatiales. Les plus petites ( $<2 \mu\text{m}$ ), peuvent voyager dans l'air sur de grandes distances à plus de 200 m des routes voir même jusqu'à des régions

isolées, alors que les plus grosses particules ( $>2 \mu\text{m}$ ), retombent en lisière de route, et s'accumulent dans ce qu'on appelle « la poussière de route » (Zechmeister *et al.*, 2006). Ainsi, en 1976, on a mesuré dans l'air en Californie, un taux de  $0,06 \text{ pg/m}^3$  de Pd contre  $1 \text{ pg/m}^3$  de Pd en 2000. Ces résultats offrent un ordre de grandeur à analyser mais ne sont pas comparables aux mesures faites dans d'autres agglomérations ou métropoles, notamment à cause du grand nombre de facteurs *in situ* influençant ces dernières comme la topographie, les conditions météorologiques, *etc.* Il existe encore peu, de résultats interprétables des valeurs de contamination de l'air à cause d'un manque de système de surveillance des EGP (Gomez *et al.*, 2002). Sur la période de 1994 à 1998, des mesures effectuées dans une bouche de ventilation d'un tunnel d'autoroute à Styria en Autriche ont montré une augmentation de la concentration en EGP dans les poussières recueillies soit  $+26 \text{ ng/g}$  de Pt,  $+2,5 \text{ ng/g}$  de Rh,  $+1,5 \text{ ng/g}$  de Pd. Le rapport mesuré est semblable au ratio utilisé pour la fabrication des catalyseurs. Les poussières quant à elles peuvent facilement être lessivées par les eaux de pluie et s'accumuler sur des organismes et dans les sols, les eaux et les sédiments où ils seront préconcentrés. On observe d'ailleurs une forte concentration en Pd dans les milieux aquatiques avec des valeurs atteignant  $38,7 \text{ ng/g}$  dans les sédiments de la rivière Mölndal, en Suède et  $19,93 \text{ ng/g}$  dans les sédiments du port de Boston aux Etats-Unis. Des concentrations moindres sont retrouvées dans le Rhin en Allemagne ( $0,4 \text{ ng/L}$ ), et dans les eaux usées de Varèse, en Italie ( $2 \mu\text{g/L}$ ) mais celles-ci restent au-dessus des niveaux naturels (Vannini *et al.*, 2011). Au final, il est donc normal d'observer une augmentation massive de la concentration des EGP dans l'environnement, corrélée à l'augmentation perpétuelle du nombre d'automobiles produites en circulation. Néanmoins, le domaine automobile n'est pas la seule source d'EGP dans l'environnement. Des études ont notamment révélé le système d'élimination des eaux usées des hôpitaux comme source d'EGP importante. Le Pd remplace progressivement le Pt dans les traitements anti-cancéreux, pour faire face à certaines résistances au Pt, et finit par être éliminé via les urines dans les eaux usées (Kümmerer *et al.*, 1997; Goykhman *et al.*, 2019; Zhou, X.-Q. *et al.*, 2019).

### 1.3.3 Le palladium, biodisponible et toxique

Depuis les années 90, des initiatives ont cherché à remplacer le Pt par le Pd dans les convertisseurs catalytiques, de par son coût plus faible et une plus grande stabilité chimique (Fumagalli *et al.*, 2010; Birke *et al.*, 2018). Cela peut constituer un risque majeur dans la contamination des écosystèmes, car celui-ci est le EGP le plus soluble avec un gradient de solubilité de Pd>Rh>Pt et un taux de solubilité de 6% en 15h, le rendant fortement disponible bien plus que le Pt dont les concentrations dans l'environnement sont significativement plus élevées mais reflétant un risque moindre (Vannini *et al.*, 2011; Mahyon *et al.*, 2019). La communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux effets que cette augmentation pourrait avoir sur la santé environnementale et humaine via l'inhalation, et les résultats sont sans équivoque, mais loin d'être alarmants tant que la concentration dans l'air reste inférieure à 100 ng/m<sup>3</sup> (Gomez *et al.*, 2002; Bocca *et al.*, 2004). Néanmoins, l'Europe, les États-Unis, la Chine, l'Inde et l'Australie affichent une augmentation des EPG dans l'environnement de 2 ordres de grandeur durant les 15 dernières années précédant les années 2000. Les concentrations environnementales en EGP ne cessent d'augmenter partout dans le monde (Birke *et al.*, 2018). Un petit groupe d'étude tente de comprendre et réduire l'élimination des EGP via de nouveaux modèles de convertisseurs catalytiques (Mahyon *et al.*, 2019). Néanmoins, ce sont les eaux qui représentent la principale cible de contamination et qui devraient constituer une réelle préoccupation de la communauté scientifique. Or, la majorité des études de toxicologie se focalisent sur la santé via le modèle animal, et peu d'étude s'intéresse aux producteurs photosynthétiques à la base d'un grand nombre de chaînes alimentaires, ou bien ces études n'ont pas été standardisées et ne peuvent pas être comparées les unes aux autres. Même si la situation est loin d'être alarmante, il est urgent de s'intéresser au phénomène car il a été montré que le Pd, à de très faibles concentrations, pouvait agir comme un inhibiteur de procédés biologiques (enzymatiques, cellulaires, ...) à cause de sa forte affinité pour les atomes de soufre et

d'azote. Il pourrait également bloquer les défenses cellulaires constituant ainsi une voie privilégiée à l'entrée d'autres contaminants, comme le Pt qui agirait en synergie avec le Pd déjà présent en excès dans l'environnement (Zimmermann *et al.*, 2017), ou encore les nombreux pesticides en synergie affectant la croissance du végétal.

#### 1.4 La croissance végétale

##### 1.4.1 Matériel biologique : *Lemna minor*

L'organisme d'étude de ce travail est un macrophyte, c'est à dire que ce végétal aquatique est visible à l'œil nu (Figure 1.3). *Lemna minor* est une plante supérieure dotée de thalles et de racines qui en fait un bon modèle d'étude de la toxicité des polluants chez les végétaux supérieurs. Elle constitue un bio-indicateur adéquat des écosystèmes aquatiques, mais également un modèle de laboratoire facile à cultiver grâce à sa rapidité de multiplication et l'homogénéité génétique de la population. (Smith *et al.*, 1989; Wang, 1990; OCDE, 2006)

Classification systématique de *Lemna minor* :

Règne : Plantae, Sous Règne : Tracheobionta, Clade : Angiosperme, Sous Clade : Monocotylédones, Ordre: Alismatales, Famille: Araceae, Sous Famille : Lemnoideae / Lemnaceae, Genre: *Lemna* , Espèce: *Lemna minor* (Hillman, 1961; Wang, 1990).

Les plantes du genre *Lemna* sont facilement invasives par leur rapidité de croissance et leur capacité à prélever les minéraux de leur biotope dit lentique, c'est-à-dire un écosystème d'eau calme des régions tempérées de l'hémisphère nord du globe (Hillman, 1961; Arber, 1963; Marie-Victorin, 1964; Wang, 1990; OCDE, 2006). Ses thalles sont de formes sphériques et aplaties et de petite taille, atteignant parfois les 5 mm (Figure 1.2). Chaque individu possède une racine unique filiforme qui peut atteindre 5 cm lorsque la plante est dans des conditions optimales de croissance

(Hillman, 1961; Marie-Victorin, 1964; Wang, 1990). Ses thalles possèdent également une structure appelée parenchyme aërifère qui leur confère cette capacité de flottaison et de former un tapis végétal à la surface de l'eau, où elle diminue l'illumination des autres espèces en dessous dans la colonne d'eau (Hillman, 1961; Marie-Victorin, 1964; Godfrey, 1981). Décrite comme une plante hyperaccumulatrice de métaux lourds, notamment du cuivre et du chrome, elle peut absorber entre 80 à 330 mg de cuivre et entre 250 et 660 mg de chrome par jour et par m<sup>2</sup> de surface foliaire (Wahaab *et al.*, 1995; Shukla *et al.*, 2019). La plante, suit une croissance exponentielle, qui dépend essentiellement de deux facteurs physiques, la température (environ 24°C) et le temps d'illumination soit 16h de jour en moyenne (Wang, 1990; OCDE, 2006).



Figure 1.3 Photographies de *Lemna minor*.

#### 1.4.2 Développement de *Lemna minor*

*Lemna minor* possède 2 stades de vie, un stade juvénile à 2 thalles, qui croît durant 2 jours et atteint alors une forme adulte à 4 thalles. La forme adulte se divise à nouveau en deux individus juvéniles libres à deux thalles le 3<sup>ème</sup> jour du développement (Figure 1.4). Au cours de cette division on voit apparaître une structure appelée

pétiole qui relie les 2 futurs individus libres (Hillman, 1961; Marie-Victorin, 1964; Godfrey, 1981; Wang, 1990). Cette reproduction est dite végétative, elle se fait par bourgeonnement et est non sexuée, même si la reproduction sexuée est possible, notamment dans les milieux naturels, mais celle-ci reste rare. La croissance par bourgeonnement, est donc la production d'un nouvel individu fille à partir d'un unique individu mère (Hillman, 1961; Marie-Victorin, 1964). L'élaboration d'un tel individu nécessite l'activation du cycle cellulaire, mais avant toute chose, la plante doit activer les voies métaboliques impliquées dans la synthèse des nouveaux constituants cellulaires via la production de matière organique et ce par le biais de la photosynthèse.

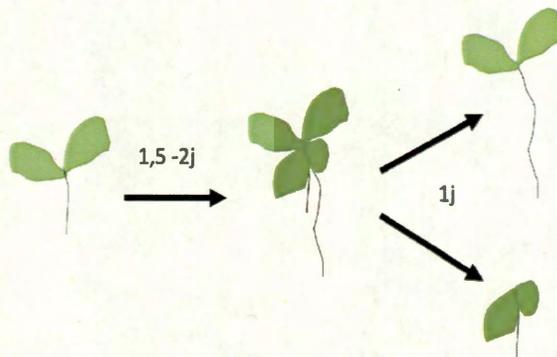


Figure 1.4 Schéma de la reproduction de *Lemna minor* par bourgeonnement.

### 1.5 La photosynthèse

Les végétaux prélèvent l'eau et les éléments essentiels de leurs milieux de vie par des organes spécialisés : les racines. Ces éléments circulent jusqu'aux thalles via les vaisseaux conducteurs du xylème et interviennent dans la biosynthèse des macromolécules biologiques. Les thalles réalisent la photosynthèse, processus essentiel à la croissance végétale. Le parenchyme foliaire des thalles est interrompu par de petites structures appelées stomates, qui régulent les échanges gazeux au sein de la plante soit, l'absorption de  $\text{CO}_2$  et la libération d' $\text{O}_2$  (Lodish *et al.*, 2005;

Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018). Le thalle permet donc de produire du carbone organique à partir du carbone inorganique présent dans l'air sous forme de  $\text{CO}_2$  en présence de lumière. Les produits de cette synthèse sont des sucres qui circulent via les vaisseaux conducteurs du phloème. Ainsi, la plante élabore des chaînes carbonées simples et peut les métaboliser en macromolécules complexes qui constituent les composants nécessaires à la duplication d'un individu tels que les acides aminés, les acides nucléiques, les acides gras, les sucres, *etc.* La fabrication des chaînes carbonées (étapes précoces de la synthèse des macromolécules) se déroule au sein d'organites appelés chloroplastes (Alberts *et al.*, 2008; Buchanan *et al.*, 2015).

#### 1.5.1 Le chloroplaste et les thylakoïdes

La photosynthèse à proprement parler se déroule au sein d'organites appelés chloroplastes (Figure 1.5), propres aux organismes photosynthétiques. Ces organites sont des disques lenticulaires de 2 à 4 micromètres de diamètre et de 5 à 10 micromètres de long, renfermant eux-mêmes un grand nombre d'ultrastructures membranaires appelées thylakoïdes empilés en granum et baignant dans un liquide, le stroma. Un thylakoïde est formé d'une membrane thylakoïdienne délimitant un espace appelé lumière ou lumen (Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018). Les protéines présentes à la surface de cette membrane thylakoïdienne réalisent l'ensemble de la photosynthèse notamment les photosystèmes (PS) I et II (contenant les pigments photosynthétiques), la plastoquinone (PQ), le complexe du cytochrome  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ), la plastocyanine, la ferrédoxine et une ATPase (Alberts *et al.*, 2008; Buchanan *et al.*, 2015). Le processus est réalisé en deux étapes bien distinctes, dans deux zones également distinctes de l'organite : la phase claire, lumineuse ou photochimique dans la membrane thylakoïdienne, et la phase sombre, obscure ou thermochimique dans le stroma (Lodish *et al.*, 2005).

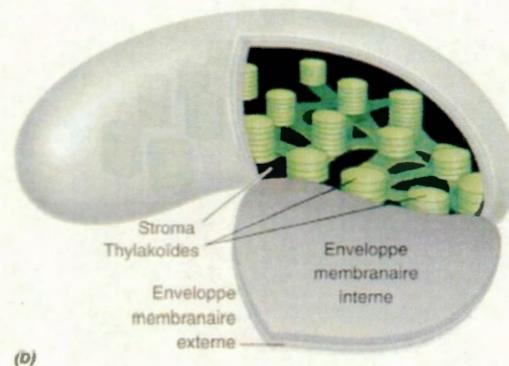


Figure 1.5 Schéma de l'ultrastructure d'un chloroplaste (Karp *et al.*, 2018).

### 1.5.2 Les pigments photosynthétiques

Les pigments photosynthétiques sont des molécules colorées capables d'absorber spécifiquement des gammes de longueur d'onde de la lumière. Les différents pigments absorbent dans des longueurs d'ondes distinctes et spécifiques. La superposition des spectres d'absorption de chacun des pigments couvre la quasi-totalité du spectre d'émission de la lumière blanche solaire (Figure 1.6), ce qui permet d'optimiser l'efficacité de la photosynthèse. Les pigments sont les caroténoïdes, les chlorophylles, les xanthophylles, les violaxanthines *etc.* (Horton *et al.*, 1996; Karp *et al.*, 2018). Les chlorophylles s'intègrent dans des protéines de la membrane thylakoïdienne, formant les photosystèmes des complexes pigments-protéines. Ces composés sont donc localisés au niveau des photosystèmes, formés eux-mêmes de deux types de structures ; l'antenne collectrice de photons et le centre réactionnel. Les pigments sont regroupés en cluster au sein de l'antenne, formés d'un noyau porphyrine au centre duquel est complexé un atome de magnésium. C'est cette structure qui est engagée dans la délocalisation d'électrons sur un orbital de niveau d'énergie supérieur via l'excitation lumineuse. En plus de cela, les pigments comportent une queue phytol qui permet un ancrage physique du pigment dans la

membrane du thylakoïde. Il faut savoir que la biosynthèse de la Chl *b* découle de celle de la Chl *a*, les deux pigments diffèrent par la présence d'un groupement aldéhyde au lieu d'un groupement méthyle sur le carbone en position 7 du noyau porphyrine (Figure 1.7) (Buchanan *et al.*, 2015). En somme, les pigments captent les photons de la lumière et permettent d'initier la photosynthèse. Les caroténoïdes quant à eux jouent en plus un rôle photoprotecteur des pigments chlorophylliens (Young, 1991; Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018).

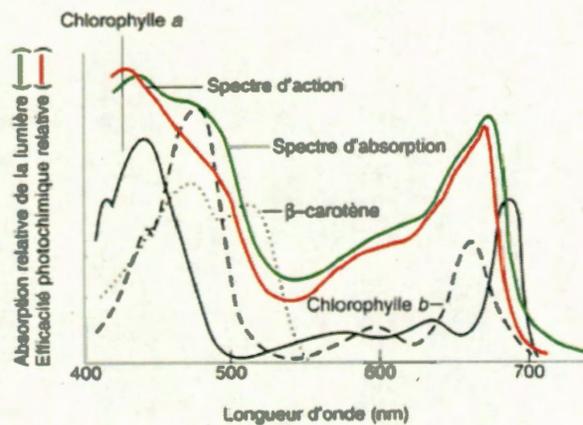


Figure 1.6 Spectres d'absorption des pigments photosynthétiques (Karp *et al.*, 2018).



réactionnel, qui cèdera à son tour un électron excité à un accepteur de la chaîne photosynthétique (Owens, 1996; Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018).

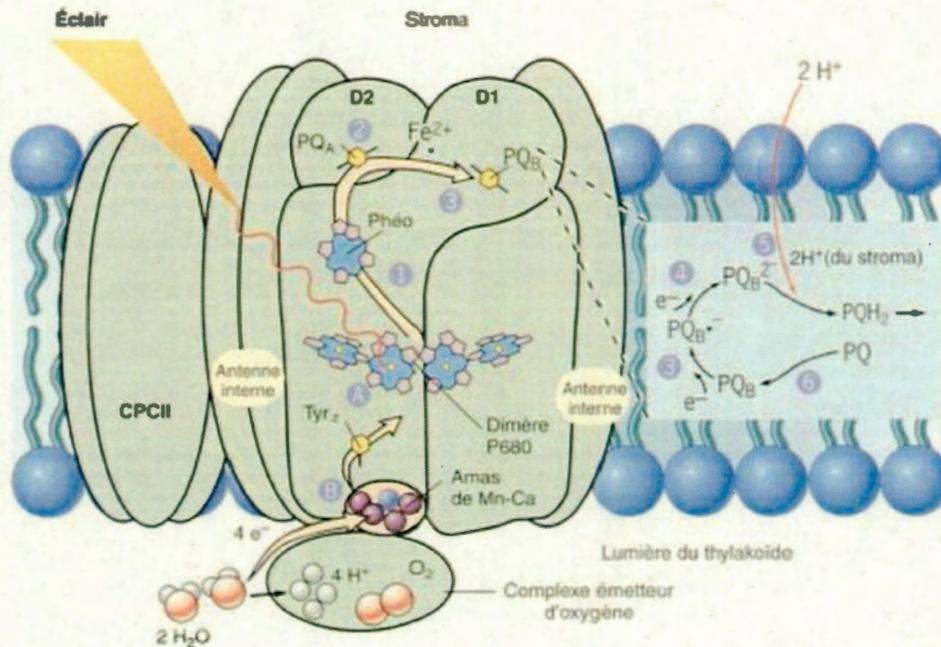


Figure 1.8 Structure du photosystème II (Karp *et al.*, 2018).

◆ L'antenne collectrice de photon

C'est la partie qui absorbe l'énergie lumineuse grâce aux pigments photosynthétiques. Les antennes sont composées de 2 structures, les antennes internes et périphériques. Les antennes internes sont composées de Chl *a*, de violaxanthine, de caroténoïdes ainsi que d'autres pigments photosynthétiques, alors qu'on retrouve exclusivement de la chlorophylle *b* dans les antennes périphériques (Sakuraba *et al.*, 2010; Buchanan *et al.*, 2015; Kirst *et al.*, 2017). L'absorption d'un photon permet l'excitation de la molécule de chlorophylle, et cet état d'excitation est transmis de manière aléatoire et de proche en proche entre les pigments de l'antenne, jusqu'au centre réactionnel qui

passera de l'état stable P680 à un état excité P680\* (Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018).

◆ Le centre réactionnel

C'est la structure protéique qui renferme le cluster de manganèse, le centre réactionnel (P680) à proprement parlé, renfermant la paire de Chl *a* ainsi que les accepteurs d'électrons du PS II tels que la phéophytine, la Q<sub>A</sub>, la Q<sub>B</sub> et la PQ. Ce centre réactionnel est associé à un autre complexe protéique, situé dans le lumen, appelé complexe de dégagement de l'oxygène (CDO). Ce complexe renferme des ions (Ca<sup>2+</sup> et Cl<sup>-</sup>) qui jouent le rôle de cofacteurs et stabilisateurs. C'est le CDO qui réalise l'étape initiatrice de photolyse de l'eau, durant laquelle des électrons sont arrachés à des molécules d'eau et transmis à la paire de Chl *a*, accompagnés d'un dégagement de O<sub>2</sub>. Le cluster de manganèse du CDO, accumule des charges positives, ce qui permet de fournir le potentiel de réduction nécessaire à la séparation de deux molécules d'eau et ainsi former du dioxygène et 4 protons (Kok *et al.*, 1970; Buchanan *et al.*, 2015; Cuypers *et al.*, 2016; Karp *et al.*, 2018).

◆ Les états S

La photolyse de l'eau passe par 5 étapes appelées états S. S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, et S<sub>4</sub>, chacune caractérisée par différents rendements d'O<sub>2</sub>. A chaque fois que la chlorophylle du centre réactionnel P680 est excitée et cède son électron à la phéophytine (premier accepteur d'électron du PS II) nouvellement réduite, le centre réactionnel quant à lui est oxydé (P680<sup>+</sup>/Phéo<sup>-</sup>), le CDO cède alors un électron d'un magnésium qui vient réduire P680<sup>+</sup> (Figure 1.9). La somme de tous les états S permet de fractionner 2 molécules d'eau pour obtenir une molécule de dioxygène et quatre protons dans le lumen provenant de la perte des électrons du cluster de manganèse du CDO et fourni ainsi le potentiel nécessaire à la réaction chimique. La photolyse de l'eau complète à proprement parlé se déroule à l'état S<sub>4</sub> permettant un retour à l'état S<sub>1</sub> (Kok *et al.*, 1970; Buchanan *et al.*, 2015).

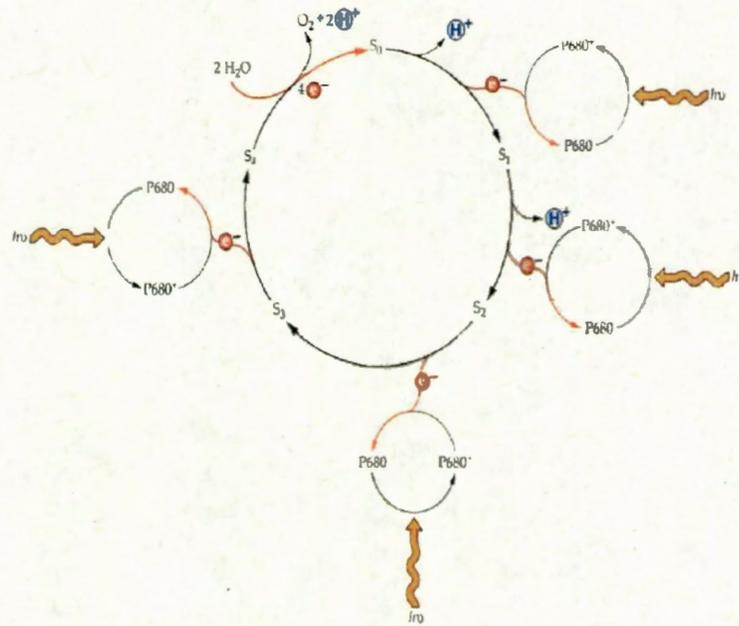


Figure 1.9 Schéma des états S (Buchanan *et al.*, 2015).

#### 1.5.4 La phase claire ou photochimique

En parallèle de la formation d'O<sub>2</sub>, la phéophytine constitue le premier accepteur d'électron provenant de la Chl *a* du centre réactionnel. La phéophytine devient donneuse d'électron, et transmet spontanément son état d'excitation par transfert d'un électron au prochain accepteur la Q<sub>A</sub>. Ce mécanisme se poursuit de proche en proche, le long d'une chaîne de transport, formée de quinone (Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>) avant de le céder à la PQ. Deux électrons seront nécessaires afin de réduire PQ, en PQH<sub>2</sub> (Whitmarsh *et al.*, 2002). L'énergie lumineuse nécessaire à cette phase peut constituer un danger pour l'appareil photosynthétique. En effet, lors d'un stress, celui-ci, subit une inhibition de son activité, on parle de photoinhibition. L'activité des PS est réduite et il y a alors accumulation de l'énergie lumineuse au sein de l'antenne. L'excès d'énergie peut

alors être dissipé sous forme de chaleur par les antennes (Müller *et al.*, 2001; Gururani *et al.*, 2015).

### 1.5.5 Biophysique du transfert des électrons

Le transfert des électrons le long de la chaîne de photosynthèse (Figure 1.10 et 1.11) est dû à une propriété des couples d'oxydoréduction. Ces derniers peuvent céder spontanément leurs électrons au couple possédant un potentiel Red/Ox plus élevé.

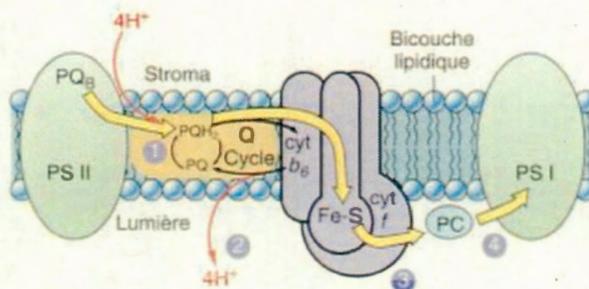


Figure 1.10 Transport cyclique et acyclique des électrons (Karp *et al.*, 2018).

Ainsi l'énergie lumineuse captée par l'antenne collectrice est transmise à la paire de chlorophylle du centre réactionnel du PS II (+0,9 V). Une fois excitée par l'énergie lumineuse, cette paire de chlorophylle réduite atteint une valeur de potentiel Red/Ox de (-0,8 V). Elle cède alors spontanément ses électrons à l'accepteur primaire du PS II : la phéophytine (Phéo) (-0,6 V), qui se retrouve réduite et cède les électrons acquis à la protéine suivante les quinones  $Q_A$  et  $Q_B$  (-0,2 V) et ainsi de suite, la plastoquinone (0 V), le cytochrome  $b_6/f$  (+0,2 V), la plastocyanine (+0,4 V) jusqu'au PS I. La Chl *a* du centre réactionnel se retrouve démunie de ses électrons et retrouve sa stabilité électronique via le CDO associé au PS II. Celui-ci lui cède alors 4 électrons provenant de 4 atomes de manganèse selon :  $4 \text{Mn}^{3+} \rightarrow 4 \text{Mn}^{4+} + 4e^-$ . Le CDO retrouvera lui-même son état initial via la photolyse de l'eau, pendant laquelle le CDO récupère ses 4 électrons en brisant deux molécules d'eau selon :  $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2$

+ 4H<sup>+</sup> + 4e<sup>-</sup>. À son tour, le PS I réduit (+0,6 V), ne peut pas transmettre spontanément ses électrons, précédemment acquis à la NADP réductase (-0,32 V). La lumière joue à nouveau un rôle important au niveau de l'antenne collectrice du PS I. L'énergie lumineuse accumulée est transmise au centre réactionnel du complexe atteignant un potentiel de (-1,3 V), ce dernier transmet alors les électrons à un accepteur A0 (-1,0 V) qui est une chlorophylle modifiée. Une fois réduit, le A0 va transmettre ses électrons à la Ferrédoxine qui la transmet à son tour à la Ferrédoxine NADP réductase, produisant du pouvoir réducteur NADPH dans le stroma selon : 2 NADP<sup>+</sup> → 2 NADPH + 2H<sup>+</sup>. Une partie de l'énergie dissipée entre le PS II et le PS I permet au Cyt b<sub>6</sub>f de pomper des protons du stroma vers le lumen. Les protons issus de la photolyse de l'eau et du Cyt b<sub>6</sub>f sont pompés à nouveau par une enzyme membranaire générant un gradient de proton H<sup>+</sup>. Ce gradient permet à l'enzyme de produire de l'ATP dans le stroma grâce au flux diffusif d'H<sup>+</sup> qui permet la fixation d'un phosphate inorganique à l'ADP (Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018).

### 1.5.6 La phase sombre

Cette phase connue sous le nom du cycle de Calvin-Benson (Figure 1.12), elle ne nécessite pas d'énergie lumineuse, mais l'intervention de deux molécules : le NADPH et l'ATP produit dans la phase claire. Ces deux molécules vont jouer un rôle important dans l'étape de fixation du carbone atmosphérique. Le cycle se déroule en 3 étapes : la carboxylation, la réduction et la régénération. Le cycle débute par le recrutement de trois molécules de Ribulose 1,5-Biphosphate (RuBP) qui joue le rôle d'accepteur. Ces trois molécules vont subir une étape de carboxylation via trois carbones inorganiques provenant du CO<sub>2</sub> atmosphérique et ce grâce à l'enzyme RuBisCo : Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase Oxygénase. Les composés à six carbones formés sont fortement instables et donnent spontanément six composés à trois carbones, les 3-Phosphoglycérate (PGA). S'en suit l'étape de réduction, durant laquelle, les six (PGA) sont réduits en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) par

consommation de six ATP et six NADPH. A la fin de cette étape, une molécule de (G3P) est produite et peut s'engager dans les réactions métaboliques de la plante. Les cinq autres passent par la dernière étape du cycle : la régénération de l'accepteur de  $\text{CO}_2$ , (Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018).

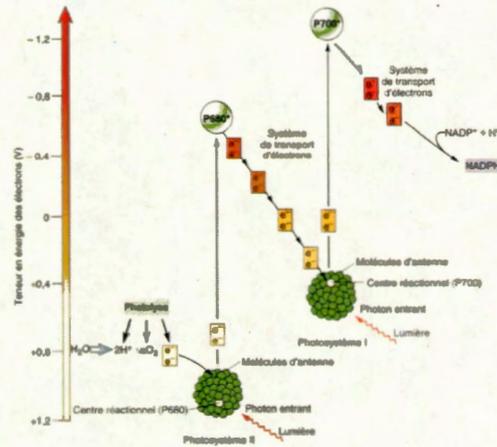


Figure 1.11 Schéma en Z (Karp *et al.*, 2018).

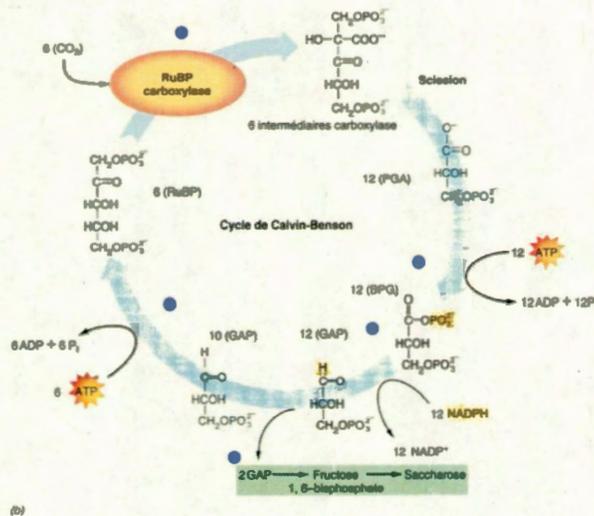


Figure 1.12 Cycle de Calvin-Benson (Karp *et al.*, 2018).

### 1.5.7 Excitation de la chlorophylle et cinétique rapide

Les molécules de chlorophylle associées à la membrane thylakoïdienne possèdent un état fondamental à l'obscurité. Après éclairage, les photons percutent les électrons des chlorophylles ce qui entraîne un transfert d'énergie du photon à l'électron, il se retrouve alors excité en passant d'un orbital à faible niveau énergétique à un orbital à haut niveau énergétique. La chlorophylle est alors instable et dite activée. Cette énergie est restituée au système selon 4 voies citées ci-dessous :

- Par transfert d'énergie par résonance. La chlorophylle retrouve son orbitale d'énergie de départ en transférant le quantum d'énergie à la molécule voisine.
- Extinction par transfert successif d'électrons. La chlorophylle transmet l'électron à un accepteur. La molécule anciennement donneuse d'électrons se retrouve oxydée et récupère un électron d'un donneur mais à un niveau d'énergie correspondant à l'orbital de l'état fondamental (Phase claire).
- Par formation d'espèces réactives de l'Oxygène (ERO). L'excès d'énergie peut entraîner la formation d'ions superoxydes  $O_2^-$  par le biais des molécules de chlorophylle des PS (Karp *et al.*, 2018), ou encore former du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  par la photorespiration dans le peroxysome (Strasser, *et al.*, 1995).
- Par émission de lumière (fluorescence) et de chaleur. L'émission d'énergie sous forme de fluorescence a été observée pour la première fois par Kautsky et Hirsh en 1931. Lorsqu'on illumine une plante, la fluorescence réémise par les pigments montre une intensité variable  $F_v$  donnant une cinétique de cette fluorescence appelée effet Kautsky (Kautsky *et al.*, 1931; Eyletters *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer cette émission de fluorescence et permettent de donner un indice sur le transport des électrons lors de la phase photochimique liée aux PS II.

### 1.5.8 Cinétique rapide et polyphasique de la Chl *a*

Le PEA (HANSATECH®), “Plant Efficiency Analyzer” est un appareil qui permet d’analyser la cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence chlorophyllienne, qui témoigne du transport des électrons au sein du PS II depuis la photolyse de l’eau. Après une adaptation à l’obscurité, on arrive à induire la fluorescence chlorophyllienne par exposition de la molécule à une lumière saturante d’environ 1s. Les 50 premières  $\mu$ s d’éclairement, la fluorescence affichent une valeur constante noté  $F_0$  (Strasser, *et al.*, 1995; Strasser, *et al.*, 2004). Sa variation témoigne d’une altération de l’antenne collectrice de photon (Owens, 1996). Après l’état de transition O, le rendement de la fluorescence varie dans le temps, témoigne de l’état des transporteurs d’électrons associé au PS II ( $Q_A$ ,  $Q_B$  et PQ). Lorsque la cinétique de la fluorescence est présentée selon une échelle logarithmique de temps (Figure 1.13), on voit apparaître trois niveaux de transitions J et I et P qui correspondent respectivement à la réduction de  $Q_A$ ,  $Q_B$  et PQ. La transition J est souvent affectée par un blocage au niveau de la photolyse de l’eau et donc du blocage du centre réactionnel du PS II. S’en suit d’un blocage du transport des électrons vers les quinones (Hsu, 1993; Strasser, 1997; Strasser, *et al.*, 2004). Sous une illumination saturante on obtient les valeurs suivantes  $F_0 = F_{50\mu s}$ ,  $F_J = F_{2ms}$ ,  $F_I = F_{30ms}$ ,  $F_P = F_M = 300ms$ . Dans les travaux de ce mémoire, les paramètres suivants sont utilisés (Strasser, *et al.*, 2004; Dewez *et al.*, 2018; Zhou, *et al.*, 2019) :

- ◆ ABS/RC permet une estimation de l’absorption des antennes collectrices par centre réactionnel actif du PS II :

$$\frac{ABS}{RC} = \frac{M_0}{V_J} = \Phi_{Po}$$

- ◆  $M_0$  est la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable dépendante du centre réactionnel du PS II selon :

$$M_0 = \frac{F_{300\mu s} - F_{50\mu s}}{(F_P - F_{50\mu s}) \times 0,25}$$

( $F_{300\mu s}$  représente le niveau de fluorescence à 300 $\mu s$ )

- ◆ Le paramètre  $V_J$  représente la fluorescence variable relative à la réduction de  $Q_A$  selon :

$$V_J = \frac{F_{2ms} - F_{50\mu s}}{F_P - F_{50\mu s}}$$

( $F_{2ms}$  représente le niveau de fluorescence à 2ms à la transition J.)

- ◆ Le rendement de la réaction photochimique primaire du PS II, il est d'environ 0,8 chez les plantes supérieures (Björkman *et al.*, 1987).

$$\Phi_{P_0} = \frac{F_P - F_{50\mu s}}{F_P} = \frac{F_v}{F_P}$$

( $F_{50\mu s}$  représente la fluorescence à la transition O,  $F_M$  le niveau de fluorescence maximal à la transition P.

- ◆  $PI_{ABS}$  étant l'indice de performance de l'activité photochimique du PS II.

$$PI_{ABS} = \frac{1 - \left(\frac{F_0}{F_m}\right)}{\frac{M_0}{V_J}} \times \frac{(F_m - F_0)}{F_0} \times \frac{(1 - V_J)}{V_J}$$

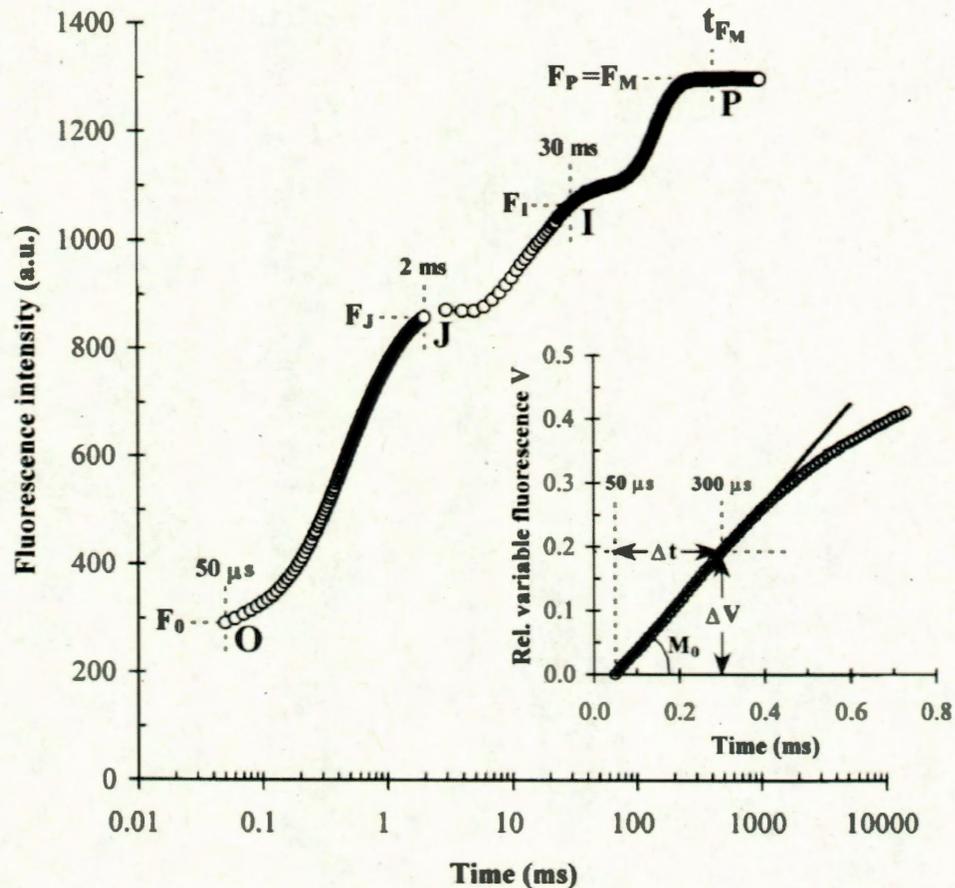


Figure 1.13 Courbe cinétique de la fluorescence de la chlorophylle *a* (Strasser, *et al.*, 2004).  $F_0$  correspond à la valeur de  $F$  à  $50\mu\text{s}$  d'illumination. La phase O-J correspond à la réduction de  $Q_A$  ( $Q_A^-$ ).  $F_i$  correspond à la première réduction de  $Q_B$  ( $Q_A^- Q_B^-$ ). La phase I-P correspond à une accumulation de  $Q_B$  réduit 2 fois ( $Q_A^- Q_B^{2-}$ ).  $F_p$  correspond à la réduction maximale du PS II lorsque les PQ sont réduits  $PQH_2$ . Après  $F_p$ , la fluorescence diminue et correspond au transfert d'électrons du PS II au PS I ou au  $NADP^+$  réductase.

## 1.6 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif provient d'un déséquilibre entre les défenses antioxydantes et la formation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Lorsque les organismes subissent un stress biotique ou abiotique tel qu'une exposition aux métaux, ces derniers favorisent la formation d'ERO. Les ERO sont des métabolites naturels qui sont pris en charge par un système de défense antioxydante, dont le rôle est de réduire leur concentration intracellulaire (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003; Cuypers *et al.*, 2016). Ces molécules ont la particularité d'être fortement réactives avec les macromolécules biologiques et finissent par être cytotoxiques voir génotoxiques. Si le stress est prolongé, ou trop important, les mécanismes de défense sont alors dépassés et la concentration d'ERO intracellulaire augmente (Haleng *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2015; Cuypers *et al.*, 2016). Dans la cellule végétale, la formation des ERO se produit majoritairement dans les organites suivants : chloroplaste, mitochondrie, peroxysomes, paroi cellulaire *etc.* (Apel *et al.*, 2004).

### 1.6.1 Les principales formes d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'oxygène singulet :  $^1\text{O}_2^*$ , l'ion superoxyde :  $^{\bullet}\text{O}_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène :  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le radical hydroxyle :  $\text{OH}^{\bullet}$ , le radical perhydroxyl :  $^{\bullet}\text{O}_2\text{H}$ . (Buchanan *et al.*, 2015; Cuypers *et al.*, 2016)

## 1.6.2 Origine des ERO

### 1.6.2.1 Les ERO : des déchets métaboliques

- ◆ Un déchet métabolique de la mitochondrie

Un excédent de NADH peut entraîner la réduction de l'oxygène moléculaire en ion superoxyde (Apel *et al.*, 2004).

- ◆ Un déchet métabolique du chloroplaste

La chlorophylle excitée au sein du PS I et PS II peut réagir avec l'oxygène moléculaire et former de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2^*$ ). Les PS peuvent également former l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) suite à une photoinhibition. Le PS I peut également former l'ion superoxyde par la ferrédoxine qui lui est associée. Cette dernière transfère les électrons à l'oxygène moléculaire et le réduit en ion superoxyde, au lieu de réduire le  $\text{NADP}^+$  en NADPH (Apel *et al.*, 2004).

- ◆ Un déchet métabolique du peroxysome

Soit en étant un déchet métabolique du peroxysome via la photorespiration: Dans certains cas, la Rubisco utilise l' $\text{O}_2$  au lieu du  $\text{CO}_2$  par la voie de la photorespiration aussi appelée voie du glycolate. Le produit de cette étape d'oxydation du carbone est le phosphoglycolate qui sera transporté au peroxysome, le transformant en glyoxylate par la Glycolate Oxydase et produisant du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Apel *et al.*, 2004; Karp *et al.*, 2018). Soit en étant un déchet métabolique du peroxysome via la  $\beta$ -Oxydation : l'oxydation de l'acétyl CoA par l'acyl-CoA-oxydase réduit le FAD en  $\text{FADH}_2$ . Il s'en suit, une étape de régénération du CoA par la réduction de  $\text{O}_2$  et la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , déchet métabolique toxique (Demarquoy *et al.*, 2015; del Río *et al.*, 2016; Karp *et al.*, 2018).

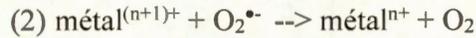
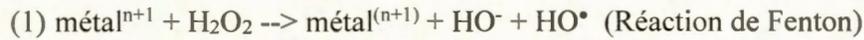
### 1.6.2.2 Les ERO des produits de stress

#### ◆ Le stress lumineux chez les organismes photosynthétiques

En cas d'excès lumineux, la photosynthèse ralentit, et le transport des électrons au niveau de la chaîne de photosynthèse est affecté. C'est la photoinhibition (Gururani *et al.*, 2015). Ces derniers vont interagir avec l'oxygène et former des ERO comme vu précédemment. D'autre part, la Rubisco va également être perturbée et l'enzyme aura tendance à oxyder plutôt que carboxyler l'accepteur organique, produisant à nouveau de la phosphoglycolate expédiée au peroxyosome (Apel *et al.*, 2004; Karp *et al.*, 2018). Ce qui renvoie au paragraphe précédent sur le peroxyosome.

#### ◆ Le stress métallique chez les organismes photosynthétiques

Perturber la photosynthèse, c'est perturber le deuxième processus biologique sur la planète après la respiration. Les végétaux sont les principaux producteurs de matière organique et la toxicité engendrée par les métaux constitue un risque majeur pour la production de biomasse. Les métaux pénètrent dans les cellules par diffusion passive à travers les membranes, ou par un transport actif par compétition avec les autres ions dits essentiels (Zhao et Wilkinson, 2015), affectant les différents processus biochimiques de la phase claire et obscure (Rai *et al.*, 2016). Les métaux pénètrent la cellule et les organites via des transporteurs membranaires spécifiques à des éléments essentiels (Zhao et Wilkinson, 2015). Ils s'accumulent dans différents organites notamment le chloroplaste (Vannini *et al.*, 2011), et finissent par produire un stress oxydatif indirectement en affectant négativement les mécanismes de défenses ou le transport des électrons le long de la chaîne de transport (Żróbek-Sokolnik *et al.*, 2009). À forte concentration intracellulaire, ils sont à l'origine des ERO. Ces métaux produisent le radical hydroxyle (HO•) par les réactions de Fenton et Haber-Weiss à partir de produits métaboliques tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou les anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Liochev *et al.*, 2002; Cuyper *et al.*, 2016).



◆ Effets des métaux sur les pigments

Les métaux perturbent la biosynthèse des pigments chlorophylliens (Rai *et al.*, 2016). Ils ciblent l'enzyme responsable de leurs biosynthèses : la NADPH Protochlorophyllide Oxydoréductase (POR). Par exemple, le cadmium est connu pour inhiber l'activité de cette enzyme et donc la production de pigments. La diminution de la quantité de chlorophylle entraîne une diminution de la taille des antennes collectrices de photon dont ils sont essentiellement composés (Lenti *et al.*, 2002; Myśliwa-Kurziel *et al.*, 2005). Les métaux peuvent affecter l'adhérence des pigments aux protéines de la membrane thylakoïdienne (Vannini *et al.*, 2011). Les ERO peuvent aussi modifier l'intégrité de ces composés en les oxydant ou en les décomposant en phéophytine (Rodríguez *et al.*, 2007). La substitution du magnésium du noyau porphyrine des chlorophylles est une autre des conséquences entraînant une diminution de l'efficacité de l'antenne collectrice à absorber et transférer l'énergie lumineuse des photons aux centres réactionnels (Küpper *et al.*, 1998). Ces modifications fondamentales de la structure du pigment altèrent le spectre d'absorption de la chlorophylle. Suite à l'altération de la biosynthèse des pigments, le ratio entre Chl *a* et Chl *b* peut également être impacté (Rai *et al.*, 2016). Cela illustre une modification de la taille des antennes périphériques seule structure composée de Chl *b* (Sakuraba *et al.*, 2010; Kirst *et al.*, 2017). En réponse à ce stress, il est normal d'observer suite à un stress métallique, l'augmentation de caroténoïdes, qui joue un rôle photoprotecteur essentiel des PS (Young, 1991; Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018). Leurs biosynthèses sont moins impactées que la biosynthèse des pigments chlorophylliens (Rai *et al.*, 2016).

◆ Effets des métaux sur le photosystème II

Le PS II est une cible privilégiée des ions métalliques (Dewez *et al.*, 2005). Des études ont montré que les ions métalliques peuvent bloquer le CDO en inhibant la photolyse de l'eau par une substitution du  $\text{Ca}^{2+}$  cofacteur de l'enzyme (Faller *et al.*, 2005; Cuypers *et al.*, 2016; Dewez *et al.*, 2018). Les sous unités protéiques du CDO D1 et D2 (Figure 1.8) sont aussi une cible du stress métallique (Ali *et al.*, 2006). Les accepteurs du PS II peuvent aussi être une cible privilégiée et inhiber le transfert d'électrons aux autres protéines de la chaîne photosynthétique (Sigfridsson *et al.*, 2004). La photoinhibition dû au stress peut entraîner la dégradation du centre réactionnel en visant la protéine D1 plus sensible, et donc inactiver le centre réactionnel (Gururani *et al.*, 2015).

◆ Effets des métaux sur les phases de la photosynthèse

En plus des différentes actions sur la phase lumineuse, la phase obscure est souvent sujette au stress, les métaux agissent sur le cycle de Calvin, bloquant l'activité de la Rubisco, et entraînant des mutations de l'enzyme, inhibant la fixation de carbone atmosphérique (Vannini *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2016). Le blocage du cycle de Calvin va entraîner une lacune dans la demande en ATP et en NADPH ce qui va freiner le transport d'électrons le long de la phase claire et donc produire une photoinhibition due à l'énergie lumineuse en excès toujours absorbée par les antennes fonctionnelles (Subrahmanyam *et al.*, 2000). Le blocage des PS I et II, des voies de dissipation de l'énergie par les métaux, favorisent la formation des ERO dans ces organites ; en plus de la réaction de Fenton (Rai *et al.*, 2016).

◆ Effets des métaux sur *Lemna*

Tableau 1.1 Effets des métaux chez *Lemna*.

Phénomène biologique observé	Métaux
Diminution de la biomasse et croissance	ZnSe, AgNPs, Cu, Al, Co
Diminution de la biosynthèse des chlorophylles	Co, Pb et Hg, Cd et Cr, AgNPs, ZnSe, Cu, Cd, Al, Mg et Ni
Augmentation de la biosynthèse des protéines totales Variation de l'activité enzymatique et ERO: CAT, SOD, POD, GPx, APX	Cu, Cd, Co, Mg et Ni Cu, Cd, ZnSe, Co, Al, Mg et Ni
Augmentation des composés phénols	ZnSe
Diminution des carbohydrates	Al, Cd
Diminution de l'expression des gènes de la Rubisco, de la protéine D1 et D2 du PS II, de l'ATPase chloroplastique des protéines de l'antenne collectrice de photon	Al
Variation des paramètres photosynthétiques - Diminution de Fv/Fm - Variation de ET/RC et ABS/RC et Vj	AgNPs, Al, Cu, Cd, Zn AgNPs

Co (Hu, D. *et al.*, 2019), Pb et Hg (Hegazy *et al.*, 2017), Cd et Cr (Chaudhary *et al.*, 2019), AgNPs (Dewez *et al.*, 2018), ZnSe (Tarrahi *et al.*, 2018), Cu (Hu, C. *et al.*, 2018), Cd (Unadkat *et al.*, 2018), Al (Su *et al.*, 2019), Cd (John *et al.*, 2007), Mg et Ni (Doganlar *et al.*, 2012), Cu Cd et Zn (Drinovec *et al.*, 2004).

### 1.6.3 Indicateurs de stress

Il existe plusieurs indicateurs du stress oxydatif, notamment la présence d'un fort taux de lipides peroxydés, une suractivité ou surexpression des enzymes antioxydantes et des transporteurs membranaires de cations métalliques DMT1, DMT2, MRP, une production accrue de protéines à groupements thiols, ou de composés phénols qui chélatent les métaux *etc.* (Michalak, 2006; Haleng *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015; Cuypers *et al.*, 2016).

#### 1.6.3.1 Le glutathion

Il s'agit d'un tripeptide formé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine principalement localisé dans le chloroplaste et le cytosol. Le peptide peut agir seul grâce à son pouvoir réducteur qui lui est conféré par le groupement thiol (SH) de la cystéine et ainsi inactiver les ERO où il peut agir comme coenzyme (Haleng *et al.*, 2007; Cuypers *et al.*, 2016).

#### 1.6.3.2 Les phytochélatines

Les PC sont des polymères protéiques, répétition du monomère identique à celui du glutathion. On observe l'enchaînement des trois acides aminés, (l'acide glutamique, la cystéine et la glycine)<sub>n</sub> avec n variant entre 2 et 11 (Figure 1.14). Ils ont la capacité de chélater les métaux grâce aux groupements thiols de la cystéine, afin de les rendre non disponibles et réduire le stress qu'ils occasionnent. Les différents types de PC se distinguent par leurs longueurs variables (Clemens, 2006; Kińska et Kowalska, 2019).

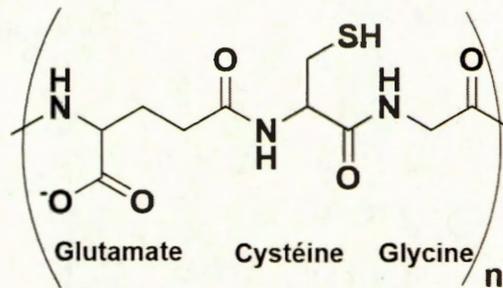


Figure 1.14 Structure d'un monomère de glutathion formant la structure de la phytochélatine.

Les métaux sont capables d'activer la phytochélatine synthase. Cette enzyme est capable de synthétiser des complexes à faible poids moléculaire, qui transportent les métaux vers la vacuole. Arrivés dans cet organite, sont ajoutés des groupements sulfures, formant des complexes à haut poids moléculaire. Le pH de la vacuole aide à la dégradation des complexes en monomères ou acides aminés libres qui retourneront vers le cytoplasme. Les ions métalliques quant à eux seront à nouveau complexés dans la vacuole ou retournés vers le cytoplasme (Supalkova *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2012; Kińska et Kowalska, 2019).

### 1.6.3.3 Les enzymes antioxydantes

Afin de contenir l'augmentation des ERO au sein de la cellule, plusieurs enzymes travaillent de concert afin d'endiguer leur production et de réduire leur toxicité en les transformant en produits moins réactifs (Haleng *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2015; Cuyper *et al.*, 2016).

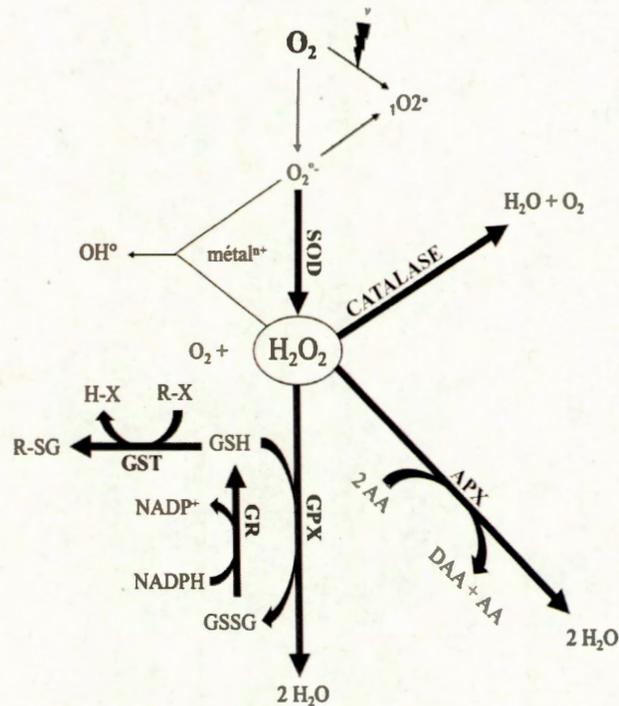


Figure 1.15 Mécanisme de réduction des ERO par la voie enzymatique. SOD: Superoxyde dismutase, APX: Ascorbate peroxydase, AA: Acide L-ascorbique, DAA: acide L-déshydroascorbique, GPX: Glutathion peroxydase, GR: Glutathion réductase, GSH: glutathion réduit, GSSG: Glutathion oxydé, GST: Glutathion S-transférase, R: radical et X: ERO

Afin de contenir l'augmentation des ERO au sein de la cellule, plusieurs enzymes travaillent de concert afin d'endiguer leur production et de réduire leur toxicité en les transformant en produits moins réactifs. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une forme d'ERO centrale et important dans le mécanisme d'inactivation de ces derniers. La superoxyde dismutase (SOD) EC.1.15.1.1, est la première enzyme à intervenir. Elle permet de catalyser la conversion des ions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Selon la réaction suivante :  $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ , le peroxyde d'hydrogène, moins réactif que l'ion superoxyde va être le substrat par la suite de 3 enzymes importantes dans le mécanisme

d'inactivation des ERO (Figure 1.15) : l'ascorbate peroxydase (APX) EC.1.11.1.11, qui catabolise le  $\text{H}_2\text{O}_2$  selon les réactions suivantes :  $\text{L-AA} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{L-DAA} + 2 \text{H}_2\text{O}$  ; la glutathion peroxydase (GPX) EC.1.11.1.9 qui catabolise le  $\text{H}_2\text{O}_2$  à l'aide d'une coenzyme, le glutathion selon :  $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$  pour former : du glutathion disulfide (oxydé) et de l'eau. Enfin la catalase (CAT) EC.1.11.1.6, selon la réaction suivante :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . L'étude de la CAT est très intéressante de par sa simplicité, mais également car on sait que son activité est sensible à la présence de métaux (Tableau 1.1). S'ajoute à ces 4 enzymes, la glutathion réductase (GR) EC.1.8.1.7 qui permet au sein du chloroplaste de régénérer du glutathion actif réduit selon la réaction suivante :  $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GSH} + \text{NADP}^+$  sans oublier la glutathion S-transférase (GST) EC. 2.5.1.18 capable de catalyser le transfert de xénobiotiques avec le glutathion selon la réaction suivante :  $\text{SH-Glutathion} + \text{RX} \rightarrow \text{RS-Glutathion} + \text{X-H}$  et où R peut être un groupement aliphatique, aromatique, hétérocyclique et X, un groupement sulfate, nitrile, halide *etc.* (Haleng *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2015; Cuypers *et al.*, 2016).

### 1.7 Problématique générale

Les organismes à la base de la chaîne alimentaire constituent une voie d'entrée sensible et privilégiée pour les contaminants. Les petits organismes aquatiques photosynthétiques sont des organismes essentiels à la production de biomasse dans ces écosystèmes. Ces producteurs primaires absorbent massivement les éléments essentiels ainsi que des polluants par le phénomène de bioaccumulation et les transmettent à leurs prédateurs par bioamplification. Une potentielle contamination aux métaux provenant du trafic routier, constituerait donc un risque de phytotoxicité important. Cette toxicité, peut être compensée par des mécanismes de défense et tolérance des plantes, risquant également d'impacter négativement leurs métabolismes comme la photosynthèse mais aussi le métabolisme de leurs prédateurs. *Lemna minor* est un bon exemple de ces organismes photosynthétiques à la base de

plusieurs chaînes alimentaires. Elle constitue la nourriture des canards et des poissons dans les étendues d'eau de l'hémisphère nord. La plante constitue un bon modèle de laboratoire par sa rapidité de croissance et l'homogénéité génétique qui découle du mode de reproduction asexuée (par bourgeonnement). La plante permet également une projection de l'étude chez les végétaux supérieurs des champs et vergers qui longent les bords de routes destinés à la consommation animale ou humaine, et qui subissent un stress métallique constant provenant du trafic routier.

### 1.8 Objectifs généraux et spécifiques

La toxicité des métaux lourds est souvent testée en laboratoire à de trop grandes concentrations, proches de celles que connaissent les travailleurs de raffineries et d'industries. Il serait intéressant de tester la toxicité du Pd à des concentrations plus proches de celles présentes dans l'environnement. Aux concentrations allant de 0 à l'EC50 du modèle d'étude choisi. L'objectif général de cette étude est de démontrer la capacité qu'a le Pd à être bioaccumulé chez *Lemna minor* sans entraîner d'effet létal tout en discriminant des biomarqueurs sensibles d'une contamination au Pd. En ce qui concerne les objectifs spécifiques, il est intéressant d'étudier le comportement de chacun des biomarqueurs biochimiques et physiologiques mesurés suite à la contamination au métal, car ils informent notamment sur la présence et la lutte contre un stress métallique (protéines à groupement thiols), un stress oxydatif (production d'espèces réactives de l'oxygène, enzymes antioxydantes), et enfin la perturbation de la croissance végétale due à un impact sur la photosynthèse tout en mettant l'accent dans l'étude sur la phase claire du métabolisme en question. Les effets seront étudiés par des observations macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Préalable et incubation de *Lemna minor*

##### 2.1.1 Préparation du milieu de culture SIS

Le milieu de culture choisi est le milieu SIS soit une version modifiée du milieu établi par l'Institut Suédois de normalisation pour *Lemna minor* comme décrit et recommandé dans l'annexe 4 du rapport 221 de l'OCDE, afin d'optimiser la croissance des *Lemna minor*. Sept solutions mères ont été préparées dans du matériel en verre « *metal free* ». La solution I :  $\text{NaNO}_3$  à 8,5 g/L ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 1,34 g/L. La solution II :  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  à 15 g/L. La Solution III :  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 7,2 g/L. Solution IV :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 4 g/L. La solution V :  $\text{H}_3\text{BO}_3$  à 1 g/L ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  à 200 mg/L ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 10 mg/L ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  à 50 mg/L ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 5 mg/L ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 10 mg/L. La solution VI :  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 170 mg/L ;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 280 g/L. Solution VII : Tampon MOPS à 490 g/L. Les solutions I à VI sont filtrées sur une membrane à pores de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les solutions sont maintenues au frais et à l'obscurité. Les solutions I à V sont valables six mois alors que les solutions VI et VII ne sont valables qu'un mois. Un litre de milieu SIS se compose au final de : 10 mL de la solution I, 5 mL de la solution II, 5 mL de la

solution III, 5 mL de la solution IV, 1 mL de la solution V, 5 mL de la solution VI, 1 mL de la solution VII ainsi que 968 mL d'eau nanopure. Le milieu est préparé 2 jours avant son utilisation afin que le pH se stabilise ( $6,5 \pm 0,2$ ). Ce dernier est ajusté grâce à du HCl et NaOH 0,1M.

### 2.1.2 Entretien de la culture mère des *Lemna minor*

Les plantes ont été obtenues auprès d'une collection de culture provenant du laboratoire de Philippe Juneau de l'UQAM Sciences. Le milieu de croissance est déversé dans un récipient "metal free" et l'espèce *Lemna minor* est ajoutée au milieu de culture frais. Le récipient est ensuite maintenu à 24°C respectant un cycle de 16h de lumière et 8h d'obscurité. Il est important de choisir des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties en chlorose. On applique un éclairage continu à fluorescence blanche, afin d'obtenir une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Longueur d'onde 400 à 700 nm pour favoriser la photosynthèse). Équivalent à 6500-10000 lux  $\pm 15\%$ . Le récipient est couvert par un film plastique pour minimiser l'évaporation et la contamination tout en autorisant les échanges gazeux nécessaires. Enfin le milieu est remplacé une fois par semaine pour maintenir de bonnes conditions de culture (OCDE, 2006; Hu, C. *et al.*, 2018).

### 2.1.3 Solution stock de Palladium

Du fait de la « mauvaise » solubilité du sel de palladium  $\text{PdCl}_2$  dans l'eau, on a réalisé une solution stock mère de 20 mg/mL de  $\text{PdCl}_2$  (Sigma Aldrich®) qui a reposé pendant 10 jours (Cobelo-Garcia, 2007). Cette dernière a été filtrée 3 fois sur filtre à pores de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre et 2 fois sur filtre à pores de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre pour retirer tout précipiter possible. La concentration de cette dernière a été mesurée à l'ICP-EOS 5100 de Agilent Technologies® à une longueur d'onde de 340,458 nm,

après digestion à l'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  5%. Puis des solutions stocks filles de 1000 ppm de Pd total ont été réalisées pour toute la suite des expérimentations.

#### 2.1.4 Préparation des milieux de cultures contaminés

Sept contenants en verre ont été préalablement nettoyés afin de s'assurer d'être en condition "metal free", suivi de la contamination du milieu SIS par les stocks filles. Sept concentrations nominales en Pd (ensemble des espèces chimique dans le milieu de culture) ont été réalisées : 0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12,5 ; 25 et 50  $\mu\text{M}$  de Pd, équivalent respectivement à : 0 ; 0,21 ; 0,42 ; 0,84 ; 1,32 ; 2,65 ; 5.3 mg/L de Pd. De plus lors de l'élaboration du milieu de culture contaminé, on a observé une diminution de la concentration du métal solubilisé comme observé dans l'étude de (Zimmermann *et al.*, 2017), celle-ci est due à une précipitation d'hydroxyde insoluble et à une adhésion sur les parois des flasques. Une haute salinité du milieu et la présence de matière organique entraînent une diminution de la précipitation du métal en le complexant et en le maintenant en solution. Un moyen efficace est de soniquer le milieu contaminé à haute amplitude avant utilisation afin de retarder la précipitation, surtout aux fortes concentrations de métal (Cobelo-Garcia *et al.*, 2007).

#### 2.1.5 Incubation et condition d'essais

Des plantes formées de 2 à 3 thalles visibles sont prélevées de la culture mère et réparties au hasard dans les flasques de cultures cellulaires (T-75 SARSTEDT®) contenant les milieux de cultures contaminés à différentes concentrations en palladium de 0 à l'EC50 de *Lemna minor* (Bednarova *et al.*, 2014). Les plantules doivent impérativement incuber dans un minimum de 140 mL (20 mm) de milieu. Dix individus juvéniles à 2 thalles sont incubés dans chaque flasque durant 7 jours (Figure 2.1). Les cultures d'essais sont maintenues à  $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Le pH du milieu témoin (6,5) ne doit pas augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Les boîtes

sont fermées par un bouchon qui permet les échanges gazeux en minimisant l'évaporation du milieu. Les boîtes sont ensuite disposées de manière aléatoire dans un incubateur respectant les mêmes paramètres physiques et physiologiques que ceux de la culture mère (OCDE, 2006; Hu, *et al.*, 2018). Et toutes les expérimentations sont réalisées cinq fois ( $n=5$ ).

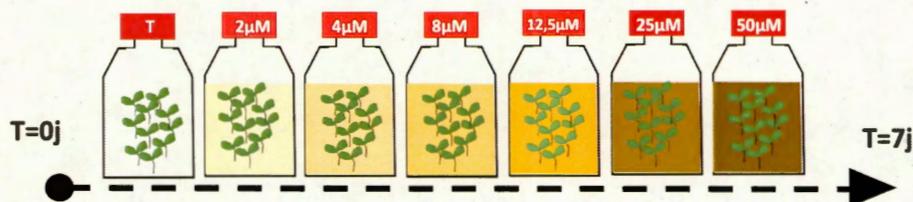


Figure 2.1 Schéma expérimental de l'incubation en milieu contaminé.

## 2.2 Expérimentations

### 2.2.1 Concentration en palladium disponible

Nous disposons d'une solution standard de Pd (Sigma Aldrich®) de concentration de 1000 µg/mL préparée dans une matrice d'acide nitrique 5%. On réalise ensuite une courbe étalon (A) de 8 concentrations (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20 µg/mL). Un prélèvement de chaque milieu de culture contaminé au métal est réalisé avant incubation et acidifié à l'acide nitrique 5% (Hu, *et al.*, 2018), afin de quantifier le Pd total disponible dans le milieu de culture (Pd, Pd<sup>2+</sup>; PdOH<sup>+</sup>; PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>; PdCl<sub>3</sub><sup>-</sup>; PdCl<sub>2</sub>(<sub>aq</sub>); PdCl<sup>+</sup>; PdEDTA<sup>2-</sup>) par l'ICP-EOS 5100 de Agilent Technologies® à une unique longueur d'onde de 340,458 nm.

## 2.2.2 Spéciation du Pd dans le milieu SIS

La spéciation du Pd a été estimée dans le milieu SIS est réalisée par modélisation des milieux contaminés à pH 6.5 grâce au logiciel Visual MINTEQ<sup>®</sup> version 3.1. Cette expérience permet d'obtenir une idée générale des espèces chimiques du Pd disponible pour la plante.

## 2.2.3 Bioaccumulation du Pd et son impact

### 2.2.3.1 Calcul de l'inhibition de croissance

Après une semaine d'incubation, le pH est mesuré dans chaque flasque. Le nombre d'individus et de thalles (a) sont comptés dans chaque flasque et on réalise une mesure du poids frais (b).

- ◆ Calcul du taux de croissance spécifique :

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

(N<sub>j</sub> variable (a ou b) à t = 7 ; N<sub>i</sub> variable (a ou b) à t = 0 et t = temps en jours)

- ◆ Calcul du pourcentage d'inhibition de croissance végétale :

$$\%I = \frac{(\mu_T - \mu_E)}{\mu_T} \times 100$$

( $\mu_E$  = taux de croissance spécifique des échantillons traités et  $\mu_T$  = taux de croissance spécifique du témoin (OCDE, 2006; Hu, C. *et al.*, 2018). Les calculs des deux paramètres seront ensuite moyennés.

### 2.2.3.2 Bioaccumulation du métal par *Lemna minor*

Les plantes sont broyées au broyeur Potter dans un volume d'eau nano-pure (2mL). Les broyats subissent par la suite une digestion à bouchon ouvert grâce à de l'acide nitrique 70% (1-1) pendant 6h à 70°C jusqu'à totale évaporation, afin de connaître la quantité de Pd accumulée par les organismes (absorption et adsorption totales du contaminant). Les échantillons sont solubilisés pendant 24h dans de l'acide nitrique 5% avant lecture à l'ICP-EOS 5100 de Agilent Technologies® à une unique longueur d'onde de 340,458 nm (Hu, *et al.*, 2018). Des blancs de digestion ont également été réalisés.

### 2.2.3.3 Mesure de la quantité de métal adsorbée

Après une semaine d'incubation, les plantules sont photographiées et dénombrées. Au lieu de réaliser la digestion de nos plantes, on réalise un lavage au 2-propanol / eau (1:17) selon une méthodologie développée pour *Lemna minor* et inspirée pour son choix de solvant de l'étude suivante (Fumagalli *et al.*, 2010). Cette dernière se compose de 4 lavages consécutifs de 20 minutes dans une roue tournante à vitesse 40. Deux lavages à la solution de 2-propanol entrecoupés de deux lavages à l'eau. L'ensemble des eaux de lavages est récupéré afin de quantifier la quantité de Pd ayant été adsorbée à la surface des organismes d'études. La libération de Chl *a* est utilisée comme point de repère de la perte d'intégrité des cellules pour le choix de la concentration optimale en solvant à utiliser. La même courbe étalon du Pd est réalisée, nommée (B), dans ce cas-ci, elle est réalisée dans une matrice d'acide nitrique 5% et de 2-propanol (1:17). Les échantillons et les standards sont quantifiés à l'ICP-EOS 5100 de Agilent Technologies® à une unique longueur d'onde de 340,458 nm.

## 2.2.4 Mécanisme de défense

### 2.2.4.1 Préalable

Après une semaine d'incubation, la totalité de chaque groupe de *Lemna minor* est récupérée et pesée afin d'obtenir le poids frais. Elles sont ensuite broyées au broyeur Potter à froid dans du tampon homogénat (Tampon Phosphate de Sodium 50 mM pH : 7,8). Le broyat est ensuite filtré sur un filtre à café puis centrifugé à froid (4°C) à 12 000g pendant 20 minutes (Hu, *et al.*, 2019). Le surnageant est ensuite aliquoté et conservé à -80°C pour toute la suite de l'expérience des dosages enzymatiques.

### 2.2.4.2 Dosage des protéines totales

On réalise une courbe étalon de BSA (0, 10, 20, 50, 100 µg/mL,  $\epsilon = 0,0069 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) à partir d'un stock de BSA à 1 mg/mL. Puis, on réalise un dosage des protéines totales par la méthode de Bradford (Bradford, 1976; Basiglini *et al.*, 2018), sur les échantillons et les standards à 595 nm au spectrophotomètre Cary 60 UV-vis de Agilent Technologies®.

### 2.2.4.3 Dosage de l'activité de la Catalase

L'activité de la Catalase est suivie par mesure de la disparition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du temps. Une mesure est faite par colorimétrie dans l'UV, toutes les trois secondes pendant trois minutes sur un mélange réactionnel contenant 50µL de filtrat végétal, 100 µL de tampon phosphate de sodium (50 mM pH 7,0). La réaction débute lors de l'ajout du substrat : 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%. Enfin, la lecture se fait dans une cuve en quartz à 240 nm au spectrophotomètre Cary 60 UV-vis de Agilent Technologies® (Chaoui *et al.*, 1997; Radić *et al.*, 2010). Une courbe étalon de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est préparée aux concentrations suivantes (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM,  $\epsilon = 0,0392 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 2.2.4.4 Dosage des thiols totaux

On utilise le réactif d'Ellman, le DTNB comme agent de couplage aux groupements thiols présents dans l'extrait végétal, créant des complexes TNB-SR et libérant un TNB libre qui absorbe la lumière à 412 nm (Cary 60 UV-vis de Agilent Technologies®). Pour cela on mélange l'extrait végétal à une préparation de méthanol, de DTNB et de tampon Tris HCl 30mM et EDTA 3mM à pH 8,2, puis on centrifuge à 3000g à température ambiante pendant 5 minutes (Ellman, 1959; Radić *et al.*, 2019). Une courbe étalon est réalisée sur le glutathion réduit aux concentrations suivantes (0 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100  $\mu\text{M}$ ,  $\epsilon = 0,0047 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 2.2.4.5 Dosage des Espèces Réactives de l'Oxygène

(Ce dosage est indépendant des autres dosages et est réalisé sur des plantes entières)  
Les plantes ont été incubées dans deux réactifs à 5 $\mu\text{M}$  pendant 40 minutes à 37°C, le CellRox® Orange (545/565nm) et le CellRox® Green (485/520nm) (ThermoFisher®) qui permettent respectivement de révéler la présence des ERO cytoplasmique et ceux présents dans les organites à ADN comme décrit par le fournisseur. Après l'incubation les plantes sont lavées trois fois au PBS à température ambiante pendant 10 minutes pour chaque lavage (Ranjit *et al.*, 2019). Puis on réalise une lecture de la fluorescence grâce à un fluorimètre Infinite M200 (TECAN®) sur une surface de 2  $\text{cm}^2$  (un puit d'une microplaque à 6 puits) recouverte de *Lemna minor*. On réalise 16 lectures par puit avec un gain de 200 et les valeurs sont moyennées.

#### 2.2.5 Impact sur la photosynthèse

Après une semaine d'incubation, la totalité de chaque groupe de plante est récupérée et pesée afin d'obtenir le poids frais.

### 2.2.5.1 Dosage des pigments photosynthétiques

Les plantules entières sont récupérées et détruites dans un mortier avec du sable d'Ottawa à l'obscurité. L'extraction des pigments se fait avec 10 mL d'éthanol à 96% à température ambiante. Après 24h, les pigments subissent une forte agitation suivie d'une centrifugation à 5198 g pendant 5 minutes. L'absorbance est mesurée à 665 (Chl *a*), 648 (Chl *b*) et 470 nm (Caroténoïdes) (Hu, C *et al.*, 2018). La lecture des échantillons est réalisée par le spectrophotomètre Cary 60 UV-vis de Agilent Technologies®. Et les concentrations en pigments sont calculées par les formules suivantes.

$$(1) \text{ Chl } a = 13,36 \times (\text{Abs } 665\text{nm}) - 5,19 \times (\text{Abs } 648 \text{ nm})$$

$$(2) \text{ Chl } b = 27,43 \times (\text{Abs } 648 \text{ nm}) - 8,12 \times (\text{Abs } 665 \text{ nm})$$

$$(3) \text{ Caroténoïdes} = (1000 \times (\text{Abs } 470 \text{ nm}) - (2,13 \times \text{Chl } a) - (97,64 \times \text{Chl } b)) / 209$$

(Lichtenthaler, 1987; Hu, *et al.*, 2018).

### 2.2.5.2 Mesure de la cinétique rapide de la Chl *a* du PS II

Après une semaine d'incubation, la totalité de chaque groupe de plante est récupérée. La mesure de la cinétique rapide de la Chl *a*, a été réalisée par le Handy PEA (HANSATECH®) "Plant Efficiency Analyzer". Les plantes ont été préalablement maintenues à l'obscurité pendant 15 minutes (pour vider la chaîne de transport des électrons), avant une stimulation lumineuse de 6 secondes à intensité saturante de 3500  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Les valeurs de fluorescence variables et de cinétique rapide sont normalisées respectivement par la fluorescence maximale  $F_m$  et initiale  $F_0$  de la Chl *a*. (Strasser, *et al.*, 2004; Dewez *et al.*, 2018).

### 2.3 Analyse statistique

Des analyses de variances (ANOVA à un facteur) ont été réalisées avec le logiciel Statistical Package for Social Sciences (SPSS), afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les échantillons traités ainsi que le témoin. Suite à une différence significative déterminée par les ANOVAs, le test Post Hoc de Tukey a été utilisé afin d'évaluer les différences significatives qui existent entre les valeurs des échantillons traités les uns des autres \* ( $p < 0,05$ ) et \*\* ( $p < 0,01$ ).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

Dans cette présente étude, nous avons investigué les effets toxiques du Pd en milieu aqueux en utilisant l'organisme modèle *Lemna minor*, ce qui a permis de déterminer le changement de biomarqueurs de présence et de toxicité sensibles suite à la bioaccumulation du métal dans les tissus des plantules. Pour bien comparer la toxicité du Pd par rapport au témoin, les résultats font référence à des valeurs obtenues pour des concentrations en Pd en  $\mu\text{M}$  dans le milieu de culture. Dans des conditions contrôlées de laboratoire, les expérimentations comportaient suffisamment de répliques et nous avons pu tester la reproductibilité de nos résultats en tenant compte de la variabilité biologique et celle causée par la manipulation en laboratoire

#### 3.1 Spéciation du Pd dans le milieu SIS

D'après l'estimation de la spéciation du Pd en solution aqueuse, nous observons que la composition chimique du milieu SIS cause la présence de différentes espèces chimiques de Pd avec une concentration dépendante de la concentration nominale en Pd (Tableau 3.1). En particulier, la présence de l'espèce  $\text{PdEDTA}^{2-}$  est dominante aux concentrations égales et inférieures à  $8 \mu\text{M}$  de Pd, et la concentration de cette espèce continue de diminuer jusqu'à 8,5 % pour la concentration nominale de  $50 \mu\text{M}$  de Pd. Au fur et à mesure de la disparition de cette espèce, on voit apparaître d'autres espèces chimiques de Pd. À une concentration nominale de  $2 \mu\text{M}$  de Pd, on retrouve

0,032 % de PdOH<sup>+</sup>, et à 4 µM, on retrouve 0,629 % de PdOH<sup>+</sup>, 0,125 % de PdCl<sub>2</sub> et 0,022 % de PdCl<sup>+</sup>. À 8 µM de Pd, on retrouve 37,535 % de PdOH<sup>+</sup>, 7,54 % de PdCl<sub>2</sub>, 1,321 % de PdCl<sup>+</sup> et 0,272 % de PdCl<sub>3</sub><sup>-</sup>. À une concentration nominale de 12,5 µM de Pd, on retrouve 52,879 % de PdOH<sup>+</sup>, 1,707 % de PdCl<sub>2</sub>, 1,878 % de PdCl<sup>+</sup>, 0,387 % de PdCl<sub>3</sub><sup>-</sup> et 0,011 % de PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> et 0,010 % de Pd<sup>2+</sup>. Les proportions des espèces PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> et Pd<sup>2+</sup> sont relativement semblables aux mêmes concentrations nominales. À 25 µM, on retrouve 66,327 % de PdOH<sup>+</sup>, 13,705 % de PdCl<sub>2</sub>, 2,368 % de PdCl<sup>+</sup>, 0,501 % de PdCl<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0,015 % de PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> et 0,013 % de Pd<sup>2+</sup>. À la concentration nominale de 50 µM de Pd, on retrouve 72,666 % de PdOH<sup>+</sup>, 15,548 % de PdCl<sup>+</sup>, 2,639 % de PdCl<sub>2</sub>, 0,578 % de PdCl<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0,017 % de PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> et 0,14 % de Pd<sup>2+</sup>. Le PdOH<sup>+</sup> est l'espèce chimique dominante pour les concentrations nominales égales et supérieures à 12,5 µM de Pd.

Tableau 3.1 Spéciation du Pd (%) dans le milieu SIS à pH 6,5 et obtenue grâce au logiciel Visual MINTEQ (3.1), T : témoin.

Espèces Chimiques	Concentration nominale en Pd						
	T	2 µM	4 µM	8 µM	12,5 µM	25 µM	50 µM
Pd <sup>2+</sup>	0	0	0	0	0,01	0,01	0,01
PdOH <sup>+</sup>	0	0,03	0,63	37,54	52,88	66,33	72,67
PdCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0	0	0	0	0,01	0,01	0,02
PdCl <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	0	0,27	0,39	0,50	0,58
PdCl <sub>2</sub> (aq)	0	0	0,13	7,54	10,70	13,71	15,55
PdCl <sup>+</sup>	0	0	0,02	1,33	1,87	2,37	2,64
PdEDTA <sup>2-</sup>	0	99,97	99,22	53,32	34,14	17,07	8,53

### 3.2 Effet du Pd sur le phénotype de *Lemna minor*

Nos résultats montrent que le témoin a une croissance exponentielle rapide de *Lemna minor* pendant 7 jours, avec une masse fraîche moyenne de 180 mg, un nombre moyen de frondes de 147,67 et une taille moyenne de racines de 3,06 cm (Tableau 3.2). Les racines et les frondes sont bien visibles et vertes. Nous avons ensuite

observé, avec l'augmentation de la concentration en Pd dans le milieu, une diminution significative de ces paramètres avec un niveau de confiance de 99 % à partir de 12,5  $\mu\text{M}$  d'exposition, dont voici les valeurs suivantes : 91,33 frondes, 78,4 mg et 0,98 cm de racines, soit une diminution respective de 38,15 %, 57,32 % et 67,97 % par rapport au témoin. De plus, une couleur brune apparaît progressivement sur les plantes.

Tableau 3.2 Diminution du poids frais (mg), de la longueur des racines (cm) et du nombre de frondes, après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd chez *Lemna minor* ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\* par rapport au témoin (T), (n=5).

Label	T	2 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
Poids frais (mg)	182,82 (8,79)	158,77 (8,38)	162,71 (5,35)	155,71 (10,15)	78,04** (6,01)	64,44** (5,73)	58,38** (10,28)
Longueur des racines (cm)	3,06 (0,11)	3,13 (0,04)	2,52 (0,15)	2,06 (0,04)	0,98** (0,04)	0,86** (0,08)	0,52** (0,04)
Nombre de frondes	147,67 (22,06)	139,33 (16,21)	137,33 (16,21)	130,00 (16,08)	91,33** (4,78)	87,00** (1,41)	79,67** (3,77)

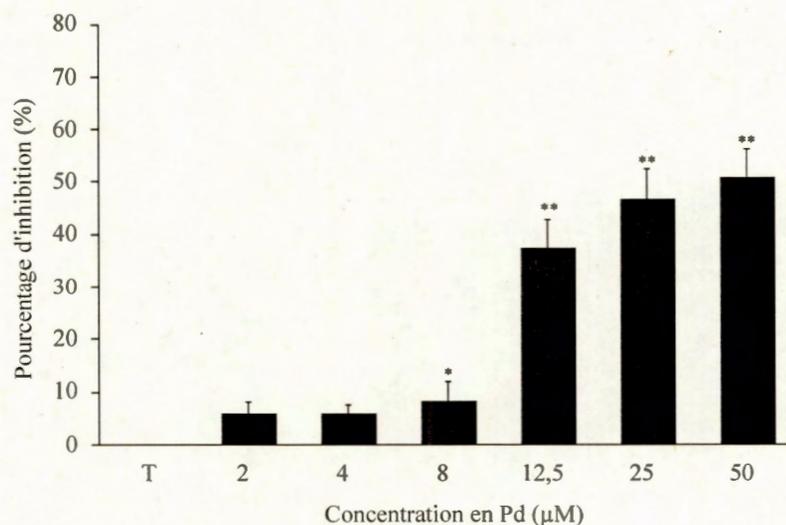


Figure 3.1 Effet inhibiteur du Pd sur la croissance de *Lemna minor* (%). L'inhibition de croissance des plantes de *Lemna minor* a été calculée grâce aux nombres de frondes et à la masse fraîche après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*. T, témoin.

### 3.3 Effet du Pd sur la croissance

Le poids frais et le nombre de frondes sont deux modifications morphologiques faciles à observer et à mesurer permettant d'étudier l'impact du métal sur la croissance des plantes (Figure 3.1). Le graphique montre une corrélation entre le pourcentage d'inhibition de la croissance et la concentration en Pd dans le milieu. Le pourcentage est de 0 % pour le témoin, car il correspond à une croissance optimale. Ensuite, nous observons une inhibition progressive de la croissance de la biomasse qui est dépendante de la concentration d'exposition. Pour une concentration en Pd inférieure à 4  $\mu\text{M}$ , l'inhibition n'est pas significative par rapport au témoin, mais à partir de 8  $\mu\text{M}$ , nous avons observé une augmentation significative de 8,1 % de cette inhibition par rapport au témoin, avec un niveau de confiance de 99 %. Pour un niveau de confiance de 95 %, une exposition de 12,5; 25 et 50  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu cause une inhibition correspondante de 37,4; 46,6 et 50,8 %.

### 3.4 Absorption et adsorption de Pd

Les résultats d'ICP-EOS nous permettent de déterminer la quantité de Pd dans les plantes. Nous pouvons observer une augmentation progressive de la concentration en Pd bioaccumulé (absorbé et adsorbé) avec une valeur de 263,26  $\mu\text{g/g}$  MF pour une exposition à 50  $\mu\text{M}$ , sans aucun effet létal (Tableau 3.3). La méthode de lavage au 2-propanol nous permet de détecter une valeur croissante de Pd adsorbé sur les plantes, à partir de 8  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu, correspondant à 0,7  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd adsorbé. En dessous de 8  $\mu\text{M}$ , la matrice d'acide/2-propanol, produit un effet de matrice qui stoppe la capacité de quantification, mais au-dessus de cette valeur nous avons observé une augmentation progressive et significative de la concentration avec un niveau de confiance de 99 % par rapport au témoin, et la formation d'un plateau maximum à partir de 25  $\mu\text{M}$  de Pd. Nous pensons que ce plateau nous indique la limite physique que la plante peut supporter à sa surface sans effet létal (11,5  $\mu\text{g/g}$

MF). L'effet de ce métal a également été observé en microscopie optique, causant une altération des racines (Figure 3.2).

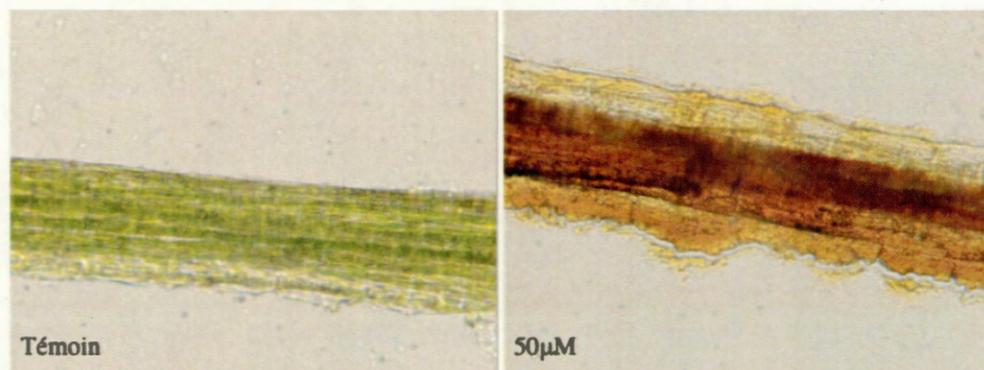


Figure 3.2 Photographies des racines de *Lemna minor* du témoin (gauche) et après 7 jours d'exposition à 50  $\mu\text{M}$  de Pd (droite).

Tableau 3.3 Augmentation de la concentration en Pd absorbée et adsorbée chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*\*, par rapport au témoin (T), (n=5).

Label	T	2 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
Pd Absorbé ( $\mu\text{g/gMF}$ )	0 (0)	5,35 (0,40)	11,27 (2,02)	28,35 (2,82)	63,04** (25,17)	107,69** (24,35)	263,26** (39,64)
Pd Adsorbé ( $\mu\text{g/gMF}$ )	- (-)	- (-)	- (-)	0,77 (0,32)	7,22** (1,43)	12,11** (1,02)	11,75** (1,73)

### 3.5 Effet du Pd sur la production de ERO

La mesure de la fluorescence relative des deux sondes de détection d'ERO (Figure 3.3) ne nous a pas montré de variation significative par rapport au témoin pour les concentrations de 2, 4 et 8  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu, mais à partir de 12,5  $\mu\text{M}$ , nous avons observé une augmentation significative avec un niveau de confiance de 95 % pour le ERO cytosolique et dans les organites ADN et avec un niveau de confiance de 99 % à partir de 25  $\mu\text{M}$  de Pd. Nous avons ensuite observé deux comportements distincts, en fonction du compartiment étudié. À 12,5  $\mu\text{M}$  de Pd, nous observons une

augmentation de 20 % de la fluorescence de la sonde cytosolique par rapport à 40 % de la fluorescence dans les organites avec ADN. À 25  $\mu\text{M}$  de Pd, nous observons une augmentation supplémentaire de 40 % du pourcentage de la fluorescence dans le cytosol contre 20 % supplémentaire uniquement dans les organites. Ces variations seraient attribuées aux mécanismes de transport et d'internalisation du Pd dans les différents compartiments cellulaires.

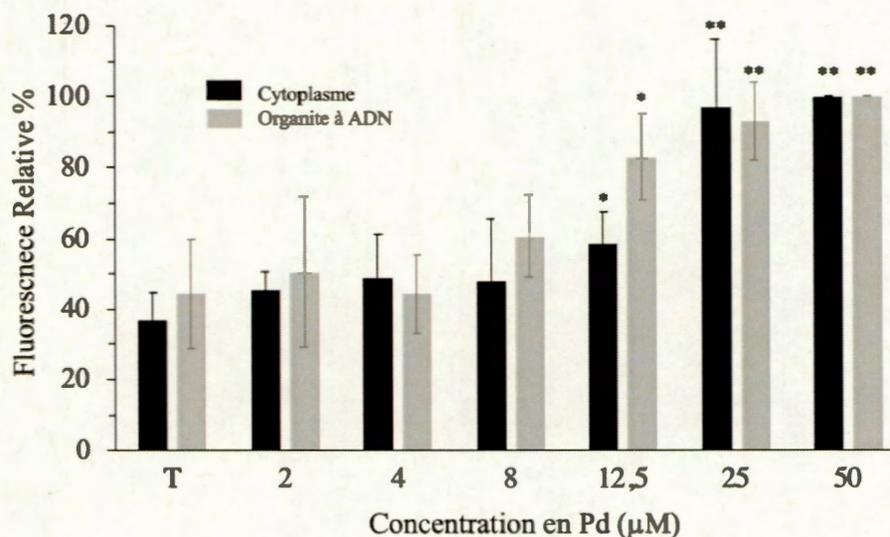


Figure 3.3 Production des ERO dans le cytoplasme (noir) et dans les organites à ADN (gris) chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*, par rapport au témoin (T), ( $n=5$ ).

### 3.6 Effet du Pd sur le contenu en pigments

Le dosage du contenu en pigments (Figure 3.4) montre une tendance similaire pour les deux pigments chlorophylliens. En effet, nous observons une légère variation non significative aux concentrations testées de Pd de 2, 4 et 8  $\mu\text{M}$ . C'est à partir de 4  $\mu\text{M}$  que nous avons observé une valeur maximale de Chl *a* de 0,74  $\mu\text{g/g}$  MF et une valeur de Chl *b* de 0,18  $\mu\text{g/g}$  MF. Ensuite, à partir de la concentration de 12,5  $\mu\text{M}$  de Pd, les

deux pigments diminuent par rapport à la valeur obtenue à 8  $\mu\text{M}$ , suivie d'une diminution significative avec un niveau de confiance de 99 % par rapport au témoin pour 25 et 50  $\mu\text{M}$  : Respectivement 0,47 et 0,39  $\mu\text{g/g}$  MF de Chl *a*, et 0,5 et 0  $\mu\text{g/g}$  MF de Chl *b*, comparé à la valeur de base (témoin) de 0,62  $\mu\text{g/g}$  MF de Chl *a* et 0,16  $\mu\text{g/g}$  MF de Chl *b*. Les teneurs en caroténoïdes suivent une autre tendance, les résultats nous montrent une variation non significative jusqu'à 8  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu. Puis à partir de 12,5  $\mu\text{M}$  de Pd, nous observons une augmentation progressive avec un niveau de confiance de 99% et une valeur de 0,30  $\mu\text{g/g}$  MF contre 0,20  $\mu\text{g/g}$  MF pour le témoin. Nous avons alors une inhibition jusqu'à une valeur non significative de 0,14  $\mu\text{g/g}$  MF sous une exposition de 50  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu.

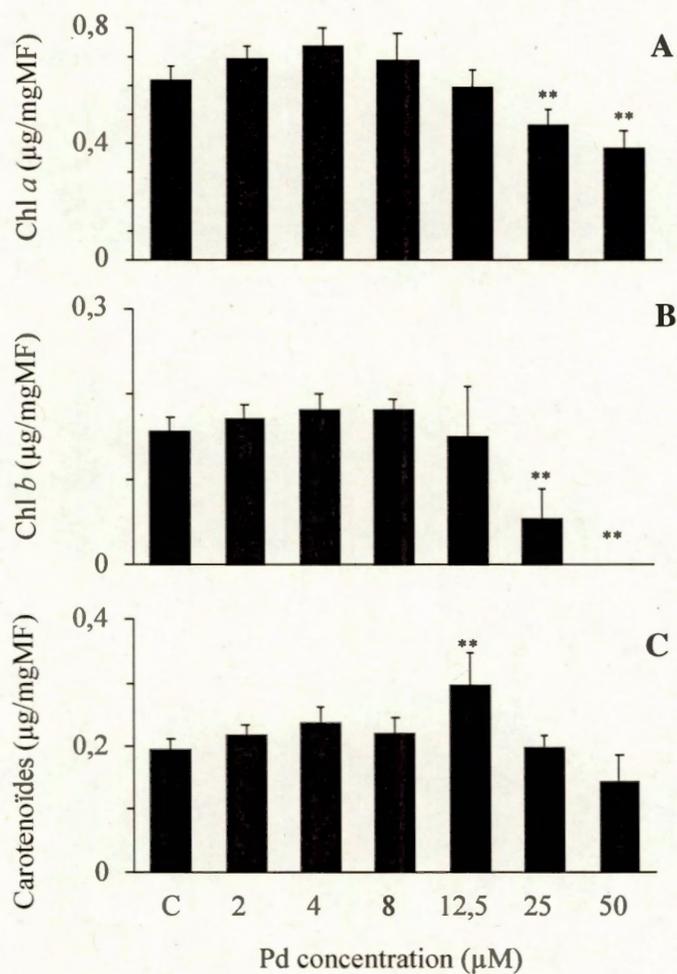


Figure 3.4 Variation du contenu en chlorophylle *a* (A), *b* (B) et caroténoïdes (C) ( $\mu\text{g}/\text{mgMF}$ ) chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\* par rapport au témoin (T), ( $n=5$ ).

### 3.7 Effet du Pd sur les paramètres photosynthétiques

Le rapport Chl *a/b* (Tableau 3.4) nous donne des informations sur la taille et l'organisation structurale du PSII. Nous observons pour ce paramètre une augmentation significative pour 25 et 50  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu avec un niveau de confiance de 99 % par rapport au témoin, avec des valeurs respectives de 16,49 et 0 par rapport à la valeur basale de 3,97 (témoin). Les paramètres étudiés avec le fluorimètre Handy-PEA nous permettent de déterminer la variation pour plusieurs biomarqueurs d'intérêts associés au PSII après la contamination. Tout d'abord, la cinétique rapide et polyphasique de fluorescence de la Chl *a* seule ( $F_v/F_o$ ) nous montre une perturbation de l'activité du PSII à partir de 25  $\mu\text{M}$  de Pd, indiqué par le changement des transitions J-I-P, et un blocage du transfert d'électrons photosynthétiques (Figure 3.5). Ensuite, nous avons observé que le ratio ABS/RC suit la même tendance statistique avec des valeurs de 1,13 et 1,21 comparées à 0,73 pour le témoin. Nous avons ensuite étudié l'efficacité quantique du PSII ( $F_v/F_M$ ) et l'indice de performance de l'activité du PSII ( $PI_{\text{ABS}}$ ), qui nous montre une variation significative à un niveau de confiance de 95 % pour 25  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu et à un niveau de confiance de 99 % pour 50  $\mu\text{M}$  de Pd: Pour  $F_v/F_M$ , 0,74 et 0,73 contre 0,79 pour le témoin ; et pour  $PI_{\text{ABS}}$ , 3,61 et 2,38 contre 4,56. Enfin, le paramètre  $V_J$ , soit la fluorescence relative nécessaire à la réduction de  $Q_A$ , a soudainement augmenté de manière significative avec un niveau de confiance de 99 % à 50  $\mu\text{M}$  de Pd avec une valeur de 0,51 par rapport à une valeur de base de 0,44 (témoin).

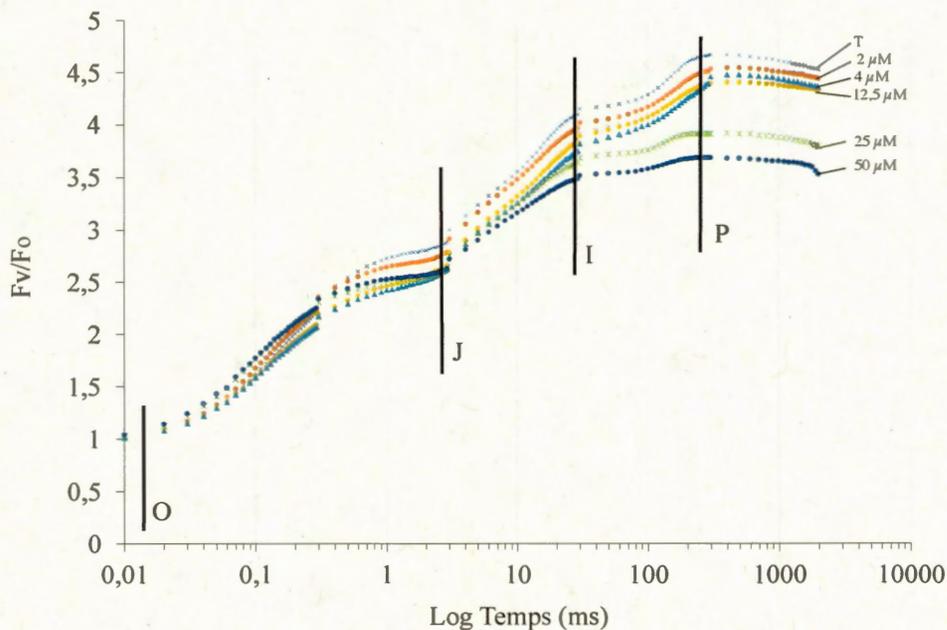


Figure 3.5 Diminution de l'intensité de la cinétique rapide et polyphasique de fluorescence de la Chl *a*, chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd, par rapport au témoin (T), (n=5).

Tableau 3.4 Variation de différents paramètres photosynthétiques chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*, par rapport au témoin (T), (n=5).

Label	T	2 $\mu$ M	4 $\mu$ M	8 $\mu$ M	12,5 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	3,97 (0,11)	4,06 (0,13)	4,03 (0,10)	3,76 (0,37)	5,23 (2,94)	16,49** (12,79)	- ** -
Fv/Fm	0,79 (0,01)	0,79 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,78 (0,01)	0,74 * (0,01)	0,73** (0,01)
ABS/RC	0,73 (0,09)	0,80 (0,02)	0,82 (0,05)	0,85 (0,05)	0,81 (0,03)	1,13 ** (0,12)	1,21** (0,12)
Vj	0,44 (0,01)	0,42 (0,01)	0,40 (0,03)	0,41 (0,01)	0,42 (0,01)	0,41 (0,02)	0,51** (0,01)
PI <sub>ABS</sub>	4,56 (0,41)	4,64 (0,12)	4,71 (0,57)	4,30 (0,21)	4,52 (0,28)	3,61* (0,23)	2,38** (0,13)

### 3.8 Effet du Pd sur les mécanismes de défense

La méthode de Bradford nous a permis de déterminer le contenu en protéines totales de la plante exposée à différentes concentrations en Pd (Figure 3.6). Nous observons une augmentation lente de ce paramètre. Les valeurs sont significatives par rapport au témoin dès 12,5  $\mu\text{M}$  de Pd avec un niveau de confiance de 99 % par rapport au témoin, avec les mesures suivantes : 10,66, 10,54, 16,67  $\mu\text{g/g}$  MF pour les valeurs respectives de 12,5, 25 et 50  $\mu\text{M}$  contre 8,6  $\mu\text{g/g}$  MF pour le témoin. Nous avons observé la même tendance pour la détermination des thiols totaux selon le réactif d'Ellman (Figure 3.7), avec 11,2, 12,3 et 17,4  $\mu\text{mol/g}$  MF de thiols contre 7,6  $\mu\text{mol/g}$  MF pour le témoin. Enfin, la mesure de l'activité spécifique de la catalase (Figure 3.8) suit la même tendance, mais avec des valeurs qui décroissent : 0,15, 0,13 et 0,12 U/mg P par rapport au témoin de 0,2 U/mg P.

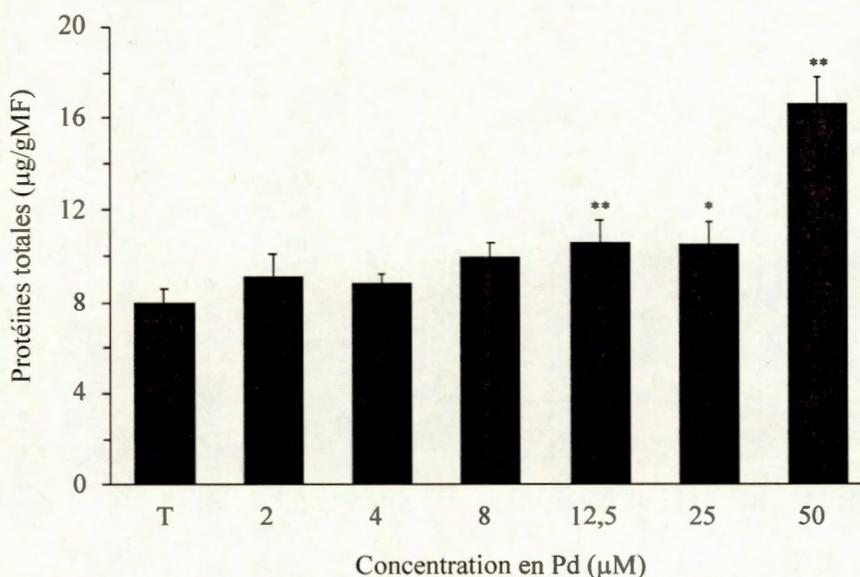


Figure 3.6 Augmentation des protéines totales ( $\mu\text{g/g}$  MF), chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*, par rapport au témoin (T), ( $n=5$ ).

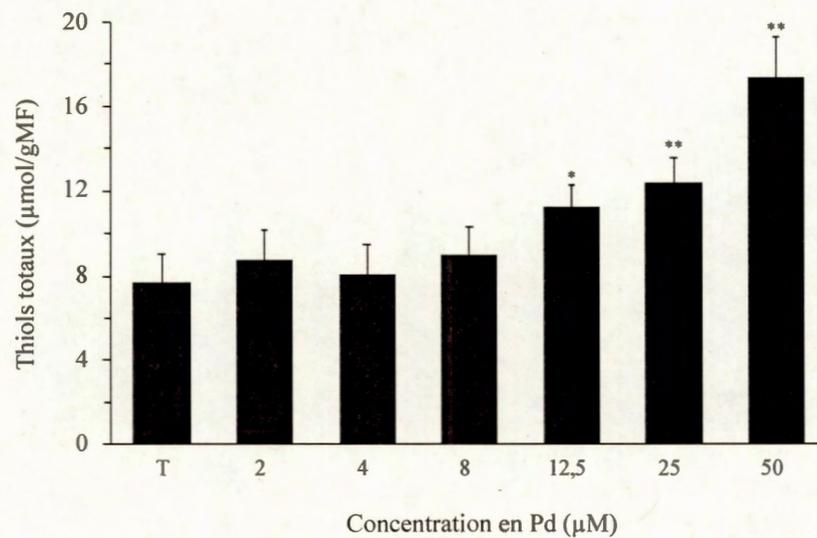


Figure 3.7 Augmentation des composés thiols totaux ( $\mu\text{mol/g MF}$ ), chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*, par rapport au témoin (T), ( $n=5$ ).

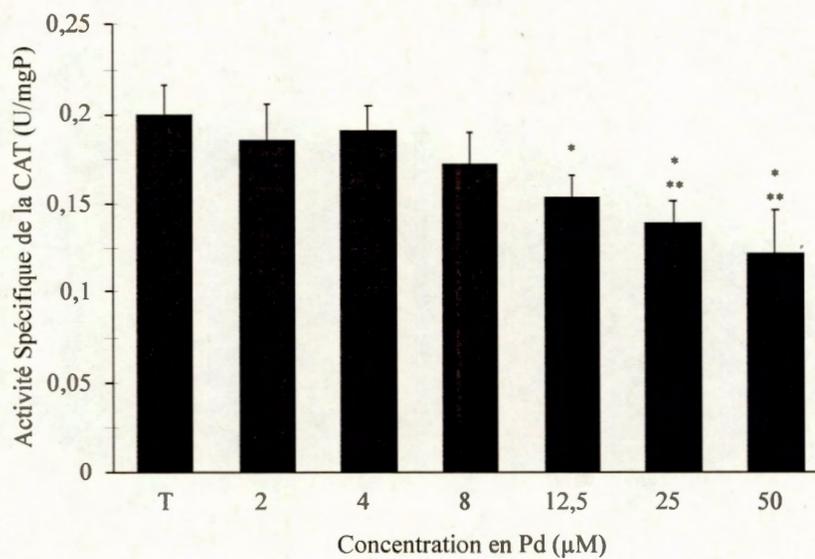


Figure 3.8 Diminution de l'activité spécifique de la Catalase (U/mg Protéines), chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations nominales de Pd. ( $p < 0,05$ )\* et ( $p < 0,01$ )\*\*, par rapport au témoin (T), ( $n=5$ ).

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Dans cette étude, les effets du Pd ont été investigués chez la plante aquatique *Lemna minor* après une incubation de 7 jours dans du milieu de culture contaminé. Dépendamment de la concentration nominale d'exposition de Pd en  $\mu\text{M}$  (représentant l'ensemble des espèces chimiques de Pd), la plante a absorbé activement le métal allant de 28,35 jusqu'à un maximum de 263,26  $\mu\text{g/g}$  MF (masse/masse de masse fraîche, voir correspondance au Tableau 3.3). Nos résultats ont montré l'apparition d'altérations morphologiques, physiologiques et moléculaires en fonction de la bioaccumulation en Pd.

Dans le milieu SIS, le Pd a tendance à former de nombreuses espèces complexées (Tableau 4.1). Le métal a tendance à se complexer avec l'EDTA pour former du  $\text{PdEDTA}^{2-}$ . L'EDTA permet de tamponner le  $\text{Pd}^{2+}$  libre dans le milieu. Lorsque ces ions présents en très faible proportions sont absorbés par les plantes, l'espèce  $\text{PdEDTA}^{2+}$  libère à nouveau des ions  $\text{Pd}^{2+}$  afin de maintenir la concentration d'ions libres. C'est la forme la plus bioaccumulable par les organismes ce qui expliquerait les inhibitions de croissances importantes relevées pour les plantes ayant été incubées à 12,5; 25 et 50  $\mu\text{M}$  (Figure 3.1). En effet, de fortes concentrations nominales de métal en solution renversent la tendance précédemment établie entre la forme  $\text{PdEDTA}^{2+}$  et les autres espèces de complexations possibles. En effet, le  $\text{PdEDTA}^{2+}$  disparaît progressivement pour laisser apparaître des espèces complexées

essentiellement à un groupement hydroxyle ( $\text{PdOH}^+$ ) ou chlorées ( $\text{PdCl}_4^{2-}$ ;  $\text{PdCl}_3^-$ ;  $\text{PdCl}_2(\text{aq})$ ;  $\text{PdCl}^+$ ) en plus petite proportion. La précipitation de l'espèce hydroxyle serait probablement à l'origine de la formation de particules en solution qui s'adsorbent sur la plante (Cobelo-Garcia *et al.*, 2007). Au final, l'étude de la complexation du Pd dans le milieu SIS nous montre la très faible disponibilité du métal dans le milieu de culture dû à sa complexation avec l'EDTA. Ces faibles valeurs des formes biodisponibles ont été nécessaires pour causer une bioaccumulation de 5,35 à 28,34  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd dans les tissus végétaux et stimuler certains processus biochimiques. Ensuite, l'apparition de la précipitation hydroxyle dès 28,35  $\mu\text{g/g}$  MF a été suffisante pour constituer la cause principale de la variation significative de l'inhibition de croissance à ce niveau. De plus, la valeur de la concentration d'ion  $\text{Pd}^{2+}$  est non nulle, et sa représentation en revanche face aux autres espèces est égale à zéro. Ces formes biodisponibles et bioaccumulables peuvent ainsi agir fortement sur la santé de la plante malgré tout. Enfin, dès 63,04  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd bioaccumulé dans les tissus de la plante, on observe l'apparition de la forme libre du métal parmi les autres espèces en solution. On peut donc supposer que l'apparition de cette espèce contribue aux perturbations majeures travaillant de concert avec l'espèce  $\text{PdOH}^+$ , deux espèces dont les proportions augmentent progressivement pour les 3 dernières valeurs nominales de Pd étudiées. Les légères variations des proportions des différentes espèces de Pd, d'une concentration nominale à l'autre, seraient la cause de la bioaccumulation du Pd et des perturbations cellulaires suite au stress.

D'après les résultats obtenus sur la toxicité, nous observons un impact sur la croissance de la biomasse et une variation de nombreux paramètres macroscopiques en fonction de la bioaccumulation de Pd. Comme le ZnSe (Tarrahi *et al.*, 2018), les nanoparticules d'argent, le cuivre (Hu, *et al.*, 2018), l'aluminium (Su *et al.*, 2019) et le cobalt (Hu, *et al.*, 2019), le Pd a entraîné une diminution de la biomasse et une augmentation du pourcentage d'inhibition de la croissance chez *Lemna minor*. Cela

confirme la capacité de *Lemna minor* à absorber les minéraux et les contaminants, en particulier les métaux (Wahaab *et al.*, 1995; Shukla et Srivastava, 2019). Au niveau microscopique, il y a une adhérence du métal sur les racines, provoquant un changement de couleur de l'organe. D'autres études ont déjà montré la capacité du Pd à s'adsorber à la surface des plantes (Fumagalli *et al.*, 2010), et l'observation microscopique de la plante en témoigne (Figure 3.2). On observe la formation d'une précipitation métallique, en particulier sur la racine. Ce phénomène d'adsorption a déjà été observé pour un mélange de cuivre et d'oxyde de graphène dans une étude passée (Hu, *et al.*, 2018). On suppose que le Pd peut ainsi interagir avec les macromolécules des membranes cellulaires, encapsulant la racine et bloquant certains mécanismes protéiques (enzyme, transport, signalisation, et même la respiration), provoquant la mort des plantes à long terme.

De 5,35 à 28,35  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd bioaccumulé dans les tissus végétaux, nous n'avons pas observé une diminution de la concentration en pigments photosynthétiques (Figure 3.4), malgré une diminution progressive de la biomasse (Tableau 3.2). Cela peut être dû à une phase d'acclimatation physiologique des plantes, causée par le stress du xénobiotique (Dewez *et al.*, 2008). À de faibles concentrations, le Pd modifierait la biosynthèse des pigments chlorophylliens, et cela peut être également dû à une substitution du magnésium par le palladium. Le magnésium n'est pas le seul métal pouvant être chélaté par le macrocycle de la chlorophylle (Küpper *et al.*, 1998). Le Pd en excès peut également être utilisé pour la biosynthèse de pigments avec son diamètre de 4,2 Å. Le macrocycle peut aussi chélater l'ion  $\text{Pd}^{2+}$  avec un diamètre atomique de 2,8 Å, légèrement inférieur à l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  avec un diamètre atomique de 3 Å (Slater, 1964).

À partir de 28,35  $\mu\text{g/g}$  MF, nous avons observé une variation significative de l'inhibition du taux de croissance (Figure 3.1), mais celle-ci n'est associée à aucune autre perturbation biochimique ou physiologique étudiée. On pense que cette

inhibition de la croissance est dû à la toxicité du Pd au sein d'un organite non étudié dans ce travail, la mitochondrie. En effet, nous pensons que ce compartiment a une grande affinité pour ce métal et perturbant ainsi le métabolisme mitochondrial par un blocage du transfert des électrons le long de la chaîne. On suppose également que la somme de toutes les perturbations étudiées et non significatives peut ensemble provoquer cette variation du taux de croissance. Néanmoins, la superposition des résultats de cette étude à ceux d'une étude antérieure (Bednarova *et al.*, 2014) permet de déterminer la concentration de métal critique absorbée dans les tissus de la plante et susceptible de provoquer les premières variations significatives. Cette valeur serait atteinte entre 8 et 10  $\mu\text{M}$  de Pd dans le milieu de culture.

Dès 63,04  $\mu\text{g/g}$  MF, on observe la modification de plusieurs paramètres phénotypiques, dont la longueur de la racine (Tableau 3.2). Cela peut être attribué à un blocage du processus d'élongation de l'organe, comme l'ont déjà montré d'autres métaux (Dewez *et al.*, 2018). Les racines étant moins grandes, avec une moins grande surface d'échange physique et une surface affectée également par l'adsorption du métal, on peut supposer que les transports actifs et passifs des minéraux se verront fortement affectés. En parallèle, on observe une augmentation des protéines totales (Figure 3.6), ce qui indique la mise en place d'une batterie de mécanismes de défense protéique, tels que des enzymes antioxydantes, des macromolécules chélatantes ou des protéines chaperonnes (HSP 70), *etc.* On sait que ces dernières sont produites sous l'influence des métaux (Basile *et al.*, 2015; Hu, *et al.*, 2018; Hu, *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019). Le Pd a d'ailleurs déjà été démontré comme un agent capable de favoriser la surexpression de HSP 70 chez les algues unicellulaires (Vannini *et al.*, 2011). Nous supposons que l'absorption du Pd (Tableau 3.3), entraîne deux conséquences, la première directement liée à la présence du métal par la formation d'ERO par la réaction de Fenton (Cuypers *et al.*, 2016), et la deuxième suite à un blocage du transport des électrons dans les organites semi-autonomes (Żróbek-Sokolnik *et al.*, 2009). Nos résultats montrent une augmentation des ERO dans les

organites à ADN (Figure 3.3), indiquant que le Pd serait internalisé préférentiellement dans ces compartiments (noyau, mitochondrie et surtout chloroplaste). Il est connu que les métaux sont capables de directement activer la synthèse de certaines protéines, telles que la phytochélatine synthétase, une enzyme qui permet de produire des PC. Ces protéines vont être capables de réduire la quantité de métal intracellulaire libre en le séquestrant dans la vacuole (Supalkova *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2012; Kińska et Kowalska, 2019). On peut supposer que *Lemna minor* surexprime ainsi des PC, illustrées par l'augmentation des thiols au sein de la plante (Figure 3.8). En revanche, on ne peut pas discriminer parmi ces thiols ceux du GSH seul de ceux des PC. On sait que certains métaux tels que le Cd pourraient conduire à la réduction de GSH en provoquant l'inhibition de certaines enzymes responsables de sa régénération (GR, GPx, *etc.*) (Levesque *et al.*, 2002; Ivanina *et al.*, 2008). Il a déjà été montré que le Pd était internalisé dans les chloroplastes perturbant plusieurs mécanismes majeurs, tel que les défenses, la phase sombre de la photosynthèse (formation d'adduit à l'ADN sur la séquence codante de la Rubisco), l'expression des gènes... (Vannini *et al.*, 2011). L'aluminium a aussi montré sa capacité à perturber les processus biochimiques cellulaires, tels que la photosynthèse, la respiration, la transcription, la biosynthèse, la voie de signalisation, et les défenses chez le même modèle (Su *et al.*, 2019). On suppose que le Pd serait capable de perturber ainsi la phase claire de la photosynthèse en bloquant le transfert d'électrons dans l'organite, ce qui favorise la formation d'ERO (Figure 3.3), (c'est expliqué dans la section suivante avec les paramètres de photosynthèse).

De plus, nous supposons que l'absorption croissante de Pd entraîne la production de ERO (Figure 3.3) par la réaction de Fenton dans le cytosol, mais moins que dans les organites à ADN. Ils sont tout d'abord compensés par l'activité de l'enzyme antioxydante et des PC, et leur production est plus importante par la perturbation du transfert d'électrons que par la seule réaction de Fenton. Ce qui explique la surexpression des caroténoïdes (Figure 3.4 C) pour prévenir ces phénomènes, mais on

observe progressivement une diminution de l'activité spécifique de la catalase (Figure 3.7). Nous pouvons en conclure, pour la première fois, que d'autres macromolécules protéiques montrent une plus grande biosynthèse suite à l'exposition au Pd que la catalase. Dans un second temps, nous avons pensé que le Pd ou les ERO pourraient agir sur l'enzyme, en bloquant ou en modifiant les mécanismes d'expression génique, en bloquant le complexe enzyme-substrat, en modifiant les sous-unités d'assemblage de l'enzyme, comme cela a été proposé pour l'action du Cd chez la *Lemna* (John *et al.*, 2007). De plus, on observe une bioaccumulation croissante et une production de ERO qui s'équilibre vers un blocage de la catalase. Néanmoins, la surexpression des caroténoïdes est un moyen localisé qui permet d'endiguer la formation des ERO par leur capacité photoprotectrice. L'internalisation des métaux dans le chloroplaste a des conséquences graves (Vannini *et al.*, 2011). En fait, le Pd s'est déjà révélé comme un perturbateur majeur de la photosynthèse chez les algues unicellulaires comme beaucoup d'autres métaux, et il peut modifier la structure des chloroplastes, ainsi que leur forme, leur taille et leur ultrastructure (Vannini *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2016). Le Pd est capable de modifier la régulation de la morphogenèse et de la synthèse des protéines du chloroplaste (Vannini *et al.*, 2011). D'autre part, l'aluminium a montré des effets similaires chez *Lemna*, affectant l'expression de protéines comme la Rubisco, les protéines de l'antenne du PS II et les sous-unités D1 et D2 du PSII, *etc.* (Su *et al.*, 2019).

À partir de 107,69 µg/g MF, nous observons que le Pd perturbe la biosynthèse des pigments chlorophylliens (Figure 3.4 A et B), qui constituent aussi la cible principale de nombreux autres métaux (John *et al.*, 2007; Upadhyay *et al.*, 2009; Doganlar *et al.*, 2012; Hegazy *et al.*, 2017; Dewez *et al.*, 2018; Hu, C. *et al.*, 2018; Tarrahi *et al.*, 2018; Chaudhary et Sharma, 2019; Hu, D. *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019). Nous observons d'abord une diminution progressive de leur biosynthèse (Figure 3.4) avec une plus grande disparition de la Chl *b*, car sa biosynthèse dépend de la Chl *a* (Buchanan *et al.*, 2015). Il est à noter que la Chl *b* compose les antennes

périphériques du PSII, élément important pour initier l'absorption et le transfert de l'énergie lumineuse accumulée des photons vers la paire de Chl *a* du centre réactionnel (Kirst *et al.*, 2017; Karp *et al.*, 2018). Le rapport Chl *a/b* (Tableau 3.4) montre une perturbation de la structure de l'antenne du PSII, ou de sa taille elle-même, par rapport au reste du complexe (Clijsters *et al.*, 1985; Appenroth *et al.*, 2003; Aravind *et al.*, 2004). Celui-ci est probablement plus petit. Constituée essentiellement de Chl *b*, l'antenne perd de son efficacité et n'est plus en mesure de collecter l'énergie nécessaire à l'excitation de la paire de Chl *a* du centre réactionnel, ce qui a un impact sur l'efficacité de la photosynthèse, moins d'énergie transmise à la Chl *a*, et c'est une fluorescence du pigment qui est également affectée. Ceci est confirmé par la baisse de l'indice de performance de l'activité du PSII ( $PI_{ABS}$ ) (Tableau 3.4). La diminution de la capacité des antennes à collecter l'énergie photonique peut également être due à la destruction des pigments eux-mêmes (Rodríguez *et al.*, 2007), à un retard dans l'intégration des pigments dans les photosystèmes (Miao *et al.*, 2012) ou à leurs stabilités dans la membrane thylacoïdienne (Vannini *et al.*, 2011). Les propriétés physiques de Chl *a* sont affectées par le stress généré par les métaux, qui les oxydent ou les décomposent en phéophytine (Rodríguez *et al.*, 2007). Ensuite, le paramètre  $F_v/F_M$  (Tableau 3.4), connu pour sa sensibilité, est hautement apprécié pour témoigner de la toxicité d'un xénobiotique chez les plantes. Ce paramètre est également affecté, et montre une diminution de l'efficacité quantique du PSII. Le donneur d'électrons n'est plus en mesure de transmettre efficacement ces électrons le long de la chaîne de transport d'électrons. Le paramètre ABS/RC (Tableau 3.4) est connu pour être efficace pour discriminer une affinité au métal pour les centres réactionnels du PSII suite à une augmentation des valeurs de ce paramètre (Tableau 3.4). Les résultats nous montrent que, comme pour le cuivre et les nanoparticules d'argent (Dewez *et al.*, 2005; Dewez *et al.*, 2018), le Pd bloque le centre réactionnel des PSII. On peut supposer que cela est dû à un substitut du  $Ca^{2+}$  du CDO, cofacteur essentiel pour catalyser la réaction de la photolyse de l'eau (Faller *et al.*, 2005; Cuyppers *et al.*, 2016; Dewez *et al.*, 2018). L'énergie absorbée n'est pas retransmise et

continue d'être accumulée, et fini par être retransmise à l'oxygène moléculaire favorisant la formation d'ERO (Apel *et al.*, 2004; Cuypers *et al.*, 2016). Ceci expliquerait la deuxième phase d'augmentation des ERO, soit les 20% supplémentaires liés (Figure 3.3) à un blocage du transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique, comme le montre la (Figure 3.5). Ce phénomène reste "contrôlé" par l'action photoprotectrice des caroténoïdes dont la biosynthèse est maintenue à un niveau basal (Young, 1991; Buchanan *et al.*, 2015; Karp *et al.*, 2018). Une perturbation généralisée du PSII diminue le rendement de la phase claire et donc par la suite de la phase sombre avec une diminution de la production d'ATP et de NADPH, deux molécules essentielles à la production de carbohydrates comme on le voit après une contamination par le Cd et l'aluminium (Unadkat et Parikh, 2018; Su *et al.*, 2019).

Enfin, à partir de 263,26  $\mu\text{g/g}$  MF, c'est le paramètre de photosynthèse Vj (Tableau 3.4) qui est affecté par le Pd. L'augmentation de la fluorescence relative montre une accumulation de  $Q_A$  réduite, suite à un blocage du transfert d'électrons. De plus, nous observons une diminution de la biosynthèse des caroténoïdes pouvant expliquer la dernière phase d'augmentation de la ERO de 5%, le PSII (Figure 3.3) perdant sa capacité à se protéger.

Dans cette étude, nous avons analysé le changement de 11 biomarqueurs chez la plante aquatique *Lemna minor* présentant une différence de sensibilité envers l'exposition au Pd (Tableau 4.1). Cette sensibilité a été déterminée par la plus faible quantité de Pd absorbé causant un changement significatif par rapport au témoin. Ainsi, ces 11 biomarqueurs apparaissent au fur et à mesure de la bioaccumulation du métal dans les tissus de *Lemna minor*. L'étude du pourcentage d'inhibition de croissance constitue le biomarqueur le plus sensible de la toxicité du Pd dès 28,35  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd dans la plante. Cependant, l'utilisation de cette méthodologie en milieu naturel est peu réalisable. Elle convient mieux à une étude en laboratoire. À

63,04  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd bioaccumulé, on observe une variation significative pour 4 biomarqueurs causée par la présence du xénobiotique (Tableau 4.1) : La production des ERO dans les différents compartiments suite aux réactions de Fenton et de la perturbation du transfert des électrons dans les organites semi-autonomes ; La surexpression des protéines totales, des groupements thiols et des caroténoïdes permettant de lutter de concert contre le stress physiologique causé par la toxicité du Pd ; La diminution de l'activité spécifique de la Catalase qui témoigne d'une perturbation biochimique des macromolécules. Ensuite, à 107,69  $\mu\text{g/g}$  MF, on observe le changement significatif de 5 biomarqueurs au niveau de la structure de l'appareil photosynthétique, comme la biosynthèse des pigments chlorophylliens et du rapport Chl *a/b*, et de l'activité photochimique du PSII : La diminution du paramètre  $PI_{\text{ABS}}$  témoigne de la désorganisation du PSII ; La diminution du rapport  $F_V/F_M$  est due à la diminution de l'efficacité photochimique du centre réactionnel ; Le paramètre  $ABS/RC$  témoigne de l'affinité du blocage de l'activité du centre réactionnel du PSII par le métal. Enfin, à 263,26  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd bioaccumulé, on observe l'apparition d'un seul biomarqueur, le paramètre  $V_J$  qui témoigne de l'affinité du Pd pour la  $Q_A$ .

Tableau 4.1 Sensibilité des biomarqueurs étudiés chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations de Pd.

<b>Biomarqueurs</b>	<b>Sensibilité (<math>\mu\text{g/gMF}</math>)</b>
Inhibition de la Croissance	28.35
Activité spécifique de la CAT	63.04
Caroténoïdes	63.04
ERO	63.04
Thiols Totaux	63.04
Chlorophylles Totales	107,69
Chl <i>a/b</i>	107,69
Fv/Fm	107,69
ABS/RC	107,69
Vj	263,26
PI <sub>ABS</sub>	263,26

## CONCLUSION

Nos résultats montrent que les effets toxiques du Pd chez *Lemna minor* se déroulent en trois temps. Après une incubation pendant 7 jours dans du milieu de culture contaminé, la plante absorbe activement le métal jusqu'à 263,26 µg/g MF sans conséquence létale, mais en entraînant un stress physiologique causant l'apparition de modifications morphologiques et moléculaires au fur et à mesure de la bioaccumulation. Lorsque les plantes sont exposées à 28,35 µg/gMF, le taux de croissance des plantes commence à être significativement inhibé. Dès 63,04 µg/g MF de Pd bioaccumulé dans les tissus, le métal provoque la production d'ERO dans les cellules, et ce de manière préférentielle dans les organites à ADN que le cytoplasme. Ce phénomène serait dû à l'internalisation du métal permettant d'activer les voies de signalisation et de biosynthèse des mécanismes de défenses chélateurs (composés thiols), réduisant la portion du Pd libre dans le cytosol. De cette manière, à cette concentration de Pd bioaccumulé, la toxicité des ERO produits affecte négativement sur les macromolécules biologiques dont le matériel génétique expliquant le « saut d'inhibition primaire » de 30%. On note ainsi une toxicité qui stimuleraient l'expression de défenses protéiques dont les protéines à groupements thiols (glutathion et phytochélatines), qui permettent de chélater les métaux et de les séquestrer au sein de la vacuole pour les rendre non disponibles. Mais également l'inactivation progressive de la catalase causée par cette inhibition. De plus, la biosynthèse des caroténoïdes suit la même tendance que les groupements thiols qui agissent comme moyen de défense supplémentaire de l'appareil photosynthétique. Néanmoins, l'absorption du métal ne montre pas de ralentissement et le pourcentage d'inhibition de croissance laisse apparaître un second « saut d'inhibition » de 10%

supplémentaire, dès 107,69  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd bioaccumulé. L'inhibition mesurée serait dû à une production accrue des ERO au sein du cytosol, inactivant progressivement l'efficacité de la biosynthèse des mécanismes de défenses ou en perturbant les défenses directement comme le montre l'exemple de la catalase. Les valeurs d'ERO continuent d'augmenter dans les organites à ADN, notamment au sein du chloroplaste et ainsi perturbent la biosynthèse des trois pigments photosynthétiques majeurs (dont les deux chlorophylles), altérant la composition des antennes des photosystèmes. Ces antennes sont plus petites et cela entraîne une diminution de la quantité d'énergie absorbée donc transmise à la paire de Chl *a* du centre réactionnel qui est responsable d'activer le transfert des électrons le long de la chaîne photosynthétique. À ces quantités de métaux bioaccumulés, le Pd bloque également le transfert des électrons directement dans la chaîne photosynthétique via sa forte affinité pour le centre réactionnel lui-même, favorisant la formation d'ERO suite à l'excès d'énergie absorbée par les antennes qui est ensuite restitué à l'oxygène moléculaire au lieu du centre réactionnel du complexe. Ce phénomène est d'autant plus encouragé par la diminution des caroténoïdes et de leur pouvoir photoprotecteur des photosystèmes. Ainsi, l'ensemble de ces paramètres indiquent par extension une perturbation de la phase claire et sombre de la photosynthèse. Enfin, un dernier saut d'inhibition de 5% est observé dès 263,26  $\mu\text{g/g}$  MF de Pd bioaccumulé. À ce stade, la bioaccumulation est telle, que la  $Q_A$  du PS II, va à son tour présenter une affinité pour le métal bloquant le transfert des électrons également à ce niveau de la chaîne. La biosynthèse de la Chl *b* devenue nulle, provoque l'incapacité de l'antenne périphérique de collecter l'énergie des photons nécessaires afin d'exciter la paire de Chl *a* du centre réactionnel. Dans cette condition, le stress physiologique causé par le métal sur l'organisme est trop important pour le système.

*Lemna minor* met en place une panoplie de mécanismes de défenses afin de diminuer la concentration de métal libre et d'inactiver les ERO. Il serait intéressant pour poursuivre l'étude, de réaliser une mesure du niveau d'expression génique par RT-

PCR des enzymes antioxydantes pour mieux cerner l'implication enzymatique dans la lutte contre le stress oxydatif, de même pour les transporteurs de cation divalent qui aideraient à l'expulsion du métal hors de l'organisme. Des mutants au niveau des séquences codantes des transporteurs de métaux permettraient de mieux cerner le mécanisme de prise en charge du Pd au niveau intracellulaire. Il serait également intéressant d'étudier le rapport GSH/PC selon une approche quantitative et qualitative par HPLC couplé à un spectrophotomètre de masse pour mieux connaître le type de PC impliquées. D'autres approches peuvent aider à l'étude du sujet, telle que l'analyse de composés impliqués dans la lutte contre le stress par RMN, il serait alors possible de dresser des profils de métabolites produits. L'étude du fractionnement subcellulaire permettrait également de mieux comprendre les régions cellulaires à hautes affinités pour le métal en s'intéressant plus particulièrement à la mitochondrie. Il sera plus facile de comprendre si c'est le métal lui-même ou les ERO qui affectent les processus biochimiques. En effet, c'est un organite intéressant à analyser pour comprendre si le métabolisme énergétique n'est pas également impacté. Enfin, il serait intéressant de mieux comprendre les effets synergiques des trois EGP ensemble comme on les retrouve dans la nature chez le même modèle.

Il est important de souligner que dans la nature, la contamination d'un espace naturel est progressive, des mécanismes peuvent être mis en place en fonction du temps d'exposition, or, l'expérience n'illustre en aucun cas ce paramètre temporel essentiel. À long terme les faibles concentrations d'expositions en métal de 2 à 8  $\mu\text{M}$ , qui n'ont jamais montrés de variation significative par rapport au témoin durant l'étude, peuvent entraîner une bioaccumulation critique en fonction du temps si celle-ci dépasse les 7 jours. Et les plus fortes, si l'exposition est progressive dans un environnement dynamique par exemple, peuvent permettre aux plantes de mettre en place des mécanismes de défenses suffisants et pérennes, adéquats pour lutter contre ce stress. Enfin, le modèle *Lemna minor* constitue un très bon bioindicateur de la toxicité du Pd au sein des environnements aquatiques. Elle a une capacité de

bioaccumulation qui permettrait potentiellement, d'utiliser ce modèle comme agent de phyto-rémediation pour assainir les eaux polluées au Pd, dans une infrastructure contrôlée afin d'empêcher le phénomène de bioamplification au sein de la chaîne alimentaire. Cette capacité à bioaccumuler le métal biodisponible dans son environnement, illustre le réel danger du métal chez les végétaux supérieurs et surtout ceux destinés à la consommation. En effet, la majorité des routes dont celles à haut trafic sont bordées par des champs de cultures agricoles destinées à la consommation humaine ou animale. Le métal relâché par le trafic routier est une source dangereuse de contaminants pour l'écosystème par le phénomène de bioaccumulation et de bioamplification.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland science. *New York*, 1227-1242.
- Ali, N. A., Dewez, D., Didur, O. et Popovic, R. (2006). Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosynthesis Research*, 89(2-3), 81-87.
- Apel, K. et Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Appenroth, K.-J., Keresztes, A., Sárvári, É., Jaglarz, A. et Fischer, W. (2003). Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza*: electron microscopy and biochemical investigations. *Plant Biology*, 5(03), 315-323.
- Aravind, P. et Prasad, M. (2004). Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. *Plant Science*, 166(5), 1321-1327.
- Arber, A. (1963). *Water Plants: A Study of Aquatic Angiosperms*, Wheldon and Wesley Ltd : and Hafner Publishing Co., New York, NY.
- Artemieva, I. M. et Shulgin, A. (2019). Making and altering the crust: A global perspective on crustal structure and evolution. *Earth and Planetary Science Letters*, 512, 8-16.
- Aruguete, D. M., Murayama, M., Blakney, T. et Winkler, C. (2019). Enhanced release of palladium and platinum from catalytic converter materials exposed to ammonia and chloride bearing solutions. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 21(1), 133-144.
- Barnes, S.-J., Naldrett, A. et Gorton, M. (1985). The origin of the fractionation of platinum-group elements in terrestrial magmas. *Chemical Geology*, 53(3-4), 303-323.

- Basiglioni, E., Pintore, M. et Forni, C. (2018). Effects of treated industrial wastewaters and temperatures on growth and enzymatic activities of duckweed (*Lemna minor L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153, 54-59.
- Basile, A., Sorbo, S., Cardi, M., Lentini, M., Castiglia, D., Cianciullo, P., . . . (2015). Effects of heavy metals on ultrastructure and Hsp70 induction in *Lemna minor L.* exposed to water along the Sarno River, Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 93-101.
- Beary, E. et Paulsen, P. (1995). Development of high-accuracy ICP mass spectrometric procedures for the quantification of Pt, Pd, Rh, and Pb in used auto catalysts. *Analytical Chemistry*, 67(18), 3193-3201.
- Bednarova, I., Mikulaskova, H., Havelkova, B., Strakova, L., Beklova, M., Sochor, J., . . . (2014). Study of the influence of platinum, palladium and rhodium on duckweed (*Lemna minor*). *Neuroendocrinology Letters*, 35(2), 35-42.
- Belyaeva, E. A., Dymkowska, D., Więckowski, M. R. et Wojtczak, L. (2008). Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1), 34-42.
- Birke, M., Rauch, U., Stummeyer, J., Lorenz, H. et Keilert, B. (2018). A review of platinum group element (PGE) geochemistry and a study of the changes of PGE contents in the topsoil of Berlin, Germany, between 1992 and 2013. *Journal of Geochemical Exploration*, 187, 72-96.
- Björkman, O. et Demmig, B. (1987). Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170(4), 489-504.
- Bocca, B., Alimonti, A., Cristaudo, A., Cristallini, E., Petrucci, F. et Caroli, S. (2004). Monitoring of the exposure to platinum-group elements for two Italian population groups through urine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 512(1), 19-25.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P. et Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. *Médecine-Sciences, Flammarion*.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Buchanan, B. B., Gruissem, W. et Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland :
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H. et El Ferjani, E. (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Plant Science*, 127(2), 139-147.
- Chaudhary, E. et Sharma, P. (2019). Chromium and cadmium removal from wastewater using duckweed-*Lemna gibba L.* and ultrastructural deformation due to metal toxicity. *International Journal of Phytoremediation*, 21(3), 279-286.
- Chen, M., Chen, S., Du, M., Tang, S., Chen, M., Wang, W., . . . (2015). Toxic effect of palladium on embryonic development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 159, 208-216.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707-1719.
- Clijsters, H. et Van Assche, F. (1985). Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7(1), 31-40.
- Cobelo-Garcia, A., Turner, A., Millward, G. E. et Couceiro, F. (2007). Behaviour of palladium (II), platinum (IV), and rhodium (III) in artificial and natural waters: Influence of reactor surface and geochemistry on metal recovery. *Analytica Chimica Acta*, 585(2), 202-210.
- Corella, J., Saiz-Lopez, A., Sierra, M., Mata, M., Millán, R., Morellón, M., . . . (2018). Trace metal enrichment during the Industrial Period recorded across an altitudinal transect in the Southern Central Pyrenees. *Science of The Total Environment*, 645, 761-772.
- Cuypers, A., Hendrix, S., Amaral dos Reis, R., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., . . . (2016). Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7, 470.
- del Río, L. A. et López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1364-1376.
- Demarquoy, J. et Le Borgne, F. (2015). Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(4), 301.

- Dewez, D., Didur, O., Vincent-Héroux, J. et Popovic, R. (2008). Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isoproturon toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Pollution*, 151(1), 93-100.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G. et Popovic, R. (2005). Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology*, 74(2), 150-159.
- Dewez, D., Goltsev, V., Kalaji, H. M. et Oukarroum, A. (2018). Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Current Plant Biology*, 16, 15-21.
- Doganlar, Z. B., Cakmak, S. et Yanik, T. (2012). Metal uptake and physiological changes in *Lemna gibba* exposed to manganese and nickel. *International Journal of Biology*, 4(3), 148.
- Drinovec, L., Drobne, D., Jerman, I. et Zrimec, A. (2004). Delayed fluorescence of *Lemna minor*: a biomarker of the effects of copper, cadmium, and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(5), 896-902.
- Duffus, J. H. (2002). " Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793-807.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ely, J. C., Neal, C. R., Kulpa, C. F., Schneegurt, M. A., Seidler, J. A. et Jain, J. C. (2001). Implications of platinum-group element accumulation along US roads from catalytic-converter attrition. *Environmental Science & Technology*, 35(19), 3816-3822.
- Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Chaumot, A., Duflot, A., Geffard, A., . . . (2019). Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H.) population of the Seine estuary. *Environmental Pollution*, 245, 485-493.
- Evans, A. E., Mateo-Sagasta, J., Qadir, M., Boelee, E. et Ippolito, A. (2019). Agricultural water pollution: key knowledge gaps and research needs. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 36, 20-27.
- Eyletters, M., Ooms, D. et Destain, M.-F. (2010). La fluorescence chlorophyllienne au service des productions végétales. *Biofutur*, (308), 46-48.

- Faller, P., Kienzler, K. et Krieger-Liszkay, A. (2005). Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706(1-2), 158-164.
- Fumagalli, A., Faggion, B., Ronchini, M., Terzaghi, G., Lanfranchi, M., Chirico, N., . . . (2010). Platinum, palladium, and rhodium deposition to the *Prunus laurus cerasus* leaf surface as an indicator of the vehicular traffic pollution in the city of Varese area. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 665-673.
- Ghannem, S., Khazri, A., Sellami, B. et Boumaiza, M. (2016). Assessment of heavy metal contamination in soil and *Chlaenius (Chlaeniellus) olivieri (Coleoptera, Carabidae)* in the vicinity of a textile factory near Ras Jbel (Bizerte, Tunisia). *Environmental Earth Sciences*, 75(5), 442.
- Ghemari, C., Waterlot, C., Ayari, A., Douay, F. et Nasri-Ammar, K. (2019). Bioaccumulation of heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* in the vicinity of Gabes-Ghannouch industrial complex. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 1-15.
- Godfrey, R. K. (1981). *Aquatic and wetland plants of southeastern United States: Dicotyledons* (vol. 2) University of Georgia Press.
- Gomez, B., Palacios, M., Gomez, M., Sanchez, J., Morrison, G., Rauch, S., . . . (2002). Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities. *Science of the Total Environment*, 299(1-3), 1-19.
- Goykhman, N., Dror, I. et Berkowitz, B. (2019). Transport of platinum-based pharmaceuticals in water-saturated sand and natural soil: Carboplatin and cisplatin species. *Chemosphere*, 219, 390-399.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J. et Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular plant*, 8(9), 1304-1320.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C. et Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628-638.

- Hegazy, A. K., Emam, M., Lovett-Doust, L., Azab, E. et El-Khatib, A. (2017). Response of duckweed to lead exposure: phytomining, bioindicators and bioremediation. *Desalination and Water Treatment*, 70, 227-234.
- Hillman, W. S. (1961). The Lemnaceae, or duckweeds. *The Botanical Review*, 27(2), 221-287.
- Horton, P., Ruban, A. et Walters, R. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 655-684.
- Hsu, B.-D. (1993). Evidence for the contribution of the S-state transitions of oxygen evolution to the initial phase of fluorescence induction. *Photosynthesis Research*, 36(2), 81-88.
- Hu, C., Liu, L., Li, X., Xu, Y., Ge, Z. et Zhao, Y. (2018). Effect of graphene oxide on copper stress in *Lemna minor* L.: evaluating growth, biochemical responses, and nutrient uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 341, 168-176.
- Hu, D., Cheng, M., Hu, K., Zhang, W., Yang, Y. et Xu, Q. (2019). Evaluation of cobalt hyperaccumulation and tolerance potential of the duckweed (*Lemna minor* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 179, 79-87.
- Ivanina, A. V., Habinck, E. et Sokolova, I. M. (2008). Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(1), 72-79.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. et Sharma, S. (2007). Antioxidative response of *Lemna polyrrhiza* L. to cadmium stress. *Journal of Environmental Biology*, 28(3), 583-589.
- Karp, G., Isawa, J. et Marshall, W. (2018). Biologie cellulaire et moléculaire De Boeck Supérieur.
- Kautsky, H. et Hirsch, A. (1931). Neue versuche zur kohlenensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, 19(48), 964-964.
- Kińska, K. et Kowalska, J. (2019). Comparison of Platinum, Rhodium, and Palladium Bioaccumulation by *Sinapis alba* and their Influence on Phytochelatin Synthesis in Plant Tissues. *Polish Journal of Environmental Studies*, 28(3), 1735-1740.

- Kirst, H., Gabilly, S. T., Niyogi, K. K., Lemaux, P. G. et Melis, A. (2017). Photosynthetic antenna engineering to improve crop yields. *Planta*, 245(5), 1009-1020.
- Kok, B., Forbush, B. et McGloin, M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution—I. A linear four step mechanism. *Photochemistry and Photobiology*, 11(6), 457-475.
- Kümméner, K. et Helmers, E. (1997). Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *Science of the Total Environment*, 193(3), 179-184.
- Küpper, H., Küpper, F. et Spiller, M. (1998). In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*, 58(2), 123-133.
- Kushner, D. J. (1993). Effects of speciation of toxic metals on their biological activity. *Water Quality Research Journal*, 28(1), 111-128.
- Lagadic, L. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie.
- Lenti, K., Fodor, F. et Böddi, B. (2002). Mercury inhibits the activity of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Photosynthetica*, 40(1), 145-151.
- Levesque, H., Moon, T., Campbell, P. et Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60(3-4), 257-267.
- Li, Z., Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z. et Huang, L. (2014). A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 468, 843-853.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* (vol. 148, p. 350-382). Elsevier.
- Liochev, S. I. et Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle 70 years later: an alternative view. *Redox Report*, 7(1), 55-57.
- Lodish, M. H., Berk, M. A. et Matsudaira, P. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule* De Boeck Supérieur.

- Mahyon, N. I., Li, T., Martinez-Botas, R., Wu, Z. et Li, K. (2019). A new hollow fibre catalytic converter design for sustainable automotive emissions control. *Catalysis Communications*, 120, 86-90.
- Marie-Victorin, F. (1964). *Flore laurentienne*.
- Mašić, E., Žero, S., Barudanović, S. et Memić, M. (2018). Effect of heavy metals on phytobenthos assemblages in mine pit lakes of Bosnia and Herzegovina.
- Melber, C., Keller, D. et Mangelsdorf, I. (2002). Palladium.
- Mertz, W. (1981). The essential trace elements. *Science*, 213(4514), 1332-1338.
- Miao, L., Ma, Y., Xu, R. et Yan, W. (2012). Geochemistry and genotoxicity of the heavy metals in mine-abandoned areas and wasteland in the Hetai goldfields, Guangdong Province, China. *Environmental Earth Sciences*, 65(7), 1955-1964.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4).
- Müller, P., Li, X.-P. et Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566.
- Myśliwa-Kurdziel, B. et Strzałka, K. (2005). Influence of Cd (II), Cr (VI) and Fe (III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(2-3), 199-207.
- Needleman, H. L. (2000). The removal of lead from gasoline: historical and personal reflections. *Environmental Research*, 84(1), 20-35.
- Nolan, A. L., Lombi, E. et McLaughlin, M. J. (2003). Metal bioaccumulation and toxicity in soils—why bother with speciation? *Australian Journal of Chemistry*, 56(3), 77-91.
- OCDE, L. (2006). 221 (2006) *Lemna sp. Essais d'inhibition de la croissance*.
- Owens, T. G. (1996). Processing of excitation energy by antenna pigments. *Photosynthesis and the Environment* (p. 1-23).

- Ozaki, H., Ichise, H., Kitaura, E., Yaginuma, Y., Yoda, M., Kuno, K., . . . (2019). Immutable heavy metal pollution before and after change in industrial waste treatment procedure. *Scientific Reports*, 9(1), 4499.
- Pan, S., Zhang, G., Sun, Y. et Chakraborty, P. (2009). Accumulating characteristics of platinum group elements (PGE) in urban environments, China. *Science of the Total Environment*, 407(14), 4248-4252.
- Radić, S., Babić, M., Škobić, D., Roje, V. et Pevalek-Kozlina, B. (2010). Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor L.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 336-342.
- Radić, S., Domijan, A.-M., Ljubimir, K. G., Maldini, K., Ivešić, M., Štefanić, P. P., . . . (2019). Toxicity of nanosilver and fumonisin B1 and their interactions on duckweed (*Lemna minor L.*). *Chemosphere*.
- Rai, R., Agrawal, M. et Agrawal, S. (2016). Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. *Plant Responses to Xenobiotics* (p. 127-140).
- Ranjit, M., Hirano, M., Aoki, K., Okuno, Y., Ohka, F., Yamamichi, A., . . . (2019). Aberrant Active cis-Regulatory Elements Associated with Downregulation of RET Finger Protein Overcome Chemoresistance in Glioblastoma. *Cell Reports*, 26(9), 2274-2281. e2275.
- Ressources naturelles Canada (2018) <https://www.rncan.gc.ca/minesmateriaux/faits/platine/20605>, *Visité en juin 2019*
- Rodríguez, M. C., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Conforti, V. et Gualtieri, P. (2007). Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Research*, 105(2), 234-239.
- Rychen, G., Ducoulombier-Crépineau, C., Jurjanz, S., Méjean, L. et Feidt, C. (2006). La chaîne alimentaire vecteur de polluants organiques persistants. *Cahiers de Nutrition et de Dietétique*, 41(3), 139-146.
- Sakuraba, Y., Yokono, M., Akimoto, S., Tanaka, R. et Tanaka, A. (2010). Dereglated chlorophyll *b* synthesis reduces the energy transfer rate between photosynthetic pigments and induces photodamage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 51(6), 1055-1065.

- Schwartz, J. (1994). Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environmental Research*, 64(1), 36-52.
- Shukla, A. et Srivastava, S. (2019). A Review of Phytoremediation Prospects for Arsenic Contaminated Water and Soil. *Phytomanagement of Polluted Sites* (p. 243-254).
- Sigfridsson, K. G., Bernát, G., Mamedov, F. et Styring, S. (2004). Molecular interference of Cd<sup>2+</sup> with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1659(1), 19-31.
- Slater, J. C. (1964). Atomic radii in crystals. *The Journal of Chemical Physics*, 41(10), 3199-3204.
- Smith, S. et Kwan, M. K. (1989). Use of aquatic macrophytes as a bioassay method to assess relative toxicity, uptake kinetics and accumulated forms of trace metals. Dans *Environmental Bioassay Techniques and Their Application* (p. 345-351).
- Strasser, B. J. (1997). Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthesis Research*, 52(2), 147-155.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. et Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and photobiology*, 61(1), 32-42.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. et Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. *Chlorophyll a Fluorescence* (p. 321-362)..
- Su, C., Jiang, Y., Yang, Y., Zhang, W. et Xu, Q. (2019). Responses of duckweed (*Lemna minor L.*) to aluminum stress: Physiological and proteomics analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 127-140.
- Subrahmanyam, D. et Rathore, V. (2000). Influence of manganese toxicity on photosynthesis in ricebean (*Vigna umbellata*) seedlings. *Photosynthetica*, 38(3), 449-453.
- Supalkova, V., Huska, D., Diopan, V., Hanustiak, P., Zitka, O., Stejskal, K., . . . (2007). Electroanalysis of plant thiols. *Sensors*, 7(6), 932-959.

- Tarrahi, R., Khataee, A., Movafeghi, A. et Rezanejad, F. (2018). Toxicity of ZnSe nanoparticles to *Lemna minor*: Evaluation of biological responses. *Journal of environmental management*, 226, 298-307.
- Thomas, V. (1995). The elimination of lead in gasoline. *Annual Review of Energy and the Environment*, 20(1), 301-324.
- Unadkat, K. et Parikh, P. (2018). Research Article Influence of Cadmium Toxicity and its Accumulation in *Lemna polyrhiza L.*
- Upadhyay, R. K. et Panda, S. K. (2009). Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes L.*). *Comptes rendus biologies*, 332(7), 623-632.
- VanBriesen, J. M., Small, M., Weber, C. et Wilson, J. (2010). Modelling chemical speciation: thermodynamics, kinetics and uncertainty. *Modelling of Pollutants in Complex Environmental Systems*, 2(1), 133-149.
- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., Fumagalli, A., Terzaghi, R., Labra, M., . . . (2011). Physiological and molecular effects associated with palladium treatment in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic toxicology*, 102(1-2), 104-113.
- Von Storch, H., Costa-Cabral, M., Hagner, C., Feser, F., Pacyna, J., Pacyna, E., . . . (2003). Four decades of gasoline lead emissions and control policies in Europe: a retrospective assessment. *Science of the Total Environment*, 311(1-3), 151-176.
- Wahaab, R. A., Lubberding, H. et Alaerts, G. (1995). Copper and chromium (III) uptake by duckweed. *Water Science and Technology*, 32(11), 105-110.
- Waldron, K. J. et Robinson, N. J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 25.
- Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental research*, 52(1), 7-22.
- Whitehead, L. et Buchanan, S. (2019). Childhood Lead Poisoning. *Journal of Public Health Management and Practice*, 25.
- Whitmarsh, J. et Govindjee, R. (2002). *Photosystem II. Encyclopedia of Life Sciences* : Oxford :Nature Publishing Group, 13 p.

- Yao, Y., Xu, G., Mou, D., Wang, J. et Ma, J. (2012). Subcellular Mn compartation, anatomic and biochemical changes of two grape varieties in response to excess manganese. *Chemosphere*, 89(2), 150-157.
- Young, A. J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 83(4), 702-708.
- Zechmeister, H. G., Hagendorfer, H., Hohenwallner, D., Hanus-Iltnar, A. et Riss, A. (2006). Analyses of platinum group elements in mosses as indicators of road traffic emissions in Austria. *Atmospheric Environment*, 40(40), 7720-7732.
- Zhao, C.-M. et Wilkinson, K. J. (2015). Biotic ligand model does not predict the bioavailability of rare earth elements in the presence of organic ligands. *Environmental Science & Technology*, 49(4), 2207-2214.
- Zhou, R., Kan, X., Chen, J., Hua, H., Li, Y., Ren, J., . . . (2019). Drought-induced changes in photosynthetic electron transport in maize probed by prompt fluorescence, delayed fluorescence, P700 and cyclic electron flow signals. *Environmental and Experimental Botany*, 158, 51-62.
- Zhou, X.-Q., Busemann, A., Meijer, M. S., Siegler, M. A. et Bonnet, S. (2019). The two isomers of a cyclometalated palladium sensitizer show distinct photodynamic properties in cancer cells. *Chemical Communications*.
- Zimmermann, S., Wolff, C. et Sures, B. (2017). Toxicity of platinum, palladium and rhodium to *Daphnia magna* in single and binary metal exposure experiments. *Environmental Pollution*, 224, 368-376.
- Zitoun, R., Clearwater, S. J., Hassler, C., Thompson, K. J., Albert, A. et Sander, S. G. (2019). Copper toxicity to blue mussel embryos (*Mytilus galloprovincialis*): The effect of natural dissolved organic matter on copper toxicity in estuarine waters. *Science of The Total Environment*, 653, 300-314.
- Żróbek-Sokolnik, A., Asard, H., Górska-Koplińska, K. et Górecki, R. J. (2009). Cadmium and zinc-mediated oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(1), 43-49.