

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION TOXICOLOGIQUE DE DIFFÉRENTES ESPÈCES CHIMIQUES DE
ZIRCONIUM EN UTILISANT LE MODÈLE LEMNA MINOR

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ(E)

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MOHAMADOU DIALLO

MARS 2023

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.04-2020). 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 mon directeur de recherche, David Dewez, pour sa confiance et la chance qu'il m'a donnée d'intégrer son groupe de recherche.

Il m'a permis de développer mon projet de recherche pour la maîtrise en biochimie. Je le remercie pour l'aide, les connaissances et l'autonomie qu'il m'a offertes pendant mes deux années de maîtrise dans son laboratoire.

Son expertise et son expérience dans le domaine de la toxicologie m'ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances en chimie environnementale.

Mes remerciements à tous mes collègues Amina Benghaffour, Fatima Zohra, Meriem Benhamida pour leur soutien et leur collaboration pour la réalisation de mon projet. Merci pour vos conseils et les moments partagés.

Je remercie également M. Gwenaël Chamoulaud, Directeur Technique de Nanoqam et Marie Claude Giguère de m'avoir formé à l'utilisation des instruments et équipements de Nanoqam et de l'UQAM. Sans oublier de remercier le personnel du centre de caractérisation microscopique des matériaux (CM)² de Polytechnique Montréal qui m'a permis d'obtenir mes résultats sur la caractérisation des matériaux.

Je remercie toute ma famille au Sénégal et en Guinée et mes amis pour leur soutien, en particulier M. Pierre Grosjean qui m'a accompagné tout au long de ce processus.

DÉDICACE

À mes parents, ma mère Khadidiatou Bah pour
son soutien et ses conseils

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DE L'ART	3
1.1 Le Zirconium	3
1.1.1 Historique.....	3
1.1.2 Nature et propriétés	3
1.2 Tétrachlorure de zirconium.....	4
1.3 Dioxyde de zirconium (ZrO ₂).....	6
1.4 Production et utilisation du zirconium sous différentes formes	7
1.5 Le zirconium et ses deux différentes formes dans l'environnement	9
1.6 Les nanotechnologies.....	9
1.6.1 Les Nanoparticules (NPs)	10
1.6.2 Propriétés physico-chimiques des NPs déterminant leur toxicité	11
1.6.3 Solubilités, taille et surface spécifique.....	12
1.6.4 Charge de surface.....	13
1.6.5 Forme et Structure.....	14
1.6.6 Degrés d'agrégation et d'agglomération.....	15
1.7 Facteurs influençant la toxicité des NPs-ZrO ₂	15
1.8 Contamination et toxicité du ZrCl ₄ et NPs-ZrO ₂	15
1.9 Le modèle d'étude	17
1.9.1 Le milieu naturel	17
1.9.2 <i>Lemna minor</i> un modèle d'étude toxicologique.....	19
1.9.3 Capacité de bioaccumulation des contaminants.....	19
1.9.4 Le stress oxydatif causé par les contaminants.....	20

1.9.5	La photosynthèse comme indicateur de toxicité	21
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES		24
2.1	Appareillage.....	24
2.2	Le modèle d'étude	24
2.3	Milieu de culture SIS pour la plante aquatique <i>Lemna minor</i>	25
2.4	Caractérisation physico-chimique du ZrCl ₄	26
2.4.1	Solution mère de ZrCl ₄	26
2.4.2	Spéciation du Zr dans le milieu SIS.....	26
2.4.3	Analyse par ICP-OES du Zr libre	26
2.5	Caractérisation physico-chimique des NPs-ZrO ₂ dans le milieu culture SIS.....	28
2.5.1	Solution mère des NPs-ZrO ₂	28
2.5.2	Fraction soluble.....	28
2.5.3	Taille des particules par diffusion dynamique de la lumière	29
2.5.4	Mesure du potentiel zêta (ζ).....	30
2.5.5	Analyse des propriétés optiques.....	31
2.5.6	Analyse de la morphologie et composition des NPs-ZrO ₂	32
2.5.7	Analyse par diffraction des rayons X (DRX).....	33
2.5.8	Analyse par spectroscopie Raman et infrarouge	34
2.5.9	Analyse par spectroscopie infrarouge (FT-IR)	36
2.6	Expositions de la plante <i>Lemna minor</i>	37
2.7	Mesures et déterminations analytiques.....	38
2.7.1	Poids sec.....	38
2.7.2	Détermination de l'inhibition de la croissance.....	38
2.7.3	Bioaccumulation du Zr.....	39
2.8	Effets des NPs-ZrO ₂ et du Zr bioaccumulé par la plante.....	39
2.8.1	Dosage des thiols totaux.....	39
2.8.2	Dosage des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	39
2.8.3	Dosage des pigments photosynthétiques.....	40
2.9	Impact des NPs-ZrO ₂ sur la structure de <i>Lemna minor</i> : observation par MEB des racines et frondes de la plante et détection des ions Zr ⁴⁺ par EDS.....	40
2.10	Analyses statistiques.....	41
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....		42
3.1	Caractérisation physico-chimique des deux espèces chimiques.....	42
3.1.1	Dissolution du ZrCl ₄	42
3.1.2	Spéciation du Zr dans le milieu SIS.....	43
3.1.3	Fraction soluble des NPs-ZrO ₂	43
3.1.4	Diffusion dynamique de la lumière et potentiel zêta des NPs-ZrO ₂	44
3.2	Analyse TEM et EDS des NPs-ZrO ₂	46

3.2.1	Absorption dans l'ultra-violet des NPs-ZrO ₂	47
3.2.2	Analyse XRD des NPs-ZrO ₂	48
3.2.3	Spectroscopie Raman des NPs-ZrO ₂	49
3.3	Effet du Zr bioaccumulé et des NPs-ZrO ₂ sur la croissance	50
3.3.1	Effet sur la production des ROS.....	52
3.3.2	Activation des mécanismes de défense	53
3.3.3	Effet sur les pigments chlorophylliens.....	55
3.4	Observation par MEB des changements de la structure de <i>Lemna minor</i> après exposition aux NPs-ZrO ₂ et détection des ions Zr ⁴⁺ par EDS.....	57
	CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	60
	CONCLUSION et PERSPECTIVES	65
	ANNEXE A Courbe d'étalonnage de l'analyse du Zr par ICP-OES	67
	ANNEXE B Courbe d'étalonnage de l'analyse du Zr par HR-ICP-MS	68
	ANNEXE C Spectre FT-IR des nanoparticules d'oxyde de zirconium	69
	ANNEXE D Effet du pH et du tétrachlorure de zirconium sur la croissance de la plante	70
	ANNEXE E Tableaux de l'analyse statistique multicomparaison.....	71
	BIBLIOGRAPHIE	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure cristalline du Zr, (A) hexagonale compacte (forme α) et (B) cubique centrée (forme β) (Klemic, 1975).	4
Figure 1.2 Structure octaédrique du tétrachlorure de zirconium (Greenwood et Earnshaw, 1997).5	
Figure 1.3 Transformation allotropique des cristaux d'oxyde de zirconium au cours du réchauffement et du refroidissement (Moriya et Navrotsky, 2006).	6
Figure 1.4 Répartition des différentes applications des minéraux du zirconium (élaborée à partir de la source : TZMI-2016).	8
Figure 1.5 Répartition mondiale des pays producteurs (A) et réserves (B) du minerai de zirconium (élaborée à partir de la source : WMD et USGS 2018).	8
Figure 1.6 Classification des nano-objets selon ISO TS/27687 (Binet <i>et al.</i> , 2015).	10
Figure 1.7 Divers états et configurations des NPs à l'état sec et dispersé en solution aqueuse (Jiang <i>et al.</i> , 2009).	11
Figure 1.8 Devenir des NPs dans le milieu naturel, adapté (Sivry <i>et al.</i> , 2011).	12
Figure 1.9 Relation entre la taille d'une particule et la proportion d'atomes de surface (Ricaud, 2018).	13
Figure 1.10 Schéma de la double couche électrique d'une particule en solution (El Kass, 2011).14	
Figure 1.11 <i>Lemna minor</i> (photographie du 28 aout 2018, auteur Stephan Lefnaer).	18
Figure 1.12 Schéma simplifié des processus de bioaccumulation et de bioamplification, adapté de la source (Monitoring et Symon, 2013).	20
Figure 1.13 Schéma de la toxicité des NPs à base d'oxydes métalliques et d'ions métalliques pour les algues et les plantes aquatiques, adapté de la source (Hou <i>et al.</i> , 2018).	23
Figure 2.1 <i>Lemna minor</i> (A) et culture de la plante (B).	24
Figure 2.2 Schéma du fonctionnement de l'instrumentation ICP-OES (Khan <i>et al.</i> , 2022).	27
Figure 2.3 Principe de la diffusion dynamique de la lumière (Blessing et Ghestem, 2012).	30
Figure 2.4 Technique de mesure du potentiel zêta, modifié et adapté (El Kass, 2011).	31
Figure 2.5 Principe de la diffraction des rayons X modifiés de (Zouari, 2018).	33
Figure 2.6 Principe de la diffusion Raman (Falgayrac, 2006).	35

Figure 2.7 Principe d'un spectromètre Raman (Colomban, 2003).	35
Figure 2.8 Schéma du principe de la spectroscopie infrarouge (FT-IR) avec l'ATR.	36
Figure 2.9 Schéma expérimental de l'exposition de <i>Lemna minor</i> aux contaminants, modifié de (Kalčíková <i>et al.</i> , 2017).....	37
Figure 3.1 Distribution granulométrique des NPs-ZrO ₂ dans le milieu de culture SIS.	45
Figure 3.2 Caractérisation par TEM et EDS des NPs-ZrO ₂	46
Figure 3.3 Spectres d'absorption UV-Vis des NPs-ZrO ₂ pur commercial dans l'eau nanopure et dans le milieu SIS à 1 et 200 ppm respectivement.	47
Figure 3.4 Spectre XRD des NPs-ZrO ₂	48
Figure 3.5 Spectre Raman des NPs-ZrO ₂	49
Figure 3.6 Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le cytosol et dans les organites contenant de l'ADN pour la plante <i>Lemna minor</i> témoin et traitée au ZrCl ₄ (A) et aux NPs-ZrO ₂ (B).....	52
Figure 3.7 Variation des thiols totaux par µmol/ g de poids sec (DW), pour <i>Lemna minor</i> témoin et traitée par du ZrCl ₄ (A) et NPs-ZrO ₂ (B).	53
Figure 3.8 Changement de la teneur en pigments par (en µg/mg de DW) de la chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> et <i>t</i> , pour le témoin et les traitements aux ZrCl ₄ (A, B, C) et NPs-ZrO ₂ (D, E, F).	55
Figure 3.9 MEB de la plante <i>Lemna minor</i> incluant fronde et racine, témoin (A-B-C) et exposition aux NPs-ZrO ₂ (D-E-F-G) après 7 jours d'exposition à des concentrations d'effets.	57
Figure 3.10 MEB couplé à EDS de la plante <i>Lemna minor</i> , témoin (A) et exposition aux NPs-ZrO ₂ (B) fronde et (C) racine, après 7 jours d'exposition à des concentrations d'effets.	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Résumés de quelques études sur les NPs-ZrO ₂ et ZrCl ₄	16
Tableau 2.1 Composition du milieu SIS	25
Tableau 3.1 La fraction soluble de Zr libres après 24 h. Les valeurs rapportées sont exprimées en moyenne ± écart-type.	42
Tableau 3.2 Spéciation du Zr dans le milieu SIS.	43
Tableau 3.3 Fraction soluble de Zr. Les valeurs rapportées sont exprimées en moyenne ± écart-type.	43
Tableau 3.4 Diamètre hydrodynamique (D _H) et potentiel Zêta (ZP) des NPs-ZrO ₂ en fonction de la concentration dans le milieu SIS à pH 6,5 durant l'incubation (J ₀ et J ₇).	44
Tableau 3.5 Résumé des propriétés physico-chimiques des NPs-ZrO ₂	50
Tableau 3.6 Changement des paramètres biologiques de <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition à différentes concentrations du ZrCl ₄ et des NPs-ZrO ₂	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

+II, +III et +IV :	Degrés d'oxydation
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ATR :	Réflectance totale atténuée
Chl <i>a</i> :	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i> :	Chlorophylle <i>b</i>
Chl <i>t</i> :	Chlorophylle totale
CMEO :	Concentration minimale avec effet observé
D _H :	Diamètre hydrodynamique
DLS :	Diffusion dynamique de la lumière
DRX :	Diffraction des rayons X
DW :	Dry Weight (Poids sec)
EC ₅₀ :	Concentration efficace médiane
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
FT-IR :	Spectrophotométrie infrarouge
GSH :	Enzyme glutathion S-transférases
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HO [·] :	Radical hydroxyle
HR-ICP-MS :	Haute résolution Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif
ICP-OES :	Spectrométrie à plasma à couplage inductif

LC ₅₀ :	Concentration létale médiane
LD ₅₀ :	Dose létale médiane
MEB :	Microscopie électronique à balayage
MET :	Microscopie électronique en transmission
PBS :	Phosphate tampon salin
PC :	Poids corporel
POD :	Glutathion peroxydase,
PZ ou ζ :	Potentiel Zeta
SDE ou EDS :	Spectroscopie de rayon X à dispersion d'énergie
SH :	Groupement thiol
SIS :	Institut suédois de normalisation
SOD :	Superoxyde dismutase
TCSM :	Taux de croissance spécifique moyen
UV-Vis :	Spectroscopie ultraviolet-visible

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

% :	pourcentage
μm :	micromètre
μE :	microeinstains
Å :	armstrong
cm :	centimètre
g :	gramme
h :	heure
Kv :	kilovolt
L :	litre
lux :	éclairage
M :	molaire
mm :	millimètre
mV :	millivolts
nm :	nanomètre
°C :	degrés Celsius
ppb :	parties par billion
ppm :	parties par million
s :	seconde
u :	unité de masse atomique unifiée

RÉSUMÉ

Le zirconium (Zr) est un métal de transition relativement abondant dans la croûte terrestre. En 2020, la production mondiale est estimée à 1,7 million de tonnes, le tétrachlorure de zirconium ($ZrCl_4$) et les nanoparticules d'oxyde de zirconium (NPs- ZrO_2) sont largement utilisées dans les applications industrielles et biomédicales. Leurs utilisations de plus en plus croissantes entraînent des rejets dans l'environnement et pourraient avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques et leurs écosystèmes. La plante aquatique *Lemna minor*, en raison de sa petite taille, d'une reproduction rapide dans des conditions contrôlées et de sa sensibilité aux substances toxiques est un modèle adéquat pour étudier la toxicité des contaminants émergents. Notre objectif principal est d'évaluer les mécanismes de toxicité du $ZrCl_4$ et des NPs- ZrO_2 chez la plante *Lemna minor*. Pour cela, nous avons quantifié la bioaccumulation du Zr libre par l'ICP-OES. Nous avons caractérisé les propriétés physico-chimiques des NPs- ZrO_2 en vrac et dans le milieu de culture. Nos résultats ont montré que le $ZrCl_4$ sous l'effet du pH présente une plus grande toxicité pour *Lemna minor*. Les ions Zr^{4+} libres sont fortement bioaccumulés et induisent la production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO). Leur toxicité est très dépendante de la concentration et de la biodisponibilité dans le milieu aquatique. Cependant, les NPs- ZrO_2 présentent une toxicité moyennement importante et s'expliqueraient par leurs propriétés physico-chimiques. La faible solubilité des NPs, degrés d'agrégation et une sédimentation dans le milieu aquatique, les rendent moins disponibles pour la plante. Cette étude montre la différence entre les mécanismes de toxicités du $ZrCl_4$ et des NPs- ZrO_2 pour la plante aquatique *Lemna minor*. Elles apportent de nouvelles connaissances sur le devenir des contaminants émergents dans l'environnement aquatique.

Mots clés : Mots clés : Tétrachlorure de zirconium, Nanoparticule d'oxyde de zirconium, Ions Zr^{4+} , Bioaccumulation, Espèces réactives de l'oxygène, *Lemna minor*

INTRODUCTION

Les contaminants émergents sont couramment définis comme des substances chimiques synthétiques ou naturelles non surveillées, présentes dans l'environnement. Ces composés sont dits « émergents », non pas parce que les contaminants eux-mêmes sont nouveaux, mais en raison de leur niveau de préoccupation croissant pour la santé et l'environnement. Ces substances peuvent provoquer des effets néfastes sur les écosystèmes même lorsqu'ils sont présents à l'état de traces (Descroix et Marut, 2015; Hochella Jr *et al.*, 2019). Un large éventail de ces composés utilisés dans divers secteurs (agriculture, alimentation, fabrication industrielle, extraction minière, etc.) sont toxiques et menacent les organismes aquatiques et terrestres (Hochella Jr *et al.*, 2019).

De plus, les nanoparticules viennent s'ajouter à la liste existante des substances chimiques déjà très préoccupantes (Ding *et al.*, 2022). Cette perception positive passe par des applications innovantes dans tous les domaines de la vie courante (secteur de la santé, automobile, construction, environnement, textiles et l'industrie) (Py *et al.*, 2011; Rai, P. K. *et al.*, 2018). Les propriétés physico-chimiques des NPs comme la taille, la structure ou encore le rapport surface/volume déterminent la réactivité de surface (Guerrini *et al.*, 2018). La contamination des NPs dans l'environnement inquiète la communauté scientifique, surtout concernant leurs impacts sur les organismes aquatiques (Sohal *et al.*, 2018). Face à la dynamique de développement de la nanotechnologie dans le secteur de la santé, de l'automobile, et bien d'autres, les risques pour l'environnement et la santé induits par l'utilisation de ces nouvelles technologies représentent des sujets d'étude intéressants lorsqu'il est question de contamination environnementale. Les progrès rapides de la nanotechnologie ont conduit à une utilisation intensive des nanomatériaux, comme les nanoparticules d'oxyde de zirconium (NPs-ZrO₂), et à une augmentation de leur volume de production (Hochella Jr *et al.*, 2019; Sohal *et al.*, 2018). Les NPs-ZrO₂ seraient inclus dans des milliers de produits nanoactivés, avec des applications commerciales notables comprenant les céramiques dures, les produits pharmaceutiques, les dispositifs médicaux, et les sondes à oxygènes (Wang, Z. *et al.*, 2021). Compte tenu du rythme actuel d'industrialisation et de la demande croissante du marché mondial pour les NPs-ZrO₂, une augmentation de leur volume de production au cours des prochaines décennies conduira à une émission inévitable de NPs-ZrO₂ dans l'environnement (Wang, Z. *et al.*, 2021). En effet, le rejet des NPs-ZrO₂ dans l'environnement

pourrait présenter des risques environnementaux, en grande partie en raison des propriétés physico-chimiques qui les rendent hautement réactifs (Meng *et al.*, 2018). En tant que nanomatériau prometteur pour les applications biomédicales, les NPs-ZrO₂ ont récemment suscité des inquiétudes vis-à-vis des rejets qu'on pourrait retrouver dans l'environnement, mais la toxicité des NPs-ZrO₂ a reçu peu d'attention (Meng *et al.*, 2018). D'autres études ont révélé que de grandes quantités de ces nanoparticules inorganiques ont été rejetées délibérément ou par inadvertance dans l'environnement au cours de leurs applications dans les eaux usées pour éliminer le phosphore (Smotraiev *et al.*, 2022), les métaux et d'autres polluants. Les NPs-ZrO₂ sont pas les seuls, d'ailleurs les effets toxiques des nanoparticules d'oxyde métallique comme TiO₂, ZrO₂, FeO sur les micro-organismes ont été rapportés (Otero-González *et al.*, 2013).

L'utilisation de catalyseurs pour polymérisation à base de tétrachlorure de zirconium (ZrCl₄) a récemment connu un développement scientifique remarquable, constituant un modèle de ce que devrait être toute catalyse de polymérisation du futur (Spitz et Boisson, 2002). Dans la littérature, puisque les mécanismes de toxicité des NPs-ZrO₂ et du ZrCl₄ ne sont pas autant révélés sur les plantes aquatiques. Ces dernières années, la lentille d'eau, *Lemna minor* a été utilisés comme modèle pour des études de toxicités des nanomatériaux, de certains métaux et d'autres polluants à cause de leur importance comme producteur primaire dans les écosystèmes aquatiques (Baudo *et al.*, 2015). Il serait donc important d'étudier ces mécanismes de toxicité en utilisant la lentille d'eau, *Lemna minor* comme modèle d'étude.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des propriétés physico-chimiques du ZrCl₄ et des NPs-ZrO₂. La connaissance des propriétés physiques et chimiques des deux espèces chimiques était un atout permettant d'évaluer les mécanismes de toxicité des NPs-ZrO₂ et du ZrCl₄ chez la plante *Lemna minor* avec comme hypothèse de travail, les mécanismes de toxicité des NPs-ZrO₂ sont différents de ceux du ZrCl₄. Dans les chapitres suivants, nous avons développé les propriétés de chaque espèce chimique allant de l'historique aux applications, les contaminations connues et le modèle d'étude a été présenté : la plante *Lemna minor*, sa physiologie et son intérêt pour les essais toxicologiques en laboratoire. La méthodologie utilisée lors de ce projet a été développée au chapitre deux, suivie du chapitre trois présentant les résultats et le chapitre quatre la discussion générale pour finir avec la conclusion et les perspectives.

CHAPITRE 1

ÉTAT DE L'ART

1.1 Le Zirconium

1.1.1 Historique

Le Zirconium (Zr) est une pierre semi-précieuse mentionnée dès l'antiquité. En 1789, le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth découvre qu'il contient un nouvel élément chimique. L'oxyde de zirconium (ZrO_2), alors un élément inconnu appelé zircone. En 1824, le chimiste suédois Jons Jakob Berzelius, isole et purifie le zirconium métallique.

Le Zr est un métal réfractaire résistant à la corrosion et relativement abondant constituant près de 0,023% de la croûte terrestre (Klemic, 1975). Dans les roches et les minéraux, il est associé à l'hafnium (Hf) (Klemic, 1975). Le Zr a une grande affinité pour l'oxygène et se présente le plus souvent sous l'une des trois formes suivantes : zircon ($ZrSiO_4$), baddeleyite (ZrO_2) et eudialyte ($Na_4(Ca,Ce,Fe,Mn)_2ZrSi_6O_{17}(OHCl)_2$). Le zircon et la baddeleyite sont les principales sources commerciales de Zr, et constituent les minéraux primaires des roches ignées très alcalines (Klemic, 1975).

1.1.2 Nature et propriétés

Le Zr est un métal de transition appartenant à la colonne IVb de la classification périodique des éléments. Le Zr peut exister sous deux formes allotropiques à pression atmosphérique ambiante : en dessous de 863 °C, il adopte une structure hexagonale compacte (forme α) et au-dessus de 863 °C, sa structure est cubique centrée (forme β), la forme β est plus légère que la forme α (Brown *et al.*, 2005; Klemic, 1975). En raison de ses propriétés anticorrosives et de sa résistance structurelle à haute température, le Zr présente une faible section efficace de capture neutronique dans les deux domaines thermiques (Klemic, 1975).

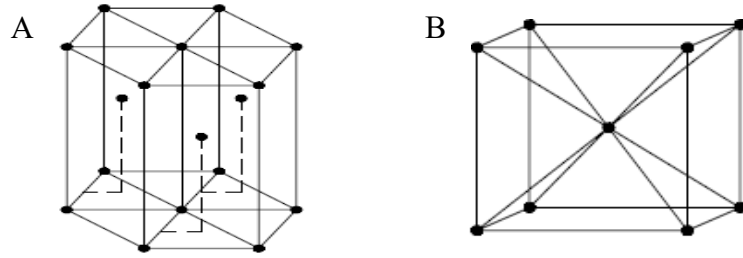
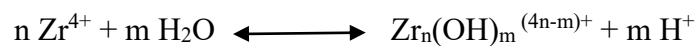


Figure 1.1 Structure cristalline du Zr, (A) hexagonale compacte (forme α) et (B) cubique centrée (forme β) (Klemic, 1975).

Sa configuration électronique à l'état fondamental est $[\text{Kr}]4d^25s^2$. Il peut exister aux degrés d'oxydation +II ou +III, toutefois ces composés aux propriétés fortement réductrices sont instables. Il est donc principalement présent au degré d'oxydation +IV dans les différents composés et c'est sous cette forme qu'on le retrouve en solution. En solution aqueuse, l'ion Zr^{4+} est très réactif et a tendance à s'hydrolyser même en milieu acide du fait de sa charge importante et de sa petite taille (Jolivet, 1994). À des pH et concentrations molaires inférieures respectivement à 0,7 et 5E^{-6} M, l'ion Zr^{4+} se stabilise (Brown *et al.*, 2005). Cependant, lorsqu'il est en solution aqueuse, il conduit à la formation de diverses espèces de zirconium et de complexes avec d'autres espèces chimiques dissoutes en solution comme illustrée dans la réaction ci-dessous.



Les sels de Zr à l'état d'oxydation +IV sont écologiquement les plus stables et s'hydrolysent en solution en présence de sels basiques (Couture *et al.*, 1989). Le Zr possède 33 isotopes connus. Parmi ces isotopes, quatre sont stables, ^{90}Zr , ^{91}Zr , ^{92}Zr et ^{94}Zr , et sont présents dans la nature pour des abondances naturelles respectives de 51,45 %; 11,22 %; 17,15 % et 17,38 % (Emsley *et al.*, 1991). La masse atomique standard attribuée au Zr est de $91,223 \pm 0,002$ u. Il est employé dans différents secteurs, mais n'a pas connu de débouchés importants avant le développement de l'industrie électronucléaire.

1.2 Tétrachlorure de zirconium

Le chlorure de zirconium (IV), également connu sous le nom de tétrachlorure de zirconium (ZrCl_4), est un composé inorganique fréquemment utilisé comme précurseur à d'autres composés du

zirconium. C'est une poudre blanche formant des cristaux monocliniques d'un poids moléculaire de 233,03 g/mol (Nikoofar et Khademi, 2016). Ce solide à haute température de fusion s'hydrolyse rapidement dans l'air humide. Il peut être obtenu par chloration de zirconium chauffé et à partir de carbure de zirconium (Cotton et Wilkinson, 1988). En laboratoire, il est préparé à partir d'un procédé utilisant le ZrO_2 et le tétrachlorure de carbone (CCl_4) par remplacement du carbone et du chlore (Greenwood et Earnshaw, 1997). Le $ZrCl_4$ présente une structure dans laquelle chaque atome de Zr est coordonné de façon octaédrique et adopte une structure linéaire en forme de bande (Greenwood et Earnshaw, 1997).

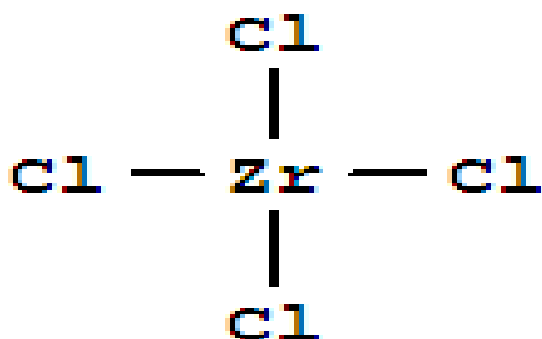


Figure 1.2 Structure octaédrique du tétrachlorure de zirconium (Greenwood et Earnshaw, 1997).

Le tétrachlorure de zirconium est souvent employé comme un intermédiaire dans la conversion de minéraux de zirconium en zirconium métallique par le procédé de Kroll (Kroll, 1950). Il présente une grande solubilité dans l'alcool, l'éther et l'acide chlorhydrique concentré (Nikoofar et Khademi, 2016). Pour leur conversion en métal en vrac, ses oxydes réfractaires sont d'abord convertis en tétrachlorures, qui peuvent ensuite être distillés à haute température. Le $ZrCl_4$ purifié peut être réduit avec du métal Zr pour produire du trichlorure de zirconium ($ZrCl_3$). En synthèse organique, le $ZrCl_4$ est utilisé comme acide de Lewis faible pour la réaction de Friedel-Crafts, la réaction de Diels-Alder et les réactions de cyclisation intramoléculaires (Bora, 2003). Il est également utilisé pour fabriquer un traitement hydrofuge des textiles et autres matériaux fibreux. Sa faible toxicité est rapportée dans de nombreuses études menées chez la souris et le rat notamment, avec une faible toxicité partielle ($LD_{50} = 440$ et 1688 mg/kg respectivement) (Delonges *et al.*, 1983; Nikoofar et Khademi, 2016). Sa faible toxicité permet l'utilisation du $ZrCl_4$ comme un acide de Lewis vert et écologique sans danger pour diverses transformations organiques et répond aux défis environnementaux croissants (Nikoofar et Khademi, 2016). De ce fait, il

remplace certains acides de Lewis traditionnels nocifs pour les mammifères comme le chlorure d'aluminium (AlCl_3) et le trifluorure de bore (BF_3). Les ions Zr^{4+} ont un rapport charge sur taille élevée, ce qui leur donne une capacité de coordination élevée (Chakraborti et Gulhane, 2004).

1.3 Dioxyde de zirconium (ZrO_2)

Le dioxyde de zirconium montre une très grande inertie chimique. Les propriétés du ZrO_2 sont souvent liées à sa structure cristalline, à sa composition et à la taille des nanoparticules (NPs- ZrO_2) synthétisées (Soni *et al.*, 2022). De nature polymorphique, ZrO_2 se présente sous trois variétés allotropiques. Les trois structures cristallines sont thermodynamiquement stables en dessous de la température de fusion sous la pression atmosphérique. La phase monoclinique est stable en dessous de $1170\text{ }^\circ\text{C}$, c'est la forme cristalline de la baddeleyite (Moriya et Navrotsky, 2006). La phase tétragonale est quant à elle stable entre $1170\text{ }^\circ\text{C}$ et $2370\text{ }^\circ\text{C}$ (Moriya et Navrotsky, 2006). Enfin, la phase cubique se forme par chauffage de ZrO_2 tétragonale à une température supérieure à $2370\text{ }^\circ\text{C}$ et inférieure à la température de fusion du ZrO_2 qui est de $2680\text{ }^\circ\text{C}$, c'est le domaine de stabilité de la phase cubique (Béranger *et al.*, 2008). Une phase intermédiaire thermodynamiquement instable du ZrO_2 peut également apparaître à haute pression, causée par la transformation de la phase monoclinique en phase tétragonale (Baldinozzi *et al.*, 2003; Desgreniers et Lagarec, 1999).

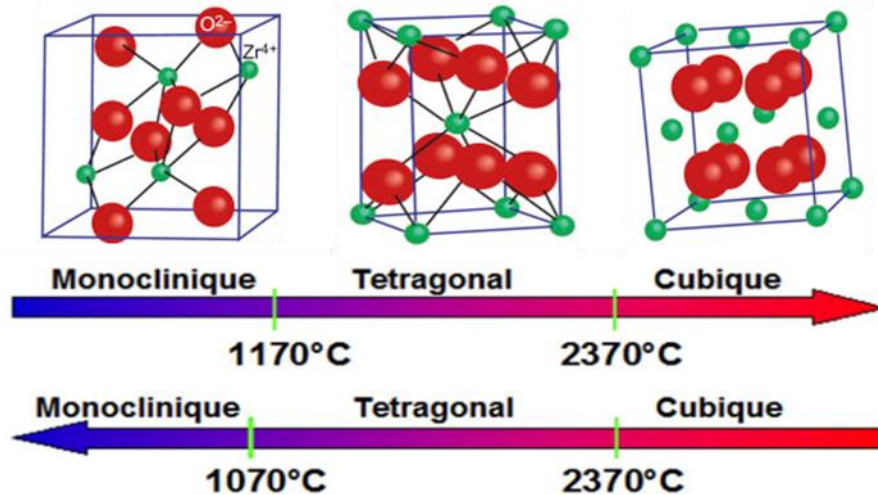


Figure 1.3 Transformation allotropique des cristaux d'oxyde de zirconium au cours du réchauffement et du refroidissement (Moriya et Navrotsky, 2006). Les boules rouges et vertes représentent respectivement les ions O^{2-} et les ions Zr^{4+} dans le plan.

Le ZrO_2 est un bon isolant électrique utilisé pour la fabrication des transistors et des mémoires de stockage (Nishizawa *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009). Pour les applications thermiques, le ZrO_2 est un bon isolant thermique et entre dans la fabrication des turbines à gaz pour protéger les pièces métalliques en vue de limiter les transferts de chaleur (Bertrand et Mévrel, 1997). Dans le domaine du nucléaire, la stabilité du ZrO_2 lui confère des propriétés permettant le stockage des actinides et présente une barrière directe lors du stockage des déchets radioactifs dans l'environnement géologique (Heimann et Vandergraaf, 1988). En médecine, grâce à ses propriétés mécaniques, sa biocompatibilité et sa durabilité, le ZrO_2 est très utilisé dans la fabrication des prothèses dentaires biocéramiques (Gremillard, 2009). Les diverses applications du ZrO_2 citées plus haut sont étroitement liées à ses propriétés physiques et chimiques avancées et diverses méthodes sont utilisées pour synthétiser ce matériau d'intérêt. Les plus courantes sont la méthode sol-gel et l'hydrolyse forcée (Bellon *et al.*, 2001). Ces méthodes de synthèses ont pour avantage de contrôler les propriétés physico-chimiques telles que la taille, la structure et la composition des NPs- ZrO_2 (Soni *et al.*, 2022).

1.4 Production et utilisation du zirconium sous différentes formes

La production mondiale de Zr de 2016 à 2020 est estimée à environ à 1,7 million de tonnes (Ober, 2018). Cette augmentation est la conséquence de la demande croissante de zirconium sous différentes formes pour diverses applications. L'importance des réserves en minerais de Zr prévoit que la production devrait faire face à une augmentation dans les années à venir (figure 1.5). La Chine, un des plus gros consommateurs de Zr, devrait jouer un rôle croissant du fait de l'augmentation du nombre de réacteurs nucléaires en construction (Ober, 2018).

En 2015 l'usage du Zr sous la forme ZrO_2 représente 97 % de l'usage total de Zr. Cette forme sert à fabriquer les céramiques, les produits chimiques, les matériaux synthétisés tels que les NPs- ZrO_2 . Sous sa forme métallique, sa consommation est d'environ 3 %, dont les 2/3 sont utilisés dans les industries nucléaires avec la production d'alliages et de superalliages et les 1/3 dans le domaine de l'aéronautique, l'électronique, l'électricité et la chimie. Selon le rapport de l'association mondiale du nucléaire, la consommation de céramique est de plus en plus importante. Malgré le développement des énergies renouvelables et les craintes d'incidents, le secteur du nucléaire

devrait continuer à croître pour les prochaines années et augmenter la demande en ZrO_2 et du Zr (figure 1.4).

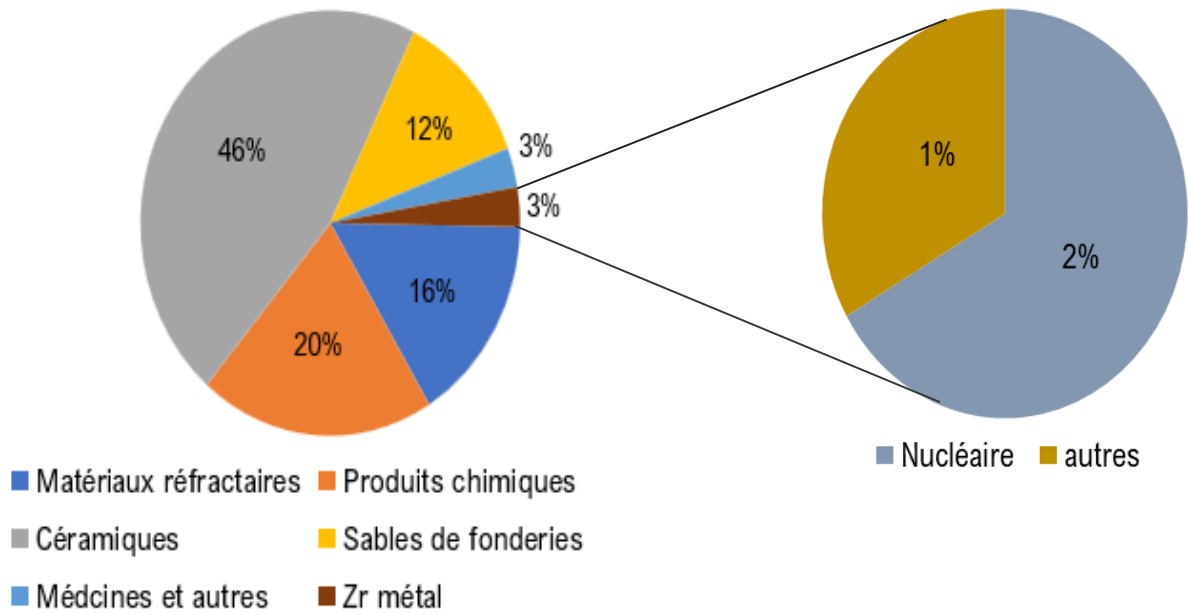


Figure 1.4 Répartition des différentes applications des minéraux du zirconium (élaborée à partir de la source : TZMI-2016).

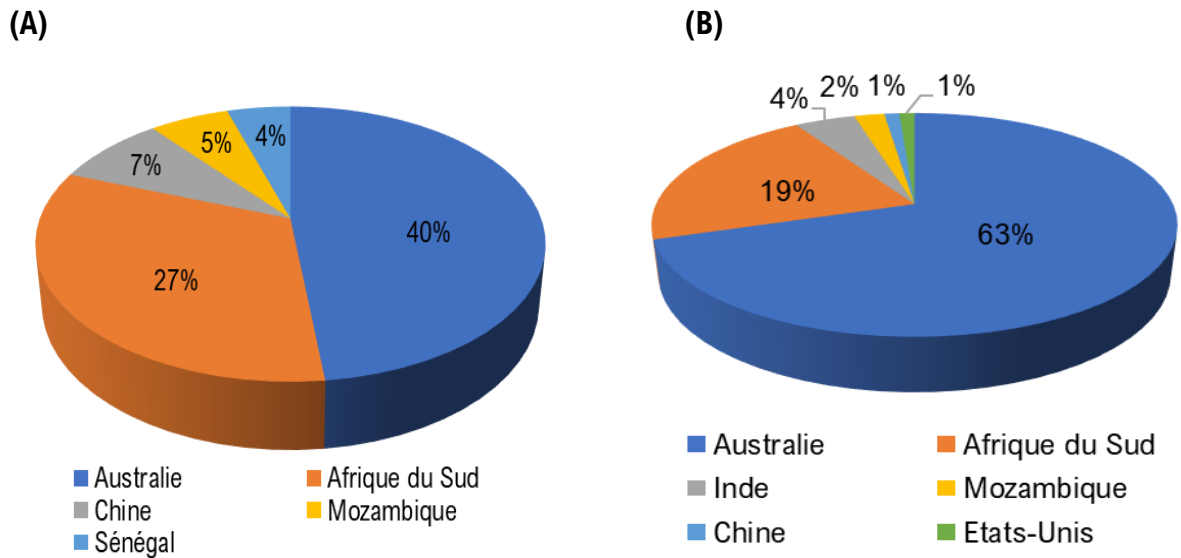


Figure 1.5 Répartition mondiale des pays producteurs (A) et réserves (B) du minerai de zirconium (élaborée à partir de la source : WMD et USGS 2018).

1.5 Le zirconium et ses deux différentes formes dans l'environnement

Dans l'industrie nucléaire, le zirconium est très utilisé pour la fabrication de grains de combustibles pour les pastilles d'oxyde d'uranium (UO_2). Du zirconium pur est ajouté aux éléments d'alliage afin d'améliorer les propriétés mécaniques des grains de combustible pour les réacteurs nucléaires. Dans l'environnement, la sûreté du stockage des déchets nucléaires tels que les combustibles irradiés et les grains compactés représente des défis majeurs pour l'évaluation des risques de contamination à long terme (Zouari, 2018).

En effet, lors d'un dysfonctionnement des barrières protectrices de ses déchets, l'eau souterraine peut se mélanger aux radioéléments entraînant ainsi la migration des éléments chimiques vers le milieu aquatique et provoquer des effets plus ou moins néfastes pour les organismes aquatiques. Dans l'environnement, les sels Zr sont considérés comme de potentiels coagulants, à la fois grâce à leurs capacités à augmenter l'efficacité du processus de purification et la formation de précipitée bioinertes d'oxyhydroxyde de zirconium (Smotraiev *et al.*, 2022). Ayant une grande affinité avec le phosphore, Smotraiev *et al.* ont rapporté que le $ZrCl_4$ pourrait jouer un rôle important dans le traitement de l'eau en éliminant le phosphore, les solides en suspension et la turbidité par comparaison à d'autres métaux comme l'aluminium (Smotraiev *et al.*, 2022). Cependant, les phosphates de zirconium formés lors des processus d'épuration des eaux peuvent être persistants (Glauser *et al.*, 2017), donc bioaccumulables pour certains organismes aquatiques comme les plantes aquatiques, les microalgues, les poissons et présenter une toxicité aiguë à long terme.

1.6 Les nanotechnologies

Selon la norme ISO TS/27687, les nanomatériaux ont une structure de surface à l'échelle nanométrique entre 1 et 100 nm (Binet *et al.*, 2015). On retrouve principalement dans cette catégorie les nanoparticules (NPs) (dont les 3 dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique), les nanofibres et les nanotubes (dont les 2 dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et la troisième y est supérieure) et finalement les nanofeuilles (dont une dimension se situe à l'échelle nanométrique et les deux autres l'excèdent). Les matériaux de type nanostructures constituent la deuxième famille de nanomatériaux, ils possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. On distingue plusieurs sous-familles parmi

lesquelles les agrégats et agglomérats de nano-objets, les nanocomposites et les matériaux nanoporeux.

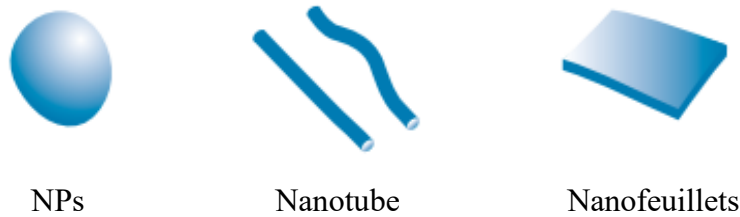


Figure 1.6 Classification des nano-objets selon ISO TS/27687 (Binet *et al.*, 2015).

1.6.1 Les Nanoparticules (NPs)

Les NPs par définition sont des particules de matière minuscules et nanométriques, de taille inférieure au micromètre, avec une dimension comprise entre 1 et 100 nm. Les particules plus petites que 1 nm sont constituées seulement d'amas d'atomes. Les NPs sont mille fois plus petites qu'un grain de sable. De ce fait, elles ont une très grande surface par rapport à leur volume. Autrement dit, elles ont beaucoup d'atomes qui se retrouvent à la surface de la particule. Cette dernière est constituée de quelques milliers d'atomes ou de molécules. Ses propriétés entre différentes particules dépendent de la taille. Les propriétés colloïdales, optiques ou électriques sont différentes des microparticules de dimensions comprises entre 1 à 1000 μm . Ces NPs peuvent avoir des propriétés différentes des plus grandes particules ou les matériaux classiques. Les propriétés inhabituelles des NPs métalliques aux dimensions nanométriques sont de grand intérêt avec des propriétés et des fonctionnalités physico-chimiques uniques (Jiang *et al.*, 2009). Cependant, ces propriétés uniques qui rendent les nanomatériaux précieux pour de nombreuses applications ont également le potentiel d'accroître leurs effets néfastes (Dowling, 2004). Les deux phénomènes qui modifient le comportement des NPs sont leurs degrés d'agrégation et la taille des particules. Ce dernier se définit comme un ensemble de particules fortement liées par des liaisons chimiques, dont la surface externe résultante est plus petite que la somme des surfaces de chacun des éléments qui la composent. En solution aqueuse, les faibles forces de répulsives entraînent une agglomération des NPs, ce dernier est un ensemble de NPs faiblement liées par des forces faibles de Van der Waals et dont la surface externe résultante est sensiblement égale à chacun des éléments qui le composent (Jiang *et al.*, 2009).

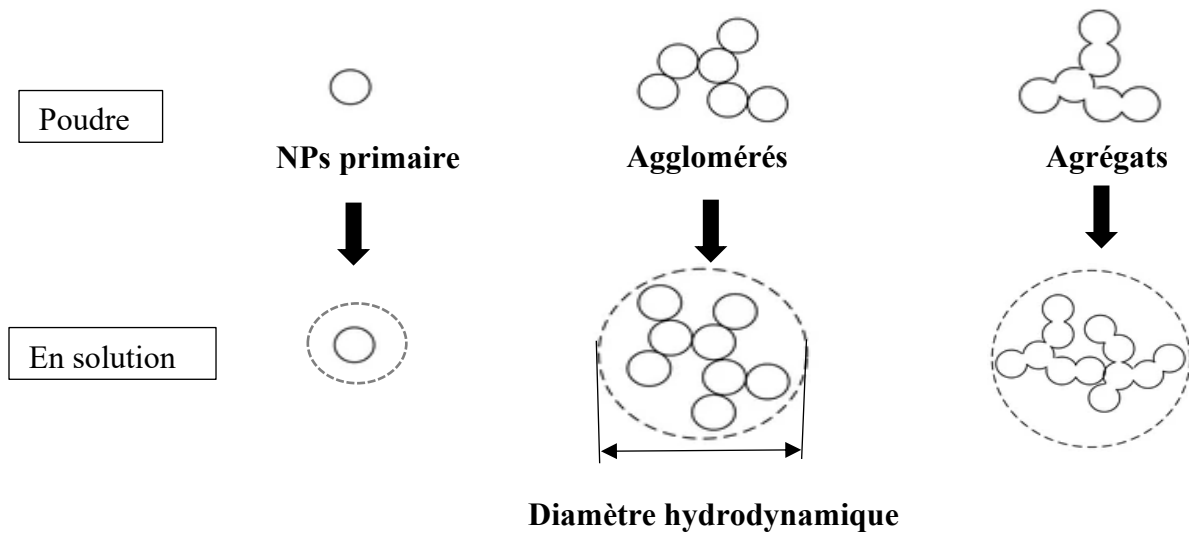


Figure 1.7 Divers états et configurations des NPs à l'état sec et dispersé en solution aqueuse (Jiang *et al.*, 2009).

1.6.2 Propriétés physico-chimiques des NPs déterminant leur toxicité

La nanotoxicologie est définie comme la relation entre les propriétés physico-chimiques des NPs (la solubilité, la taille, les propriétés de surface et la phase cristalline) et leurs effets toxiques (Hochella Jr *et al.*, 2019; Sivry *et al.*, 2011). En raison de leurs très petites tailles, avec des propriétés physico-chimiques sans précédent, une très bonne sélectivité et une forte stabilité (Guinée *et al.*, 2017). Elle constitue un ratio relativement plus élevé d'atomes de surface par rapport aux atomes intérieurs, ce qui leur donne des énergies de surface et de réactivités chimiques plus favorables (Ricaud, 2018; Singh *et al.*, 2018). La solubilité des NPs conditionne leurs devenir dans l'environnement aquatique.

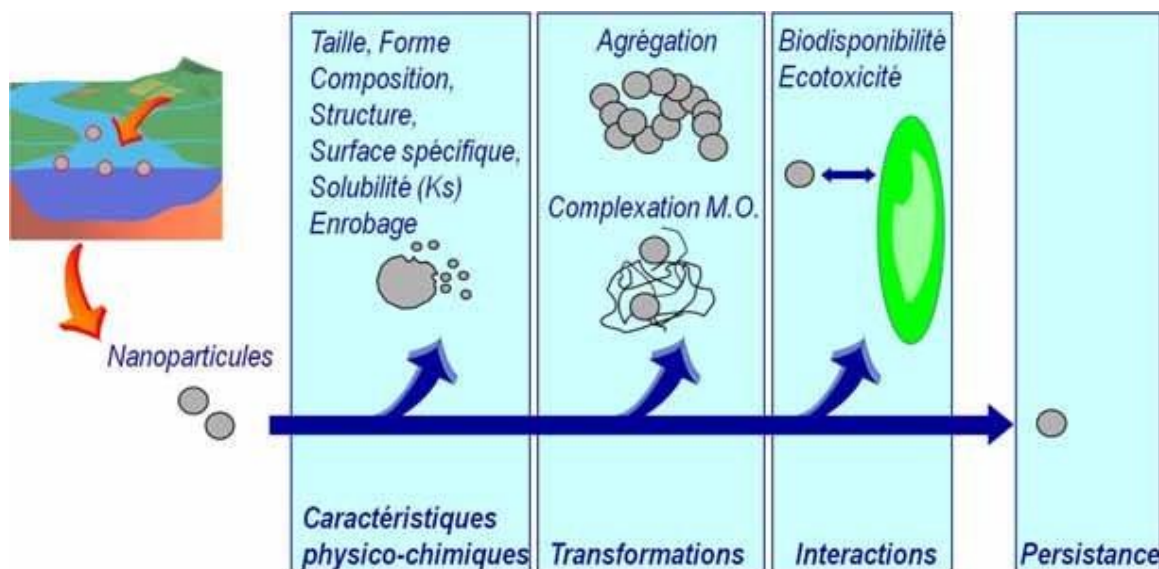


Figure 1.8 Devenir des NPs dans le milieu naturel, adapté (Sivry *et al.*, 2011).

1.6.3 Solubilités, taille et surface spécifique

La libération d'espèces chimiques ionisées à partir de NPs plus ou moins solubles peut contribuer au développement d'effets toxiques (Zouari, 2018). La surface spécifique d'une particule à l'échelle nanométrique est proportionnelle à sa taille. Ce dernier conditionne le site de dépôt lors de l'exposition. Plus la taille diminue plus le rapport surface volume augmente (figure 1.9). Par conséquent, la diminution de la taille des NPs favorise leur migration et pénétration dans différents compartiments cellulaires des organismes aquatiques. La réactivité chimique des NPs dépend notamment de leur surface. Cependant, une augmentation de la surface spécifique des particules pourrait induire un accroissement de leur réactivité chimique et biologique et ainsi accroître leur interaction avec différentes cellules, tissus et fluides biologiques de l'organisme (Sun *et al.*, 2021).

Des particules avec des surfaces spécifiques importantes favorisent la pénétration de celle-ci dans différents organes et induisent des effets toxiques très spécifiques (Guerrini *et al.*, 2018; Ricaud, 2018). La taille des nanoparticules est un paramètre important à connaître quand il s'agit de caractériser les NPs dans l'environnement aquatique. Elle peut influencer sur la capacité d'une plante aquatique à éliminer les particules étrangères et influencer aussi les mécanismes de toxicités (cytotoxicité, nécrose). La taille des NPs peut avoir un effet sur la façon dont un organisme réagit à l'exposition (Jiang *et al.*, 2009).

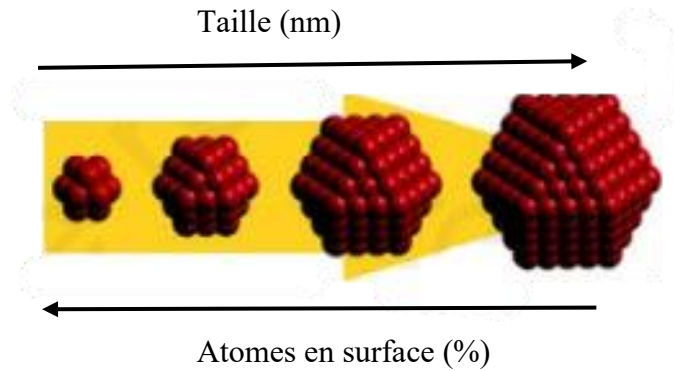


Figure 1.9 Relation entre la taille d'une particule et la proportion d'atomes de surface (Ricaud, 2018).

1.6.4 Charge de surface

Les nanoparticules en solution aqueuse développent des charges de surface. Ce potentiel de surface, désigné généralement par la lettre grecque zêta (ζ) dite potentiel zêta (PZ), est l'une des caractéristiques les plus importantes des NPs. Elle indique dans quelle mesure la dispersion des nanoparticules est électrostatiquement stabilisée par répulsion interparticulaire. En conséquence, le PZ a une influence majeure sur le comportement des nanoparticules (Dunphy Guzman *et al.*, 2006). Pour une particule chargée négativement (Fig.1.10), une partie des ions positifs sont fortement liés à la surface de la particule formant ainsi une couche d'ions adhérents, appelée couche de Stern. Cette dernière attire à son tour des ions moins fortement liés selon une couche diffuse constituée d'anions et de cations (Fig. 1.10). L'intensité de la charge informe sur la dispersion et l'agglomération des nanoparticules en suspension. Une valeur absolue supérieure à 30 mV indique la présence de forces de répulsion électrostatiques permettant la dispersion des NPs. Une valeur absolue inférieure à 30 mV et qui tend vers zéro, engendre une diminution de ces forces entre les NPs causant leurs agglomérations.

Le pH et la concentration des NPs en solution sont des facteurs importants qui influencent fortement le PZ. Jiang *et al.*, ont rapporté que lorsque le pH est éloigné du point isoélectrique, la valeur absolue du PZ devient plus élevée. La force répulsive électrostatique est alors dominante sur les forces de Van Der Waals, de sorte que l'agglomération est supprimée. Lorsque le pH approche le point isoélectrique, la force répulsive est affaiblie en raison d'une faible charge de

surface et la taille hydrodynamique augmente. Les NPs sédimentent alors rapidement (Jiang *et al.*, 2009).

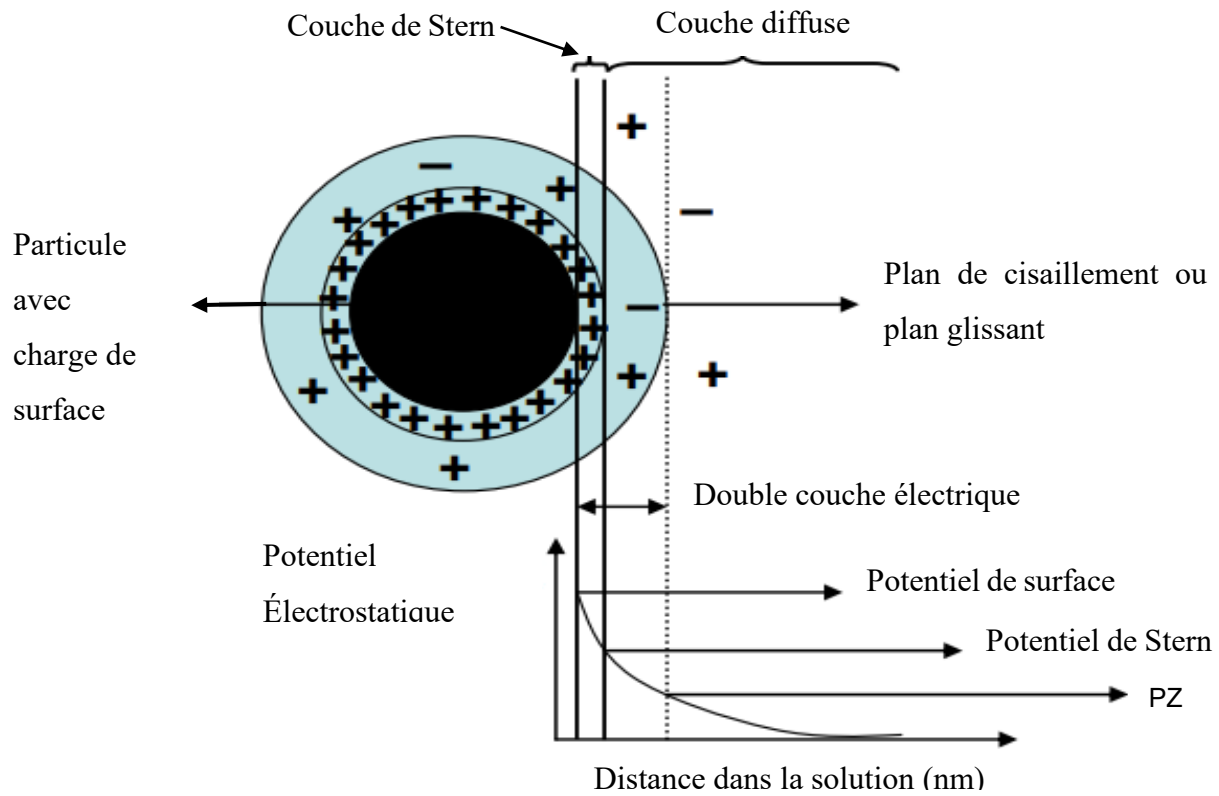


Figure 1.10 Schéma de la double couche électrique d'une particule en solution (El Kass, 2011).

1.6.5 Forme et Structure

La morphologie des NPs peut être un facteur déterminant sur la toxicité de ces dernières. Les particules longues telles que les nanotubes ou nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique (Hochella Jr *et al.*, 2019). La structure cristalline de certains minéraux comme la silice peut contribuer à moduler les propriétés toxicologiques des NPs. Dans la littérature, il a été rapporté que le dioxyde de titane (TiO_2) sous forme anatase génère plus de ERO et entraîne plus d'effets cytotoxiques que la forme rutile (Jiang *et al.*, 2009; Noël, 2013).

1.6.6 Degrés d'agrégation et d'agglomération

Les NPs ont tendance à s'agréger (forte liaison chimique) ou s'agglomérer (faible liaison physique) en amas de plus grande dimension pouvant atteindre des micromètres dans certains cas. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des NPs dans les systèmes biologiques des organismes aquatiques, leur bioaccumulation ou leur adhérence et leurs effets biologiques (Jiang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2021). Sur la base d'un examen approfondi de la littérature sur la nanotoxicologie. Menard et al ont conclu que l'effet des nanoparticules n'est pas corrélé à la taille des particules primaires, mais que l'effet peut être lié à la taille des particules secondaires et/ou à leur surface spécifique (Menard *et al.*, 2011). Cependant, le manque de données donne lieu à considérer que les caractéristiques biologiques devraient être prises en compte pour évaluer la toxicité des nanoparticules.

1.7 Facteurs influençant la toxicité des NPs-ZrO₂

Les caractéristiques des NPs-ZrO₂ à l'échelle nanométrique très avancée sont différentes des propriétés physiques et chimiques du ZrO₂ en vrac en raison de la variation du rapport surface volume (Joshi *et al.*, 2021). Un exemple très important pour l'application du zirconium métallique est l'utilisation sous forme de NPs-ZrO₂ (Wu *et al.*, 2010). Compte tenu des propriétés antimicrobiennes (Bindhu *et al.*, 2016; Joshi *et al.*, 2021) des NPs-ZrO₂, leur incorporation dans différents matériaux, il agit comme des biocides (Arreche *et al.*, 2015).

1.8 Contamination et toxicité du ZrCl₄ et NPs-ZrO₂

Le ZrCl₄ et les NPs-ZrO₂ inorganiques à base métallique occupent une place importante dans de nombreuses applications industrielles et ont connu un essor grandissant ces dernières années. Il est bien connu que certains métaux et NPs peuvent causer de la toxicité, bien que certaines études signalent également l'absence d'effets à des concentrations élevées. Le tableau 1.1 répertorie des études sur le potentiel toxique des ions Zr⁴⁺ et NPs-ZrO₂. Par exemple, certaines études *in vitro* basées sur des lignées cellulaires HepG2 (Sun *et al.*, 2021) et MDA-MB-231 (Tabassum *et al.*, 2021) ont montré que différentes concentrations de NPs-ZrO₂ provoquent une génotoxicité et une cytotoxicité. Alors que d'autres études utilisant des lymphocytes humains ne montrent pas de cytotoxicité pour des NPs similaires.

Tableau 1.1 Résumés de quelques études sur les NPs-ZrO₂ et ZrCl₄.

Modèles d'étude	Paramètres toxicologiques		Références
	ZrCl ₄ (Zr ⁴⁺)	NPs-ZrO ₂	
Animaux et cultures cellulaires Rat Souris Cellules HepG2 Cellules MDA-MB-231	LD ₅₀ =1688mg/kg LD ₅₀ =440 mg/kg	LC ₅₀ (20 mg/Kg PC) LC ₅₀ (250 µg/mL) LC ₅₀ (100 µg/mL)	(Delongas <i>et al.</i> , 1983) (Sun <i>et al.</i> , 2021) (Tabassum <i>et al.</i> , 2021)
Poissons Truite arc-en-ciel Danio rerio (embryon)	LC ₅₀ = 20 mg/L	LC ₅₀ (1-2 µg/mL)	(Couture <i>et al.</i> , 1989) (Rajendran <i>et al.</i> , 2018)
Bactéries et levures <i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> (gram -)	EC ₅₀ = 4,3 mg/L	CME0=1000mg/L EC ₅₀ =10-30 µg/mL	(Couture <i>et al.</i> , 1989) (Gomes <i>et al.</i> , 2015) (Tabassum <i>et al.</i> , 2021)
Invertébré <i>Enchytraeus crypticus</i>		EC ₅₀ (502 mg/Kg)	(Tabassum <i>et al.</i> , 2021)
Microalgues <i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella sp</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	EC ₅₀ (2,6 mg/L) EC ₅₀ (2,13mg/L)	CME0=1 mg/L CME0=10 g/L EC ₅₀ (15,3 mg/L)	(Couture <i>et al.</i> , 1989) (Liu <i>et al.</i> , 2018) (Fu <i>et al.</i> , 2020) (Wang, Z. <i>et al.</i> , 2021)

Pour les invertébrés du sol, une étude in vitro utilisant *enchytraeus crypticus* a montré que les NPs-ZrO₂ ont été absorbées par les cellules, mais sans changement dans les niveaux de stress

antioxydant ou dans la viabilité cellulaire (Tabassum *et al.*, 2021). Des données *in vivo* ont montré que l'exposition de souris par injection intraveineuse de 20 mg/kg de PC a donné lieu à une accumulation de NPs-ZrO₂ dans l'organisme, mais avec peu d'effet sur la reproduction (Sun *et al.*, 2021). Des études récentes sur des microalgues exposées aux ions Zr⁴⁺ et NPs-ZrO₂ (Table 2.1) ont montré respectivement une EC₅₀ (inhibition de 50 % de la croissance) des microalgues. De plus la concentration minimale avec effet observé (CMEO) a été démontrée pour les microalgues (Couture *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2018; Wang, Z. *et al.*, 2021).

1.9 Le modèle d'étude

1.9.1 Le milieu naturel

La lentille d'eau *Lemna minor* est une plante aquatique d'eau douce appartenant à la sous-famille des *Lemnoideae*, autre fois la famille des *Lemnaceae*. Une des espèces les plus courantes et cosmopolites de lentilles d'eau se reproduit très rapidement quand les conditions d'ensoleillement et la température sont optimales (Filbin et Hough, 1985). *Lemna minor* est présent partout où les eaux sont de faible débit ou stagnantes, à l'exception des climats arctiques et des déserts secs. Elle peuple ainsi une grande partie des régions du monde comme l'Afrique, l'Asie, l'Europe et l'Amérique du Nord. Elle présente un fort potentiel pour l'épuration de l'eau et peut être utilisée comme engrais organique ou comme aliment pour certains organismes aquatiques (Leng, 1999). Elle peut aussi bioconcentrer certains polluants non biodégradables et les transférer à d'autres compartiments de l'environnement.

La plante aquatique *Lemna minor*, est la plus petite de toutes les angiospermes (plante à fleurs). Elle est composée d'une ou de quelques feuilles légèrement ovales de couleur vert clair appelées frondes mesurant 1 à 8 mm de long et 0,6 à 5 mm de larges, d'une racine blanc verdâtre d'une longueur de 1 à 2 cm. Elles se reproduisent de manière végétative (Baudo *et al.*, 2015). Elle mesure environ 2 à 4 mm de diamètre, formant des colonies de 2 à 6 frondes (Fig.3.1) à la surface de l'eau (Rusoff *et al.*, 1980). Il a été rapporté que le temps de dédoublement de *Lemna minor* est approximativement 1 à 4 jours (Frick, 1985) avec un délai optimal de 3 jours selon la norme (#221-OCDE-2006).

Chez la plante *Lemna minor* le mode de reproduction asexuée par bourgeonnement est dominant. De petites feuilles finissant par se séparer de la culture mère pour donner de nouvelles lentilles d'eau. *Lemna minor* est en outre souvent groupé par 2 à 3 individus. Dans des conditions de croissance optimales, un pH de 5 à 9 et une température entre 6 et 33 °C sont nécessaires (Ekperusi *et al.*, 2019). Toutefois, en dessous des températures optimales, de petits organes denses remplis d'amidon appelés «turions» sont produits et *Lemna minor* entame une phase dormante. Elle repousse et remonte à la surface quand les conditions le permettent. Elle s'adapte en contrepartie facilement à diverses conditions d'éclairage. Des nutriments comme le phosphore et l'azote sont essentiels à sa croissance. Lorsque les conditions de croissances optimales sont réunies, la plante peut doubler sa masse en moins de 2 jours (Fig. 1.11). En laboratoire, pour une bonne croissance les lentilles d'eau ont besoin d'un pH 6 à 7,5, d'une quantité suffisante d'azote, de phosphore, de potassium ainsi que d'autres nutriments essentiels comme le soufre et le sodium (Baudo *et al.*, 2015).

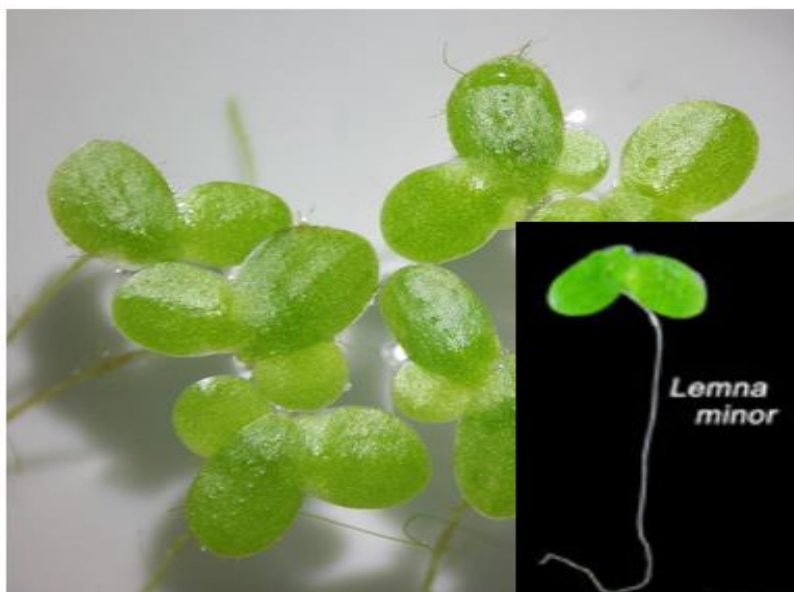


Figure 1.11 *Lemna minor* (photographie du 28 aout 2018, auteur Stephan Lefnaer).

1.9.2 *Lemna minor* un modèle d'étude toxicologique

La lentille d'eau, *Lemna minor* peut être cultivée en laboratoire dans des conditions optimales de croissance permettant d'avoir un nombre important d'individus pour effectuer des essais toxicologiques (Ekperusi *et al.*, 2019).

Les plantes aquatiques du genre *Lemna* sont de très bons bio-indicateurs pour la recherche en écotoxicologie. Grâce à l'utilisation de biomarqueurs, de nombreuses études en laboratoire ont confirmé la capacité des plantes aquatiques à agir comme bio-indicateurs quand il s'agit de contamination environnementale (Ferrat *et al.*, 2003; Rainbow et Phillips, 1993). La lentille d'eau, *Lemna minor*, fait partie des plantes aquatiques utilisées pour le traitement des eaux résiduelles domestiques ou industrielles. Elles sont utiles dans l'élimination des contaminants grâce à leurs capacités d'assimilation de l'azote et du phosphore (Atindehou *et al.*, 2002; Tangou Tabou *et al.*, 2014). Comme d'autres macrophytes, elles peuvent bioaccumuler de manière sélective un certain nombre d'espèces chimiques présentes dans l'environnement aquatique (Salt *et al.*, 1995). *Lemna minor* est facile à cultiver en laboratoire et ses propriétés physiologiques de taille réduite, multiplication rapide et propagation végétative en font un modèle idéal pour l'étude de la toxicité des contaminants émergents dans les écosystèmes aquatiques (Salt *et al.*, 1995; SUR et SANS, 2014). Des études de suivi et de mesure de la biomasse de *Lemna minor* ont été réalisées pour mesurer la sensibilité de la plante à certains métaux comme le palladium (Jmii et Dewez, 2021) et les nanoparticules d'oxyde de cuivre (NPs-CuO) (Yue *et al.*, 2018). Les lignes directrices de l'Organisation Internationale de Coopération et de développement Économique (# 221-OCDE, 2006) prescrivent des essais de toxicité de produits chimiques utilisant *Lemna minor*. Cette ligne directrice conçue à partir de lignes directrices existantes et comportant un certain nombre de modifications est le reflet des dernières avancées en recherche (Wang, W., 1986; Wang, W. et Keturi, 1990). Cette dernière a été validée (Sims *et al.*, 1999) et est destinée à évaluer la toxicité des substances chimiques ou polluants dans l'environnement aquatique.

1.9.3 Capacité de bioaccumulation des contaminants

Dans les écosystèmes aquatiques, les métaux peuvent être dissous, complexés avec d'autres molécules organiques ou inorganiques ou en suspension. Certaines de ces formes peuvent être

incorporées et bioaccumulées dans les organismes aquatiques (Sanders *et al.*, 2014). Ses macrophytes sont largement répartis dans divers milieux humides et en matière de biomasse, elles sont prédominantes dans les écosystèmes aquatiques (Phillips *et al.*, 2015; Vardanyan et Ingole, 2006). Par comparaison avec les autres formes végétales, ces plantes ont une grande capacité d'accumulation de métaux (Łojko *et al.*, 2015; Matache *et al.*, 2013) et sont des indicateurs efficaces de la qualité de l'environnement aquatique (Matache *et al.*, 2013). Plusieurs auteurs ont déjà démontré que les quantités de métaux absorbées par les plantes (ex : cadmium ou palladium) étaient proportionnelles à leur teneur dans les compartiments abiotiques de leur environnement (Jmii et Dewez, 2021; Stout *et al.*, 2010). Elles peuvent aider à estimer les niveaux de pollution dans de nombreux environnements aquatiques (Vardanyan et Ingole, 2006). Au-delà de la bioaccumulation (Fig.1.12), la bioamplification est le processus par lequel les contaminants s'accumulent dans les tissus d'un organisme aquatique à la suite d'une bioaccumulation de contaminants dans le milieu aquatique (Jelassi *et al.*, 2019).

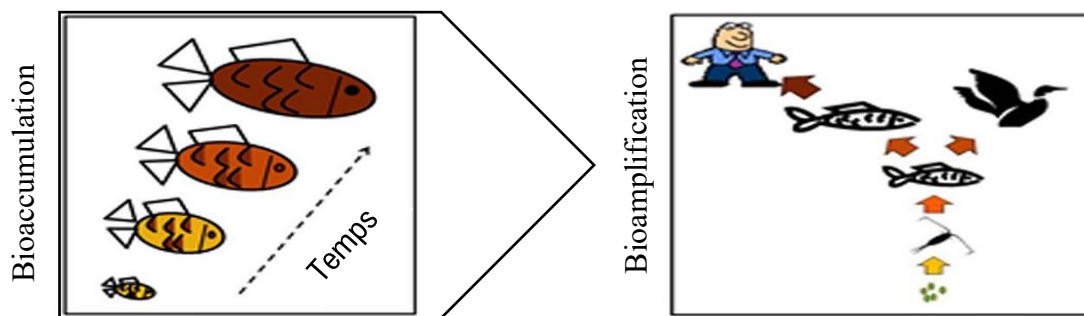


Figure 1.12 Schéma simplifié des processus de bioaccumulation et de bioamplification, adapté de la source (Monitoring et Symon, 2013).

1.9.4 Le stress oxydatif causé par les contaminants

Les ERO peuvent être radicalaires ou non. Les plus connus sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et enfin le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il se forme quand des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou des radicaux libres pénètrent dans la cellule. Les ERO sont très instables et cytotoxiques. En raison de leur pouvoir oxydant, ils induisent l'oxydation d'autres molécules par soustraction d'un électron (Cuypers *et al.*, 2016).

Le déséquilibre entre les défenses antioxydantes et la formation intracellulaire (ERO) est la conséquence d'un stress oxydatif. Bien que la production d'ERO soit normale pour les organismes aquatiques vivant en aérobiose, il n'en demeure pas moins qu'ils présentent une toxicité pour ces mêmes organismes à fortes doses et induise la mort cellulaire. Ils ont la particularité de s'attaquer aux macromolécules biologiques telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Halliwell, 1999) et induire une toxicité pour les plantes aquatiques. Les espèces réactives oxygénées se forment davantage lorsque les plantes aquatiques sont exposées aux métaux et aux NPs se trouvant dans leurs écosystèmes aquatiques. En effet, un stress oxydatif prolongé a pour conséquence que les antioxydants ne sont plus en mesure de limiter les effets d'une augmentation de la concentration de ERO intracellulaire (Cuypers *et al.*, 2016). En raison du transport d'électrons au niveau des thylacoïdes et des mitochondries, les organismes photosynthétiques sont susceptibles aux dommages causés par les ERO. La libération dans l'environnement aquatique d'ions métalliques, de NPs à base d'oxydes métalliques auxquels s'ajoutent d'autres facteurs environnementaux comme la présence de xénobiotiques peut être la cause d'une production importante d'ERO chez certains organismes aquatiques. En effet, la cellule dispose d'un complexe de détoxification contre les ERO qui agissent en synergie. Les principales lignes de défense des cellules contre les ERO ont pour particularité d'agir de manière préventive contre formation excessive d'ERO. Parmi ces lignes de défense se trouvent les enzymes antioxydantes telles la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (POD) (Ighodaro et Akinloye, 2018). D'autres font intervenir un mécanisme adaptatif, comme les voies de signalisations cellulaires via la synthèse de l'enzyme glutathion S-transférases (GSH) (Ighodaro et Akinloye, 2018). Le GSH est un tripeptide formé dans l'ordre des acides aminés suivants : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Il est principalement localisé dans le chloroplaste et dans le cytosol où il réagit avec l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. Il peut agir seul grâce à son pouvoir réducteur qui réside dans le groupement thiol (SH) de la cystéine et peut être utilisé comme coenzyme permettant d'inactiver les ERO (Cuypers *et al.*, 2016).

1.9.5 La photosynthèse comme indicateur de toxicité

Chez les plantes terrestres comme chez les plantes aquatiques, la lumière est nécessaire à la synthèse de pigments chlorophylliens et constitue le facteur le plus important de la régulation de la biogenèse de l'appareil photosynthétique. Les plantes comme *Lemna minor* grâce à leur racine

absorbent les éléments nutritifs essentiels à leur croissance dans leur milieu de vie. Ces éléments nutritifs sont acheminés au niveau des frondes via les vaisseaux conducteurs du xylème. Ils permettent ainsi de réaliser la biosynthèse de diverses macromolécules biologiques et ainsi de réaliser le processus de la photosynthèse essentielle à leur croissance.

Au sein des organites appelés chloroplastes se déroule la photosynthèse. Ils sont enveloppés par deux membranes, une interne et une externe de nature phospholipide et séparées par un espace intermembranaire. Dans le stroma qui est l'intérieur des chloroplastes, baigne les thylakoïdes regroupés en granum représentant le siège de la photosynthèse. Les thylakoïdes sont des disques aplatis entourés par une membrane de thylakoïdes délimitant un espace appelé lumen (Karp *et al.*, 2018). La photosynthèse quant à elle se déroule plus précisément dans la membrane des thylakoïdes, grâce à des regroupements de complexes protéiques membranaires. Ces complexes renferment des pigments chlorophylliens qui absorbent l'énergie de la lumière. Un dysfonctionnement du système photosynthétique des plantes en raison du stress causé par les métaux et les NPs présentes dans leur milieu de vie représente un risque majeur pour la bonne croissance des plantes aquatiques dans leur écosystème. Les plantes aquatiques sont productrices de matière organique, donc une exposition continue aux contaminants peut inhiber la production de la biomasse.

Les NPs d'oxyde métallique peuvent causer un stress chez la plante soit par contact direct soit en pénétrant à travers les racines ou les frondes. Le passage des NPs à travers les parois cellulaires est conditionné par leur taille qui doit être inférieure au diamètre des pores des parois (Hou *et al.*, 2018). Les ions métalliques et les métaux peuvent pénétrer les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique (fig.1.13), ou par transport actif et par compétition avec d'autres ions dits essentiels pour la croissance des plantes et par conséquent affecter les différents processus biologiques de ces derniers (Zhao, C.-M. et Wilkinson, 2015). Une fois passée la membrane cellulaire, les ions métalliques sont captés par les métallothionéines (MT) et induisent la production de radicaux l'hydroxyle (HO[•]) par les réactions de Fenton et Haber-Weiss à partir de produits métaboliques tels que le H₂O₂ (Cuypers *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2018), (Fig.1.13). Il est connu que les métaux peuvent perturber la biosynthèse des pigments chlorophylliens (Rai, R. *et al.*, 2016). Par exemple, il a été observé que le palladium bioaccumulé entraîne une détérioration de toute la physiologie de la plante *Lemna minor* y compris la synthèse de la chlorophylle, le complexe

d'antenne du photosystème II et les réactions phytochimiques de la photosynthèse (Jmii et Dewez, 2021). L'inhibition de la photosynthèse à la suite de la dégradation de la biosynthèse des pigments. Le ratio entre la chlorophylle *a* et *b* peuvent être impactés et entraîner une diminution de la chlorophylle totale (*t*) (Rai, R. *et al.*, 2016).

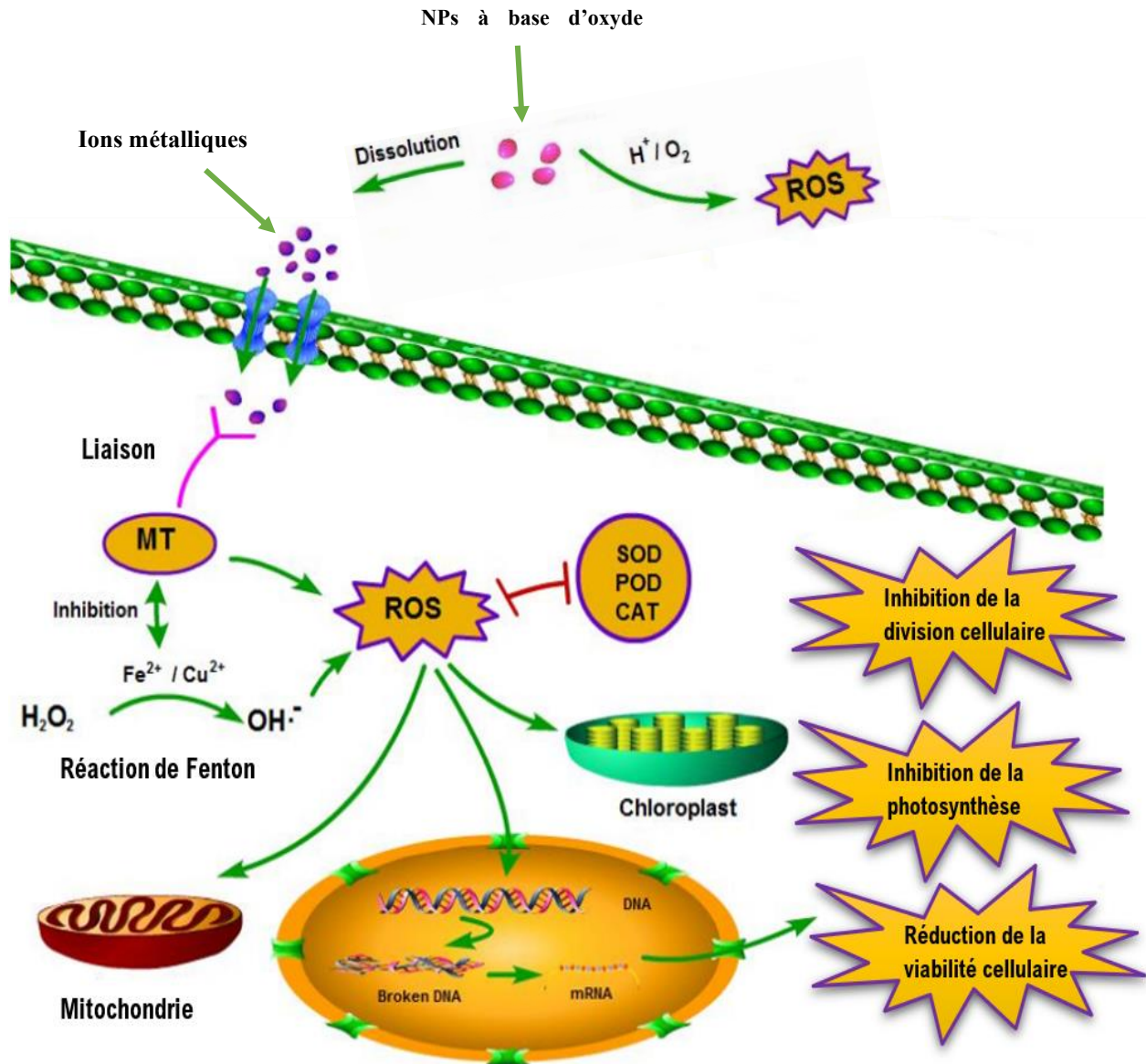


Figure 1.13 Schéma de la toxicité des NPs à base d'oxydes métalliques et d'ions métalliques pour les algues et les plantes aquatiques, adapté de la source (Hou *et al.*, 2018).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Appareillage

Tout le matériel entrant en contact avec le milieu expérimental est en verre et chimiquement inerte. Le matériel est nettoyé et rincé à l'eau nanopure, puis une solution d'acide nitrique (HNO_3) 10 % a été utilisée pour éliminer toute trace de métal.

2.2 Le modèle d'étude

La plante *Lemna minor* est obtenue auprès d'une collection de cultures, d'un laboratoire au département des sciences biologiques de l'UQAM (laboratoire Philippe Juneau). Les plantes ont été acclimatées pendant 3 semaines dans le milieu SIS (composition du milieu SIS en 4.3) avec un renouvellement du milieu tous les 7 jours.

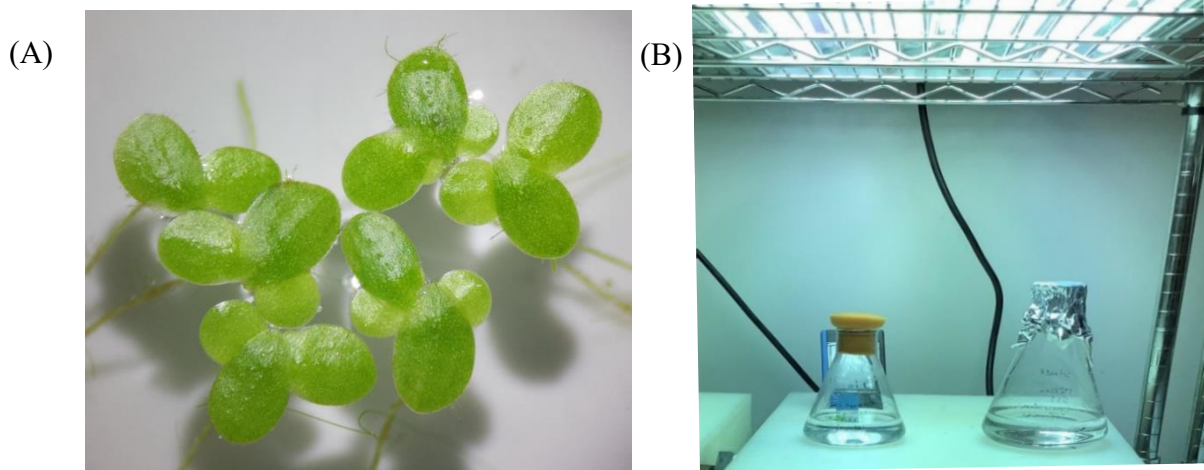


Figure 2.1 *Lemna minor* (A) et culture de la plante (B).

Les cultures de stocks de *Lemna minor* ont été maintenues sous conditions contrôlées dans du milieu nutritif SIS, selon les recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) 2006. Les plantes ont été acclimatées pendant 3 semaines dans le milieu SIS avec renouvellement du milieu tous les 7 jours. Un éclairage continu à fluorescence blanche, chaude, est appliqué afin d'obtenir une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ (équivalant à 6 500-10 000 lux). La température du milieu d'essai est maintenue

à 24 ± 2 °C. Le pH du milieu est maintenu à $6,5 \pm 0,2$. Un cycle de lumière avec une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité a été appliqué (Fig.2.1).

2.3 Milieu de culture SIS pour la plante aquatique *Lemna minor*

La culture des *Lemna minor* a été réalisée avec une version modifiée du milieu de croissance pour établi par la norme suédoise (SIS), selon les directives de l'OCDE 2006 # 221, qui contient les éléments nutritifs suivants :

Tableau 2.1 Composition du milieu SIS

Substances	Conc (mg/L)
NaNO ₃	85
KH ₂ PO ₂	13,4
MgSO ₂ . 7H ₂ O	75
CaCl ₂ . 2H ₂ O	36
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	1
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,005
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,01
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,84
Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	1,4
MOPS (tampon)	490

Pour préparer le milieu SIS, une série de solutions mères ont été préparées au préalable. À 900 mL d'eau déionisée ont été ajoutés respectivement 10; 5; 5; 5; 1; 5 et 1 mL des solutions 1 à 7. Le pH du milieu a été ajusté à $6,5 \pm 0,2$. Les milieux ont été stérilisés par filtration à travers un filtre de 0,2 µm. Les expériences ont été réalisées dans des conditions axéniques.

2.4 Caractérisation physico-chimique du $ZrCl_4$

2.4.1 Solution mère de $ZrCl_4$

Le chlorure de zirconium (IV) de qualité réactif ($ZrCl_4$, Sigma Aldrich CAS No.10026-11-6) d'une pureté de 99,9 % sur une base métallique a été utilisé. Une solution mère de 20 mg/mL de $ZrCl_4$ a été préparée dans de l'eau nanopure et a été utilisée pour déterminer la sensibilité de la plante aux ions (Zr^{4+}). Les solution mère ont été soniquée pendant 30 minutes dans un bain de sonication à température ambiante et stockée à 4 degrés jusqu'à utilisation (Wang, Z. *et al.*, 2021).

2.4.2 Spéciation du Zr dans le milieu SIS

Pour déterminer les différentes formes chimiques du zirconium dans le milieu d'essai, la spéciation du Zr^{4+} a été estimée à 25 °C dans le milieu de croissance SIS en utilisant le logiciel d'équilibre chimique Visual MINTEQ 3.1 (KTH Département of Land and Water Ressources Engineering).

2.4.3 Analyse par ICP-OES du Zr libre

La spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-OES) est une technique très puissante avec d'excellentes capacités de détection qui permet l'analyse d'éléments à l'état de trace d'où son utilité quand il s'agit d'essais toxicologiques pour l'analyse environnementale. Ses avantages sont sa rapidité, limites de détection faibles, une plage dynamique linéaire large et des interférences chimiques négligeables (Khan *et al.*, 2022).

La technique consiste à ioniser un échantillon sous forme liquide en l'injectant dans un plasma d'argon avec une température environnant 6000K permettant un séchage rapide. L'échantillon est injecté dans le plasma sous forme aérosol (gouttelettes finement divisées), généré par un dispositif pneumatique (nébuliseur en verre concentrique) dans une chambre de pulvérisation double passe en verre cyclonique (fig.2.2). Son intensité est comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue (Rouessac et Rouessac, 2022). Lors du retour à l'état fondamental, les électrons des atomes excités (ionisés) émettent un photon dont l'énergie émise est caractéristique de l'élément, la lumière émise par l'élément est alors détectée et mesurée (Ghosh *et al.*, 2013). Le détecteur mesure les intensités du signal d'émission à différentes longueurs d'onde, correspondant à la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental de l'électron

(Halfmann *et al.*, 2007). L'abondance de l'élément dans le plasma est proportionnelle à la force du signal d'émission (Khan *et al.*, 2022). Les photons sont collectés à l'aide d'un miroir puis convertis en un signal électrique qui est ensuite traité et amplifié par des intégrateurs et enregistré par un ordinateur (Khan *et al.*, 2022).

En comparaison, l'ICP-OES et la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) utilisent le même type de source d'ionisation, mais la principale différence est que les ions de l'analyte formés dans l'ICP-OES sont envoyés à l'aide d'une décharge de radiofréquence tandis que dans la technique d'HR-ICP-MS, les ions issus de l'analyse sont transportés à travers un spectromètre de masse où les ions sont séparés par un champ magnétique en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Schenk et Almirall, 2012). L'ICP-MS est très sensible et très spécifique par rapport à l'ICP-OES (Kannamkumarath *et al.*, 2002).

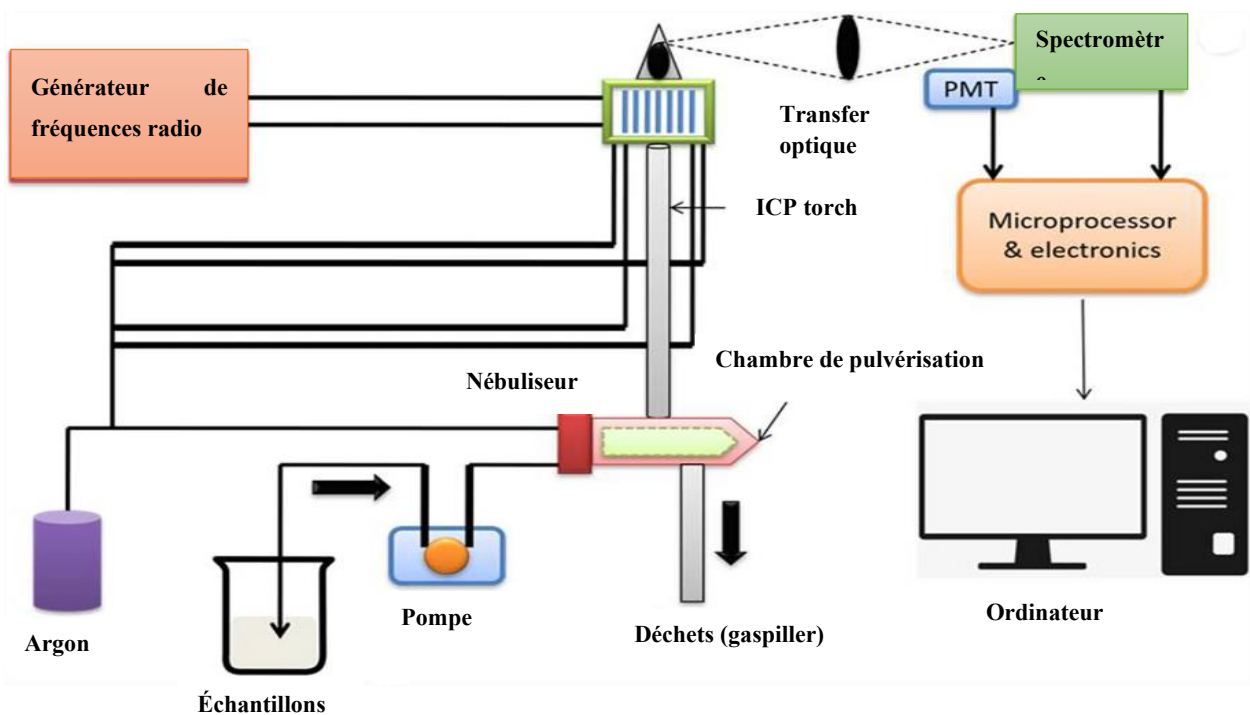


Figure 2.2 Schéma du fonctionnement de l'instrumentation ICP-OES (Khan *et al.*, 2022).

Une série de solutions étalon ont été préparées dans de l'eau nanopure à partir d'une solution Zr standard avec une pureté 998 ± 3 ppm (environ 1000 mg/L), dans une matrice de 5 % v/v (HNO_3) à des concentrations de 0,05; 0,25; 1,25; 6,25; 31,25 et 156,25 ppm. Des solutions standards de concentration 0,05; 0,25; 1,25; 6,25 et 31,25 ppb ont été préparées comme précédemment avec la

solution standard pour ICP pour l'analyse par HR-ICP-MS. Pour chaque essai, un blanc a été préparé avec la même matrice que les solutions standards. Les échantillons sont conservés à 4°C, jusqu'à leur utilisation. Les concentrations de ZrCl₄ 1; 50; 100; 150 et 200 ppm déjà préparées ont été analysées par ICP-OES (Agilent Technologie, 5100), après ajout de HNO₃ pour quantifier le Zr libre. Les courbes d'étalonnages (voir annexe A et B) obtenue grâce aux solutions standards sert à déterminer la concentration du Zr libre. Pour les paramètres du système, un nébuliseur en verre concentrique et une chambre de pulvérisation double passe en verre cyclonique ont été utilisés. Le débit de gaz auxiliaire (Ar), le débit de gaz porteur (Ar) et le débit de gaz plasmagène (Ar) étaient respectivement de 1,0, 1,0 et 12 L/min et la longueur d'onde utilisée était de 343,823 nm (Shariati et Yamini, 2006). Les mesures ont été réalisées en triplicata.

2.5 Caractérisation physico-chimique des NPs-ZrO₂ dans le milieu culture SIS

Les propriétés physiques et chimiques des nanoparticules dans le milieu de culture SIS, soit la fraction soluble, la stabilité, la taille et l'absorption, sont nécessaires pour les essais toxicologiques.

2.5.1 Solution mère des NPs-ZrO₂

Les nanoparticules d'oxyde de zirconium (NPs-ZrO₂) d'une taille primaire ≤ 100 nm et de surface spécifique de $25 \geq \text{m}^2/\text{g}$ ont été achetées chez Sigma Aldrich CAS No.1314-23-4. Les suspensions mères de nanoparticules d'essai ont été préparées en dispersant des poudres dans de l'eau déionisé, puis les suspensions mères ont été soniquées pendant 30 minutes dans un bain de sonication à température ambiante suivie de 10 minutes de sonication par sonde, puis stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation (Liu *et al.*, 2018; Wang, Z. *et al.*, 2021).

2.5.2 Fraction soluble

Pour déterminer la fraction soluble du Zr libéré par les NPs-ZrO₂, des suspensions de nanoparticules de 1; 50; 100; 150 et 200 ppm ont été préparées dans milieu de culture et incubées pendant 24 h dans les conditions d'incubation décrites par #221-OCDE-2006 pour *Lemna minor*. Avant l'analyse, les NPs-ZrO₂ ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 30 min. L'analyse de l'absence de nanoparticules a été vérifiée à l'aide d'un analyseur de taille de particules (DLS Malvern Zetasizer Nano S90). La quantification du Zr en solution a été réalisée par ICP-OES

(Agilent Technologie, 5100), après ajout de HNO₃ 5 %. Les concentrations de Zr inférieures à 0,2 ppm ont été déterminées par HR-ICP-MS à haute résolution (HR-ICP-MS, Attom de nu instruments) (Zouari, 2018), un analyseur de type secteur magnétique a été utilisée. Les mesures ont été réalisées en triplicata.

2.5.3 Taille des particules par diffusion dynamique de la lumière

La technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) mesure optiquement le mouvement en enregistrant le signal de lumière diffusée à un angle fixe. Les particules sont éclairées par une source de lumière monochromatique (laser) et la lumière diffusée par les particules est enregistrée. Cela permet de déterminer la distribution en taille des particules ou plutôt le diamètre hydrodynamique des particules en suspension, en utilisant leur mouvement brownien comme une signature de leur taille via la mesure du coefficient de diffusion D (Blessing et Ghestem, 2012).

L'échantillon contenant des NPs-ZrO₂ est éclairé grâce à un faisceau laser de 4 mW et les fluctuations de la lumière diffusée par les nanoparticules en mouvement brownien sont détectées à un angle de diffusion θ reconnu par un détecteur de photons rapide de particules de diamètre compris entre 0,3 nm à 5 microns (Fig.2.3). En DLS, l'autocorrélation de ces fluctuations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée est évaluée pour déterminer le coefficient de diffusion moyen pondéré en fonction de l'intensité (m²/s) des particules. Le diamètre hydrodynamique moyen, d_p , peut ensuite être calculé grâce au coefficient de diffusion à partir de l'équation de Stokes-Einstein :

$$d_p = kT / 3\pi\mu D$$

Où k est la constante de Boltzmann (J K⁻¹), T est la température absolue en kelvin(K), et μ est la viscosité du milieu en kg / ms. Le diamètre hydrodynamique est le diamètre d'une sphère qui a le même coefficient de diffusion que les particules (Jiang *et al.*, 2009). Une seule désintégration exponentielle est supposée lors de la détermination du diamètre hydrodynamique moyen. Étant donné que plusieurs tailles différentes de particules sont souvent présentes dans la solution, ils permettent ainsi de déduire une distribution de taille pour décrire la dispersion.

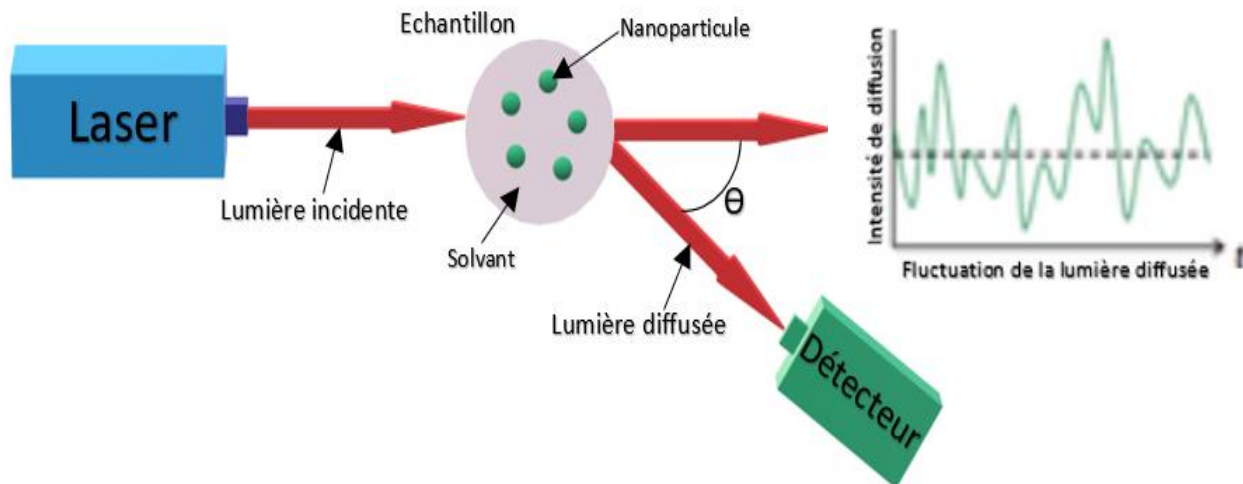


Figure 2.3 Principe de la diffusion dynamique de la lumière (Blessing et Ghestem, 2012).

L'un des avantages majeurs de la DLS est sa rapidité et sa précision pour les suspensions de NPs, permettant de donner une bonne représentation statistique de chaque suspension de NPs-ZrO₂. Les désavantages de la technique viennent de la difficulté d'accéder à des quantifications (Brar et Verma, 2011). De plus, la DLS est sensible à la présence de grosses particules qui peuvent masquer le signal.

Le diamètre hydrodynamique (D_H) des suspensions des NPs-ZrO₂ de 1; 50; 100; 150 et 200 ppm a été analysé aux jours 0 et 7 par DLS après incubation dans le milieu de culture SIS (Liu *et al.*, 2018), à l'aide d'un instrument Zetasizer (Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, UK). Elle est équipée d'un détecteur photodiode à Avalanche (APD) permettant d'obtenir une sensibilité 20 fois supérieure à un photomultiplicateur (PM). L'instrument fonctionne selon les principes de diffusions dynamiques de la lumière. Il est équipé d'un contrôleur de température et permet d'effectuer des mesures de 0°C à 90°C avec une précision de 0.1°C. Pour chaque condition, la mesure du D_H a été effectuée avec trois expériences indépendantes (triplicata).

2.5.4 Mesure du potentiel zêta (ζ)

Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur une dispersion de particule, les particules chargées dans la dispersion se déplacent alors vers l'électrode de polarité opposée. Ce phénomène est appelé électrophorèse. Si un faisceau laser traverse les NPs en solution soumises à l'électrophorèse, la lumière diffusée par les particules en mouvement est décalée en fréquence (Fig. 2.4). La mesure

du décalage de fréquence, permet de déterminer la mobilité électrophorétique ($m^2/V s$), U , en fonction de la longueur d'onde du laser et de l'angle de diffusion. Le PZ est ensuite déduit à partir de la mobilité électrophorétique à l'aide de l'équation de Smoluchowski : $PZ (\zeta) = \mu U/\epsilon$ (Lyklema, 2003), où ϵ est la permittivité électrique du milieu ($C^2/N m^2$).

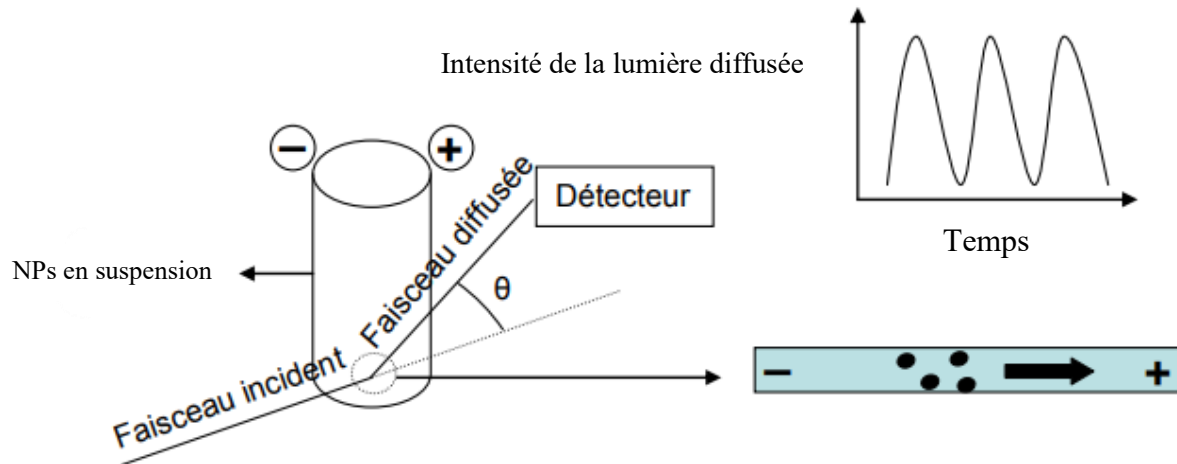


Figure 2.4 Technique de mesure du potentiel zêta, modifié et adapté (El Kass, 2011).

Le PZ des NPs-ZrO₂ (1; 50; 100; 150 et 200 ppm) en suspension dans le milieu de culture SIS ont été mesurés par la méthode de mobilité électrophorétique à l'aide d'un instrument ZêtaPlus (Brookhaven Instruments Corp) et l'acquisition des données a été effectuée par le logiciel Zeta potentiel analyser Ver.5.68. La mesure du ZP a été réalisée au cours de trois expériences indépendantes.

2.5.5 Analyse des propriétés optiques

La spectroscopie d'absorption UV-vis est un outil non destructif permettant d'analyser les propriétés optiques des nanostructures. Les spectres d'absorption des échantillons ont été enregistrés à l'aide du spectrophotomètre d'absorption UV-vis JASCO V-670 en dissolvant des NPs-ZrO₂ dans le milieu de culture SIS à des concentrations de 1 et 200 ppm en utilisant les longueurs d'onde de 600 à 200 nm (Soni *et al.*, 2022). Les cellules utilisées sont en quartz avec un parcours optique de 1 mm. Pour chaque analyse, un blanc a été utilisé. Selon la taille des particules et/ou des agrégats, la diffusion devrait suivre la théorie de Rayleigh. Si les NPs sont bien dispersées,

leur diamètre est beaucoup plus petit que la longueur d'onde de la lumière (Mangla et Roy, 2019). Les mesures ont été réalisées en triplicata pour chaque condition de traitement.

2.5.6 Analyse de la morphologie et composition des NPs-ZrO₂

La microscopie électronique en transmission (MET) combinée à la spectroscopie de rayon X à dispersion d'énergie (SDE ou EDS) est une technique très utilisée pour l'étude des paramètres structuraux et morphologiques des matériaux. Leur résolution couvre une échelle d'observation de quelques nanomètres en mode classique et jusqu'au dixième de nanomètre en mode haute résolution (Zouari, 2018). Cette technique de caractérisation d'un faisceau d'électrons transmis depuis un filament par chauffage et accélérés par une forte tension (≈ 50 jusqu'à 200 kV). Les rayonnements émis rencontrent un échantillon très mince (Kohl et Reimer, 2008). Les interactions entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image de la résolution désirée. La spectroscopie de rayon X à dispersion d'énergie utilise les rayons X caractéristiques générés dans un échantillon irradié par un faisceau d'électrons pour l'identification des éléments chimiques (KARLÍK et JOUFFREY, 2008).

Les analyses MET des NPs-ZrO₂ ont été réalisées au centre de caractérisation des matériaux, le (CM2)² de l'École polytechnique de Montréal à l'aide d'un microscope de la compagnie JEOL, de modèle JEM-2100 F, avec une tension d'accélération de 200 kV afin d'obtenir des images en fond clair avec une résolution de l'ordre de 0,1 nm. Les grilles utilisées sont des films à base de «lacey carbon» sur grille de cuivre. Le détecteur EDS est de la compagnie Oxford et le modèle est TEM Xplore. La caméra pour l'obtention des images en haute résolution est de la compagnie Gatan modèle Ultrascan 1000. L'acquisition des données a été effectuée grâce au logiciel Digital Micrograph, également de la compagnie Gatan. Pour la préparation de l'échantillon des NPs-ZrO₂ pur commercial, une petite quantité de poudre commerciale a été dispersée dans du méthanol et mise dans un bain à ultrasons pendant quelques minutes. Ensuite, la suspension a été transférée sur une grille de Cu à base de «lacey carbon film».

2.5.7 Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une méthode très utilisée pour la caractérisation des matériaux cristallins (Bragg et Williams, 1934). Elle permet d'identifier les phases présentes dans l'échantillon, de déterminer leur structure et d'obtenir leurs paramètres de maille. Chaque structure cristalline est définie par des périodicités de l'arrangement atomiques. En effet, les rayons X sont les plus employés pour l'étude des systèmes cristallisés, car leur longueur d'onde est proche de 1 Å, ce qui correspond à l'ordre de grandeur des distances interréticulaires dans la matière condensée. Selon la loi de Bragg, un faisceau de rayons X incidents de longueur d'onde λ rencontre le matériau analysé (Zouari, 2018). Ce faisceau est réfléchi par les plans atomiques rencontrés d'indice de Miller (h,k,l) sous un certain angle 2θ nommés angle de Bragg. La loi de Bragg définie par l'équation d_{hkl} (Fig. 2.5). $\sin \theta = n\lambda$ relie la position du pic repéré par θ à la longueur d'onde λ du rayonnement incident et à la distance interréticulaire d pour la famille de plans (h.k.l) (Mangla et Roy, 2019).

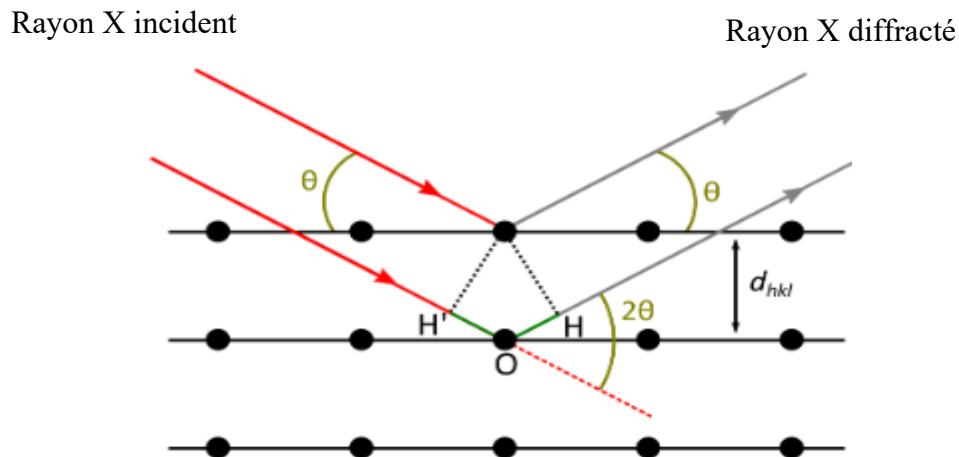


Figure 2.5 Principe de la diffraction des rayons X modifiés de (Zouari, 2018).

Les rayons X diffractés sont ensuite collectés grâce à un détecteur ponctuel ou spatial de rayons X, permettant d'enregistrer un diffractogramme de l'échantillon. L'analyse du diffractogramme obtenu permet d'obtenir des informations sur les paramètres structuraux du matériau étudié ainsi sur sa microstructure (Zouari, 2018).

L'analyse de DRX a été utilisée pour connaître l'état cristallin des NPs-ZrO₂ commerciales. Aucun traitement préalable a été nécessaire. Les NPs ont été déposées sur une lame en verre puis un sur un porte-échantillons. L'appareil utilisé pour la caractérisation des poudres commerciales de NPs-ZrO₂ est un diffractomètre de rayon X, modelé Bruker, D8 Advance, équipé d'une source de cuivre (Cu). L'appareil est équipé d'un autoéchantillonneur à 9 positions (FLIP-STICK), d'un stage XYZ (contrôlé par le logiciel Diffrac measure) et d'une fournaise haute température (HTK 1200N). L'intervalle de mesure est $2\Theta = [10^\circ - 80^\circ]$ avec un pas de 0.02 degré comme résolution et un temps d'intégration de 1 seconde par mesure (Mangla et Roy, 2019). Ces choix de paramètres permettent d'obtenir une meilleure résolution et d'augmenter l'intensité. Le diffractomètre, D8 Advance équipé d'une source de cuivre pour la production des rayons X et d'un détecteur LYNXEYE_XE courbé permettant de suivre les pics en temps réel. Une très faible quantité de poudre de ZrO₂ est suffisante pour effectuer l'analyse et enregistrer le diffractogramme en utilisant un tube capillaire de 0.2 mm de diamètre.

2.5.8 Analyse par spectroscopie Raman et infrarouge

La spectroscopie Raman permet de caractériser la composition moléculaire et la structure externe d'un matériau. Un faisceau de lumière monochromatique est envoyé sur l'échantillon et la lumière diffusée est analysée par un détecteur.

Le rayonnement incident de fréquence ν est très grand par rapport à la transition vibrationnelle ($\nu\nu$). La diffusion de Rayleigh, les photons incidents et réémis ont la même énergie. La diffusion Raman stocke et anti-stockes (Fig 2.6), la fréquence des photons diffusés est décalée par rapport à la fréquence de la lumière excitatrice ($-\nu\nu$) pour la diffusion Raman stockes et de $(+\nu\nu)$ pour la diffusion anti-stockes (Falgayrac, 2006). Une molécule polyatomique possède de nombreux degrés de liberté dont certains sont actifs en infrarouge (s'il y a variation du moment dipolaire) et d'autres en Raman (si variation de la polarisabilité) (Rouessac et Rouessac, 2022). Cependant, la spectroscopie Raman complémentaire de l'IR exploite l'interaction entre la matière et la lumière dont elle modifier légèrement la fréquence. Ce décalage de fréquence entre la lumière incidente et celle qui est réémise permet de retrouver comme dans l'IR les énergies de vibration, donc leur fréquence et quelle que soit la longueur d'onde d'excitation.

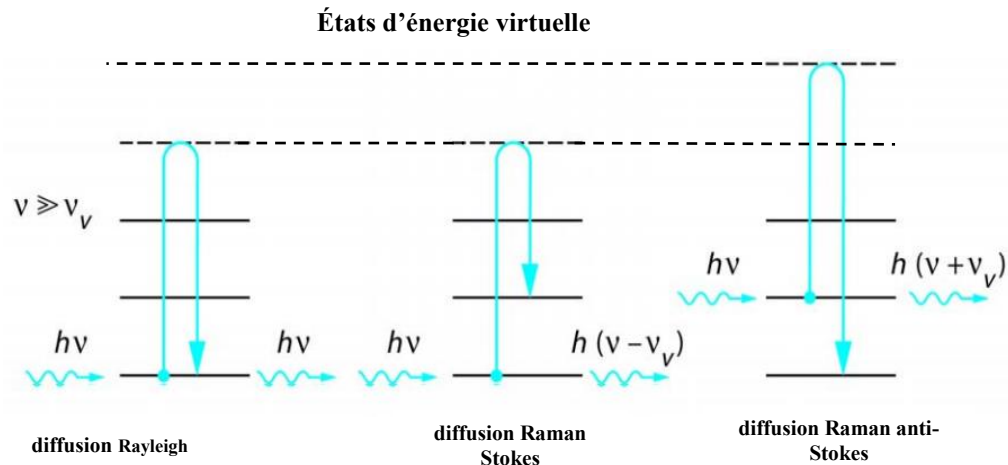


Figure 2.6 Principe de la diffusion Raman (Falgayrac, 2006).

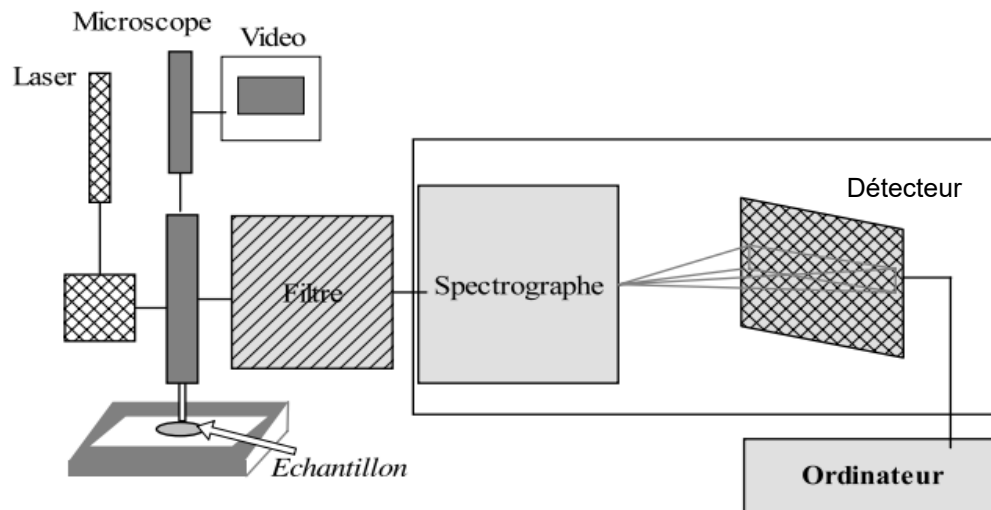


Figure 2.7 Principe d'un spectromètre Raman (Colomban, 2003).

L'objet à analyser (Fig. 2.7) est illuminé par la lumière monochromatique, polarisée d'un laser, la zone analysée étant définie par l'optique d'illumination (microscope longue focale). Le premier étage du spectromètre est un filtre qui élimine la lumière diffusée élastiquement, par diffusion Rayleigh, le second (troisième étage si besoin) permet de projeter et d'étaler le spectre sur le détecteur (Colomban, 2003).

Le microspectromètre Raman comprenant un microscope optique pourvu d'objectifs de grossissements (x5, x20 et x50), couplé d'un spectromètre Raman avec deux sources de lasers

monochromatiques (532 nm et 785 nm) de modèle Reinshaw, inVia Reflex a été utilisé pour l'analyse des NPs-ZrO₂. Ce dernier ne nécessite aucune préparation au préalable. Le microscope Raman est utilisé pour agrandir et identifier les différentes zones de l'échantillon, tandis que le spectromètre Raman diffuse la lumière et mesure les vibrations d'excitation. La mesure a été effectuée avec un laser 532 avec une puissance de 1 % permettant d'avoir plus d'émission sans endommager l'échantillon. Un balayage a été effectué dans un intervalle de 100 à 1000 cm⁻¹ (Raman shift) et un temps d'acquisition de 10 secondes avec un bruit de fond moindre (Bauer, 2018). Les données obtenues grâce au logiciel Wire 5.5 sont traitées en utilisant le logiciel Origine Pro.

2.5.9 Analyse par spectroscopie infrarouge (FT-IR)

Cette technique permet de mettre en évidence la présence de certains groupements fonctionnels et servir de « carte d'identité spectroscopique » pour une molécule ou un matériau (Rouessac et Rouessac, 2022). Dans le domaine du moyen infrarouge (IR), chaque molécule conduit à un spectre qui lui est unique, ce qui permet par exemple d'identifier un composé donné si le spectre IR obtenu est identique au spectre d'un composé déjà connu (Rouessac et Rouessac, 2022).

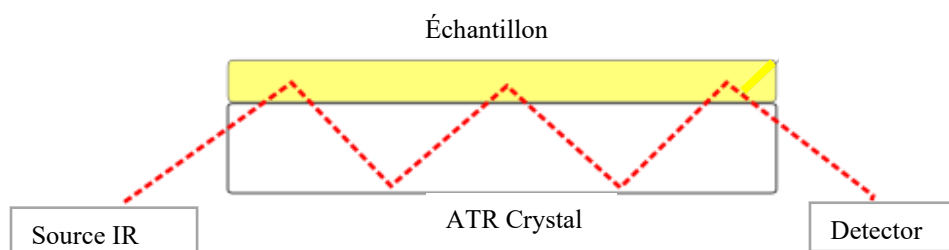


Figure 2.8 Schéma du principe de la spectroscopie infrarouge (FT-IR) avec l'ATR.

La spectroscopie FTIR-ATR (Thermo Scientific, Nicolet 6700 / Smart iTR) a été utilisée pour connaître la présence des groupements fonctionnelle des NPs-ZrO₂ pur commercial (Fig. 2.8). Avant le dépôt de l'échantillon l'analyser, le cristal ATR est nettoyé soigneusement avec de l'isopropane. Pour effectuer la mesure, un balayage dans un intervalle de 525 à 4000 cm⁻¹ de nombre d'onde a été appliqué. L'acquisition des données a été effectuée en utilisant le logiciel OMNIC.

2.6 Expositions de la plante *Lemna minor*

Des solutions de $ZrCl_4$ de 1; 50; 100; 150 et 200 ppm (0,41; 19,60; 39,82; 58,69; 76,52 ppm de Zr) avec 0 ppm comme témoin ont été préparées dans le milieu SIS dans des conditions axéniques à partir de la solution mère de $ZrCl_4$. Les différentes concentrations ont été homogénéisées et soniquées immédiatement avant le début de l'expérience pour retarder la précipitation causée par une forte concentration du métal dissous (Wang, Z. *et al.*, 2021). Un premier test a été effectué pour observer l'effet du $ZrCl_4$ sans ajustement de pH et un deuxième test avec pH réajuster avec du NaOH 0,1 M. Les solutions ont été préparées pour 2 séries de 10 conditions et 2 témoins, avec 3 répétitions (n=3).

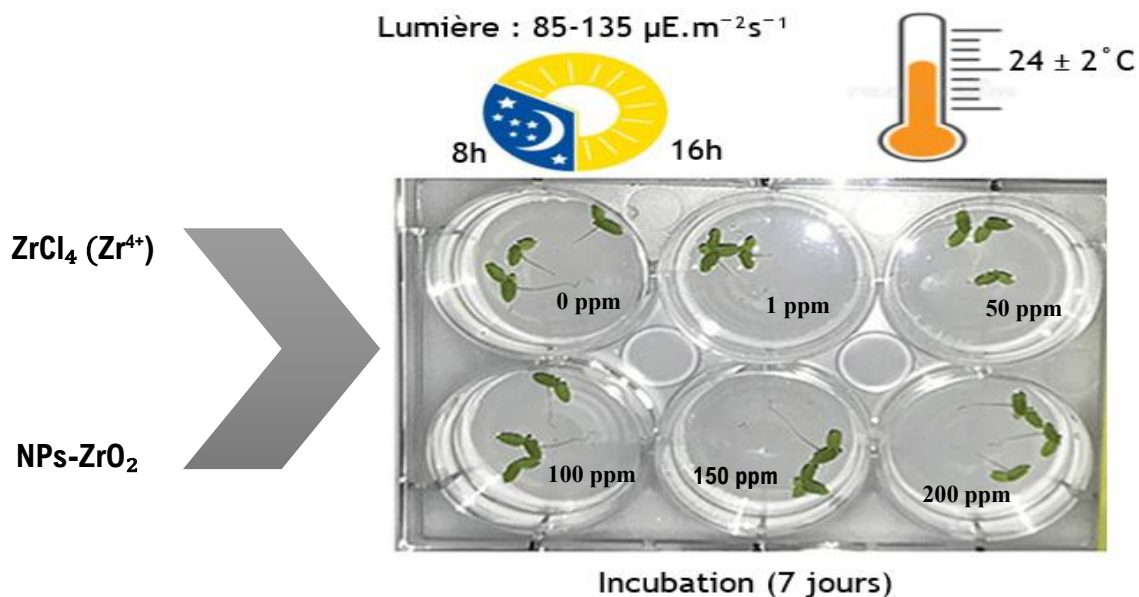


Figure 2.9 Schéma expérimental de l'exposition de *Lemna minor* aux contaminants, modifié de (Kalčíková *et al.*, 2017).

En accord avec les recommandations de l'OCDE 2006 #221, l'analyse est réalisée pendant une période de 7 jours d'exposition. Les plantes *Lemna minor* sont exposées à des concentrations 0 pour le témoin, 1; 50; 100; 150 et 200 ppm de $ZrCl_4$ et des NPs- ZrO_2 (Fig. 2.9). Les erlenmeyers sont ensuite incubés pendant une période d'exposition de 7 jours, sous une température de $24 \pm 2^\circ C$ avec une photopériode de 16 h d'illumination avec une intensité lumineuse de $110 \pm 25 \mu mol$ de photons/ m^2/s et 8 h d'obscurité.

2.7 Mesures et déterminations analytiques

Tout changement affectant le développement des plantes, leur taille, le nombre de frondes et l'aspect des frondes, les signes de nécrose. La présence de matières non dissoutes ou la contamination par d'autres algues ont été également prises en compte pendant l'exposition.

2.7.1 Poids sec

Tous les individus ont été prélevés et rincés avec de l'eau déionisée, puis ils ont été déposés sur un papier buvard pour absorber l'excès d'eau. Un séchage dans un four à 60°C a été appliqué, permettant d'atteindre un poids constant. Le poids sec est exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg.

2.7.2 Détermination de l'inhibition de la croissance

Pour chaque condition d'essai, le taux de croissance spécifique moyen de la population a été calculé comme l'augmentation logarithmique du poids frais mesuré (y compris les racines), en utilisant la formule suivante selon les directives de l'OCDE 2006 #221.

$$\mu_{i-j} = [\ln(N_j) - \ln(N_i)]/7$$

Dans l'équation, μ_{i-j} représente le taux de croissance spécifique moyen de i à j , N_i est la variable mesurée pour chaque condition au temps i (jour 0) et j (jour 7), et t est le temps de i à j (7 j).

Le taux d'inhibition de la croissance (I_r , en pourcentage) a été calculé à l'aide de la formule suivante et selon les directives de l'OCDE 2006 #221.

$$I_r = [(\mu_C - \mu_T)/\mu_C] \times 100$$

Les variables μ_C et μ_T sont, respectivement, le taux de croissance spécifique pour les conditions de contrôle et de traitement.

2.7.3 Bioaccumulation du Zr

Pour déterminer la teneur en zirconium dans la biomasse végétale, la population de chaque condition (ZrCl₄ et NPs-ZrO₂) a été collectée, et l'humidité absorbée à la main. Ensuite, le poids sec a été mesuré comme précédemment (voir section 2.7.1), et les échantillons ont été homogénéisés dans l'obscurité avec 2 mL d'eau nanopure et du sable d'Ottawa à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Pour la digestion de la biomasse, les homogénats ont été digérés dans 2 mL de HNO₃ à 70% sur un bain de sable à 90 °C pendant 6 h jusqu'à évaporation complète de l'acide (Jmii et Dewez, 2021). Les culots seront solubilisés avec 5 mL de HNO₃ à 5% (pureté 70 % ; Fisher) pendant 16 h avant l'analyse par l'ICP-OES 5100. Les plantes utilisées ont été lavées avec de l'EDTA pour éliminer toute trace de métal et de NPs à la surface de la plante. Permettant de déterminer avec précision le Zr bioaccumulé par *Lemna minor*.

2.8 Effets des NPs-ZrO₂ et du Zr bioaccumulé par la plante

2.8.1 Dosage des thiols totaux

Le colorant «Thiol Tracker» violet a été utilisé pour estimer le niveau cellulaire de GSH réduit (Mandavilli et Janes, 2010). Une solution mère de «Thiol Tracker» a été préparée dans du DMSO puis diluée dans du tampon phosphate salin (PBS) pour obtenir une concentration de travail à 20 µM. Après le traitement aux ZrCl₄ et NPs-ZrO₂, les plantes entières (frondes et racines) ont été retirées du milieu d'incubation, puis déposées dans une plaque à 96 puits. Les plantes ont été incubées avec 100 µL de colorant Thiol Tracker pendant 10 minutes dans des conditions d'exposition de *Lemna minor* établies par #221-OCDE, 2006. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un lecteur de microplaques, modèle Tecan, Infinite M200. La longueur d'onde d'excitation était de 404 nm et 526 nm pour l'émission.

2.8.2 Dosage des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène ont été mesurées à l'aide des réactifs «CellROX». Le CellROX vert est un colorant de l'ADN qui après oxydation se lie à l'ADN. Son signal est localisé principalement dans le noyau et dans les mitochondries. En revanche, les signaux des réactifs CellROX orange sont localisés dans le cytoplasme. Les plantes collectées (frondes et racines) sont

incubées pendant 30 min avec 5 μ M des réactifs fluorescents à 37 °C. Les longueurs d'onde respectives d'excitation et d'émission étaient 545/565 nm pour le CellROX orange et 485/520 nm pour le CellROX vert (Jmii et Dewez, 2021). Avant les mesures, les plantes ont été lavées 3 fois au PBS à température ambiante et l'émission de fluorescence relative a été mesurée en utilisant un lecteur microplaques de marque Tecan et modèle Infinte M200.

2.8.3 Dosage des pigments photosynthétiques

L'analyse a été réalisée en prélevant 100 mg de matière fraîche (frondes et racines) broyée dans un mortier contenant du sable 12,5 mL d'acétone 80 % et une pincée de carbonate de calcium pour permettre de neutraliser l'acide des vacuoles. Le mélange obtenu a été centrifugé à 4500 tours/minute pendant 10 minutes à température ambiante. La mesure a été effectuée à l'aide du lecteur microplaques de marque Tecan, modèle Infinte M200 en utilisant la longueur d'onde 663 nm et 645 nm pour blanc l'acétone à 80 %. Pour extraire les pigments de *Lemna minor*, la méthode utilisée repose sur les équations de Lichtenthaler et Bushman (Sumanta *et al.*, 2014). La quantité de pigment a été calculée à l'aide des équations suivantes.

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mL}) = 12,25 * A_{663} - 279 * A_{645}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mL}) = 21,5 * A_{645} - 5,1 * A_{663}$$

$$\text{Chl t } (\mu\text{g/mL}) = 8,02 * A_{663} + 20,20 * A_{645}$$

2.9 Impact des NPs-ZrO₂ sur la structure de *Lemna minor* : observation par MEB des racines et frondes de la plante et détection des ions Zr⁴⁺ par EDS

La microscopie électronique à balayage est une technique basée sur le balayage de particules nanométriques à l'aide d'électrons à haute énergie dans des conditions de vide (Joshi *et al.*, 2021). Elle est équipée d'un spectromètre de rayon X fonctionnant par dispersion d'énergie (EDS). L'impact d'un faisceau d'électrons avec la matière provoque l'émission de rayons X. Cette émission est détectée et dispersée en énergie, ainsi les spectres obtenus sont caractéristiques des éléments chimiques présents dans l'échantillon (Falgayrac, 2006).

L'analyse de la structure superficielle et de l'ultrastructure des plantes exposées aux NPs-ZrO₂ a été réalisée au centre de caractérisation des matériaux (CM2)² de l'École polytechnique de Montréal. Un microscope électronique à balayage à émission de champ de marque JEOL, modèle JSM-7600TFF, muni d'un détecteur X-Max (OXFORD instruments) avec une résolution de l'ordre du µm couplé à EDS a été utilisé. Les plantes ont été séchées dans un four à 60 °C jusqu'à évaporation complète de l'eau et un vide maximal a été appliqué. Les plantes ont été fixées et immobilisées sur une couche de carbone. Avant l'analyse des dépôts ont été effectués par la technique de «Coating » à l'aide d'un appareil Quorum de model (Q150T Plus) pour une durée de 7 minutes (<http://www.quorumtech.com>).

2.10 Analyses statistiques

Les moyennes et écarts-types ont été déterminés pour n=6. Le test d'analyse de variance à sens unique «one-way ANOVA» a été effectué grâce au logiciel Graph Pad prism version 8.0.2. Les traitements et le contrôle ont été comparés avec le test post-hoc de Tukey HSD (Honestly Significant Difference). Dans la présentation des résultats, les différentes lettres sont utilisées pour indiquer une différence significative entre les conditions de traitement avec p inférieur à 0,05.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Lors de ce projet de maîtrise, nous avons élucidé les mécanismes de toxicité du $ZrCl_4$, des ions Zr^{4+} et les NPs- ZrO_2 en utilisant *Lemna minor* comme modèle d'étude. Pour répondre à notre hypothèse : le mécanisme de toxicité du $ZrCl_4$ différent de celui des NPs- ZrO_2 . Nous avons caractérisé les propriétés physico-chimiques du $ZrCl_4$ et des NPs- ZrO_2 dans un premier temps. Les effets du $ZrCl_4$ et du pH ont été présentés en annexe pour mieux corroborer nos résultats sur le potentiel toxique du $ZrCl_4$ chez *Lemna minor*. Pour bien comparer la toxicité chez la plante à la suite de la bioaccumulation du Zr et à l'exposition aux NPs- ZrO_2 , différents biomarqueurs ont été utilisés. Le poids sec a été utilisé pour déterminer l'inhibition de croissance, ce qui a permis de déduire le EC_{50} et le stress oxydatif. Les mécanismes de défense et les teneurs en Chl *a*, *b* et *t* ont été mesurés pour chaque espèce chimique de Zr. Enfin nous avons observé l'effet d'adhérence des NPs- ZrO_2 sur les frondes et racines de *Lemna minor*. L'ensemble des résultats font référence à des valeurs obtenues pour différentes concentrations du $ZrCl_4$ et des NPs- ZrO_2 choisies en ppm dans le milieu SIS.

3.1 Caractérisation physico-chimique des deux espèces chimiques

3.1.1 Dissolution du $ZrCl_4$

Tableau 3.1 La fraction soluble de Zr libres après 24 h. Les valeurs rapportées sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Espèce chimique	Concentration d'exposition (ppm)				
	1	50	100	150	200
$ZrCl_4$					
Zr^{4+}	$0,41 \pm 0,00$	$19,60 \pm 0,02$	$39,82 \pm 0,34$	$58,69 \pm 0,12$	$76,52 \pm 0,28$

L'analyse quantitative par ICP-OES en utilisant la longueur d'onde 343,823 nm de la dissolution du $ZrCl_4$ à différentes concentrations dans le milieu SIS à pH (6,5) montrait la présence d'environ 40 % du Zr libres. Une baisse du pH due au chlore présent majoritairement entre 60,2-61,5 % selon le fournisseur (Tableau 3.1) a été observé.

3.1.2 Spéciation du Zr dans le milieu SIS

Tableau 3.2 Spéciation du Zr dans le milieu SIS.

Espèces	Concentration nominale de Zr (ppm)				
	0,41	19,6	39,82	58,69	76,52
Zr ⁴⁺	0	0	0	0	0
Zr(OH) ₅ ⁻	0,00	0,02	0,03	0,05	0,06
Zr(OH) ₄ (aq)	0,40	19,50	39,69	58,53	76,34
ZrEDTA (aq)	0,01	0,08	0,10	0,11	0,11

L'estimation de la spéciation du Zr en solution a montré que la composition chimique du milieu SIS entraînait la présence de différentes formes ou espèces chimiques du Zr, et que leurs concentrations étaient dépendantes de la concentration nominale du Zr (Tableau 3.2). En particulier, la présence du Zr(OH)₄ (aq) et du ZrEDTA (aq) était prédominante et évolutive en fonction de la concentration de Zr libre. L'EDTA agissait comme un tampon pour les éléments traces ioniques dans le milieu ainsi que pour l'ion Zr⁴⁺, contrôlant leur disponibilité pour les plantes.

3.1.3 Fraction soluble des NPs-ZrO₂

Tableau 3.3 Fraction soluble de Zr. Les valeurs rapportées sont exprimées en moyenne ± écart-type.

NPs-ZrO ₂ (ppm)	J ₀	J ₇
	Zr ⁴⁺ (ppm)	Zr ⁴⁺ (ppm)
1	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00
50	1,38 ± 0,06	0,25 ± 0,01
100	2,75 ± 0,07	0,22 ± 0,01
150	0,91 ± 0,01	0,49 ± 0,01
200	1,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01

La dissolution des NPs-ZrO₂, montre une faible fraction de Zr⁴⁺ libres dans le milieu de culture (environ 2 % après 24h et environ 1 % aux jours 7) (Table 3.3). Donc faible solubilité des NPs-ZrO₂ dans les milieux aqueux.

3.1.4 Diffusion dynamique de la lumière et potentiel zêta des NPs-ZrO₂

Tableau 3.4 Diamètre hydrodynamique (D_H) et potentiel Zêta (ZP) des NPs-ZrO₂ en fonction de la concentration dans le milieu SIS à pH 6,5 durant l'incubation (J₀ et J₇). Les valeurs rapportées sont exprimées en moyenne ± écart-type.

NPs-ZrO ₂ (ppm)	J ₀		J ₇	
	D _H (nm)	ZP (mV)	D _H (nm)	ZP (mV)
1	115 ± 22	- 32,52 ± 1,00	168 ± 39	- 36,39 ± 1,31
50	255 ± 177	- 27,17 ± 0,63	144 ± 68	- 34,24 ± 1,74
100	421 ± 358	- 26,39 ± 0,91	188 ± 97	- 36,29 ± 0,86
150	339 ± 323	- 26,93 ± 0,70	151 ± 35	- 35,98 ± 2,71
200	785 ± 372	- 26,92 ± 0,78	148 ± 59	- 35,38 ± 1,75

Les mesures granulométriques obtenues à partir de la diffusion dynamique de la lumière (table 3.4) ont indiqué que le diamètre médian de la distribution granulométrique était de 115 ± 22 nm à 1 ppm et que les NPs-ZrO₂ avaient un potentiel zêta moyen de -32,52 ± 1 mV au jour (J₀). À de forte concentration, le diamètre hydrodynamique augmente sous l'effet de la concentration des suspensions des NPs dissous (Noël, 2013) et correspond à 785 ± 372 nm à 200 ppm. Ces derniers avaient un potentiel ζ de -26,92 ± 0,78 mV.

Les diamètres primaires augmentent de 115 à 785 nm et sont supérieurs aux tailles primaires annoncées (≤ 100 nm). Cela implique que les NPs-ZrO₂ se sont agglomérés en fonction de la concentration dissoute dans le milieu de culture (SIS). Cependant aux jours 7 de l'incubation, le diamètre médian à différentes concentrations était de 160 ± 60 nm et les NPs avaient un potentiel ζ moyen de -35,66 ± 1,67 mV. Donc les NPs-ZrO₂ se sont fortement agglomérées puis sédimenté. Le diamètre hydrodynamique pour chaque condition au jour 7 est moins impacté, les NPs en suspension étaient de petits agglomérats qui avaient sensiblement le même diamètre hydrodynamique proche du diamètre primaire annoncé par le fournisseur et les gros agglomérats

ont sédimenté. L'augmentation du potentiel ζ au cours de l'incubation montre que les NPs en suspension ont de fortes réactivités de surface quand elles sont moyennement agglomérées. Ce phénomène est en lien direct avec la taille des NPs en suspension (Ricaud, 2018). Ricaud a rapporté que l'augmentation de la taille des particules réduit le nombre d'atomes de surface. Plus le diamètre hydrodynamique décroît plus le rapport surface / volume augmente (Ricaud, 2018) et par conséquent le potentiel ζ augmente.

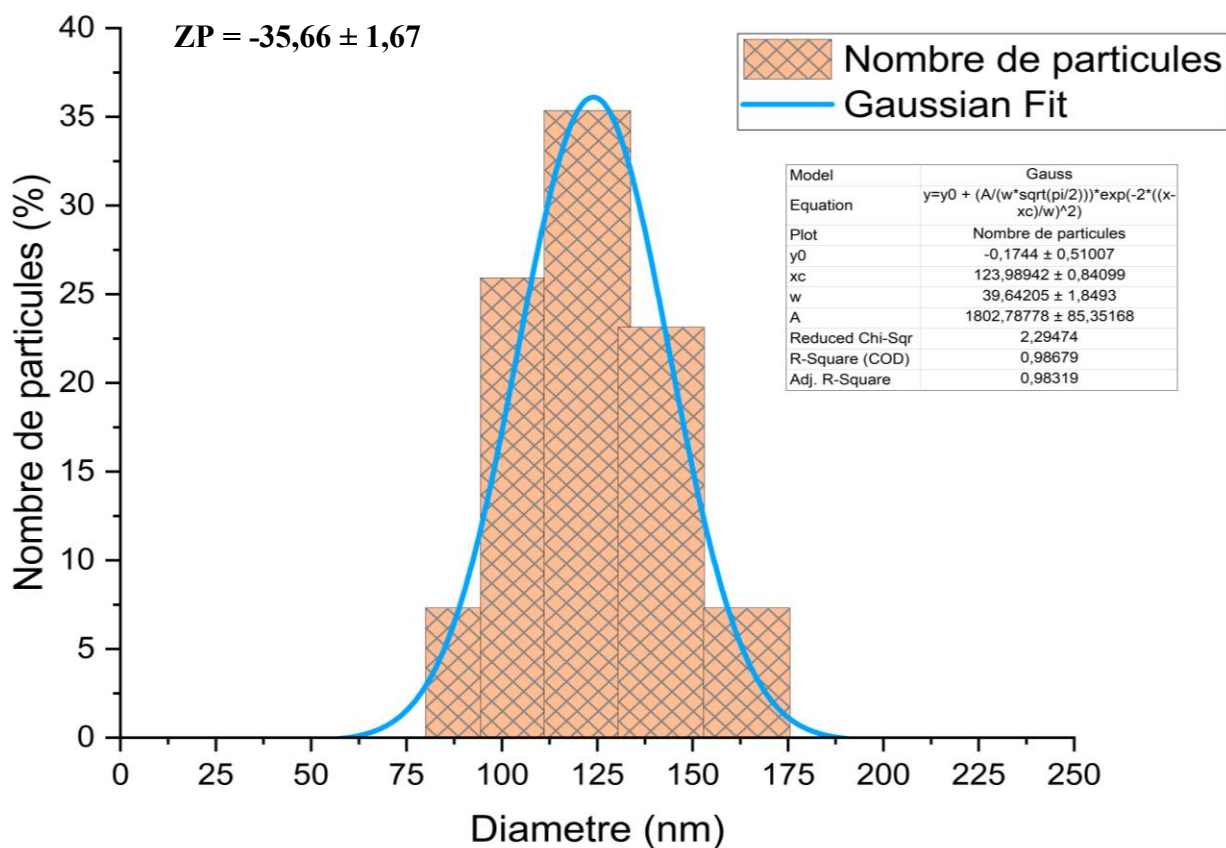


Figure 3.1 Distribution granulométrique des NPs-ZrO₂ dans le milieu de culture SIS.

La dissolution à faible concentration des NPs-ZrO₂ permet de constater que le diamètre médian des NPs était de 124 nm (Fig. 3.1) ce qui est légèrement supérieur au diamètre primaire annoncé. Les NPs-ZrO₂ ont une forte réactivité de surface avec un potentiel ζ de $35,66 \pm 1,67$ mV. Ces résultats suggèrent que le mélange des NPs n'a pas formé de complexes colloïdaux stables dans le milieu de culture SIS. Ces derniers ont tendance à s'agglomérer sous l'effet de la concentration et favorisent leurs sédimentations dans le milieu aquatique comme le montrent les résultats (tableau 3.4). Au

cours de l'expérience de 24 heures, il a également été remarqué que l'ion Zr^{4+} dissous était très faible ($\approx 1\%$) (tableau 3.3).

3.2 Analyse TEM et EDS des NPs-ZrO₂

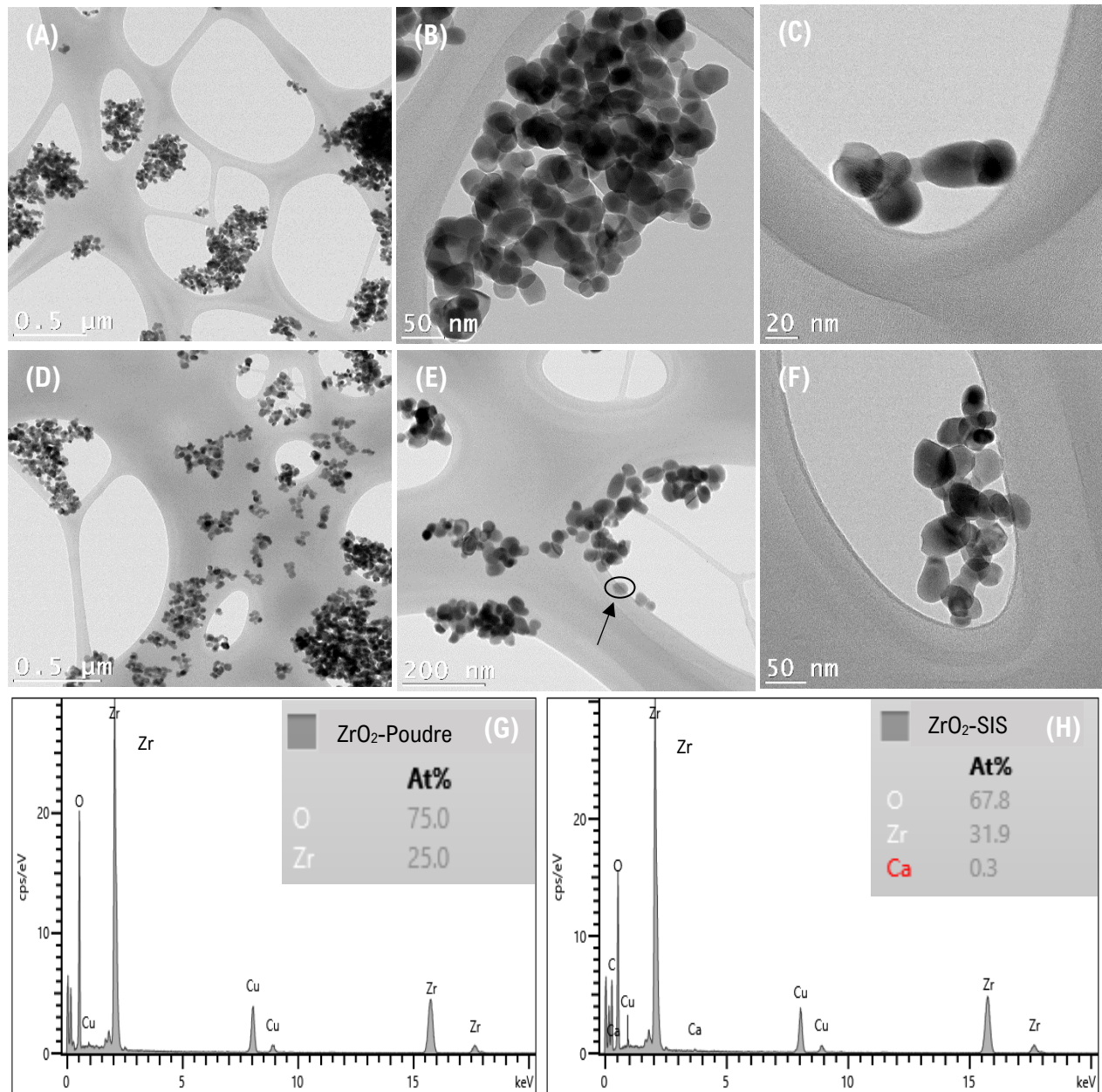


Figure 3.2 Caractérisation par TEM et EDS des NPs-ZrO₂. (A, B, C) image TEM des NPs-ZrO₂ pur commercial et (D, E, F) image TEM des NPs-ZrO₂ après dissolution dans le milieu culture SIS. (G) analyse EDS ainsi que la composition élémentaire en pourcentage (%) atomique (At) avant et (H) après dissolution des NPs dans le milieu SIS. La barre blanche est de 0,5 μm, 200 nm, 50 nm et 20 nm. Le Cu (cuivre) et C (carbone) présents dans les spectres EDS proviennent de la grille composée de Cu et des films en «lacey carbon» utilisés lors de l'analyse. Le Ca (calcium) provient probablement du milieu SIS.

Les images TEM démontrent que les NPs-ZrO₂ utilisées dans cette étude étaient des particules sphériques et fortement agrégées à un certain endroit de façon dispersive. La dissolution des NPs-ZrO₂ dans le milieu de culture SIS à pH (6,5) ne modifie pas la morphologie des NPs, cependant on observe la formation de plusieurs agrégats (figure 3.2.D.E.F). La composition en At (%) du Zr augmente légèrement et une faible baisse de O en At (%) dans le milieu SIS (H) comparé à la composition en At (%) du ZrO₂ pur commercial (G). Le Zr détecté entre 2 et 2,5 keV est la signature de ZrO₂ monoclinique (Brown *et al.*, 2005). Le Zr à (15,5 et 17,5) keV montre la signature de ZrO₂ en phase tétragonale (Brown *et al.*, 2005), ceci est dû à des impuretés lors de la synthèse du matériau.

3.2.1 Absorption dans l'ultra-violet des NPs-ZrO₂

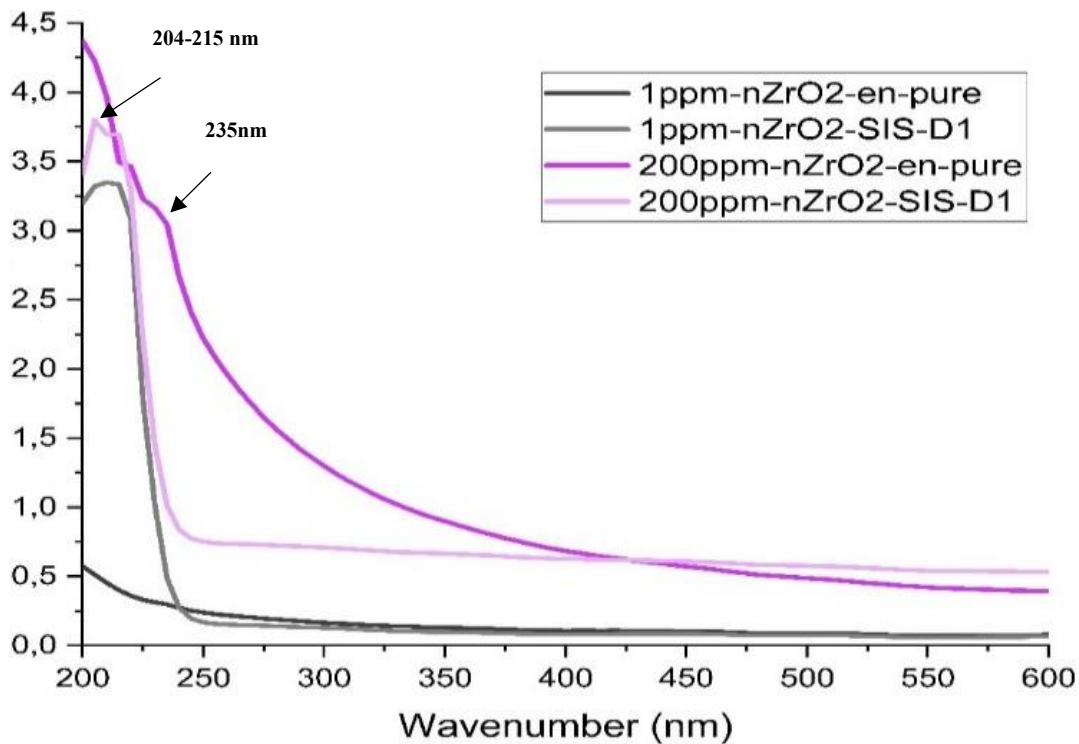


Figure 3.3 Spectres d'absorption UV-Vis des NPs-ZrO₂ pur commercial dans l'eau nanopure et dans le milieu SIS à 1 et 200 ppm respectivement.

Afin d'étudier la réponse optique des NPs-ZrO₂ préparées, les spectres d'absorption UV-vis ont été enregistrés dans la gamme de longueurs d'onde de 200 à 600 nm. La figure 3.3 illustre les spectres d'absorbance obtenus à partir des mesures UV-Vis. Les spectres montrent le pic d'absorption faible

et large à une longueur d'onde d'environ 200 nm à 350 nm pour NPs-ZrO₂ pur commercial et à environ 200 à 250 pour les NPs-ZrO₂ dans le milieu SIS. L'analyse des spectres UV-Vis des NPs commerciales permet d'observer un pic à 235 nm. Cependant, les NPs dans le milieu SIS montre un pic entre 204 et 215 nm. Ceci montre une légère modification des propriétés des NPs-ZrO₂ dans le milieu de culture SIS. La transition entre la bande de valence et la bande de conduction peut provoquer de telles observations (Soni *et al.*, 2022). Cependant, le pic d'absorption pour les NPs-ZrO₂ pur commercial dans le domaine ultraviolet est à une énergie plus élevée en comparaison avec les suspensions de NPs-ZrO₂ dans le milieu SIS. La faible absorption dans l'UV proche et dans le domaine visible serait due à une transition impliquant des états extrinsèques, tels que des états pièges de surface, des défauts ou des polluants (Soni *et al.*, 2022).

3.2.2 Analyse XRD des NPs-ZrO₂

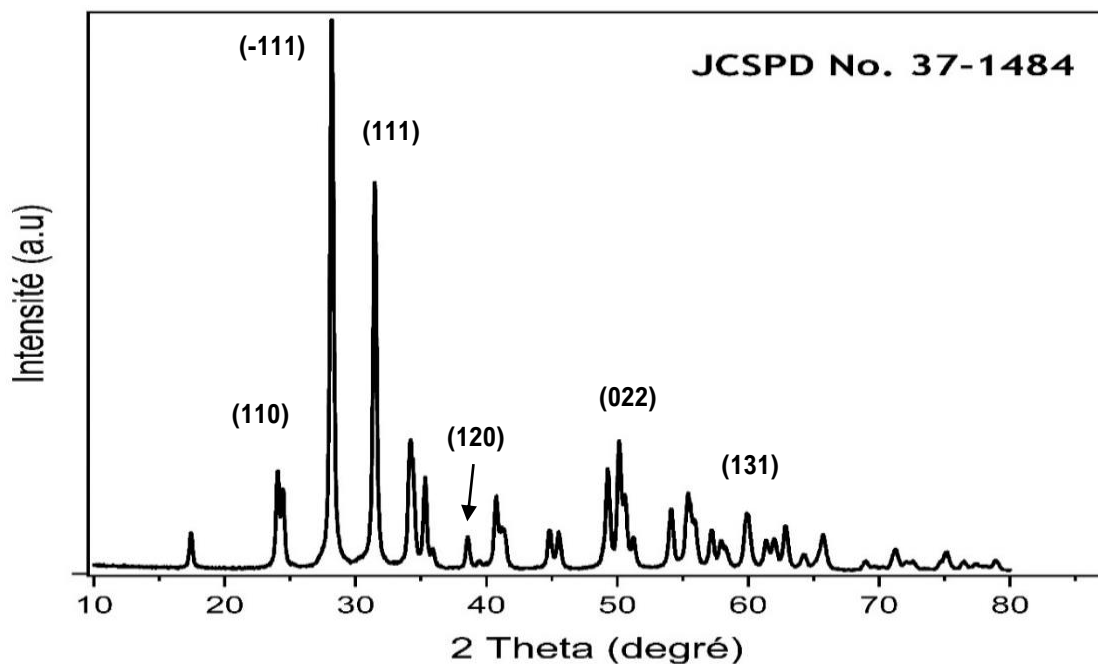


Figure 3.4 Spectre XRD des NPs-ZrO₂.

Les pics de diffraction de rayon X confirment la formation de la phase monoclinique et correspondent bien au JCSPD No. 37-1484 (Mangla et Roy, 2019). Le diagramme XRD de la figure 3.4 présente des pics de diffraction cristalline à des valeurs de 2θ de 24,04°, 28,17°, 31,46°, 38,54°, 51,11° et 59,77° correspondant respectivement à [110], [-111], [111], [120], [022] et [-111]. Des pics très fins ont été observés, ce qui indique la taille très fine des cristallins.

3.2.3 Spectroscopie Raman des NPs-ZrO₂

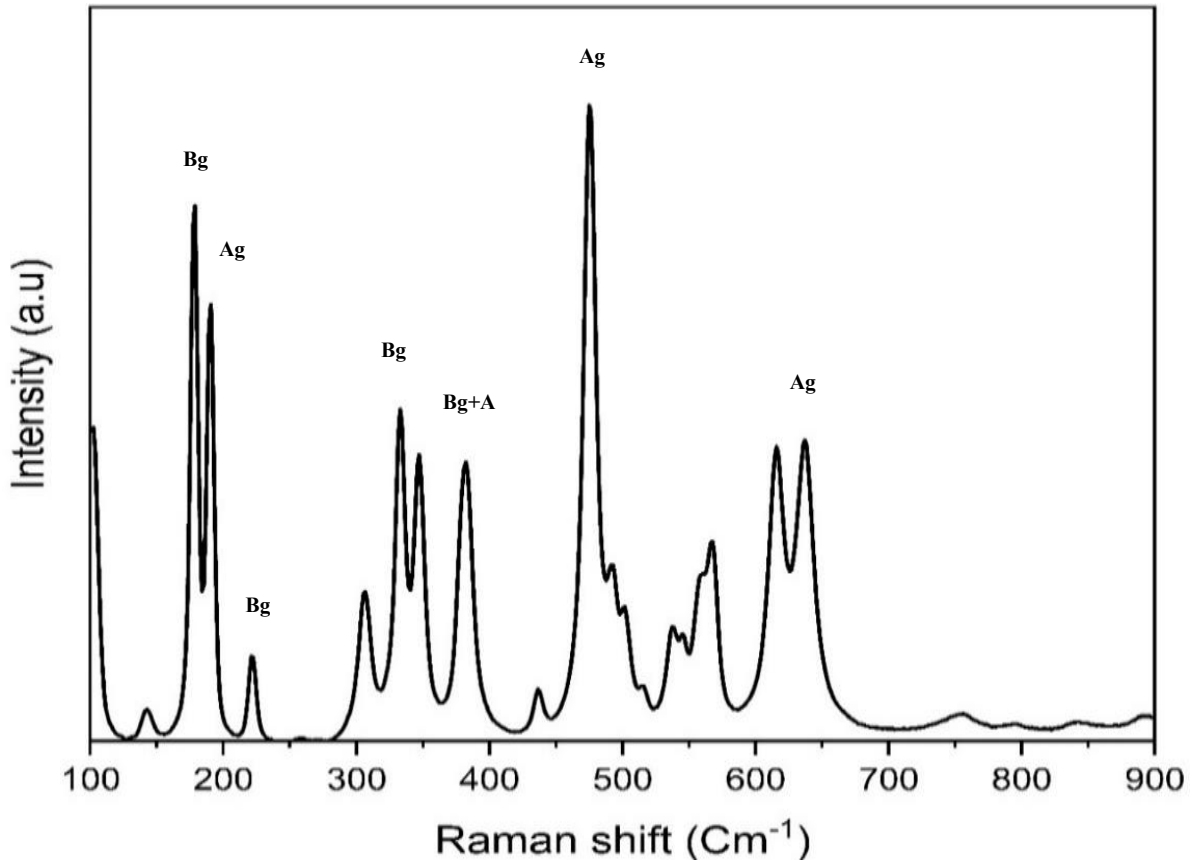


Figure 3.5 Spectre Raman des NPs-ZrO₂.

Le logiciel Wire 5.5 avec une excitation de 532 nm a été utilisé pour analyser les NPs-ZrO₂ monocliniques. La puissance du laser a été maximisée à 100 % et les acquisitions durent à 10 s. Les spectres obtenus correspondent très bien à ceux trouvés dans la littérature (Fig. 3.5) et les symétries des modes de phonons actifs Raman observés ont été attribués à (Zhao, X. et Vanderbilt, 2002). Le couple 178-191 cm⁻¹ (Bg-Ag), 222 cm⁻¹ (Bg), 333 cm⁻¹ (Bg), 382 cm⁻¹ (Ag + Bg), 475 cm⁻¹ (Ag) et 637 cm⁻¹ (Ag). La Figure de l'annexe (C) représente le spectre FT-IR des nanoparticules de ZrO₂ dans la gamme de 500-4000 cm⁻¹. Il a été réalisé pour établir la structure moléculaire et la présence de groupes fonctionnels adsorbés par l'échantillon de NPs-ZrO₂. Différentes liaisons ont été trouvées aux différents nombres d'onde (cm⁻¹). Le tracé montre des pics d'absorption forts et nets à 667,81 cm⁻¹ et 745,42 cm⁻¹ dû à la vibration Zr-O, ce qui indique la formation de Zr-O. Le large pic d'absorption dans la région de 1634,65 cm⁻¹ correspond à la liaison C=C (acide carboxylique), les pics à 2161,63 cm⁻¹ et à 2036,21 peuvent être dû à l'eau

absorbée. Le pic à 3383,93 cm^{-1} est lié à l'étirement des groupes O-H, qui est une caractéristique des composés hautement hydratés.

Tableau 3.5 Résumé des propriétés physico-chimiques des NPs-ZrO₂.

NPs	Morphologie	Phase cristalline	Taille primaire	D _H (nm)	ZP (mV)	Surface spécifique (m ² /g)
ZrO ₂	Sphérique	Monoclinique	≤ 100	123	-32,52	25

3.3 Effet du Zr bioaccumulé et des NPs-ZrO₂ sur la croissance

Tableau 3.6 Changement des paramètres biologiques de *Lemna minor* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations du ZrCl₄ et des NPs-ZrO₂. Les résultats représentent les moyennes de 3 répétitions avec 2 répliqua chacune (n=6). Les différentes lettres sont utilisées pour indiquer une différence significative entre le témoin et les concentrations de traitement.

Paramètre	Espèces Zr	Control	1 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
Nominal Zr ⁴⁺ (ppm)	ZrCl ₄	0,00 ± 0,00	0,41 ± 0,01	19,60 ± 0,02	39,80 ± 0,34	58,69 ± 0,12	76,52 ± 0,28
	NPs-ZrO ₂	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00	1,38 ± 0,06	2,75 ± 0,07	0,91 ± 0,01	1,05 ± 0,01
pH (J ₀ -J ₇)	ZrCl ₄	6,50 ± 0,02	6,53 ± 0,03	6,54 ± 0,04	6,44 ± 0,05	6,39 ± 0,10	6,46 ± 0,04
	NPs-ZrO ₂	6,50 ± 0,02	6,50 ± 0,00	6,54 ± 0,05	6,52 ± 0,03	6,53 ± 0,04	6,52 ± 0,02
Bioaccumulation (µg/mg de DW) (J ₀ -J ₇)	ZrCl ₄ (Zr ⁴⁺)	0,00 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,05 ^a	2,86 ± 0,68 ^a	6,50 ± 0,77 ^b	13,63 ± 1,79 ^c	14,89 ± 0,40 ^d
	NPs-ZrO ₂	0,00 ± 0,00 ^a	0,01 ± 6E-04 ^a	0,03 ± 1E-03 ^a	0,01 ± 3E-04 ^a	0,02 ± 6E-04 ^a	0,04 ± 9E-04 ^a
Croissance (J ₀ -J ₇)							
DW (mg)	ZrCl ₄	11,07 ± 0,03 ^a	10,99 ± 0,09 ^a	10,54 ± 0,09 ^a	6,15 ± 0,40 ^b	4,10 ± 0,10 ^c	3,41 ± 0,11 ^d
	NPs-ZrO ₂	11,07 ± 0,03 ^a	10,85 ± 0,03 ^a	10,67 ± 0,11 ^a	9,79 ± 0,20 ^a	8,33 ± 0,16 ^b	6,79 ± 0,09 ^c
TCSM (par jour)	ZrCl ₄	0,28 ± 3E-04 ^a	0,28 ± 1E-03 ^a	0,28 ± 1E-03 ^a	0,20 ± 1E-02 ^b	0,14 ± 4E-03 ^c	0,11 ± 5E-03 ^d
	NPs-ZrO ₂	0,28 ± 3E-04 ^a	0,28 ± 4E-04 ^a	0,28 ± 1E-03 ^a	0,27 ± 3E-03 ^a	0,25 ± 3E-03 ^b	0,21 ± 2E-03 ^c
Inhibition de croissance (%)	ZrCl ₄	0,00 ± 0,00 ^a	0,37 ± 0,01 ^a	2,40 ± 0,01 ^b	29,79 ± 0,04 ^c	50,12 ± 0,01 ^d	59,02 ± 0,02 ^d
	NPs-ZrO ₂	0,00 ± 0,00 ^a	0,94 ± 0,01 ^a	1,74 ± 0,01 ^a	6,11 ± 0,01 ^b	10,77 ± 0,01 ^c	24,67 ± 0,01 ^d

Lorsque les plantes ont été exposées pendant 7 jours à 1; 50; 100; 150 et 200 ppm $ZrCl_4$ et NPs- ZrO_2 respectivement, la bioaccumulation du Zr^{4+} dans la biomasse végétale était corrélée à la concentration nominale de Zr^{4+} (tableau.3.6). Les résultats ont également montré un lien entre l'augmentation de l'inhibition de la croissance (%) et l'augmentation de la teneur en Zr^{4+} dans la biomasse végétale (table. 5.6). La bioaccumulation du Zr à 13,63 $\mu g/mg$ de DW a provoqué une inhibition de la croissance de 50,12 % (tableau.3.6) et une diminution de la taille des racines a été observée. Dans les conditions de pH non ajusté (Annexe D.A1), à partir de 100 ppm du $ZrCl_4$ l'inhibition de croissance était de 100 % et la taille des racines à diminuer considérablement entraînant la mort de la plante après 48 h d'exposition. L'augmentation de la concentration du $ZrCl_4$ à entraîner une forte baisse du pH ce qui explique l'effet d'inhibition du Zr combiné à la baisse de pH sur la croissance des plantes. De plus, la diminution de la valeur du pH augmente la toxicité, ceci implique que la toxicité des ions (Zr^{4+}) issue de la dissolution du $ZrCl_4$ (Annexe D. C1) était associée à la variation du pH. Un pH bas pourrait inhiber l'absorption de macroéléments tels que le phosphore. Ces derniers ont été couplés avec des ions métalliques (Lüderitz et Nicklisch, 1989). Ainsi, le pH est un facteur important affectant la toxicité des ions (Zr^{4+}) pour les algues (Wang, Z. *et al.*, 2021). Cependant, les études précédentes n'ont pas élucidé les mécanismes de toxicité du Zr^{4+} pour *Lemna minor*. Dans la présente étude, nous avons testé les effets du Zr^{4+} dans une gamme de concentrations 1; 50; 100; 150 et 200 ppm, et nous avons déterminé une CE_{50} pour l'inhibition de la croissance de *Lemna minor* basée sur le poids sec. Par conséquent, ce paramètre de croissance représente un biomarqueur sensible de la toxicité de Zr^{4+} pour *Lemna minor*. L'accumulation de Zr^{4+} dans les plantes de *Lemna minor* exposées aux NPs- ZrO_2 a été analysée quantitativement en mesurant la teneur totale en Zr^{4+} (Tableau.3.6). La teneur totale en Zr dans les plantes traitées avec 1; 50; 100; 150 et 200 ppm de NPs- ZrO_2 était très négligeable. Ce qui pourrait s'expliquer par une faible solubilité NPs- ZrO_2 en milieu aqueux.

Ces résultats indiquent que la quantité Zr^{4+} absorbée dans les cellules végétales reste très faible due à une faible solubilité des NPs- ZrO_2 . La quantité de Zr^{4+} analysée par ICP-OES est inférieure à la limite de détection de l'appareil. La fraction soluble du Zr^{4+} est très faible et s'explique par une faible surface spécifique de 25 m^2/g des NPs- ZrO_2 en solution aqueuse. Il est fort probable que l'inhibition de la croissance provienne directement du stress causé par le contact des nanoparticules avec la plante, comme l'indique l'inhibition de la croissance 10,77 % de *Lemna minor* et dépende

de la concentration des NPs-ZrO₂ en suspension durant l'exposition. La stabilité de la dispersion des NPs pourrait jouer un rôle important pour régir leurs effets toxicologiques (Chen *et al.*, 2018).

3.3.1 Effet sur la production des ROS

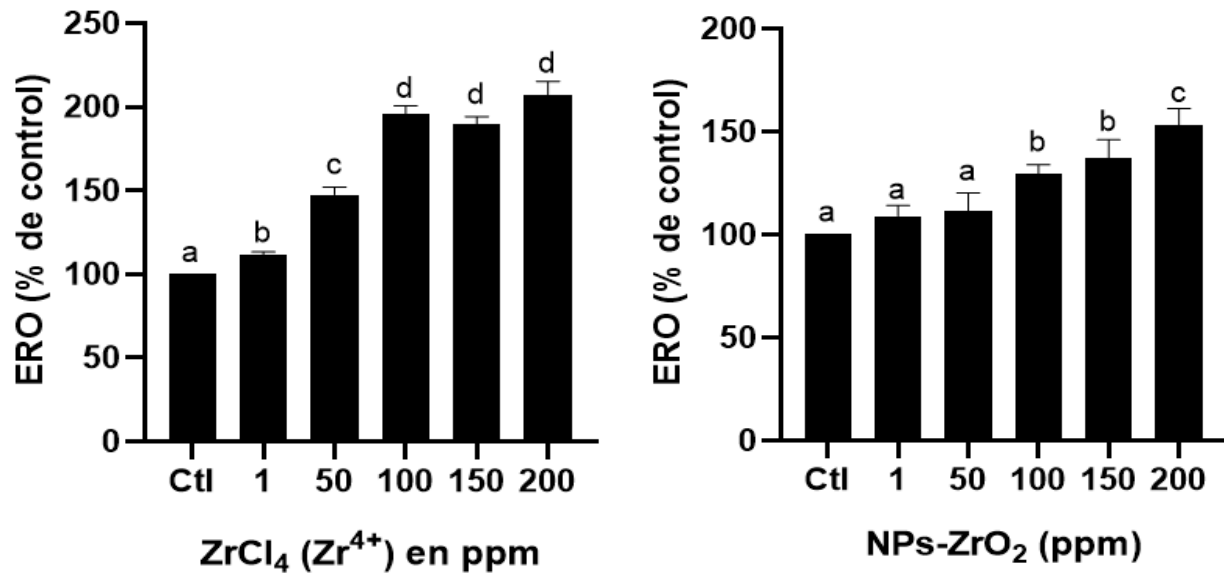


Figure 3.6 Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le cytosol et dans les organites contenant de l'ADN pour la plante *Lemna minor* témoin et traitée au ZrCl₄ (A) et aux NPs-ZrO₂ (B). Les résultats représentent les moyennes de 3 répétitions avec 2 répliqua chacune (n=6). Les différentes lettres sont utilisées pour indiquer une différence significative entre le témoin et les concentrations de traitement avec p inférieur à 0,05.

Le stress oxydatif est un mécanisme important de la toxicité des métaux et NPs pour les plantes. Les ERO peuvent attaquer les composantes cellulaires tels que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Ils sont importants pour la signalisation cellulaire dans des conditions physiologiques normales (Applerot *et al.*, 2012; Wang, Z. *et al.*, 2021). Le niveau des ROS intracellulaires totaux (cytosol et organites à ADN) a été considéré comme des indicateurs pour évaluer la toxicité après le traitement aux ZrCl₄ (Zr⁴⁺) et aux NPs-ZrO₂, comme le montre la figure 3.6. La mesure de la fluorescence relative des deux sondes de détection des ERO après l'exposition des plantes aux ZrCl₄ a montré des variations moyennes significatives aux concentrations 1 et 50 ppm par rapport au témoin. Cependant à partir de 100 ppm le niveau des ERO a augmenté significativement pour des niveaux de confiance de 95 % par rapport aux témoin (Fig.3.6. A). Comparer aux conditions de traitements aux NPs-ZrO₂ (Fig.3.6. B), nous n'avons pas observer de changement significatif par rapport au contrôle pour les concentrations de 1 et 50 ppm. À partir de 100 ppm de NPs-ZrO₂,

le niveau des ERO intracellulaires a augmenté significativement pour des niveaux de confiance à 95 % par rapport aux contrôles. De plus, les suspensions de NPs-ZrO₂ ont induit un niveau ERO élevé chez la plante *Lemna minor* dépendamment de la concentration avec une augmentation significative de la production des ROS à partir de 200 ppm par rapport aux conditions de traitements de 100 et 150 ppm et aux témoins. Ces résultats montrent que le traitement aux ZrCl₄ a provoqué des niveaux élevés de ERO chez la plante *Lemna minor* comparé aux traitements aux NPs-ZrO₂ pour des concentrations d'effet (Tableau 3.6). Ces deux espèces chimiques du zirconium ont présenté une réponse distincte avec une augmentation significative du niveau des ERO totales (cytosol et organites contenant de l'ADN) pour le ZrCl₄ à partir de 100 ppm par rapport aux NPs-ZrO₂ pour les mêmes concentrations de traitement.

3.3.2 Activation des mécanismes de défense

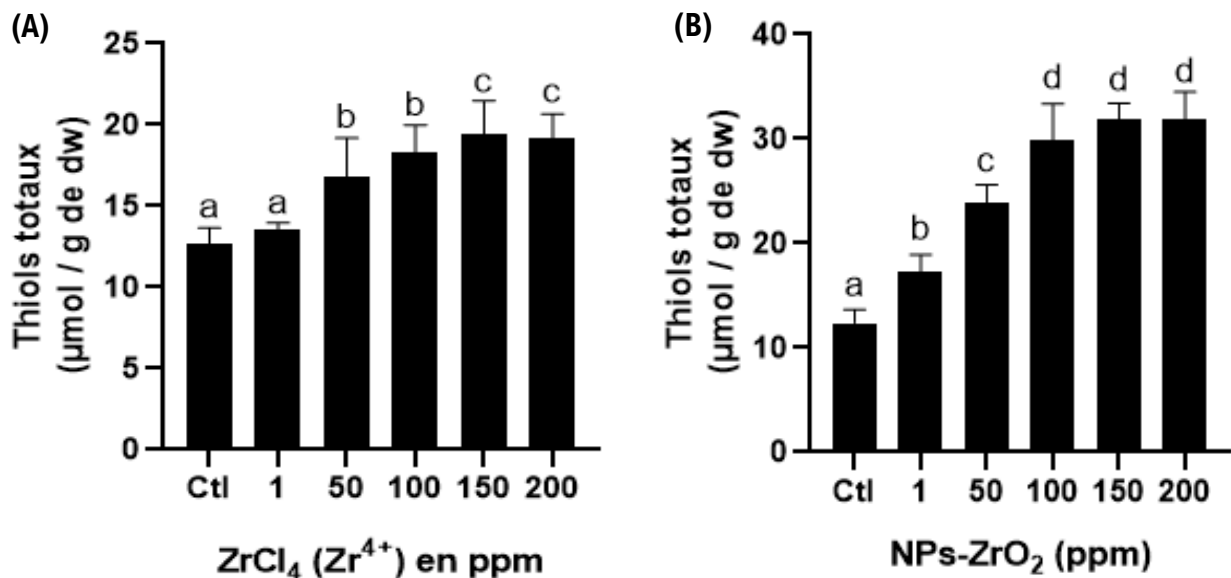


Figure 3.7 Variation des thiols totaux par µmol/ g de poids sec (DW), pour *Lemna minor* témoin et traitée par du ZrCl₄ (A) et NPs-ZrO₂ (B). Les résultats représentent les moyennes de 3 répétitions avec 2 répliqua chacune (n=6). Les différentes lettres sont utilisées pour indiquer une différence significative entre le témoin et les concentrations de traitement avec p inférieur à 0,05.

Le GSH joue un rôle important dans les défenses contre le stress oxydatif induit par les métaux, car il pourrait éliminer l'excès de H₂O₂ (Ma *et al.*, 2015). L'utilisation du réactif (Thiol Tracker) violet lors du dosage de thiol total et après le traitement au ZrCl₄ (Fig.3.7. A), nous observons une augmentation significative des thiols totaux à partir de 50 ppm par rapport à 1 ppm et au témoin.

Dès 150 ppm la sécrétions des thiols totaux a augmenté de façon très significative avec $p < 0,05$ par rapport au témoin. Les variations suivantes de thiols totaux ont été observées pour différentes concentrations de traitements : 16,75 et 19,47 $\mu\text{mol/ g}$ de DW respectivement à 50 et 150 ppm de ZrCl_4 et correspondants à 19,60 et 58,69 ppm des ions Zr^{4+} contre 12,65 $\mu\text{mol/ g}$ de DW pour le contrôle. Cependant par comparaison aux conditions de traitements des NPs- ZrO_2 (Fig.3.7. B), nous avons observé un effet dépendant de la concentration et une augmentation significative avec $p < 0,05$ à partir de 1 ppm par rapport au témoin. Les différentes conditions de traitements sont significatives l'une de l'autre comme le montre le tableau statistique (annexe E). De plus la sécrétion des thiols totaux augmente avec la concentration des NPs en suspension. Les variations significatives suivantes de thiols totaux ont été observées : 17,20; 23,89 et 29,82 $\mu\text{mol/ g}$ de DW respectivement pour les concentrations 1; 50 et 100 ppm de NPs- ZrO_2 contre 12,65 $\mu\text{mol/ g}$ de DW pour le témoin.

3.3.3 Effet sur les pigments chlorophylliens

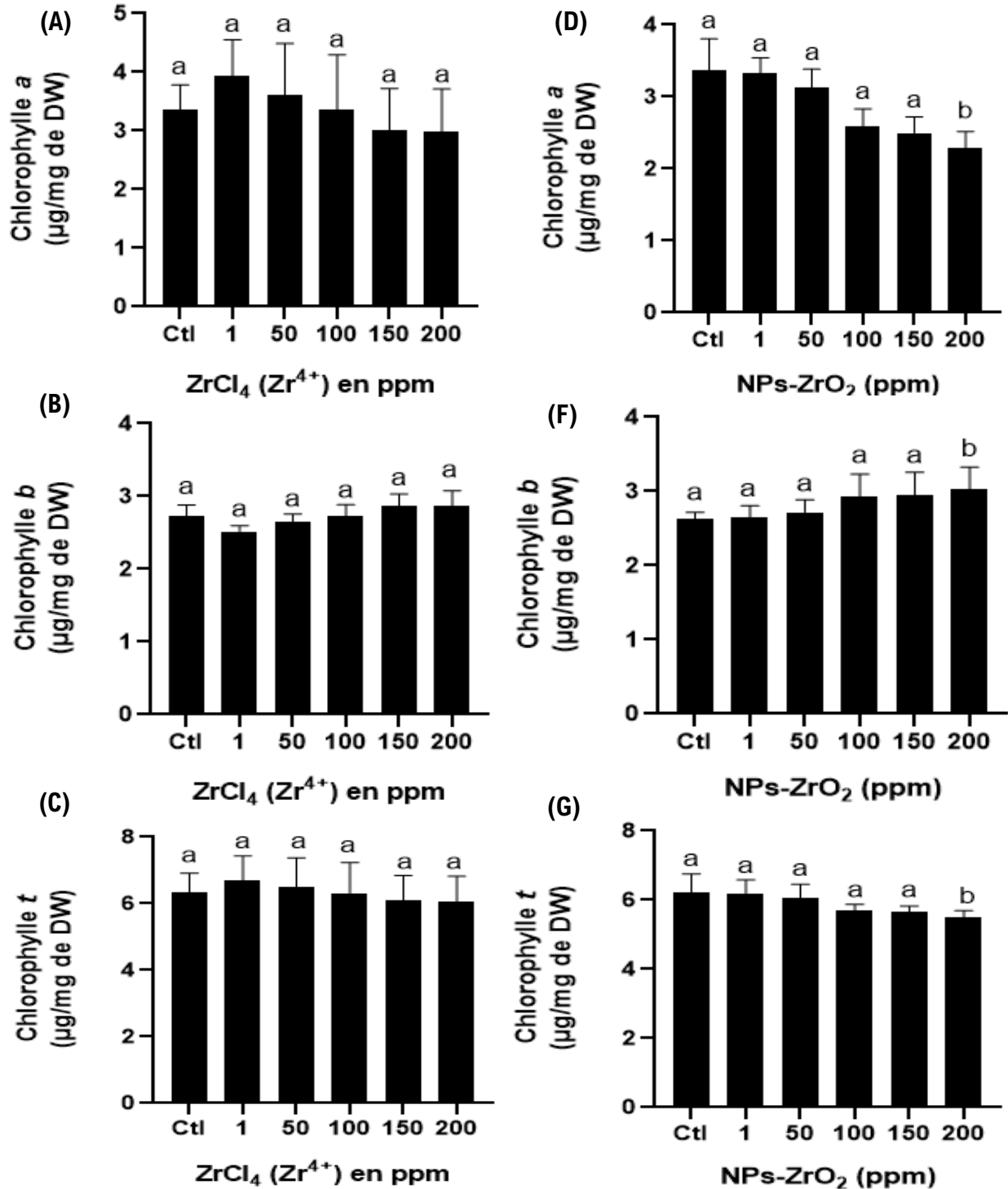


Figure 3.8 Changement de la teneur en pigments par (en µg/mg de DW) de la chlorophylle *a*, *b* et *t*, pour le témoin et les traitements aux ZrCl₄ (A, B, C) et NPs-ZrO₂ (D, E, F). Les résultats représentent les moyennes de 3 répétitions avec 2 répliqua chacune (n=6). Les différentes lettres sont utilisées pour indiquer une différence significative entre le témoin et les concentrations de traitement avec *p* inférieur à 0,05.

Le dosage des pigments photosynthétiques (Fig.3.8) a été utilisé afin d'évaluer l'effet de l'exposition aux $ZrCl_4$ aux NPs- ZrO_2 sur l'activité photosynthétique de *Lemna minor*. Le dosage des pigments photosynthétiques de la plante après l'exposition aux différentes concentrations de $ZrCl_4$ (Fig.3.8 : A=Chl *a*; B= Chl *b* et C= Chl *t*) correspondants respectivement aux concentrations nominales de l'ion Zr^{4+} (Tableau.3.1) montrent une tendance similaire pour la chlorophylle *a*, *b* et *t*. En effet, aucune concentration de $ZrCl_4$ n'a montré de changement significatif par rapport au témoin (figure 3.8 A, B et C). Les valeurs 3,93 et 2,98; 2,51 et 2,87; 6,70 et 6,07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de DW (Chl *a*, *b* et *t*) par rapport aux témoins 3,36; 2,73 et 6,32 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de DW correspondant respectivement à la Chl *a*, *b* et *t* sont non significatives aux concentrations 1 et 200 ppm de $ZrCl_4$ correspondantes à 0,41 et 76,52 ppm de l'ion Zr^{4+} .

Pour le traitement de la plante aux NPs- ZrO_2 (Fig.3.8), les résultats obtenus pour le dosage des pigments photosynthétiques D, E et F respectivement pour la Chl *a*, *b* et *t* ont montré une légère variation par comparaison aux mêmes conditions de traitements au $ZrCl_4$. Les différentes valeurs suivantes : 2,29; 3,03 et 5,50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de DW respectivement du Chl *a*, *b* et *t* sont significatives avec $p < 0,05$ à partir de 200 ppm de NPs- ZrO_2 par rapport aux conditions de traitement 1; 50; 100; 150 ppm NPs- ZrO_2 et au contrôle Chl *a* = 3,37; Chl *b* = 2,62 et Chl *t* = 5,50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de DW. L'ensemble des résultats montre une faible inhibition de l'activité photosynthétique de la plante *Lemna minore* après 7 jours d'incubation au $ZrCl_4$ et au NPs- ZrO_2 .

3.4 Observation par MEB des changements de la structure de *Lemna minor* après exposition aux NPs-ZrO₂ et détection des ions Zr⁴⁺ par EDS.

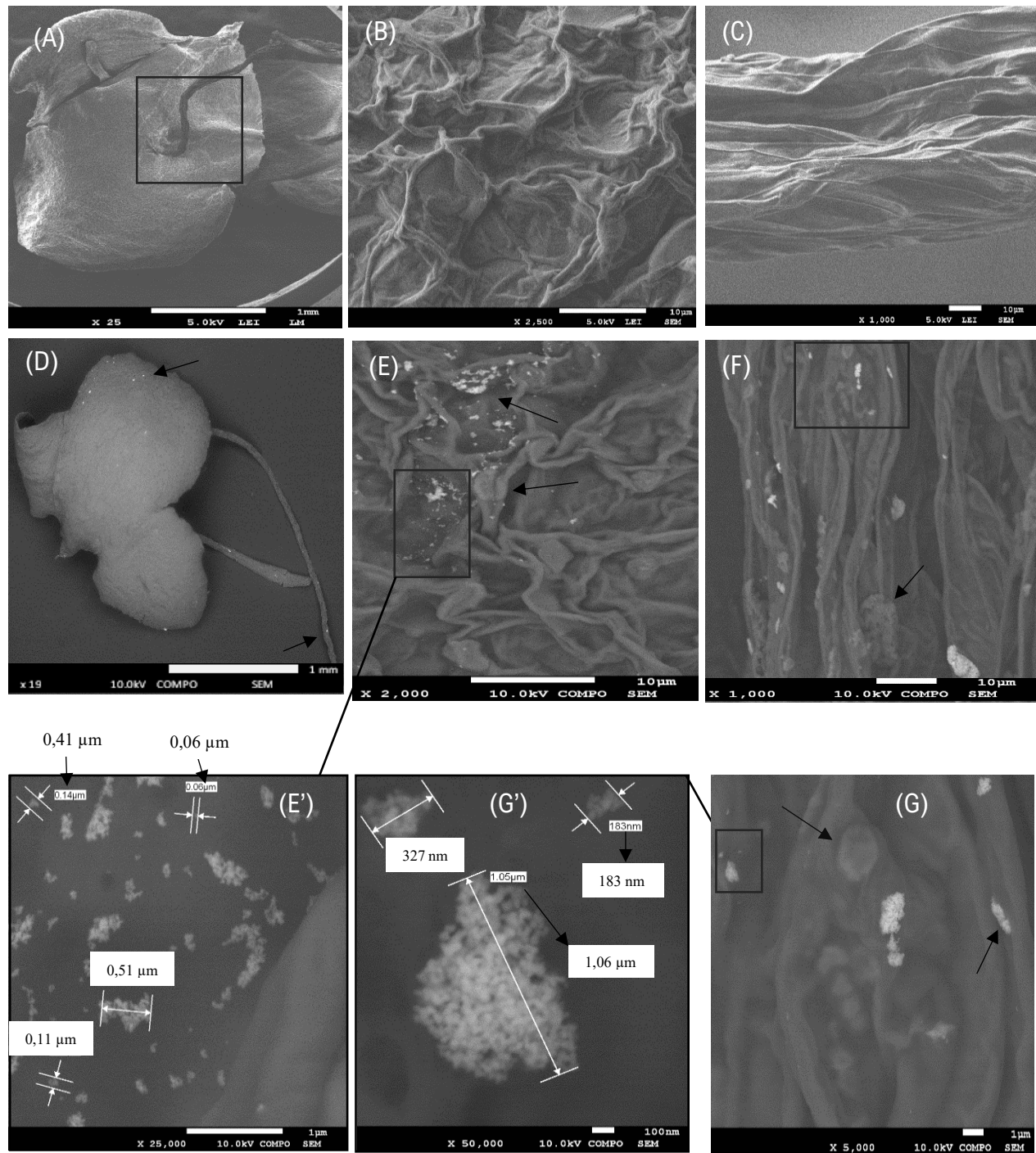


Figure 3.9 MEB de la plante *Lemna minor* incluant fronde et racine, témoin (A-B-C) et exposition aux NPs-ZrO₂ (D-E-F-G) après 7 jours d'exposition à des concentrations d'effets.

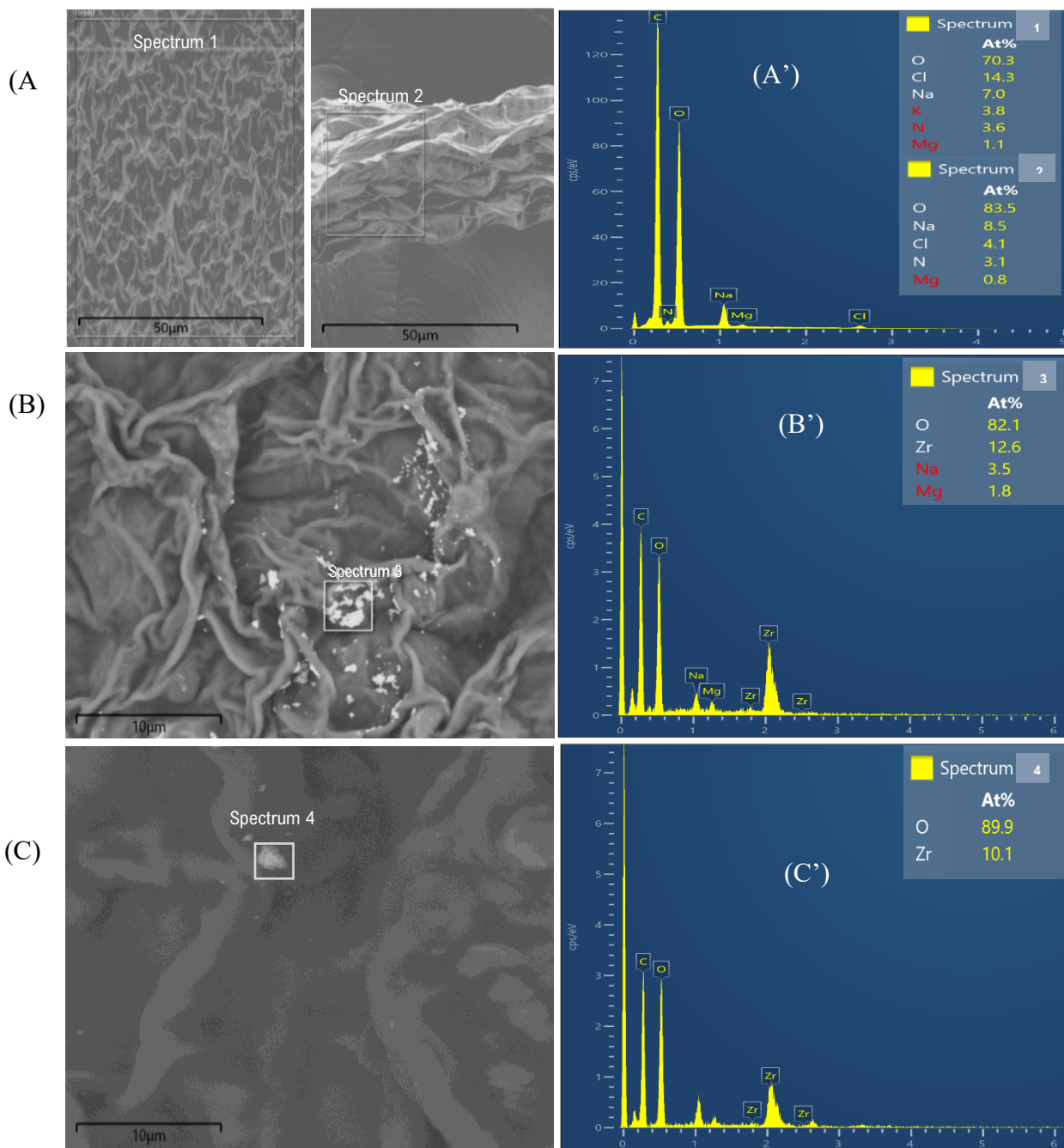


Figure 3.10 MEB couplé à EDS de la plante *Lemna minor*, témoin (A) et exposition aux NPs-ZrO₂ (B) fronde et (C) racine, après 7 jours d'exposition à des concentrations d'effets.

L'observation des frondes et racines de *Lemna minor* par MEB, montre à la figure 3.10 la présence de NPs-ZrO₂ adhérentes à l'ultrastructure des frondes et racines (Fig.3.9. D-E-F)) après une exposition aux NPs-ZrO₂ à des concentrations d'effet de 10 % (tableau 3.6) pendant 7 jours à comparer au contrôle (Fig.3.9. A-B-C). Les changements morphologiques des racines et des

frondes ont été examinés par MEB pour la plante *Lemna minor* non exposée et exposée aux NPs-ZrO₂. La surface des frondes et racines était lisse et intacte, sans aucun dommage visible. Les cellules de ces dernières sont bien disposées et rapprochées (Fig. 3.9-B-C). Cependant les frondes et racines exposées aux NPs-ZrO₂, présentent des défauts au niveau de l'ultrastructure. Des fissures profondes ont été observées par endroits (Fig. 3.9 E-F). Des NPs agglomérées et agrégées ont également été observées au niveau de la structure externe des frondes et racines. Le grossissement a permis de voir effectivement que les NPs-ZrO₂ se sont fortement agglomérées et agrégées allant de NPs de petite taille 60 nm à de plus grosses particules 1,05 µm (Fig. 3.9 E'-G'). Des études sur les microalgues *Chlorella pyrenoidosa* ont également montré que l'exposition aux NPs-ZrO₂ pouvait induire des dommages à la structure cellulaire des microalgues (Wang, Z. *et al.*, 2021).

Les ions Zr⁴⁺ libres après dissolution des NPs-ZrO₂ a été observée par MEB combiné à EDS permettant la détection d'ions Zr⁴⁺ et confirme la présence de NPs-ZrO₂ adhérentes à l'ultrastructure des frondes et racines de *Lemna minor* (Fig. 3.10. B-B'-C-C') par rapport aux témoins (Fig. 3.10. A-A'). Nous avons observé l'absorption des ions Zr⁴⁺ par les racines comme le montre la figure 3.9 (F). Des agrégats avec des teneurs élevées en Zr, mais inférieures à la teneur en Zr des NPs pures commerciales (Fig. 3.2) comme le montre les spectres EDS (Fig. 3.10.C-C') ont été observés sur les parois cellulaires des racines, ce qui laisse présager que les NPs-ZrO₂ et les ions Zr⁴⁺ libérés peuvent également être absorbés par les cellules des racines. Des agrégats similaires ont été observés au niveau frondes après exposition aux NPs-ZrO₂ (Fig. 3.10 B-B') et avais sensiblement la même teneur en Zr environ 10 et 12% respectivement. La diminution de la teneur en Zr dans les agrégats observés au niveau de la structure des frondes et racines après l'exposition peut s'expliquer par une dissolution des NPs-ZrO₂ pendant le traitement et l'absorption des ions Zr⁴⁺ libres par la plante à travers les racines.

La différence de la faible proportion en % de Zr entre les frondes et les racines suggère que les racines étaient plus susceptibles d'absorber les NPs-ZrO₂ ainsi que les ions Zr⁴⁺ libres que les frondes. Les résultats obtenus de la mesure du Zr bioaccumuler par la plante *Lemna minor* à partir des NPs-ZrO₂ dissouts (Tableau 3.6) confirment l'internalisation du Zr par *Lemna minor*. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle des racines et frondes de la plante *Lemna minor* sur l'internalisation des NPs-ZrO₂ et des ions Zr⁴⁺ libres.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce projet de maîtrise, il a été question de caractériser le potentiel toxique de deux espèces chimiques du Zr à savoir le $ZrCl_4$ et les NPs- ZrO_2 chez la lentille d'eau *Lemna minor* après 7 jours d'incubation dans le milieu de culture SIS tel que recommandé par les lignes directrices #221-OCDE-2006. La caractérisation du $ZrCl_4$ dans le milieu SIS dans les conditions d'incubation de la plante et la mesure du Zr par ICP-OES nous a permis de confirmer l'ion Zr^{4+} libre à partir du $ZrCl_4$ (Table. 3.1). Cependant la dissolution des NPs- ZrO_2 a montré une faible quantité d'ions Zr^{4+} libre dans le milieu SIS et états de 1 à 2 % (Tableau 3.3). La faible solubilité des NPs- ZrO_2 dans les conditions de pH proche de la neutralité a fait l'objet d'étude (Brown *et al.*, 2005).

La spéciation des ions Zr^{4+} libre avec d'autres espèces chimiques présents dans le milieu de culture SIS a pu être observée grâce au logiciel Visual MINTEQ. Le tableau 3.2 montre que l'ion Zr^{4+} a tendance à s'oxyder pour former l'espèce chimique le $Zr(OH)_4$ (aq) et ce dernier reste majoritaire par rapport au $Zr(OH)_5^-$. Ces résultats suggèrent que la majorité du Zr bioaccumulé par la plante est sous sa forme de $Zr(OH)_4$ (aq). La présence de complexe formé avec l'EDTA, le $Zr-EDTA$ (aq) a été observé dans le milieu SIS mais en très faible proportion. Le rôle premier de l'EDTA est de tamponner les ions métalliques dans le milieu de culture SIS. Lorsque les ions métalliques présents en très faible proportion sont absorbés par *Lemna minor*, le complexe ion métallique EDTA libère les ions métalliques dans le but de maintenir la concentration d'ion libre dans le milieu de culture SIS. Les résultats de la spéciation du Zr libre dans le milieu SIS démontrent que l'ion Zr^{4+} a tendance à former des complexes avec les groupements hydroxyles (OH). Les concentrations des espèces chimiques formées (Tableau 3.2) dépendent principalement de la concentration du $ZrCl_4$ dissous. Les faibles concentrations du $Zr-EDTA$ (aq) suggèrent que la majorité du Zr bioaccumulé par la plante est sous forme de $Zr(OH)_4$ (aq). Elles ont provoqué l'inhibition de croissance observée après 7 jours d'incubation avec du $ZrCl_4$ à des concentrations de 1 à 200 ppm dans les conditions de pH du milieu de culture SIS recommander par l'OCED,2006 (Tableau 3.6). Enfin, la spéciation du Zr libre dans le milieu SIS nous a montré une très faible disponibilité du Zr libre. Ce dernier par son affinité avec les groupements OH forme par complexation l'espèce chimique majoritaire : le

Zr(OH)₄ (aq). Les NPs-ZrO₂ du fait de leur faible solubilité dans le milieu de culture SIS, leurs complexations ont été rapportées à celle du Zr libre à partir du ZrCl₄.

Les changements de pH dû aux chlorures (Cl) présents dans du ZrCl₄ ont été observés. Les traitements de la plante en présence du ZrCl₄ 1; 50 et 100 ppm (Annex D.C1-D1) dans des conditions de pH non ajusté et les traitements en absence du ZrCl₄ dans des conditions de pH 5,5; 3,5 et 2,5 (Annexe D. A1-B1) avec un témoin à pH 6,5 pendant 7 jours. Les résultats ont montré une forte inhibition de la croissance et entraînent la mort de la plante par nécrose après 24 et 48 heures d'incubation dans le milieu SIS. Un pH (2,5) très faible serait probablement la cause de la forte inhibition de croissance observée chez la plante et les photographies obtenues (Annexe D. B1) montrent que les plantes étaient mortes par nécrose à pH (2,5). À pH (3,5), l'inhibition de croissance était de 10 %, et laisse penser que la plante indépendamment de sa physiologie peut s'adapter dans des conditions de pH très faible et cause moins d'impact sur sa croissance. Il a été rapporté dans la littérature que la plante possède une large gamme de tolérance aux valeurs de pH suivant : limite inférieure 4, optimum 6,2 et limite supérieure 10 (McLay, 1976). À 50 ppm de ZrCl₄ dans des conditions de pH non ajusté (Annexe D.C1-D1), l'inhibition de croissance de la plante était inférieure à 10 % et suggère que les effets additionnels des ions Zr⁴⁺ libre et les baisses de pH à 5,5 n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance de *Lemna minor*. En revanche à 100 ppm de ZrCl₄ l'effet était maximal et entraîne la mort de la plante après 24 et 48 heures d'incubation comme le montre la photographie (Annex. D.D1) et une forte baisse du pH a été observée.

Donc nos résultats suggèrent, que la toxicité du ZrCl₄ pour *Lemna minor* serait liée au pH trop bas dû au chlore et l'effet additionnels des ions Zr⁴⁺ libre. Zhuang Wang et Fan Zhang ont rapporté que la toxicité des ions Zr⁴⁺ pour les microalgues *Chlorella pyrenoidosa* était associée à la variation du pH (Wang, Z. *et al.*, 2021) et ce dernier est un facteur important affectant la toxicité des ions Zr⁴⁺ pour les algues. Un pH bas pourrait inhiber l'absorption de macroéléments tel que le phosphore, car ses macroéléments ont été couplés à des ions métalliques (Lüderitz et Nicklisch, 1989).

Dans les conditions de pH optimal de croissance recommandées par OCDE, l'effet du pH a été corrigé dans le milieu SIS et les plantes ont été exposées aux ZrCl₄ avec un pH de 6,5 dans le but de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des ions métalliques Zr⁴⁺ libre et une comparaison avec les NPs-ZrO₂ a été faite après la caractérisation physico-chimique de cette dernière.

D'après nos résultats de caractérisation, la taille des NPs augmente significativement en fonction de la concentration des NPs-ZrO₂ en suspension passant de 115 nm à 785 nm (Tableau 3.4). Les agrégats formés montrent une instabilité marquée par une diminution du potentiel ζ à J₀. A J₇ on a observé une sédimentation des agrégats des NPs-ZrO₂ et une diminution de la taille des NPs en suspension entre 144 et 168 nm. La diminution de la taille démontre une forte stabilité des NPs avec de faible variation du potentiel ζ de 34,24 à 36,39 mV sensiblement égale. Malgré l'utilisation de méthodes physiques telle qu'une bonne agitation suivie d'une ultrasonication par sonde, il était difficile de séparer les agrégats formés par ces NPs. *Li et al* ont rapporté le même phénomène avec les NPs-TiO₂ en suspension après 24 heures dans des milieux de culture SIS. Les NPs-TiO₂ agrégées sédimentent et modifient la toxicité des NPs pour la plante *Lemna minor* (*Li et al.*, 2013). Au niveau de la figure 3.2, on peut observer que les NPs-ZrO₂ utilisés lors de cette étude étaient des particules de forme sphérique et fortement agrégée. La composition du milieu de culture n'influe pas sur la morphologie des NPs-ZrO₂ comme expliqués dans la section 5.6. Pour une évaluation toxicologique, il est devenu nécessaire de tester les conditions du milieu de culture afin de déterminer si les changements des propriétés optiques, structurelles et morphologiques des NPs-ZrO₂ peuvent modifier les mécanismes de toxicité des NPs en suspension dans le milieu de culture SIS.

Nos résultats après traitement aux ZrCl₄ et des NPs-ZrO₂, montrent un impact sur la croissance de la biomasse de *Lemna minor* après une bioaccumulation des ions Zr⁴⁺ et des NPs-ZrO₂. Des variations ont été observées sur des paramètres macroscopiques en fonction de la concentration des ions Zr⁴⁺ libre et des NPs-ZrO₂ en suspension. Des impacts sur la croissance de *Lemna minor* ont été rapportés, comme exemple les NPs-CuO (*Yue et al.*, 2018), le palladium (*Jmii et Dewez*, 2021) et les NPs-TiO₂ (*Li et al.*, 2013). L'accumulation des ions Zr⁴⁺ et une exposition aux NPs-ZrO₂ provoquent une diminution du poids sec induisant une augmentation du pourcentage d'inhibition chez la plante *Lemna minor*, et confirme la capacité de la plante à absorber des contaminants comme les ions métalliques libres à travers diverses espèces chimiques présentes dans l'environnement aquatique (*Baudo et al.*, 2015; *Ekperusi et al.*, 2019).

Cependant, du point de vue microscopique, une adhérence des NPs-ZrO₂ sur les racines et frondes de *Lemna minor* a été observée, des malformations et des défauts de structure chez *Lemna minor* après l'exposition sont observés également. Des études récentes ont montré la capacité des NPs-

ZrO₂ à adhérer et s'adsorber à la surface des microalgues (Liu *et al.*, 2018; Wang, Z. *et al.*, 2021). L'observation de la l'ultrastructure des racines et frondes par MEB (Fig.3.9) et la détection des ions métalliques Zr⁴⁺ par EDS (Fig. 3.10) en témoignent. Une étude récente a démontré l'impact de l'exposition des NPs-CuO sur les racines et frondes de *Lemna minor* entraînant des dommages sur l'ultrastructure de la plante (Yue *et al.*, 2018). On suppose que des NPs-ZrO₂ et les ions métalliques Zr⁴⁺ peuvent interagir avec diverses macromolécules des membranes cellulaires et induire un blocage de certains mécanismes protéiques comme les enzymes, le transport et la respiration pouvant entraîner des dommages chez la plante lors d'une exposition continue dans le milieu aquatique.

Lorsque les plantes ont été exposées à des concentrations de 1 à 200 ppm de ZrCl₄ et respectivement aux NPs-ZrO₂, la bioaccumulation des ions Zr⁴⁺ dans la biomasse était en corrélation avec la concentration nominale du Zr (Tableau 3.6). D'après nos résultats de la bioaccumulation de 0,11 et 2,86 µg/mg DW du Zr, nous n'avons pas observé de variation significative sur la croissance, malgré une faible diminution du poids sec observé après 7 jours d'exposition. Cela peut être dû à une phase d'acclimatation des *Lemna minor* lors de l'incubation. À partir de 6,50 à 14,89 µg/mg DW de Zr, les variations étaient significatives. Nous avons observé de 29,79 à 59,02 % d'inhibition de croissance due à une forte accumulation et un potentiel toxique des ions Zr⁴⁺ pour la plante. En effet, nous observons un profil de concentration sur la croissance de *Lemna minor* et nous pensons que les ions métalliques Zr⁴⁺ ont une grande affinité avec divers organites de la plante. Nous avons déterminé une EC₅₀ à 58,69 ppm pour les ions Zr⁴⁺ pour *Lemna minor* comparé aux NPs-ZrO₂ dont les résultats obtenus ont montré 24,67 % d'inhibition de croissance à 200 ppm. Ce paramètre représente un biomarqueur sensible pour élucider la toxicité des deux espèces chimiques pour *Lemna minor*. Des études récentes sur des bactéries, souris, poissons, et microalgues ont démontré une toxicité des ions Zr⁴⁺ et des NPs-ZrO₂. Les auteurs ont déterminé différents paramètres toxicologiques (Tableau 3.1).

Cette étude démontre la toxicité de différentes espèces chimique du zirconium pour la plante aquatique *Lemna minor*. L'accumulation des ions Zr⁴⁺ et des NPs-ZrO₂ par la plante a provoqué la formation des ERO par l'intermédiaire de la réaction de Fenton et Haber-Weiss générant des radicaux hautement toxiques (Cuypers *et al.*, 2016). C'est la conséquence de l'internalisation de l'ion Zr⁴⁺ et des NPs-ZrO₂ dans différents compartiments cellulaires. L'inhibition des enzymes

antioxydants comme le GSH et les réactions redox impliquées dans la respiration et la photosynthèse entraîne la génération des ERO (Fig.3.6) pour les deux espèces chimiques du zirconium. Dans cette étude, la production des ERO est corrélée avec l'activation des mécanismes de défense. L'internalisation du Zr et des NPs-ZrO₂ a déclenché la synthèse de protéine totale contenant du thiol pour la tolérance au stress causée par les ions métalliques Zr et des NPs-ZrO₂ (Fig. 3.7). Des études ont montré que les ions métalliques et les NPs par leur propriété de réactivité avaient activé la synthèse d'enzymes antioxydants et on permet ainsi le contrôle de la concentration intracellulaire des ions métalliques et des NPs (Dewez *et al.*, 2018; Jmii et Dewez, 2021; Wang, Z. *et al.*, 2021). D'après nos résultats, l'augmentation des thiols totaux (Fig. 3.7) est la conséquence directe d'un fort stress causé par l'accumulation des ions Zr⁴⁺ et des NPs-ZrO₂ lors de l'exposition. L'internalisation du Zr a eu moins d'impact. Aucun effet significatif n'a été observé sur les pigments photosynthétiques dont la Chl *a* et *b* (fig. 3.8. A et B). Nos résultats n'ont montré aucune diminution de la Chl *a* et *b* sur l'ensemble des concentrations du ZrCl₄ testé. Le traitement aux NPs-ZrO₂, on observe une diminution moyenne significative de la Chl *a* et *b* (Fig.3.8.D.E. F). De nombreux métaux et NPs ont pour cible principale de perturber l'activité photosynthétique des plantes (Dewez *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Jmii et Dewez, 2021). La compréhension de ce phénomène nécessite d'autres investigations en utilisant d'autres techniques comme la fluorescence rapide et polyphasique de la Chlorophylle (Jmii et Dewez, 2021).

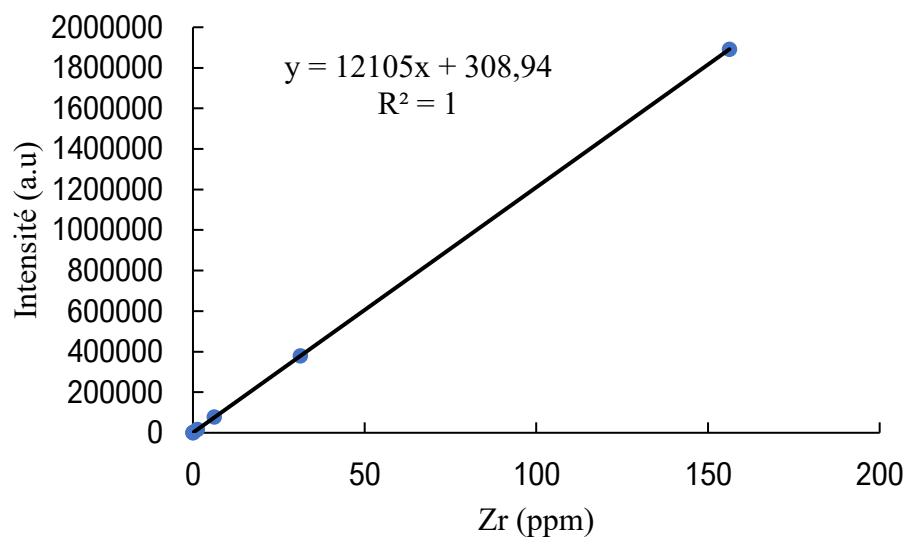
CONCLUSION et PERSPECTIVES

Lors de ce projet de maîtrise, la toxicité de différentes espèces chimiques du zirconium (le $ZrCl_4$ et NPs- ZrO_2) chez la plante aquatique *Lemna minor* a été démontrée. Le $ZrCl_4$ et les NPs- ZrO_2 ont été caractérisés en fonction des propriétés physico-chimiques telles que la solubilité dans le milieu de culture SIS. Grâce à l'analyse par ICP-OES, on a pu estimer les concentrations nominales de l'ion Zr^{4+} libre à environ 40 % pour le $ZrCl_4$ et 1 à 2 % pour les NPs- ZrO_2 . Le diamètre hydrodynamique, le potentiel ζ ainsi que les propriétés optiques, morphologiques et structurales des NPs- ZrO_2 ont été étudiés lors de ce projet. Nos résultats démontrent que les paramètres environnementaux comme la composition du milieu peuvent exercer une influence sur les propriétés physiques et chimiques des deux espèces chimiques. La biodisponibilité, des ions Zr^{4+} et des NPs- ZrO_2 pour la plante déterminent leurs effets toxiques. La bioaccumulation des ions Zr^{4+} au sein des tissus ont provoquées une production de ROS chez la plante dans l'ADN des cellules et dans le cytosol. Ce phénomène entraîne l'activation et la biosynthèse des mécanismes de défense, dont les protéines contenant des groupements thiol (GSH), qui permettent le contrôle intracellulaire des ions Zr^{4+} dans le cytosol et ainsi réduisent la disponibilité des ions Zr^{4+} par chélation dans la vacuole. L'inhibition de la croissance, 29,79 % et 50,12 % calculée à 100 et 150 ppm d'incubation pour le $ZrCl_4$ est donc la conséquence de l'internalisation des ions Zr^{4+} . En fonction des résultats sur les pigments photosynthétiques majeurs dont la Chl *a* et *b*, on suppose que la photosynthèse n'a pas été significativement affectée. Ce mécanisme de toxicité serait probablement propre aux ions métalliques Zr^{4+} libres et présents sous la forme de $Zr(OH)_4(aq)$ dans le milieu de culture SIS. Par comparaison aux NPs- ZrO_2 , du fait de leurs faibles solubilités, leurs propriétés structurales et morphologiques et leurs degrés d'agglomération et d'agrégation. La bioaccumulation, l'absorption des ions Zr^{4+} et la présence des NPs- ZrO_2 au sein de la plante, induit la production des ERO et entraîne l'activation des mécanismes de défense, les protéines contenant des groupements thiol. Nos résultats d'analyse, obtenus par MEB combinée à EDS, ont permis de mieux comprendre le mécanisme de toxicité des NPs- ZrO_2 . L'adhérence des agrégats de NPs- ZrO_2 observée à l'ultrastructure de *Lemna minor*, et la détection des ions Zr^{4+} par EDS confirme l'internalisation des NPs dans différents compartiments cellulaires de la plante. Les images obtenues par la MEB ont montré des dommages sur les racines et frondes. De plus, les NPs- ZrO_2 ainsi que les agrégats formés et les ions Zr^{4+} libre ont pu être absorbés par la plante et distribués dans différentes cellules

des frondes et des racines comme le confirme l'analyse par MEB-EDS. Par conséquent, l'internalisation des NPs-ZrO₂ ainsi que les ions Zr⁴⁺ libre a provoqué la production des ROS et a moyennement affecté les pigments photosynthétiques (Chl *a* et *b*). La différence observée entre les mécanismes de toxicité du ZrCl₄ et des NPs-ZrO₂, confirme notre hypothèse selon laquelle les deux espèces chimiques du zirconium du fait de leurs différences dans leur propriété physico-chimique adoptent un mécanisme de toxicité différent. Ces résultats fournissent davantage de preuves sur le potentiel toxique du ZrCl₄ et NPs-ZrO₂ ainsi que les ions Zr⁴⁺ libre sont facilement bioaccumulables par les plantes aquatiques présentes dans l'environnement. Cette capacité de la plante *Lemna minor* à bioaccumuler les ions Zr⁴⁺ à de fortes concentrations pourrait être un excellent moyen de phytoremédiation pour décontaminer les eaux polluées avec du ZrCl₄ et des NPs-ZrO₂ afin d'éviter le phénomène de bioamplification le long de la chaîne alimentaire. En définitive, le ZrCl₄ sous l'effet du pH présente une plus grande toxicité pour *Lemna minor* par rapport aux ions Zr⁴⁺ libre dont la toxicité dépend de la concentration et de la biodisponibilité dans le milieu aquatique. Cependant, les NPs-ZrO₂ présentent une toxicité moyennement importante qui s'expliquerait par leurs propriétés physico-chimiques : dont la faible solubilité des NPs, leurs degrés d'agrégation puis une sédimentation dans le milieu aquatique, et les rendes moins disponibles pour les plantes aquatiques. Des études futures sont nécessaires pour mieux comprendre l'interaction des NPs à base métallique comme les NPs- ZrO₂ en utilisant d'autres modèles de plantes aquatiques.

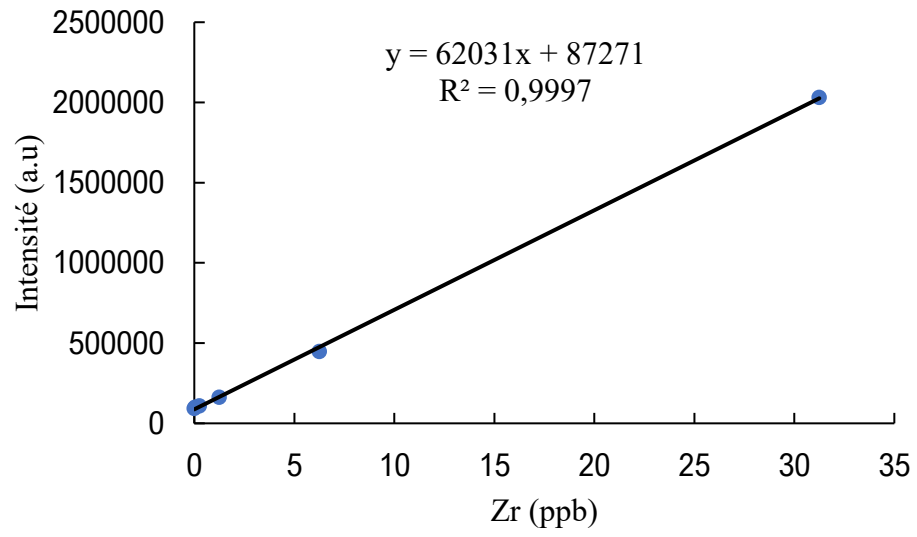
ANNEXE A

Courbe d'étalonnage de l'analyse du Zr par ICP-OES



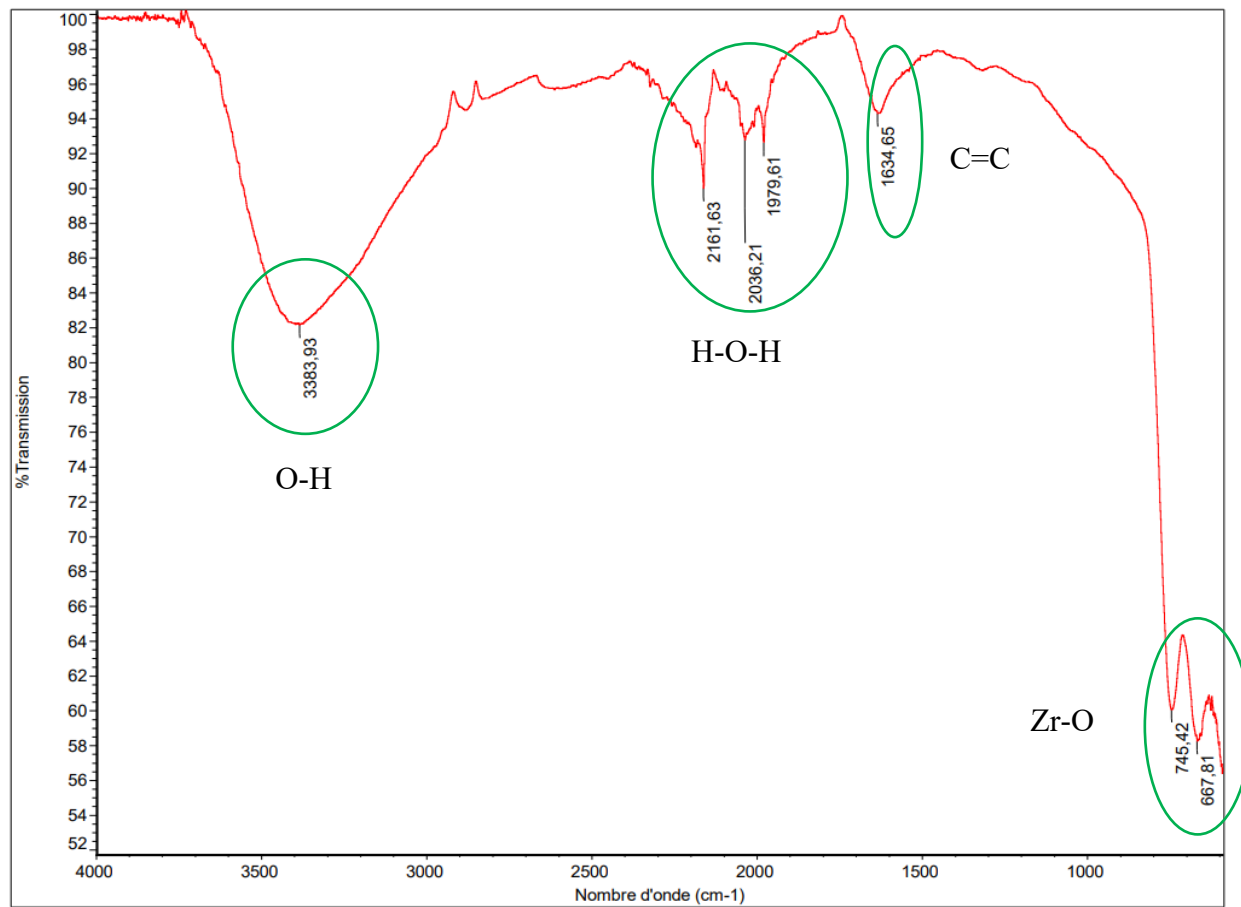
ANNEXE B

Courbe d'étalonnage de l'analyse du Zr par HR-ICP-MS



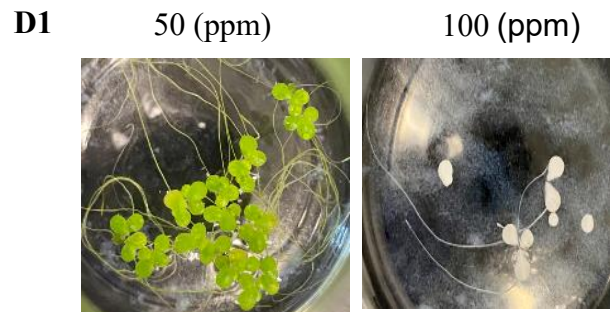
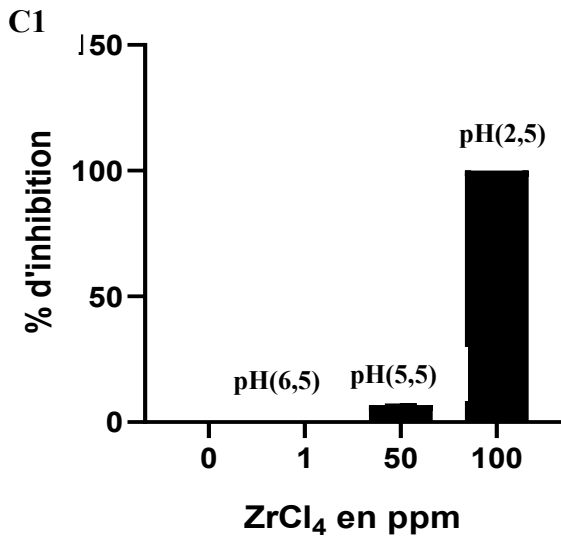
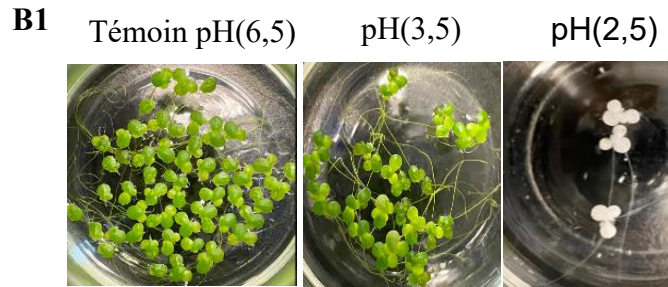
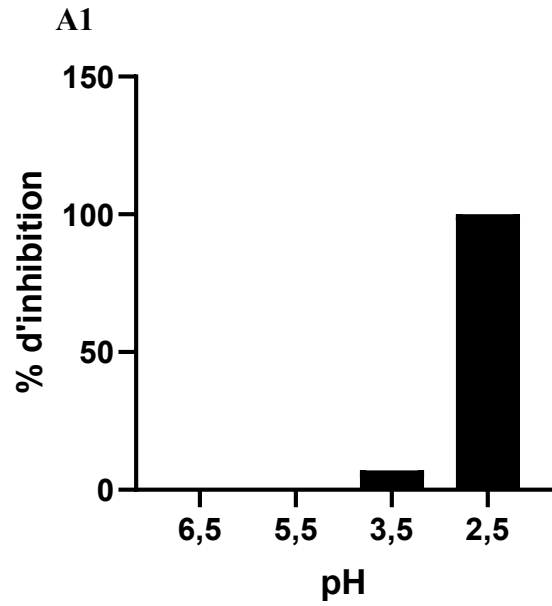
ANNEXE C

Spectre FT-IR des nanoparticules d'oxyde de zirconium



ANNEXE D

Effet du pH et du tétrachlorure de zirconium sur la croissance de la plante



ANNEXE E

Tableaux de l'analyse statistique multicomparaison

Test de comparaisons multiples de Tukey's	Significatif pour $p < 0,05$		P Value	
	?		Bioaccumulation	
	ZrCl ₄	NPs-ZrO ₂	ZrCl ₄	NPs-ZrO ₂
1 vs. Clt	No	No	0,64	0,2
50 vs. Clt	No	Yes	0,1	0,02
100 vs. Clt	Yes	Yes	0,03	0,02
150 vs. Clt	Yes	Yes	0,02	0,04
200 vs. Clt	Yes	No	0,007	0,07
50 vs. 1	No	No	0,12	0,31
100 vs. 1	Yes	No	0,03	0,18
150 vs. 1	Yes	No	0,03	0,08
200 vs. 1	Yes	No	0,009	0,08
100 vs. 50	No	Yes	0,08	0,05
150 vs. 50	No	No	0,06	0,12
200 vs. 50	Yes	No	0,007	0,19
150 vs. 100	No	No	0,18	0,29
200 vs. 100	Yes	No	0,05	0,32
200 vs. 150	No	No	0,71	0,36

Test de comparaisons multiples de Tukey's	Significatif pour $p < 0,05$?			P Value		
	ZrCl ₄			ZrCl ₄		
	DW	TCSM	Inhibition croissance	DW	TCSM	Inhibition croissance
1 vs. Clt	No	No	No	0,07	>0,99	0,12
50 vs. Clt	No	No	No	0,3	0,35	0,27
100 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	0,003	0,003	0,008
150 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	0,007	<0,001	<0,001
200 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	0,006	<0,001	0,002
50 vs. 1	No	No	No	0,42	0,39	0,39
100 vs. 1	Yes	Yes	Yes	0,005	0,007	0,007
150 vs. 1	Yes	Yes	Yes	0,008	<0,001	<0,001
200 vs. 1	Yes	Yes	Yes	0,007	<0,001	0,002
100 vs. 50	Yes	Yes	Yes	<0,001	0,01	0,01
150 vs. 50	Yes	Yes	Yes	<0,001	0,001	0,002
200 vs. 50	Yes	Yes	Yes	<0,001	0,002	0,006
150 vs. 100	Yes	Yes	Yes	0,03	0,01	0,01
200 vs. 100	Yes	Yes	Yes	0,02	<0,001	<0,001
200 vs. 150	Yes	Yes	No	0,03	0,04	0,07

Test de comparaisons multiples de Tukey's	Significatif pour $p < 0,05$?			P Value		
	NPs-ZrO ₂			NPs-ZrO ₂		
	DW	TCSM	Inhibition croissance	DW	TCSM	Inhibition croissance
1 vs. Clt	No	No	No	0,18	0,22	0,2
50 vs. Clt	No	No	No	0,3	0,35	0,33
100 vs. Clt	No	No	No	0,13	0,13	0,12
150 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	<0,001	0,006	<0,001
200 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	0,004	0,004	0,001
50 vs. 1	No	No	No	0,42	0,46	0,43
100 vs. 1	No	No	No	0,14	0,13	0,13
150 vs. 1	Yes	Yes	Yes	<0,001	0,003	<0,001
200 vs. 1	Yes	Yes	Yes	0,004	0,002	0,002
100 vs. 50	No	No	No	0,26	0,25	0,25
150 vs. 50	Yes	Yes	Yes	0,009	0,007	0,008
200 vs. 50	Yes	Yes	Yes	0,01	0,006	0,008
150 vs. 100	No	No	No	0,15	0,14	0,16
200 vs. 100	Yes	Yes	Yes	0,008	0,004	0,009
200 vs. 150	Yes	Yes	Yes	0,01	0,006	0,009

Test de comparaison s multiples de Tukey's	Significatif pour $p < 0,05$?				P Value			
	ROS		Thiols totaux		ROS		Thiols totaux	
	ZrCl ₄	NPs- ZrO ₂	ZrCl ₄	NPs- ZrO ₂	ZrCl ₄	NPs-ZrO ₂	ZrCl ₄	NPs-ZrO ₂
1 vs. Clt	Yes	No	No	Yes	0,04	0,31	0,64	0,02
50 vs. Clt	Yes	No	No	Yes	0,01	0,48	0,14	<0,001
100 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	Yes	0,002	0,03	0,02	0,02
150 vs. Clt	Yes	No	Yes	Yes	0,002	0,07	0,03	<0,001
200 vs. Clt	Yes	Yes	Yes	Yes	0,007	0,03	0,01	0,007
50 vs. 1	Yes	No	No	Yes	0,01	0,86	0,43	<0,001
100 vs. 1	Yes	No	No	Yes	<0,001	0,18	0,11	0,03
150 vs. 1	Yes	No	No	Yes	<0,001	0,24	0,12	<0,001
200 vs. 1	Yes	No	No	Yes	0,009	0,09	0,08	0,01
100 vs. 50	Yes	No	No	No	<0,001	0,38	0,27	0,11
150 vs. 50	Yes	No	Yes	Yes	<0,001	0,39	0,03	0,005
200 vs. 50	Yes	No	No	Yes	0,009	0,16	0,17	0,03
150 vs. 100	No	No	No	No	0,12	0,42	0,18	0,61
200 vs. 100	No	Yes	No	No	0,31	0,03	0,33	0,23
200 vs. 150	No	Yes	No	No	0,09	0,02	0,91	>0,99

Test de comparaisons multiples de Tukey's	Significatif pour $p < 0,05$?			P Value		
	ZrCl ₄			ZrCl ₄		
	Photosynthèses			Photosynthèses		
	Chl a	Chl b	Chl t	Chl a	Chl b	Chl t
1 vs. Clt	No	No	No	0,13	0,1343	0,1343
50 vs. Clt	No	No	No	0,94	0,9449	0,9449
100 vs. Clt	No	No	No	>0,99	>0,9999	>0,9999
150 vs. Clt	No	No	No	0,73	0,732	0,732
200 vs. Clt	No	No	No	0,77	0,7716	0,7716
50 vs. 1	No	No	No	0,61	0,612	0,612
100 vs. 1	No	No	No	0,41	0,4146	0,4146
150 vs. 1	No	No	No	0,14	0,1362	0,1362
200 vs. 1	No	No	No	0,2	0,1971	0,1971
100 vs. 50	No	No	No	0,15	0,1463	0,1463
150 vs. 50	No	No	No	0,18	0,1778	0,1778
200 vs. 50	No	No	No	0,27	0,2652	0,2652
150 vs. 100	No	No	No	0,43	0,4323	0,4323
200 vs. 100	No	No	No	0,51	0,5141	0,5141
200 vs. 150	No	No	No	>0,99	0,9968	0,9968

Test de comparaisons multiples de Tukey's	Significatif pour $p < 0,05$?			P Value		
	NPs-ZrO ₂			NPs-ZrO ₂		
	Photosynthèses			Photosynthèses		
	Chl a	Chl b	Chl t	Chl a	Chl b	Chl t
1 vs. Clt	No	No	No	0,9936	>0,99	>0,99
50 vs. Clt	No	No	No	0,7831	0,78	0,78
100 vs. Clt	No	No	No	0,4975	0,5	0,5
150 vs. Clt	No	No	No	0,4157	0,42	0,42
200 vs. Clt	No	No	No	0,3049	0,3	0,3
50 vs. 1	No	No	No	0,6356	0,64	0,64
100 vs. 1	No	No	No	0,3304	0,33	0,33
150 vs. 1	No	No	No	0,2552	0,26	0,26
200 vs. 1	No	No	No	0,1743	0,17	0,17
100 vs. 50	No	No	No	0,3929	0,39	0,39
150 vs. 50	No	No	No	0,2909	0,29	0,29
200 vs. 50	No	No	No	0,1781	0,18	0,18
150 vs. 100	No	No	No	0,0951	0,1	0,1
200 vs. 100	Yes	Yes	Yes	0,0118	0,01	0,01
200 vs. 150	Yes	Yes	Yes	0,002	0,002	0,002

BIBLIOGRAPHIE

- Applerot, G., Lellouche, J., Lipovsky, A., Nitzan, Y., Lubart, R., Gedanken, A. et Banin, E. (2012). Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. *Small*, 8(21), 3326-3337.
- Arreche, R., Bellotti, N., Blanco, M. et Vázquez, P. (2015). Synthesis and characterization of zirconium oxides for use as antimicrobial additives in paints. *Procedia Materials Science*, 9, 627-634.
- Atindehou, K. K., Kone, M., Terreaux, C., Traore, D., Hostettmann, K. et Dosso, M. (2002). Evaluation of the antimicrobial potential of medicinal plants from the Ivory Coast. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(5), 497-502.
- Baldinozzi, G., Simeone, D., Gosset, D. et Dutheil, M. (2003). Neutron diffraction study of the size-induced tetragonal to monoclinic phase transition in zirconia nanocrystals. *Physical Review Letters*, 90(21), 216103.
- Baudo, R., Foudoulakis, M., Arapis, G., Perdaen, K., Lanneau, W., Paxinou, A.-C., Kouvdou, S. et Persoone, G. (2015). History and sensitivity comparison of the Spirodela polyrhiza microbiotest and Lemna toxicity tests. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*(416), 23.
- Bauer, A. (2018). ZrO₂ Phase identification with Raman spectroscopy. *Application Note Raman-020*, 4, 01-03.
- Bellon, K., Chaumont, D. et Stuerger, D. (2001). Flash synthesis of zirconia nanoparticles by microwave forced hydrolysis. *Journal of Materials Research*, 16(9), 2619-2622.
- Béranger, G., Favergeon, J. et Moulin, G. (2008). Zircon-Céramique fonctionnelle. *Techniques de l'ingénieur*.
- Bertrand, G. et Mévrel, R. (1997). Zirconia coatings realized by microwave plasma-enhanced chemical vapordeposition. *Thin Solid Films*, 292(1-2), 241-246.
- Bindhu, M., Umadevi, M., Micheal, M. K., Arasu, M. V. et Al-Dhabi, N. A. (2016). Structural, morphological and optical properties of MgO nanoparticles for antibacterial applications. *Materials Letters*, 166, 19-22.
- Binet, S., Dedessus-Le Moustier, N., Delemarle, A., Devel, S., Drais, E., Fontaine, J.-R., De Jouvenel, F., Koller, M., Gaffet, E. et Canu, I. G. (2015). *Les nanomatériaux manufacturés à l'horizon 2030 en France inrs*].
- Blessing, M. et Ghestem, J. (2012). *Aperçu bibliographique des techniques de caractérisation des nanoparticules dans les eaux*.
- Bora, U. (2003). Zirconium tetrachloride. *Synlett*, 2003(07), 1073-1074.
- Bragg, W. L. et Williams, E. J. (1934). The effect of thermal agitation on atomic arrangement in alloys. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 145(855), 699-730.

- Brar, S. K. et Verma, M. (2011). Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 4-17.
- Brown, P. L., Curti, E., Grambow, B. et Ekberg, C. (2005). *Chemical thermodynamics of zirconium* (vol. 8, p. 544). Elsevier Amsterdam.
- Chakraborti, A. K. et Gulhane, R. (2004). Zirconium (IV) chloride as a new, highly efficient, and reusable catalyst for acetylation of phenols, thiols, amines, and alcohols under solvent-free conditions. *Synlett*, 2004(04), 627-630.
- Chen, G., Peijnenburg, W. J., Xiao, Y. et Vijver, M. G. (2018). Developing species sensitivity distributions for metallic nanomaterials considering the characteristics of nanomaterials, experimental conditions, and different types of endpoints. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 563-570.
- Colomban, P. (2003). Analyse sans contact des céramiques anciennes par diffusion Raman. *Actualite Chimique*(2), 12-17.
- Cotton, F. et Wilkinson, G. (1988). *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th edn, Chap. 18 : Wiley Interscience, Singapore.
- Couture, P., Blaise, C., Cluis, D. et Bastien, C. (1989). Zirconium toxicity assessment using bacteria, algae and fish assays. *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(1), 87-100.
- Cuypers, A., Hendrix, S., Amaral dos Reis, R., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., Jozefczak, M., Loix, C., Vercampt, H. et Vangronsveld, J. (2016). Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7, 470.
- Delongeaes, J., Burnel, D., Netter, P., Grignon, M., Mur, J., Royer, R. et Grignon, G. (1983). Toxicity and pharmacokinetics of zirconium oxychloride in mice and rats. *Journal de pharmacologie*, 14(4), 437-447.
- Descroix, L. et Marut, J.-C. (2015). L'exploitation des sables métallifères du littoral casamançais (Sénégal): un projet à risques. *Regards géopolitiques*, 1(3).
- Desgreniers, S. et Lagarec, K. (1999). High-density ZrO₂ and HfO₂: Crystalline structures and equations of state. *Physical Review B*, 59(13), 8467.
- 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.
- Ding, X., Pu, Y., Tang, M. et Zhang, T. (2022). Environmental and health effects of graphene-family nanomaterials: potential release pathways, transformation, environmental fate and health risks. *Nano Today*, 42, 101379.
- Dowling, A. P. (2004). Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7(12), 30-35.
- Dunphy Guzman, K. A., Finnegan, M. P. et Banfield, J. F. (2006). Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental science & technology*, 40(24), 7688-7693.

- Ekperusi, A. O., Sikoki, F. D. et Nwachukwu, E. O. (2019). Application of common duckweed (*Lemna minor*) in phytoremediation of chemicals in the environment: State and future perspective. *Chemosphere*, 223, 285-309.
- El Kass, M. (2011). *Nanocristaux optiquement non linéaires pour des applications en imagerie biologique: synthèse et caractérisations d'iodate de fer en microémulsions* (Doctoral dissertation, Université de Grenoble).
- Emsley, J., Palke, W. et Shilstone, G. (1991). The inclusion of electrostatic and dispersion interactions into potentials of mean torque for solutes dissolved in uniaxial liquid crystal solvents. *Liquid Crystals*, 9(5), 643-648.
- Falgayrac, G. (2006). *Physico-chimie de micro particules pour la prévision de la spéciation du plomb, du zinc et du cadmium dans des aérosols de pollution atmosphérique* Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I].
- Ferrat, L., Pergent-Martini, C. et Roméo, M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*, 65(2), 187-204.
- Filbin, G. J. et Hough, R. A. (1985). Photosynthesis, photorespiration, and productivity in *Lemna minor* L. 1. *Limnology and oceanography*, 30(2), 322-334.
- Frick, H. (1985). Boron tolerance and accumulation in the duckweed, *Lemna minor*. *Journal of plant nutrition*, 8(12), 1123-1129.
- Fu, M., Liang, J., Wang, S., Geng, C., Zhang, W. et Wu, T. (2020). The Response of Microalgae *Chlorella* sp. to Free and Immobilized ZrO₂ and Mg (OH)₂ Nanoparticles: Perspective from the Growth Characteristics. *Environmental Engineering Science*, 37(6), 429-438.
- Ghosh, R., Xalxo, R. et Ghosh, M. (2013). Estimation of heavy metal in vegetables from different market sites of tribal based Ranchi city through ICP-OES and to assess health risk. *Current World Environment*, 8(3), 435.
- Glauser, S., Astasov-Frauenhoffer, M., Müller, J. A., Fischer, J., Waltimo, T. et Rohr, N. (2017). Bacterial colonization of resin composite cements: influence of material composition and surface roughness. *European Journal of Oral Sciences*, 125(4), 294-302.
- Gomes, S. I., Caputo, G., Pinna, N., Scott-Fordsmand, J. J. et Amorim, M. J. (2015). Effect of 10 different TiO₂ and ZrO₂ (nano) materials on the soil invertebrate *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(10), 2409-2416.
- Greenwood, N. et Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the Elements 2nd Edition*. Butterworth-Heinemann.
- Gremillard, L. (2009). *Biocéramiques: des monolithes aux composites* INSA de Lyon; Université Claude Bernard-Lyon I].
- Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R. A. et Pazos-Perez, N. (2018). Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids. *Materials*, 11(7), 1154.

- Guinée, J. B., Heijungs, R., Vijver, M. G. et Peijnenburg, W. (2017). Setting the stage for debating the roles of risk assessment and life-cycle assessment of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol*, 12(8), 727-733. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.135>
- Halfmann, H., Bibinov, N., Wunderlich, J. et Awakowicz, P. (2007). A double inductively coupled plasma for sterilization of medical devices. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(14), 4145.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 31(4), 261-272.
- Heimann, R. B. et Vandergraaf, T. (1988). Cubic zirconia as a candidate waste form for actinides: dissolution studies. *Journal of materials science letters*, 7(6), 583-586.
- Hochella Jr, M. F., Mogk, D. W., Ranville, J., Allen, I. C., Luther, G. W., Marr, L. C., McGrail, B. P., Murayama, M., Qafoku, N. P. et Rosso, K. M. (2019). Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science*, 363(6434), eaau8299.
- Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S. et Wang, X. (2018). Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. *Chemosphere*, 193, 852-860. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.077>
- Huang, Y., Zhu, Z., Wu, X., Liu, Z., Zou, J., Chen, Y., Su, N. et Cui, J. (2019). Lower cadmium accumulation and higher antioxidative capacity in edible parts of *Brassica campestris* L. seedlings applied with glutathione under cadmium toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(13), 13235-13245.
- Ighodaro, O. et Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Jelassi, R., Khemaissia, H., Ghemari, C., Raimond, M., Souty-Grosset, C. et Nasri-Ammar, K. (2019). Ecotoxicological effects of trace element contamination in talitrid amphipod *Orchestia montagui* Audouin, 1826. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(6), 5577-5587.
- Jiang, J., Oberdörster, G. et Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77-89.
- Jmii, S. et Dewez, D. (2021). Toxic Responses of Palladium Accumulation in Duckweed (*Lemna minor*): Determination of Biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(6), 1630-1638.
- Jolivet, J. (1994). From solution to oxide. Cations condensation in aqueous solution. Surface chemistry of oxides.
- Joshi, N. C., Chaudhary, N. et Rai, N. (2021). medicinal plant leaves extract based synthesis, characterisations and antimicrobial activities of ZrO₂ nanoparticles (ZrO₂ NPs). *Bionanoscience*, 11(2), 497-505.
- Kalčíková, G., Žgajnar Gotvajn, A., Kladnik, A. et Jemec, A. (2017). Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*. *Environmental Pollution*, 230, 1108-1115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.050>

- Kannamkumarath, S. S., Wrobel, K., Wrobel, K., B'Hymer, C. et Caruso, J. A. (2002). Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(2), 245-266.
- Karlık, m. et Jouffrey, B. (2008). Étude des métaux par microscopie électronique en transmission (MET)-Analyse chimique locale.
- Karp, G., Isawa, J. et Marshall, W. (2018). *Biologie cellulaire et moléculaire* (4^e éd., Vol. 5) De Boeck Supérieur.
- Khan, S. R., Sharma, B., Chawla, P. A. et Bhatia, R. (2022). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES): a powerful analytical technique for elemental analysis. *Food Analytical Methods*, 15(3), 666-688.
- Klemic, H. (1975). Zirconium and Hafnium Minerals. *Industrial Minerals and Rocks, American Institute of Mining, Metallurgical, and Petroleum Engineers, Inc., New-York, New-York*, 1275-1283.
- Kohl, H. et Reimer, L. (2008). Transmission Electron Microscopy. *Springer Series in Optical Sciences*, 36.
- Kroll, W. (1950). La production industrielle du titane et du zirconium malléables. *Revue de Métallurgie*, 47(1), 1-18.
- Leng, R. (1999). Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment.
- Li, L., Sillanpää, M., Tuominen, M., Lounatmaa, K. et Schultz, E. (2013). Behavior of titanium dioxide nanoparticles in Lemna minor growth test conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, 88, 89-94.
- Liu, Y., Wang, S., Wang, Z., Ye, N., Fang, H. et Wang, D. (2018). TiO₂, SiO₂ and ZrO₂ nanoparticles synergistically provoke cellular oxidative damage in freshwater microalgae. *Nanomaterials*, 8(2), 95.
- Łojko, R., Polechońska, L., Klink, A. et Kosiba, P. (2015). Trace metal concentrations and their transfer from sediment to leaves of four common aquatic macrophytes. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 15123-15131. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4641-1>
- Lüderitz, V. et Nicklisch, A. (1989). The effect of pH on copper toxicity to blue-green algae. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 74(3), 283-291.
- Lyklema, J. (2003). Electrokinetics after smoluchowski. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 222(1-3), 5-14.
- Ma, C., White, J. C., Dhankher, O. P. et Xing, B. (2015). Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environmental science & technology*, 49(12), 7109-7122.
- Mandavilli, B. S. et Janes, M. S. (2010). Detection of intracellular glutathione using ThiolTracker violet stain and fluorescence microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, 53(1), 9.35. 31-39.35. 38.
- Mangla, O. et Roy, S. (2019). Monoclinic Zirconium Oxide Nanostructures Having Tunable Band Gap Synthesized under Extremely Non-Equilibrium Plasma Conditions †. *Proceedings*, 3, 10. https://doi.org/10.3390/IOCN_2018-1-05486

- Matache, M. L., Marin, C., Rozyłowicz, L. et Tudorache, A. (2013). Plants accumulating heavy metals in the Danube River wetlands. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 11(1), 1-7.
- McLay, C. (1976). The effect of pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*. *Freshwater Biology*, 6(2), 125-136.
- Menard, A., Drobne, D. et Jemec, A. (2011). Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environmental Pollution*, 159(3), 677-684.
- Meng, Q., Wang, A., Hua, H., Jiang, Y., Wang, Y., Mu, H., Wu, Z. et Sun, K. (2018). Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease. *International journal of nanomedicine*, 13, 705.
- Monitoring, A. et Symon, C. (2013). AMAP/UNEP technical background report for the global mercury assessment 2013: final technical report; output.
- Moriya, Y. et Navrotsky, A. (2006). High-temperature calorimetry of zirconia: Heat capacity and thermodynamics of the monoclinic–tetragonal phase transition. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 38(3), 211-223.
- Nikoofar, K. et Khademi, Z. (2016). A review on green Lewis acids: zirconium (IV) oxydichloride octahydrate (ZrOCl₂· 8H₂O) and zirconium (IV) tetrachloride (ZrCl₄) in organic chemistry. *Research on Chemical Intermediates*, 42(5), 3929-3977.
- Nishizawa, K., Miki, T., Watanabe, E. et Taoda, H. (2008). Surface Roughness Control of Zirconia Films Using a Novel Photoresponsive Precursor Molecule for Improving its Photocatalytic Activity. (p. 13-16). Materials Science Forum, Trans Tech Publ.
- Noël, A. (2013). Influence de la taille de départ, de l'état d'agglomération et de la dose de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) inhalées sur la réponse pulmonaire chez le rat.
- Ober, J. A. (2018). *Mineral commodity summaries* [Report]. US Geological Survey. USGS Publications Warehouse. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/70194932>
- Otero-González, L., García-Saucedo, C., Field, J. A. et Sierra-Álvarez, R. (2013). Toxicity of TiO₂, ZrO₂, Fe₀, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*, 93(6), 1201-1206.
- Phillips, D., Human, L. et Adams, J. (2015). Wetland plants as indicators of heavy metal contamination. *Marine pollution bulletin*, 92(1-2), 227-232.
- Py, J.-S., Garnier, A., van Regnault, G. V. et Munoz, J.-F. (2011). Occurrence du gadolinium anthropique dans les eaux destinées à la consommation humaine. *Euro Reference: les cahiers de la référence*(5), 26-29.
- Rai, P. K., Kumar, V., Lee, S., Raza, N., Kim, K.-H., Ok, Y. S. et Tsang, D. C. W. (2018). Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture. *Environment International*, 119, 1-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.012>

- Rai, R., Agrawal, M. et Agrawal, S. (2016). Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. Dans *Plant responses to xenobiotics* (p. 127-140). Springer.
- Rainbow, P. S. et Phillips, D. J. (1993). Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine pollution bulletin*, 26(11), 593-601.
- Rajendran, S., Annadurai, G. et Rajeshkumar, S. (2018). Characterization and toxicology evaluation of zirconium oxide nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(1), 104-111.
- Ricaud, M. (2018). Les nanomatériaux manufacturés: un nouvel enjeu pour la santé et la sécurité au travail. *Actes du Congrès national de médecine et de santé au travail*.
- Rouessac, F. et Rouessac, A. (2022). *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques* (3^e éd., Vol. 2). John Wiley & Sons.
- Rusoff, L. L., Blakeney Jr, E. W. et Culley Jr, D. D. (1980). Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(4), 848-850.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I. et Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/technology*, 13(5), 468-474.
- Sanders, C. J., Eyre, B. D., Santos, I. R., Machado, W., Luiz-Silva, W., Smoak, J. M., Breithaupt, J. L., Ketterer, M. E., Sanders, L. et Marotta, H. (2014). Elevated rates of organic carbon, nitrogen, and phosphorus accumulation in a highly impacted mangrove wetland. *Geophysical Research Letters*, 41(7), 2475-2480.
- Schenk, E. R. et Almirall, J. R. (2012). Elemental analysis of glass by laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry (LA-ICP-OES). *Forensic science international*, 217(1-3), 222-228.
- Shariati, S. et Yamini, Y. (2006). Cloud point extraction and simultaneous determination of zirconium and hafnium using ICP-OES. *Journal of colloid and interface science*, 298(1), 419-425.
- Sims, I., Whitehouse, P. et Lacey, R. (1999). The OECD Lemna growth inhibition test. *Report No. EA*, 4784.
- Singh, N., Nagpal, G. et Agrawal, S. (2018). Water purification by using adsorbents: a review. *Environmental technology & innovation*, 11, 187-240.
- Sivry, Y., Gélabert, A., Ferrari, R., Akrouf, A., Cordier, L., Juillot, F., Menguy, N. et Benedetti, M. F. (2011). Les nanoparticules: quels risques en seine? 22^{èmes} Journées Scientifiques de l'Environnement-Reconquête des environnements urbains: les défis du 21^{ème} siècle,
- Smotraiev, R., Nehrii, A., Koltsova, E., Anohina, A., Sorochkina, K. et Ratnaweera, H. (2022, 2022/06/01/). Comparison of wastewater coagulation efficiency of pre-polymerised zirconium and traditional aluminium coagulants. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102827. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102827>

- Sohal, I. S., O'Fallon, K. S., Gaines, P., Demokritou, P. et Bello, D. (2018). Ingested engineered nanomaterials: state of science in nanotoxicity testing and future research needs. *Particle and fibre toxicology*, 15(1), 1-31.
- Soni, D., Singh, J., Kaurav, N., Tripathi, J. et Sharma, A. (2022). Synthesis and characterization of zirconia nanocrystalline powder by thermal treatment method. *Materials Today: Proceedings*, 54, 908-911.
- Spitz, R. et Boisson, C. (2002). Catalyse de polymérisation. *L'Actualité chimique*, 54.
- Stout, L. M., Dodova, E. N., Tyson, J. F. et Nüsslein, K. (2010). Phytoprotective influence of bacteria on growth and cadmium accumulation in the aquatic plant *Lemna minor*. *Water Research*, 44(17), 4970-4979. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.073>
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J. et Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res J Chem Sci*, 2231, 606X.
- Sun, T., Liu, X., Zhan, X., Ou, L. et Lai, R. (2021). Hepatic distribution and toxicity of zirconia nanoparticles in vivo and in vitro. *Process Safety and Environmental Protection*, 147, 134-145.
- Sur, e. D. T. Et sans, d. U. S. (2014). Lignes directrices de l'ocde pour les essais de produits chimiques.
- Tabassum, N., Kumar, D., Verma, D., Bohara, R. A. et Singh, M. (2021). Zirconium oxide (ZrO₂) nanoparticles from antibacterial activity to cytotoxicity: A next-generation of multifunctional nanoparticles. *Materials Today Communications*, 26, 102156.
- Tangou Tabou, T., Baya, D. T., Liady, M. N. D., Musibono Eyul'Anki, D. et Vassel, J.-L. (2014). Apport du traitement d'images dans le suivi de l'influence des teneurs en nutriments sur la croissance des lentilles d'eau (*Lemna minor*). *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 18(1).
- Vardanyan, L. G. et Ingole, B. S. (2006). Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environment International*, 32(2), 208-218.
- Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 11(1), 1-14.
- Wang, W. et Keturi, P. H. (1990). Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. *Water, Air, and Soil Pollution*, 52(3), 369-376.
- Wang, Z., Zhang, F., Vijver, M. G. et Peijnenburg, W. J. (2021). Graphene nanoplatelets and reduced graphene oxide elevate the microalgal cytotoxicity of nano-zirconium oxide. *Chemosphere*, 276, 130015.
- Wu, H.-C., Huang, C.-J., Youh, M.-J., Tseng, C.-L., Chen, H.-T., Li, Y.-Y. et Sakoda, A. (2010). Thin-walled carbon nanotubes grown using a zirconium catalyst. *Carbon*, 48(7), 1897-1901.
- Yue, L., Zhao, J., Yu, X., Lv, K., Wang, Z. et Xing, B. (2018). Interaction of CuO nanoparticles with duckweed (*Lemna minor*. L): Uptake, distribution and ROS production sites. *Environmental Pollution*, 243, 543-552.

- 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.
- Zhao, X. et Vanderbilt, D. (2002). Phonons and lattice dielectric properties of zirconia. *Physical Review B*, 65(7), 075105.
- Zheng, H., Liu, K., Cao, H. et Zhang, X. (2009). L-Lysine-assisted synthesis of ZrO₂ nanocrystals and their application in photocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(42), 18259-18263.
- Zouari, W. (2018). *Étude de la solubilité de l'oxyde de zirconium et de sa réactivité de surface en milieux aqueux* (Doctoral dissertation, Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique).