

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'INFLUENCE DU pH SUR LA BIOACCUMULATION ET SUR L'EFFET DU
TÉTRABROMOBISPHÉNOL A CHEZ LA PLANTE AQUATIQUE *Lemna minor*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR

FATIMA ZOHRA BOUKRICHE

AVRIL 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 remercie tout particulièrement mon directeur de recherche, le Pr David Dewez, qui m'a donné l'opportunité de faire partie de son équipe de recherche. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée, le temps qu'il a consacré à mon encadrement, pour son soutien et son aide tout au long de ce travail.

Je remercie les membres du comité d'évaluation, Pr Mircea A. Mateescu et Pr Maikel Rosabal Rodriguez, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Je remercie Professeure Lekha Sleno et Leanne Ohlund pour leur participation dans mes analyses de spectrométrie de masse.

Je remercie l'ancien directeur de programme de biochimie, le Pr François Ouellet de m'avoir guidé en début de maîtrise. Je remercie aussi le directeur de programme de biochimie, le Pr Marc Lussier et la secrétaire Mylène Lacharité pour leur collaboration.

Je voudrais aussi remercier tous les professeur(e)s de l'UQAM qui m'ont encadré durant toute ma formation à l'UQAM. Je remercie également tout le personnel du département de chimie de l'UQAM.

Je remercie très chaleureusement tous mes collègues du laboratoire, Amina Benghaffour, Mohamadou Diallo et Maryam Zare Dehnavi pour les conseils et l'aide.

Je remercie très profondément mon mari, pour tout l'encouragement, le soutien inconditionnel, le respect et l'amour qu'il m'a offerts.

J'exprime ma profonde gratitude à mes très chers parents, pour leurs encouragements et leur soutien inconditionnel tout au long de mon parcours. Ainsi, à mes sœurs et mes frères, pour leur écoute, leur encouragement et leur soutien. Enfin, je remercie toutes mes amies pour leur soutien.

DÉDICACE

Je dédie plus particulièrement ce
mémoire

A ma chère fille Sidra
Tu es le bonheur de ma vie

A mon cher mari Riyadh

A mes très chers parents, mes sœurs
et mes frères

Ce travail n'aurait pas pu être achevé
sans vos soutiens

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
DÉDICACE	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xii
RÉSUMÉ	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Généralité sur le tétrabromobisphénol A.....	3
1.1.1 Définition	3
1.1.2 Production et utilisations du tétrabromobisphénol A.....	3
1.1.3 Propriétés physicochimiques du tétrabromobisphénol A.....	5
1.1.4 L'effet du pH du milieu aquatique sur la solubilité du TBBPA	6
1.1.5 Sources et présence du TBBPA dans l'environnement aquatique.....	7
1.1.6 La bioaccumulation du TBBPA chez les organismes aquatiques.....	11
1.1.7 La dégradation et la transformation du TBBPA dans l'environnement aquatique	12
1.1.7.1 Dégradation abiotique du tétrabromobisphénol A	12
1.1.7.2 Dégradation biotique du tétrabromobisphénol A.....	12
1.1.8 La toxicité du tétrabromobisphénol A chez les organismes aquatiques	15
1.2 La plante aquatique <i>Lemna minor</i>	18
1.2.1 Description de <i>Lemna minor</i>	18
1.2.2 Culture de <i>Lemna minor</i>	19
1.2.3 Utilisation de <i>Lemna minor</i> dans les études de toxicité au laboratoire.....	19
1.2.4 Capacité d'absorption des contaminants organiques dans les eaux usées ...	20
1.2.5 La transformation des contaminants organiques par <i>Lemna minor</i>	21
1.2.6 Essais normalisés de toxicité : Les paramètres de mesure.....	22
1.3 Les biomarqueurs de toxicité.....	23
1.3.1 Les biomarqueurs physiologiques.....	23
1.3.2 Les biomarqueurs biochimiques : Stress oxydant.....	24

1.3.2.1	Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	25
1.3.2.1.1	Les chloroplastes	26
1.3.2.1.2	Les mitochondries	26
1.3.2.1.3	Les peroxysomes	26
1.3.2.1.4	Les membranes plasmiques et parois cellulaires (apoplaste)	27
1.3.2.2	Les systèmes de détoxification antioxydants	28
1.3.2.2.1	Les systèmes antioxydants enzymatiques	28
1.3.2.2.2	Les systèmes antioxydants non enzymatiques	29
1.4	Problématique générale et objectifs de la recherche	31
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES		33
2.1	Préparation du matériel	33
2.2	Exigences préliminaires et incubation de la plante <i>Lemna minor</i>	33
2.2.1	Préparation du milieu de culture SIS	33
2.2.2	Culture de <i>Lemna minor</i> et acclimatation au conditions de laboratoire	34
2.3	Préparation et analyse des solutions du TBBPA par UHPLC-UV	35
2.4	Essais de toxicité	36
2.5	Analyse de la cinétique d'absorption du tétrabromobisphénol A par <i>Lemna minor</i> et quantification du TBBPA disponible dans le milieu	38
2.6	Analyse de la bioaccumulation du tétrabromobisphénol A	38
2.7	Identification du tétrabromobisphénol A dans le milieu et dans la plante par analyse chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC-MS/MS)	39
2.8	Détermination de l'effet du TBBPA sur la croissance de la biomasse	39
2.8.1	Mesure du nombre de frondes	39
2.8.2	Mesure du poids frais	39
2.8.3	Mesure du taux de croissance spécifique moyen	40
2.8.4	Calcul du pourcentage d'inhibition de croissance	40
2.9	Dosage des pigments photosynthétiques	41
2.10	Analyse du stress oxydant chez <i>Lemna minor</i>	42
2.10.1	La production des espèces réactives oxygénées (ROS)	42
2.10.2	La peroxydation lipidique	42
2.11	Analyse des activités antioxydantes de la plante	43
2.11.1	Analyse des niveaux du glutathion	43
2.11.2	Analyse de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	44
2.12	Analyses statistiques	46

CHAPITRE 3 RÉSULTATS	47
3.1 Analyse du tétrabromobisphénol A (TBBPA) dans le milieu SIS	47
3.2 Détermination de la bioaccumulation du TBBPA par les plantes	49
3.3 Détermination de l'effet du TBBPA sur la croissance de la plante.....	50
3.4 Effet du tétrabromobisphénol A sur les pigments photosynthétiques	54
3.5 Effet du tétrabromobisphénol A sur le stress oxydant.....	56
3.5.1 Effet du TBBPA sur la formation des espèces réactives oxygénées (ROS) 56	
3.5.2 Effet du TBBPA sur les niveaux de la peroxydation lipidique.....	56
3.6 Effet du tétrabromobisphénol A sur les activités antioxydantes de la plante	57
3.6.1 Effet du TBBPA sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	57
3.6.2 Effet du TBBPA sur le niveau de l'antioxydant glutathion	58
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	63
4.1 Bioaccumulation du TBBPA par la plante <i>Lemna minor</i>	64
4.2 Effet du TBBPA sur la croissance des plantes	66
4.3 Effet du TBBPA sur la teneur des pigments photosynthétiques	67
4.4 Effet du TBBPA sur le stress oxydant.....	69
4.5 Effet du TBBPA sur les systèmes de détoxification antioxydants de la plante... 71	
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	74
ANNEXE A Résultats supplémentaires.....	76
ANNEXE B ANOVA- Test de comparaison multiple Tukey	79
BIBLIOGRAPHIE	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure chimique du tétrabromobisphénol A (TBBPA).	3
Figure 1.2 Dissociation du TBBPA en fonction du pH du milieu aquatique.....	7
Figure 1.3 Sources du TBBPA dans l'environnement aquatique.	9
Figure 1.4 Voie de déshalogénéation réductrice du tétrabromobisphénol A (TBBPA) en bisphénol A (BPA) par la formation des intermédiaires	13
Figure 1.5 Voies de transformation du tétrabromobisphénol A (TBBPA) par les microalgues d'eau douce.....	14
Figure 1.6 La lentille d'eau commune <i>Lemna minor</i>	19
Figure 1.7 Mécanisme de désintoxication et de tolérance aux polluants organiques dans les cellules de <i>Lemna</i>	22
Figure 1.8 Spectres d'absorption des pigments photosynthétiques	24
Figure 1.9 Structures électroniques des espèces réactives d'oxygène (ROS) les plus communes.	25
Figure 1.10 Les sites de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale.....	27
Figure 2.1 Cultures de la plante aquatique <i>Lemna minor</i>	35
Figure 2.2 Exposition des plantes <i>Lemna minor</i> au TBBPA dans des conditions contrôlées au laboratoire.	37
Figure 2.3 Schéma du protocole du dosage des pigments photosynthétiques par mesure d'absorbance.	41
Figure 2.4 Structure de C11-BODIPY (581/591)	43
Figure 2.5 Structure du bimane et réaction avec les thiols (RSH).	44
Figure 2.6 Schéma de réaction pour l'oxydation de l'Amplex Red catalysée par la peroxydase de racines du raifort (HRP) en présence de H ₂ O ₂	45

Figure 3.1 Chromatogrammes à ions extraits (XIC) et spectre MS de TBBPA (m/z 542.74) dans le milieu SIS à temps 0 (rose) et 7 (bleu) jours après la culture de <i>Lemna minor</i> à pH 6,5 (A, D); pH 7,5 (B, E) et pH 8,5 (C, F).	47
Figure 3.2 Le TBBPA disponible dans le milieu SIS à temps 0 jour (A) et après 7 jours (B) d'exposition aux plantes <i>Lemna minor</i> en fonction de la concentration nominale du TBBPA.	48
Figure 3.3 Bioaccumulation du TBBPA (en $\mu\text{g/g}$ de poids frais) chez les plantes après exposition aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu de culture SIS à pH 6,5, 7,5 et 8,5.	50
Figure 3.4 Effet inhibiteur du TBBPA sur la croissance de <i>Lemna minor</i> (en pourcentage %) après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA à pH 6,5 (A); 7,5 (B) et 8,5 (C).	53
Figure 3.5 Variations du contenu en chlorophylle <i>a</i> (ChlA), en chlorophylle <i>b</i> (ChlB) et en caroténoïdes (Car) en ($\mu\text{g/mg}$ PF) chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA à pH 6,5 (A); pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C).	55
Figure 3.6 La production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) intracellulaires (en % de contrôle) chez <i>L. minor</i> exposé pendant 7 jours aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C). ..	59
Figure 3.7 Le niveau de la peroxydation lipidique (en % de contrôle) chez <i>L. minor</i> exposé pendant 7 jours aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C)	60
Figure 3.8 L'activité spécifique de la catalase (en % de contrôle) chez <i>L. minor</i> exposé pendant 7 jours aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C)	61
Figure 3.9 Niveaux du glutathion (en % de contrôle) chez <i>Lemna minor</i> après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C).	62
Figure S. 1 Courbe standard du tétrabromobisphénol A dans l'acétonitrile	76
Figure S. 2 Essai de la stabilité du TBBPA (1 mg/L) après 48 heures d'exposition avec les plantes <i>Lemna minor</i> dans les milieux SIS à pH 6,5; 7,5 et 8,5 par rapport à un contrôle TBBPA sans <i>Lemna minor</i>	76

Figure S. 3 Chromatogramme (XIC) du TBBPA dans le milieu SIS culture avec <i>Lemna minor</i> à pH 6,5; 7,5 et 8,5.....	77
Figure S. 4 Chromatogramme (XIC) du TBBPA (m/z 542.74) (A) et du TBBPA-Br+H (m/z 462.83) (B) dans les extraits des plantes <i>Lemna minor</i> , Contrôle (0 TBBPA) et avec TBBPA à pH 6,5; pH 7,5 et pH 8,5.....	78
Figure S. 5 Chromatogramme (XIC) et spectre MS du TBBPA-Br+H (m/z 462.83) dans le milieu SIS avant et après la culture avec <i>Lemna minor</i> à pH 6,5; 7,5 et pH 8,5.....	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Propriétés physicochimiques du TBBPA	6
Tableau 1.2 Les concentrations du TBBPA mesurées dans l'environnement aquatique à travers le monde.	10
Tableau 1.3 Exemples des études de la toxicité du TBBPA chez les organismes aquatiques.....	17
Tableau 1.4 La classification de la lentille d'eau <i>Lemna minor</i>	18
Tableau 1.5 Les biomarqueurs du stress oxydant provoqué par différents contaminants de l'eau chez les lentilles d'eau.	30
Tableau 2.1 Composition du milieu de culture SIS pour <i>L. minor</i>	34
Tableau 2.2 Différentes conditions de traitement au TBBPA.	37
Tableau 3.1 Variations dans le poids frais (mg) et le nombre de frondes totales après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA à pH 6,5 (A); 7,5 (B) et 8,5 (C), chez la plante <i>Lemna minor</i>	52
Tableau S.1 Paramètres de croissance de <i>Lemna minor</i> après acclimatation de 7 jours dans le milieu SIS aux différents pH.	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABS	Acrylonitrile Butadiène Styène
ATP	Adénosine Triphosphate
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
RFB	Retardateur de flamme bromé
BPA	Bisphénol A
BSEF	<i>Bromine Science and Environmental Forum</i>
CAS N	<i>Chemical Abstracts Service Numbers</i>
CE50	Concentration efficace médiane
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
CL50	Concentration létale 50
DMSO	Diméthylsulfoxyde
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione S-Transferase
Koe ou Kow	Coefficient de partage Octanol / Eau
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
m/z	Le rapport masse sur charge
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate réduite
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PBDE	PolyBromoDiphénylEthers
PF	Poids frais
pH	<i>potential of hydrogen</i>
PS	Poids sec
PTFE	PolyTétraFluorÉthylène
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

SIS	<i>Swedish Institute for Standards</i>
T3	Triiodothyronine
TBBPA	TétraBromoBisphénol A
TH	<i>Thyroid hormone</i>
U A	Unité arbitraire
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolet
WWTP	<i>Wastewater Treatment Plant</i>
XIC	<i>Extracted-ion chromatogram</i>

RÉSUMÉ

Le tétrabromobisphénol A (TBBPA) est un retardateur de flamme bromé utilisé dans la fabrication des polymères plastiques des équipements électroniques, pour réduire leurs risques de combustion. Dû à leur grande utilisation, il est rejeté principalement dans l'environnement via les eaux usées produites dans les sites de recyclage des déchets électroniques. Sa présence dans les milieux aquatiques et ses effets néfastes sur les organismes aquatiques ont suscité des inquiétudes à l'échelle mondiale. Cependant, l'effet des facteurs environnementaux sur la biodisponibilité du TBBPA et leur toxicité est peu connu. L'objectif de ce projet est d'étudier l'influence du pH sur la bioaccumulation du TBBPA et sa toxicité en utilisant comme modèle d'étude la plante aquatique *Lemna minor*. Pour ce faire, la plante a été exposée au TBBPA dans différentes conditions de pH pendant 7 jours. Par la suite, la fraction du TBBPA absorbé et accumulé par la plante a été analysée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. De plus, l'effet de l'absorption du TBBPA sur les fonctions physiologiques et biochimiques de la plante a été étudié. Les résultats ont montré que *Lemna minor* pouvaient absorber et accumuler le TBBPA dans toutes les conditions de pH. Ainsi, les concentrations élevées de TBBPA ont inhibé légèrement la croissance de la plante et ont généré un stress oxydant par augmentation des niveaux des espèces réactives d'oxygènes et de peroxydation lipidique. Cependant, les systèmes de détoxification enzymatiques (catalase) et non enzymatiques (glutathion) ont été déclenchés chez la plante. Les résultats suggèrent que l'accumulation du TBBPA dans *Lemna minor* induit un stress oxydant et le niveau de tolérance dépend de la capacité antioxydante des plantes. Cette étude permettra de mieux comprendre le comportement chimique de ce contaminant émergent et son interaction avec les organismes aquatiques.

Mots clés : Tétrabromobisphénol A, *Lemna minor*, bioaccumulation, stress, pH, toxicité, plante aquatique, contamination, LC/MS.

ABSTRACT

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a brominated flame retardant used in the manufacture of plastic polymers in electronic equipment, to reduce their risk of combustion. Due to its wide use, it is released into the environment via wastewater produced in e-waste recycling sites. Its presence in aquatic environments and its adverse effects on aquatic organisms have been of global concern. However, little is known about the effect of environmental factors on the bioavailability of TBBPA and its toxicity. The objective of this project is to study the influence of pH on TBBPA bioaccumulation and toxicity using the aquatic plant *Lemna minor* as a study model. To do this, the plant was exposed to TBBPA under different pH conditions for 7 days. Subsequently, the fraction of TBBPA absorbed and accumulated by the plant was analyzed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. In addition, the effect of TBBPA absorption on the physiological and biochemical functions of the plant has been studied. The results showed that *Lemna minor* could absorb and accumulate TBBPA under all pH conditions. Thus, high TBBPA concentrations slightly inhibited plant growth and generated oxidative stress through increased levels of reactive oxygen species and lipid peroxidation. However, the enzyme (catalase) and non-enzymatic (glutathione) detoxification systems were triggered in the plant. The results suggest that the accumulation of TBBPA in *Lemna minor* induces oxidative stress and the level of tolerance depends on the antioxidant capacity of the plants. This study will provide a better understanding of the chemical behavior of this emerging contaminant and its interaction with aquatic organisms.

Keywords : Tetrabromobisphenol A, *Lemna minor*, bioaccumulation, stress, pH, toxicity, aquatic plant, contamination, LC/MS.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tous les jours, de nouveaux composés chimiques industriels sont ajoutés au secteur des produits de consommation. Les retardateurs de flamme bromés (RFB) font partie de ces composés. Les RFB jouent un rôle clé dans le respect des exigences de sécurité incendie et la protection des consommateurs. Ils interviennent au cours de l'une des quatre étapes de la combustion, qui sont l'échauffement ou le préchauffage, la volatilisation/décomposition ou la combustion et la propagation en permettant des temps d'évacuation plus longs en cas d'incendie ainsi qu'un temps de réponse plus long (Alaee *et al.*, 2003). Les RFB incluent plus de 75 substances, avec des différentes structures moléculaires et propriétés physicochimiques et ils appartiennent à trois groupes principaux, les polybromés diphenyléthers et biphenyles (PBDE et PBB), les hexabromocyclododécane (HBCD) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA) (De Wit, 2002).

Dans cette étude, nous nous intéressons au tétrabromobisphénol A (TBBPA). Ce composé est largement utilisé dans la fabrication des objets courants de notre vie, tels que les plastiques, les textiles et les équipements électriques/électroniques. Ainsi, il est le RFB le plus produit dans le monde (Covaci *et al.*, 2009). Le TBBPA a d'abord été utilisé pour remplacer les PBDE, dont l'utilisation suscitait des inquiétudes en raison de leur forte persistance dans l'environnement (Eriksson *et al.*, 2004). La substitution par le TBBPA a été justifiée par le fait que les estimations de sa demi-vie chez les mammifères sont relativement courtes (< 24 h) et que le risque extrapolé d'exposition humaine et de toxicité est considéré comme faible (Kuester *et al.*, 2007). Cependant, en raison de l'utilisation intensive du TBBPA, ce dernier finit par mettre fin à leur cycle de vie dans l'environnement et son omniprésence dans l'eau pose des problèmes graves dans l'environnement aquatique. Malheureusement, il a été trouvé dans diverses matrices environnementales, telles que l'air, les sols, l'eau, les sédiments et les

organismes vivants incluant les humains (Darnerud, 2003). Ainsi, la toxicité du TBBPA a suscité de l'inquiétude ces dernières années. Des effets indésirables du TBBPA en tant que perturbateur endocrinien et plus particulièrement sur la signalisation thyroïdienne et en tant qu'un inducteur du stress oxydant ont été prouvées (Birnbaum et Staskal, 2004). Cependant, le manque d'information sur les effets toxiques et les mécanismes de cette toxicité chez les organismes aquatiques constitue un problème dans la compréhension de l'écotoxicologie de ce contaminant. Un autre problème est le devenir du TBBPA dans les milieux aquatiques et l'influence de différents facteurs environnementaux biotique et abiotique sur ce contaminant. Ainsi, la formation de certains sous-produits toxiques qui sont détectés dans les milieux aquatiques. Donc, visant à contribuer à une meilleure compréhension de la toxicologie du TBBPA, ce travail a pour objectif d'étudier l'influence de l'un des facteurs environnementaux les plus importants, qui est le pH du milieu aquatique, sur le devenir et l'effet du TBBPA chez un modèle de plante aquatique, la lentille d'eau *Lemna minor*. L'hypothèse de recherche de ce projet de maîtrise est que le pH pourrait jouer un rôle important dans la biodisponibilité de ce contaminant dans le milieu aquatique.

Ce projet est organisé en quatre (4) chapitres : Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique qui est divisée en quatre parties, en premier des généralités sur le tétrabromobisphénol A, leur utilisation, leur présence et leur toxicité dans l'environnement aquatique. Nous nous intéressons au modèle d'étude la plante aquatique *Lemna minor* en deuxième partie. En troisième partie, nous faisons le point sur les biomarqueurs de toxicité et nous nous intéressons plus particulièrement au stress oxydant. Enfin, la problématique et les objectifs de cette recherche ont aussi été discutés dans ce chapitre. Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées au laboratoire. Dans le troisième chapitre, nous avons présenté les résultats obtenus. Le quatrième chapitre est une analyse et discussion sur les résultats. Une conclusion générale, ainsi que les perspectives qui se dessinent pour de futures recherches terminent le manuscrit.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Généralité sur le tétrabromobisphénol A

1.1.1 Définition

Le tétrabromobisphénol A (TBBPA) est une molécule phénolique bromée qui appartient à la famille des retardateurs de flamme bromés (RFBs) (Zhou *et al.*, 2020). La nomenclature du tétrabromobisphénol A (TBBPA) est tirée de son nom chimique 2,2',6,6'-tétrabromo-4,4'-isopropylidènediphénol selon l'union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA). Ainsi, la structure du TBBPA est composée de deux anneaux hydroxyphényles avec des atomes de brome aux positions 2, 2', 6 et 6'. La formule brute du TBBPA est $C_{15}H_{12}Br_4O_2$ (Environment et Health Canada, 2013). La structure chimique du TBBPA est présentée dans la figure (1.1).

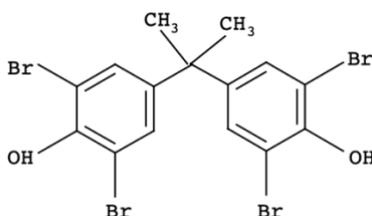


Figure 1.1 Structure chimique du tétrabromobisphénol A (TBBPA).

1.1.2 Production et utilisations du tétrabromobisphénol A

Le TBBPA est produit par bromination du bisphénol A (BPA) avec du brome en présence d'un solvant, tel que le méthanol ou un halocarbure, de l'acide hydroponique à 50 % ou de monoéthers alkylés, de méthanol et d'acide acétique (Alaee *et al.*, 2003). L'efficacité élevée et la stabilité thermique supérieure du TBBPA en tant que retardateur de flamme lui permettent d'être largement utilisé dans divers produits de consommation (Okeke *et al.*, 2022). Selon les informations publiées par le BSEF

(Bromine Science and Environmental Forum), le TBBPA est le retardateur de flamme bromé le plus produit dans le monde et il représente environ 60 % du marché total des RFBs (Zhou *et al.*, 2020) et la quantité de production annuelle de TBBPA était d'environ $6,43 \times 10^6$ tonnes uniquement en Chine, le producteur principal de TBBPA. De plus, les États-Unis d'Amérique, Israël, Japon et Jordanie sont aussi des principaux pays producteurs de TBBPA (Zhou *et al.*, 2020). Environ 58 % du tétrabromobisphénol A est utilisé comme retardateur de flamme bromé réactif dans les résines époxy et polycarbonate. De plus, 18 % de TBBPA sont utilisés comme retardateur de flamme additif dans la fabrication de résines d'acrylonitrile-butadiène-styrène (ABS) et 18 % sont utilisés pour la production de dérivés et d'oligomères du tétrabromobisphénol A (Covaci *et al.*, 2009).

Les principales applications du tétrabromobisphénol A sont:

- Le TBBPA est utilisé comme ignifuge de type réactif, c'est-à-dire qu'il est incorporé par réaction chimique dès la création de la macromolécule, ou greffé sur les chaînes polymères après polymérisation (Birnbaum et Staskal, 2004). Les principaux polymères qui contiennent le TBBPA sont les résines époxy constitutives des cartes de circuits imprimés et les résines époxy utilisées pour encapsuler certains éléments électroniques des circuits imprimés.
- Le TBBPA est aussi utilisé comme réactif dans d'autres plastiques et résines tels que les polycarbonates, résines polyester insaturées, résines vinyle, ester et résines phénoliques. Ces résines sont notamment utilisées dans des appareils de communication, des appareils électroménagers et électroniques, des appareils de transport, des articles de sport et de loisirs (Covaci *et al.*, 2009).
- Le TBBPA est intégré aux polymères en tant qu'additif ignifuge. Il est surtout utilisé dans le plastique ABS (acrylonitrile butadiène-styrène) dans des boîtiers extérieurs d'équipements électriques et électroniques. Ainsi, dans les textiles, les matériaux de construction et les peintures (Covaci *et al.*, 2009).

- Le TBBPA est également utilisé dans la fabrication de dérivés, tels que le TBBPA-bis (allyl éther) (TBBPA-BAE), le TBBPA-bis (2,3-dibromopropyl éther) (TBBPA-BDBPE) et le TBBPA-bis (2-hydroxyéthyl éther) (TBBPA-BHEE). Ils sont également utilisés dans les mousses de polystyrène et les produits en plastique, tels que les tuyaux et les hottes de cuisine (Okeke *et al.*, 2022).

1.1.3 Propriétés physicochimiques du tétrabromobisphénol A

Le tableau (1.1) résume les principales propriétés physicochimiques de tétrabromobisphénol A. Le TBBPA se trouve en commerce sous forme d'une poudre cristalline blanche contenant 58,4 % de brome, avec un point d'ébullition d'environ 316 °C et un point de fusion de 181 à 182 °C. Le TBBPA est un composé chimique hautement lipophile. Son coefficient de partage octanol-eau (log K_{ow} ou K_{ow}) dépend fortement du pH du milieu aquatique dans lequel il est dissous. Des études montrent qu'à pH faible et neutre, le TBBPA a un potentiel plus élevé de partage dans les lipides qu'à un pH élevé. De ce fait, le TBBPA est très soluble dans les solvants organiques, comme le méthanol, l'acétone et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Cependant, sa solubilité dans l'eau est faible, elle est déterminée expérimentalement entre 21 et 25 °C sur 0,148, 1,26 et 2,34 mg/L à des valeurs de pH de 5, 7 et 9, respectivement. Donc, elle dépend de la température et du pH du milieu. De plus, la présence de deux groupes hydroxyles phénoliques dans la structure du TBBPA (Fig. 1.1) explique les deux valeurs de pK_a du TBBPA (7,5 et 8,5). Ainsi, le TBBPA est un composé un peu volatil, en raison d'un poids moléculaire élevé et des faibles valeurs de la pression de vapeur et de la constante de la loi de Henry (Kuramochi *et al.*, 2008).

Tableau 1.1 Propriétés physicochimiques du TBBPA (Environment et Health Canada, 2013).

Nomenclature	Tétrabromobisphénol A
CAS Number	79-94-7
Poids moléculaire (g/mol)	543,88
Point de fusion (°C)	181 – 182
Point d'ébullition (°C)	316 (décompose à 200 – 300°C)
Solubilité dans l'eau (mg/L)	0,148 à 2,34 (pH de 5,0 à 9,0; 25 °C)
Constante de dissociation (pKa)	pKa 1 = 7,5 et pKa2 = 8,5
Coefficient de partage octanol/eau (Log Kow)	4,50 à 6,53
Pression de vapeur (Pa)	$< 1,19 \times 10^{-5}$ (20 °C)
Constante de la loi de Henry (Pa·m ³ /mol)	$1,47 \times 10^{-5}$

1.1.4 L'effet du pH du milieu aquatique sur la solubilité du TBBPA

Les propriétés physicochimiques uniques du TBBPA sont principalement influencées par les facteurs environnementaux. Le pH du milieu aquatique est l'un de ces facteurs qui peuvent exercer un effet significatif sur le comportement du TBBPA et sa distribution dans l'environnement (Zhou *et al.*, 2020), car ce paramètre peut modifier l'hydrosolubilité du TBBPA et déterminer les différents niveaux d'association ou d'ionisation du TBBPA dans l'eau (Macêdo *et al.*, 2021). Étant donné que le TBBPA est un composé phénolique à deux groupes hydroxyles (OH) polaires avec deux coefficients de dissociation (pKa1 de 7,5 et pKa2 de 8,5) (Kuramochi *et al.*, 2008), cette propriété chimique lui permet de se retrouver dans l'eau sous trois états différents et sa solubilité dans l'eau varie en fonction du pH (Fig. 1.2) :

- Dans des conditions acides (pH < pKa1), il se retrouve sous la forme moléculaire ou la forme non dissociée (TBBPA).
- Dans des conditions alcalines (pH > ou = pKa1 et pKa2), il se retrouve sous deux formes ionisées ou dissociées, la forme ionisée monobasique (TBBPA⁻)

et la forme ionisée dibasique (TBBPA^{2-}), selon si l'ionisation a fait perdre un ou deux protons des groupes hydroxyles de la molécule.

La solubilité du TBBPA dans l'eau augmente avec l'ionisation, ce qui fait que le TBBPA se dissout principalement à un pH supérieur au pKa (Li *et al.*, 2013).

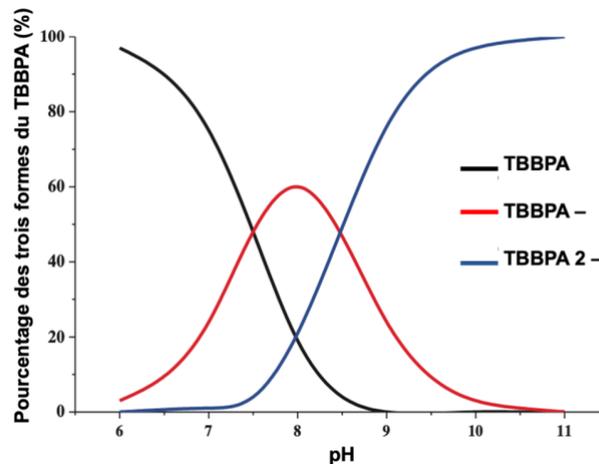


Figure 1.2 Dissociation du TBBPA en fonction du pH du milieu aquatique (en noir TBBPA = non dissocié (neutre), en rouge TBBPA- = monobasique (monoprotique), en bleu TBBPA 2- = dibasique (diprotique)) (He *et al.*, 2015).

1.1.5 Sources et présence du TBBPA dans l'environnement aquatique

Le tétrabromobisphénol A est devenu un contaminant environnemental omniprésent en raison de son utilisation massive en tant que produit ignifuge. Le TBBPA a été détecté dans pratiquement tous les compartiments environnementaux du monde. Il a été signalé pour la première fois en 1983 dans les sédiments de la rivière Neya au Japon à une concentration de 20 ng/g de poids sec par Watanabe et son équipe (Okeke *et al.*, 2022). Dans plusieurs études, le TBBPA est signalé dans diverses matrices environnementales abiotiques et biotiques (Fig. 1.3). Il est détecté à des niveaux variables dans les sols, les sédiments et les milieux aquatiques des rivières et des lacs de différents endroits géographiques (Xiong *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012; Malkoske *et al.*, 2016). Il est détecté aussi dans l'Arctique, ce qui suggère la possibilité de sa migration sur de longues distances (De Wit *et al.*, 2006). De plus, le TBBPA peut

se bioaccumuler dans les organismes aquatiques selon la chaîne trophique. Il a été trouvé dans les œufs des oiseaux, des poissons et d'autres organismes aquatiques et des échantillons du lait maternel et du plasma humain (Berger *et al.*, 2004; Kotthoff *et al.*, 2017; Pittinger et Pecquet, 2018; Ohta *et al.*, 2004; Jakobsson *et al.*, 2002). Les concentrations les plus élevées de TBBPA chez les organismes humains et animaux sont enregistrées en Chine, ce qui est lié à une alimentation riche en poissons et en fruits de mer (Birnbaum et Staskal, 2004).

Au cours des processus impliqués dans la production, l'utilisation et l'élimination élevées, le TBBPA peut être rejeté dans l'environnement. Les principales sources identifiées sont les sites de production des retardateurs de flamme (RFBs) et de fabrication de produits à base de TBBPA, les sites de recyclage des déchets électroniques (E - waste) et les stations de traitement des eaux usées (WWTP) des produits à base de TBBPA (Malkoske *et al.*, 2016). Le TBBPA pénètre inévitablement dans les milieux aquatiques par le biais d'effluents anthropiques tout au long de leur cycle de vie (De Wit, 2002). Les eaux usées provenant des industries produisant et utilisant le TBBPA devraient être les principaux contributeurs à la charge de TBBPA dans les stations d'épuration (Malkoske *et al.*, 2016). Ces eaux usées peuvent rejeter le TBBPA dans l'environnement par le rejet d'effluents dans les eaux de surface et la mise en décharge des boues (Lee *et al.*, 2015). La charge environnementale des effluents et des boues dépend de la présence de TBBPA dans les eaux usées entrantes, du volume d'eaux usées traitées et de l'efficacité d'élimination de la station d'épuration (Labadie *et al.*, 2010).

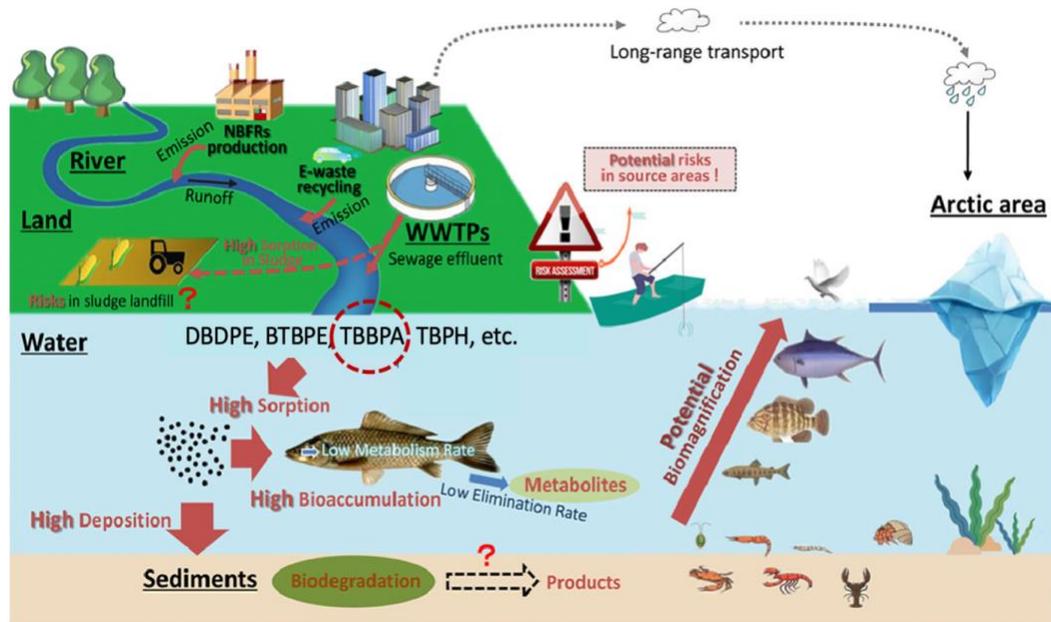


Figure 1.3 Sources du TBBPA dans l'environnement aquatique (modifié de) (Hou *et al.*, 2021).

En raison de ses propriétés physicochimiques (faible solubilité dans l'eau et forte lipophilie), le TBBPA a tendance à s'adsorber aux particules en suspension dans l'eau et avoir subi une sédimentation (Cheng *et al.*, 2019). Le TBBPA a été mesuré dans tous les milieux et les concentrations les plus élevées ont été mesurées dans des zones urbaines et industrielles, principalement dans les sédiments ainsi que dans les affluents et les effluents des stations d'épuration, à la fois en phase dissoute (DP) et en phase particulaire (PP). Les concentrations de TBBPA dans l'environnement aquatique se sont avérées variables. Le TBBPA a été détecté dans les lixiviats des décharges des sites de déchets industriels à des concentrations allant de 0,3 à 620 ng/L. La teneur de TBBPA la plus élevée a été détectée dans les sédiments, qui sont considérés comme un puits pour le TBBPA, avec une concentration maximale mesurée supérieure à 500 µg/kg. Cependant, des concentrations de TBBPA qui varie de non détectable (nd) à 4,87 µg/L ont été mesurées dans l'eau (Yang *et al.*, 2012b). Le tableau (1.2) représente des études qui mentionnent différentes concentrations de TBBPA dans les eaux usées

et les boues d'épuration, dans les eaux de surface et les sédiments proches des zones de fabrication ou de recyclage des produits contenant le TBBPA.

Tableau 1.2 Les concentrations du TBBPA mesurées dans l'environnement aquatique à travers le monde.

Matrice	Pays	Concentration TBBPA	Référence
Eaux et les boues d'épuration (Stations de traitement des eaux usées)	Chine (Guangzhou)	657 - 732 ng/g ps	(Feng <i>et al.</i> , 2012)
	Chine (Shanghai)	3,21 ng/L	(Zhou <i>et al.</i> , 2014)
	Corée	4 - 618 ng/g ps	(Hwang <i>et al.</i> , 2012)
	Canada	300 ng/g ps	(Saint-Louis et Pelletier, 2004)
		2 - 28 ng/g ps	(Chu <i>et al.</i> , 2005)
Pays-Bas	3,1–63 ng/L	(Morris <i>et al.</i> , 2004)	
Eaux de surface	Chine	0,36–1,12 ng/L	(Xu <i>et al.</i> , 2013)
		1.11–2.83 ng/L	(He <i>et al.</i> , 2013)
		nd–920 ng/L	(Xiong <i>et al.</i> , 2015)
Pologne	0,26–0,49 µg/L	(Kowalski et Mazur, 2014)	
Sédiments	Japon	5,5 ng/g ps	(Suzuki et Hasegawa, 2006)
	France	0,065–0,130 ng/g ps	(Labadie <i>et al.</i> , 2010)
	États-Unis	1,84 ng/g ps	(Quade <i>et al.</i> , 2003)
	Corée	0,5–150 ng/g ps	(Lee <i>et al.</i> , 2015)
	Angleterre	5–9800 ng/g ps	(Morris <i>et al.</i> , 2004)
	Chine	3,8–230 ng/g ps	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)

Légende : nd = non détecté. ps = Poids sec.

1.1.6 La bioaccumulation du TBBPA chez les organismes aquatiques

L'absorption et la rétention d'un contaminant pourraient conduire à son accumulation dans l'organisme. Le facteur de bioaccumulation se définit comme le rapport entre la concentration d'un contaminant dans un organisme et sa concentration dans l'environnement après l'exposition de différentes sources (Nyholm, 2009). Dans l'environnement aquatique, le TBBPA a tendance à s'adsorber sur les matières particulaires (MPS) et à s'accumuler dans les sédiments par les rejets d'eaux usées. Par la suite, le TBBPA dans les sédiments contaminés peut potentiellement migrer dans la colonne d'eau de manière persistante, par des processus de dissolution, de diffusion et de remise en suspension. Enfin, le biote aquatique peut facilement absorber le TBBPA de l'eau (Malkoske *et al.*, 2016).

Les études sur la bioaccumulation de TBBPA chez les organismes aquatiques sont limitées à quelques études. Par exemple, une étude a montré que le pétoncle *Chlamys farreri* a absorbé rapidement et a accumulé une teneur de TBBPA de 21,36 µg/g de poids sec (PS) dans la glande digestive pendant 6 jours d'exposition à une concentration de TBBPA de 0,8 mg/L. Le pétoncle *Chlamys farreri* est une espèce de coquillage répartie dans les zones côtières de la Chine, de la Corée et du Japon et il est utilisée comme organisme modèle dans des études de toxicologie (Hu *et al.*, 2015). Chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), le niveau d'accumulation du TBBPA dans le foie était de 147 ng/g, à la suite d'une exposition à 2,0 mg/L de TBBPA pendant 32 jours (Yang *et al.*, 2013). Le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) absorbe rapidement le TBBPA et l'équilibre a été atteint en moins de 3 jours (Hakk et Letcher, 2003). Les concentrations de TBBPA étaient de non détecté à 158 ng/g PS chez les bivalves l'huître (*Crassostrea gigas*) et la moule (*Mytilus coruscus*) (Gu *et al.*, 2017). Chez les plantes aquatiques, les études d'accumulation de TBBPA sont limitées. Une étude chez le macrophyte submergé, *Ceratophyllum demersum*, a montré

l'accumulation de la majeure partie du TBBPA après une exposition de 4 jours (Sun *et al.*, 2008).

1.1.7 La dégradation et la transformation du TBBPA dans l'environnement aquatique

Le tétrabromobisphénol A est considéré comme persistant dans l'environnement aquatique selon les critères établis dans le règlement sur la persistance et la bioaccumulation. Il se dégrade très lentement dans l'environnement et sa demi-vie dans l'eau est supérieure ou égale à 182 jours (Environment et Health Canada, 2013). Cependant, ce produit chimique peut être affecté par des dégradations physiques et biologiques conduisant à la formation de dérivés tels que le bisphénol A (BPA) (De Wit, 2002).

1.1.7.1 Dégradation abiotique du tétrabromobisphénol A

Parmi les voies de dégradation abiotique de TBBPA dans le milieu aquatique, il y a la photodégradation. Il a été démontré que le TBBPA est facilement photodégradé en solution aqueuse. Une décomposition photolytique de TBBPA, qui implique le clivage entre l'un des cycles benzéniques et le groupe isopropyle, produisant un certain nombre de phénols substitués, principalement le 4-hydroxy-2,6-dibromophénol, le 4-(2-hydroxyisopropyl)-2,6-dibromophénol et le 4-isopropylène-2,6-dibromophénol (Eriksson *et al.*, 2004). Une autre voie de dégradation est l'oxydation du TBBPA sous l'action du rayonnement solaire en présence d'acides humiques. Le TBBPA se transforme en radical anionique 2,6-dibromo-p-benzosemiquinone dans l'environnement naturel (Environment et Health Canada, 2013).

1.1.7.2 Dégradation biotique du tétrabromobisphénol A

La plupart des produits chimiques organiques sont biologiquement dégradés par les bactéries à l'aide du processus de boues activées pour l'élimination efficace (Lee et Peart, 2002). La biodégradation du TBBPA est considérée comme la principale voie de

transformation du TBBPA dans les milieux aquatiques. Il a été démontré que le tétrabromobisphénol A (TBBPA) peut subir une débromination microbienne dans les boues d'épuration et les sédiments fluviaux du sud de Taiwan. Deux bactéries *Bacillus pumilus* et *Rhodococcus ruber* étaient dominantes dans le processus de dégradation du TBBPA dans des conditions aérobique (Chang *et al.*, 2012a). Il est également possible que le TBBPA se dégrade dans un environnement anaérobie. Il a été démontré que le TBBPA se déshalogénait pour former du bisphénol A (BPA). D'autres dérivés, tel que le dibromobisphénol A (diBBPA) a été produit dans les sédiments d'eau douce par les bactéries sulfato-réductrices (Chang *et al.*, 2012b ; Ronen et Abeliovich, 2000). La déshalogénation réductrice de TBBPA en bisphénol A (BPA), par la formation de deux intermédiaires, le tribromobisphénol A (TriBBPA) et le dibromobisphénol A (diBBPA) (Fig. 1.4) a été démontrée dans des sédiments végétalisés par deux espèces de macrophytes de marais salés, l'herbe de cordon lisse (*Spartina alterniflora*) et le roseau commun (*Phragmites australis*) (Ravit *et al.*, 2005).

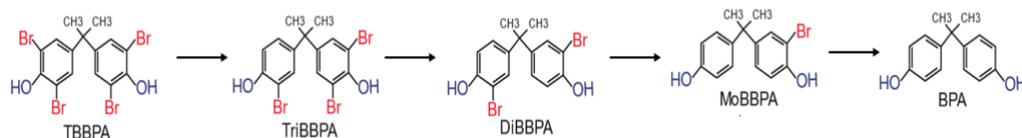


Figure 1.4 Voie de déshalogénation réductrice du tétrabromobisphénol A (TBBPA) en bisphénol A (BPA) par la formation des intermédiaires : le tribromobisphénol A (TriBBPA), le dibromobisphénol A (DiBBPA) et le monobisphénol A (MoBBPA) (Ramaswamy *et al.*, 2021).

L'hydroxylation et la débromination du TBBPA étaient des mécanismes de transformation chez les plantes de mangrove. Un essai hydroponique à court terme de 14 jours avec deux espèces de mangroves, *Avicennia marina* et *Kandelia obovata* a mené à la transformation de TBBPA en tétrabromobisphénol A- hydroxy (HO-TBBPA), tribromobisphénol A (TriBBPA), monobromobisphénol (MonoBBPA) et bisphénol A (BPA) (Jiang *et al.*, 2020). Il est suggéré que les microalgues peuvent jouer un rôle important dans le devenir du TBBPA dans les milieux aquatiques. Dans une

étude sur la capacité des algues à transformer le TBBPA en milieu de croissance et dans les eaux naturelles (pH 7,7), différentes espèces ont montré différents types de transformation. Les mécanismes impliqués dans la biotransformation algale de TBBPA comprenaient la sulfatation, la glycosylation, la O-méthylation et la débromination. Cinq produits de transformation ont été identifiés: le sulfate de TBBPA, le glucoside de TBBPA, le glucoside de TBBPA sulfaté, l'éther monométhyle de TBBPA et le tribromobisphénol-A (Fig. 1.5) (Peng *et al.*, 2014).

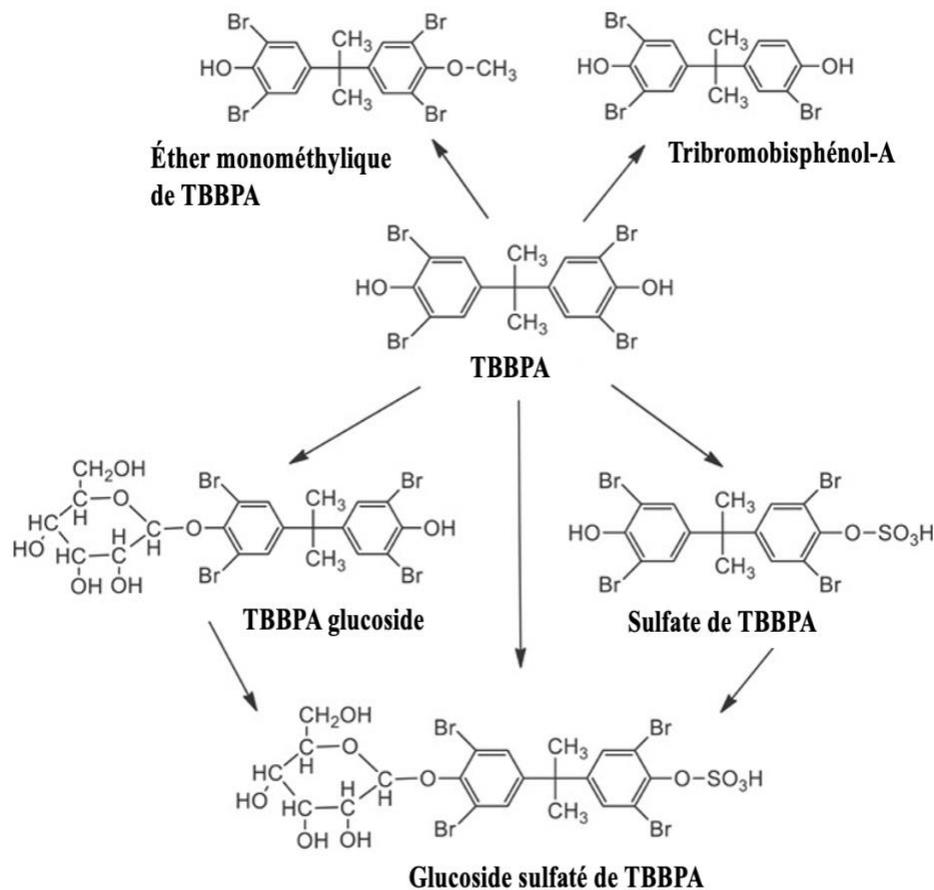


Figure 1.5 Voies de transformation du tétrabromobisphénol A (TBBPA) par les microalgues d'eau douce (Peng *et al.*, 2014).

1.1.8 La toxicité du tétrabromobisphénol A chez les organismes aquatiques

L'importante production et utilisation de TBBPA, qui causent son infiltration dans l'environnement, constituent une menace pour les organismes aquatiques. En effet, le TBBPA exerce des effets nocifs importants sur la survie, la reproduction et le développement de ces organismes à de très faibles concentrations. La toxicité du TBBPA a été largement étudiée chez les poissons, les invertébrés et les animaux aquatiques (He *et al.*, 2015; Kuiper *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012a; Ronisz *et al.*, 2004; Wollenberger *et al.*, 2005). Cependant, il y a peu d'étude sur l'effet du TBBPA chez les algues d'eau douce et les plantes aquatiques (Pittinger et Pecquet, 2018; Jiang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2008). Le tableau (1.3) résume les études effectuées sur la toxicité du TBBPA chez les organismes aquatiques, incluant les poissons, les invertébrés, les algues et les plantes aquatiques. Dans les études sur les effets du TBBPA chez les plantes aquatiques, une inhibition de croissance avec une valeur de CE50 allant de 0,09 à 5,6 mg/L a été démontrée. Chez les algues marines, des études ont signalé une CE50 sur 72 heures de 0,09 à 0,89 mg/L pour *Skeletonema costatum* et une CE50 de 0,13-1,0 mg/L sur 72 heures pour *Thalassiosira pseudonana* (Environment et Health Canada, 2013). De plus, une diminution du taux de croissance et de l'abondance des cellules viables chez deux microalgues d'eau douce (*Pseudokirchneriella subcapitata* et *Nitzschia palea*) exposés au TBBPA (9,2, 12,9 et 16,5 µM) pendant 72 h (Debenest *et al.*, 2011). Ainsi, le TBBPA était toxique et affectait la reproduction des invertébrés aquatiques *Daphnia magna* et des mysidacés, avec une CL50 d'environ 1 mg/L (Darnerud, 2003). Cependant, chez les poissons, le TBBPA était extrêmement toxique à des concentrations élevées. Les concentrations de CL50 signalées en 96 heures chez le crapet arlequin, chez la truite arc-en-ciel et chez le poisson zèbre étaient de 0,51 mg/L (0,9 µM), 0,40 mg/L (0,7 µM) et 3 mg/L (5,5 µM) respectivement (Feiteiro *et al.*, 2021). Les effets observés étaient une irritation, des contractions musculaires et une nage erratique (crapet arlequin, truite arc-en-ciel) ainsi qu'une survie et une croissance réduites des jeunes individus (Tête-de-boule *Pimephales*

promelas). Chez le poisson zèbre, le TBBPA cause un retard de développement et des malformations (par exemple des petites têtes, œdèmes dans la région péricardique et la queue) ainsi qu'une légère perturbation du système thyroïdien et le stress oxydatif (Zhou *et al.*, 2020).

Le mode d'action du TBBPA n'a pas été déterminé. Cependant, des recherches ont montré que le TBBPA pourrait perturber le fonctionnement normal du système thyroïdien chez les amphibiens et les poissons. Une concentration de 10^{-8} M (54 ng/L) de TBBPA peut supprimer le raccourcissement de la queue dépendant de la triiodothyronine (T3) chez les têtards *Rana rugosa*, ce qui indique une activité antithyroïdienne de TBBPA (Kuiper *et al.*, 2007). Ainsi, l'exposition au TBBPA induit une diminution des taux plasmatiques des hormones thyroïdiennes (TH) chez les amphibiens. Par exemple, une étude *in vitro* a démontré que le TBBPA peut agir comme une hormone thyroïdienne. En raison de sa ressemblance structurelle avec les hormones thyroïdiennes naturelles, le TBBPA entre en concurrence et inhibe la liaison de la triiodothyronine (T3) avec son récepteur plasmatique, la transthyrétine (TTR) (Birnbaum et Staskal, 2004). Ainsi, le TBBPA pourrait induire un stress oxydatif, par la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne une peroxydation des lipides membranaires, des dommages nucléaires et la destruction des protéines. Le TBBPA peut agir aussi sur les systèmes de défense antioxydants chez les poissons, les algues et les plantes aquatiques (Sun *et al.*, 2008; He *et al.*, 2015; Ronisz *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2008). Il a été démontré que le stress oxydatif peut être impliqué dans la neurotoxicité, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité des organismes (Shi *et al.*, 2005). De plus, des perturbations de l'organisation intracellulaire ont également été observées chez les microalgues exposées au TBBPA (Debenest *et al.*, 2010). Il a été démontré que le TBBPA se distribue dans toute la bicouche phospholipide, en se liant à la membrane avec une efficacité élevée et en altérant les propriétés biophysiques des membranes. En conséquence, la densité et la viscosité de la membrane peuvent s'augmenter (Ogunbayo *et al.*, 2007).

Tableau 1.3 Exemples des études de la toxicité du TBBPA chez les organismes aquatiques.

Groupe	Espèce biologique	Concentration du TBBPA	Paramètres d'exposition			Biomarqueurs étudiés (Endpoint)	Citation
			Temps	Milieu	Température		
Poisson	La truite arc-en-ciel juvénile (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	0,1; 1; 10; 50 et 100 mg /kg	1, 4, 14 et 28 jours	Eau douce	10 °C	Activité EROD, GST, GR et catalase	(Ronisz et al., 2004)
	<i>Carassius auratus</i>	0.3 et 3 mg / L	7j, 21j	Eau à pH 6.0; 7.5 et 9.0	20 ± 1 ° C	Protéines, SOD, CAT, GST, GSH	(He et al., 2015)
	<i>Danio rerio</i> (Poisson zèbre)	0, 0.023, 0.047, 0.094, 0.188, 0.375, 0.750, 1.50, 3.00, 6.00 µM	30j - 47 j	pH 7,2 à 8,4	27 ± 1 ° C	Croissance, Développement, reproduction et éclosion	(Kuiper et al., 2007)
	<i>Carassius auratus</i>	1,54; 2,00; 2,60; 3,38; 4,39; 5,71 et 7,43 mg / L	96 h	pH 7,0 ± 0,5	22 ± 2 ° C	CL 50	(Yang et al., 2012)
Invertébrés aquatiques	<i>Daphnia magna</i>	0,04;0,15;0,5;1;5;10;15;20; 30 mg/L	24h	Eau du robinet à pH 7,50 ± 0,25	20 ± 1 ° C	Immobilisation-EC50	(He et al., 2015)
	Le ver rouge (<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>)	0,06;0,15;0,30;1;5;10;20;30; 50 mg/L			23 ± 1 ° C		
	<i>Daphnia magna</i>	0,6, 0,75, 0,94, 1,18, 1,48, 1,85, 2,31, 2,88 et 3,6 mg/L	96 h	pH 7,0 ± 0,5	22 ± 2 ° C	CL 50	(Yang et al., 2012)
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	5; 6; 7,2; 8,64; 10,37; 12,44; 14,93 et 17,92 mg / L					
	Copépode (<i>Acartia tonsa</i>)	100 à 500 µg/L	48 h 5 jours	Eau salée synthétique 18‰	20 ± 0,5°C	CL 50 (Toxicité aiguë) CE50 (développement larvaire)	(Wollenberger et al., 2005)
Algues	<i>Scenedesmus quadricanda</i>	0,4; 0,56; 0,784; 1,098; 1,537; 2,151 et 3,012 mg / L	96 h	pH 7,0 ± 0,5	22 ± 2 ° C	CE 50	(Yang et al., 2012)
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	0,018; 0,032; 0,051;0,087 et 0,150 mg / L.	96 h	nd	nd	Densité cellulaire algale	(Pittinger et Pecquet, 2018)
	L'algue verte <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,67, 4,00, 6,00, 9,00, 13,50 mg/L	4, 24, 48, 72, 168, 192, 216 h	Milieu BG-11 à pH 7,1	26 °C	Activité estérase, Intégrité de la membrane, Les concentrations des ROS intracellulaires	(Liu et al., 2008)
Plantes aquatiques	Les plantes de mangrove <i>Avicennia marina</i> et <i>Kandelia obovata</i>	0,5 et 5,0 mg/L	7 à 14 j	Solution Hoagland	25 ± 5 ° C	Absorption et biotransformation Croissance, MDA et activité antioxydante (SOD, POD et CAT)	(Jiang et al., 2020)

Légende : nd = non déterminé

1.2 La plante aquatique *Lemna minor*

1.2.1 Description de *Lemna minor*

Lemna minor est une petite plante aquatique ou macrophyte flottant. *L. minor* appartient à la famille des *Lemnaceae* (Tableau 1.4), communément connue sous le nom lentille d'eau. Elle pousse généralement dans les eaux stagnantes ou à écoulement lent à travers les zones tropicales et tempérées (Mkandawire et Dudel, 2007).

Tableau 1.4 La classification de la lentille d'eau *Lemna minor* (Ekperusi *et al.*, 2019).

Domaine	Eucaryote
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	<i>Araceae</i> (Arales)
Famille	<i>Lemnacée</i>
Genre	<i>Lemna</i>
Espèce	<i>Lemna minor</i>

La plante *L. minor* est la plus petite de toutes les angiospermes. Elle est composée d'une ou de quelques feuilles (2 à 4) appelées frondes et d'une seule racine (1 mm à 5 cm). Elle mesure environ 2 à 4 mm de diamètre (Fig. 1.6). La reproduction de *Lemna* est presque exclusivement asexuée. Les frondes se reproduisent principalement en mode végétatif, selon lequel les frondes filles bourgeonnent à partir d'une ou deux poches dans les frondes mères, tout en restant attachées pendant un certain temps pour former des colonies. Dans des conditions idéales, les plantes de lentilles d'eau peuvent doubler leur masse en moins de 2,5 jours. De plus, la fronde mère produit un nombre

considérable de frondes filles au cours de sa vie, mais elle meurt généralement après une production de six générations (Ziegler *et al.*, 2016).

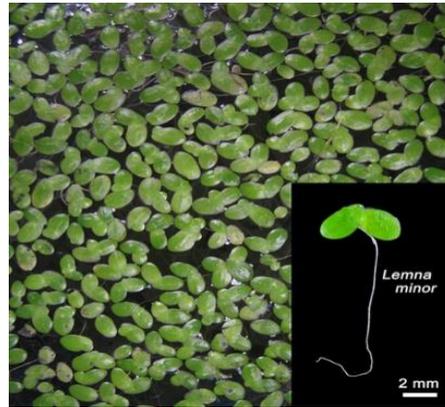


Figure 1.6 La lentille d'eau commune *Lemna minor*. De nombreuses frondes sont vues d'en haut, et une plante représentative est montrée en vue latérale (avec deux frondes) (Kutschera et Niklas, 2015).

1.2.2 Culture de *Lemna minor*

Dans le milieu naturel, la culture des lentilles d'eau nécessite un pH de 5 à 9, une température de 6 à 33 °C et une profondeur d'étang de 0,5 m. Ainsi, elle nécessite également un approvisionnement régulier en eau et en nutriments, environ 60 mg/L d'azote et un minimum de 1 mg/L de phosphore et de potassium ainsi que d'autres nutriments essentiels comme le soufre et le sodium pour sa croissance. De plus, les lentilles d'eau cultivées en laboratoire peuvent pousser indéfiniment si des nutriments, de la lumière et de l'eau sont fournis (Mkandawire et Dudel, 2007).

1.2.3 Utilisation de *Lemna minor* dans les études de toxicité au laboratoire

La plante aquatique *Lemna minor* a été proposée en 1979 comme macrophyte aquatique représentatif pour l'évaluation de la sécurité environnementale des produits chimiques. Ainsi, des méthodes d'essai sur la lentille d'eau ont été recommandées par un certain nombre d'organisations nationales et internationales, y compris l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE 2006). De plus, ces méthodes sont également utiles pour identifier la toxicité présente dans les

eaux usées et les eaux de surface et pour déterminer la toxicité des substances qui peuvent être trouvées dans ces eaux (Ziegler *et al.*, 2016). Les lentilles d'eau sont couramment utilisées comme bioindicateur dans les études écotoxicologiques en raison de leur petite taille, de leur taux de croissance rapide et de leur simplicité structurelle. Ainsi, ces plantes ont une sensibilité concomitante à l'action toxique des contaminants, tels que les métaux lourds, les composés xénobiotiques organiques et d'autres polluants. De plus, elles peuvent également éliminer ou accumuler ces contaminants dans leurs tissus (Mkandawire et Dudel, 2007).

1.2.4 Capacité d'absorption des contaminants organiques dans les eaux usées

Lemna minor est l'espèce la plus courante des plantes aquatiques généralement utilisées pour le traitement des eaux résiduelles domestiques ou industrielles. Elles sont capable d'absorber et d'éliminer les contaminants de l'eau, telle que les métaux lourds toxiques et les composés xénobiotiques organiques. Les lentilles d'eau sont utilisées pour la phytoremédiation des écosystèmes aquatiques contaminés par les métaux lourds. Ainsi, certains composés xénobiotiques organiques toxiques, qui sont rejetés dans l'environnement via les effluents d'eaux usées et la pulvérisation agricole, peuvent être absorbés par les lentilles d'eau (Ziegler *et al.*, 2016).

Il est démontré que *Lemna minor* a accumulé dans les frondes jusqu'à 26 et 41 µg/g poids frais (PF) du fongicide diméthomorphe à partir d'une solution de 0,6 mg/L et environ 13,5 µg/g poids sec (PS) de l'herbicide isoproturon à partir d'une solution de 58 µg/L (Dosnon-Olette *et al.*, 2009; Böttcher et Schroll, 2007). Ainsi, des médicaments tels que l'antibiotique synthétique, Ciprofloxacine, et l'analgésique, l'acide salicylique, ont été accumulés par *L. minor* à des niveaux de 130 µg/g PS et 25 ng/g PF à partir des concentrations de 0,75-3,05 mg/L et 50 µM, respectivement (Gomes *et al.*, 2017 ; Lu *et al.*, 2018). Dans l'étude de Zezulka (2013), le fluoranthène (hydrocarbure aromatique polycyclique) a été accumulé dans les frondes de *L. minor* jusqu'à 0,25 ng/g PF à partir d'une solution de 0,1 et 1,0 mg/L pendant 10 jours. De

plus, des études antérieures ont confirmé l'absorption et l'accumulation du Bisphénol A par *Lemna minor* à partir de l'eau de rivières à une teneur d'environ 18 ng/g PF (Aznar *et al.*, 2017).

1.2.5 La transformation des contaminants organiques par *Lemna minor*

Les plantes de *Lemna* sont capables de transformer les substances organiques en composés moins toxiques en les séquestrant dans les différents compartiments cellulaires, principalement la vacuole et la paroi cellulaire. Parmi les agents de conjugaison impliqués dans ce processus, le glutathion (GSH) et le glucose (Fig. 1.7). Ainsi, *Lemna* peut résister et survivre à une concentration extrême de contaminants grâce à cette stratégie. Cette stratégie de survie peut sembler plus importante en écotoxicologie. Elle est aussi importante en phytoremédiation, car elle permet la survie de *Lemna* même dans des conditions défavorables (Mkandawire et Dudel, 2007).

Concernant la dégradation des composés organiques, les plantes de *Lemna* peuvent transformer des polluants organiques persistants (POP) bien connus. Par exemple, dans une étude sur l'absorption et la phytotransformation du pesticide dichlordiphényltrichloréthane (DDT) en utilisant *Lemna spp*, presque tout le DDT a été retiré du milieu, accumulé ou transformé par les plantes en dichlorodiphényldichloroéthane (DDD) et en dichlorodiphényléthane (DDE) pendant une période d'incubation de 6 jours (Gao *et al.*, 2000). Ainsi, *L. minor* et *L. gibba* peuvent métaboliser le 4-chlorophénol et pentachlorophénol en produisant des métabolites conjugués tels que, le glucoside 2,4-dichlorophénol et le 2,4,5-trichlorophénol. Enfin, les chlorophénols sont incorporés dans les vacuoles et les parois cellulaires de *L. minor* (Ensley *et al.*, 1996).

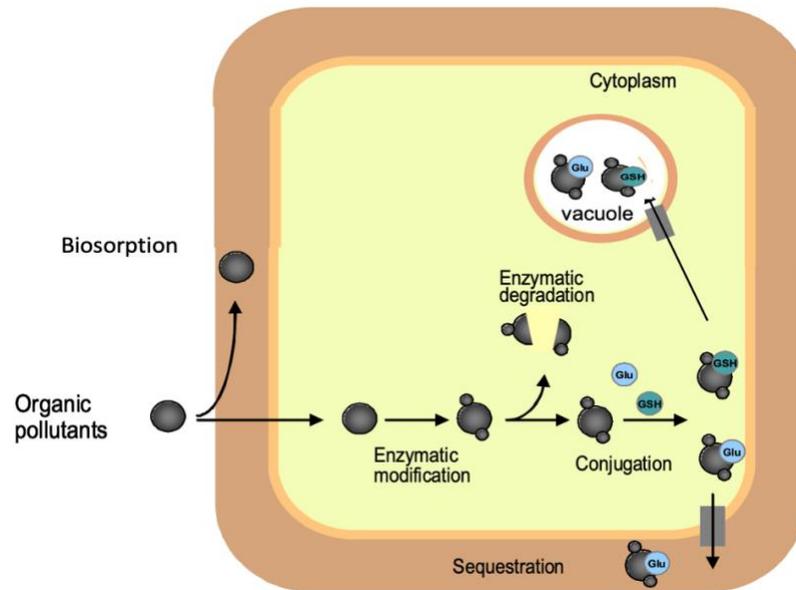


Figure 1.7 Mécanisme de désintoxication et de tolérance aux polluants organiques dans les cellules de *Lemna*. Le glutathion (GSH) ; le glucose (Glu) (Modifié à partir Mkandawire et Dudel, 2007).

1.2.6 Essais normalisés de toxicité : Les paramètres de mesure

Chez *Lemna minor*, l'inhibition de la croissance observée lors de l'exposition à des substances toxiques est présentée comme le paramètre de base d'essais de toxicité normalisée utilisant la lentille d'eau comme organisme d'essai. Ainsi, les paramètres de croissance mesurés pour documenter l'altération de la croissance sont : le nombre de frondes, la superficie, le poids frais (PF ou FW) et le poids sec (PS ou DW) (OECD Test, 2006). Un autre paramètre lié à la croissance est le changement de la teneur en pigments photosynthétiques, les chlorophylles et les caroténoïdes. Une réduction dans les pigments photosynthétiques reflète une diminution de la capacité photosynthétique des lentilles d'eau. Cependant, ces deux indicateurs indiquent seulement la toxicité générale pour les lentilles d'eau, qui est l'altération de la croissance. Ils n'indiquent pas la nature de cette toxicité, qui est causée généralement par des perturbations physiologiques et biochimiques effectuées par les contaminants (Ziegler *et al.*, 2019).

1.3 Les biomarqueurs de toxicité

Un biomarqueur est défini selon l'IUPAC, comme un indicateur signalant une condition dans un système biologique, pour donner une mesure de l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants. Cet indicateur peut être mesurable au sein d'un organisme, tel qu'une altération chimique (biochimique), physiologique et même écologique (Mouzaki-Paxinou *et al.*, 2016). De plus, l'utilisation des approches multibiomarqueurs est fortement recommandée et s'est avérée utile dans les études écotoxicologiques en laboratoire et sur le terrain, parce que ces indicateurs peuvent confirmer la présence ou l'effet toxique direct d'un contaminant dans le milieu de vie de l'organisme (Ziegler *et al.*, 2019).

1.3.1 Les biomarqueurs physiologiques

La photosynthèse est le processus physiologique caractéristique des plantes et des algues. Elle se déroule dans les chloroplastes, qui sont les organites responsables de la conversion de l'énergie lumineuse (photons) en énergie chimique (ATP et NADPH). Les réactions photosynthétiques ont lieu au niveau des membranes thylakoïdes, constituées de deux photosystèmes (PS) I et II (PSI et PSII). Chaque photosystème est constitué de pigments et comporte une antenne qui capte l'énergie des photons et un centre réactionnel qui transfère cette énergie vers un accepteur primaire d'électrons. Les classes principales des pigments photosynthétiques sont la chlorophylle (Chl) (sous ses trois formes *a*, *b* et *c*), la Chl *a* comme pigment principal et les Chl *b* et Chl *c* comme des pigments accessoires. L'autre classe est les caroténoïdes et les xanthophylles (Lichtenthaler, 1987). Ainsi, le rôle de la chlorophylle est de capter les photons de la lumière et permet d'initier la photosynthèse. En revanche, les caroténoïdes jouent un rôle de protection contre la photooxydation des pigments chlorophylliens lors des fortes expositions à la lumière (Baroli *et al.*, 2004). De plus, chaque pigment chlorophyllien absorbe spécifiquement la lumière à certaines longueurs d'ondes. L'ensemble des spectres d'absorption de ces pigments couvre la quasi-totalité du spectre

électromagnétique du domaine visible (Fig. 1.8); la première gamme d'absorption dans le bleu-vert (450-475 nm), la seconde dans le rouge (630-675 nm) et les caroténoïdes ayant une gamme comprise entre 400 et 550 nm (Masojídek *et al.*, 2013).

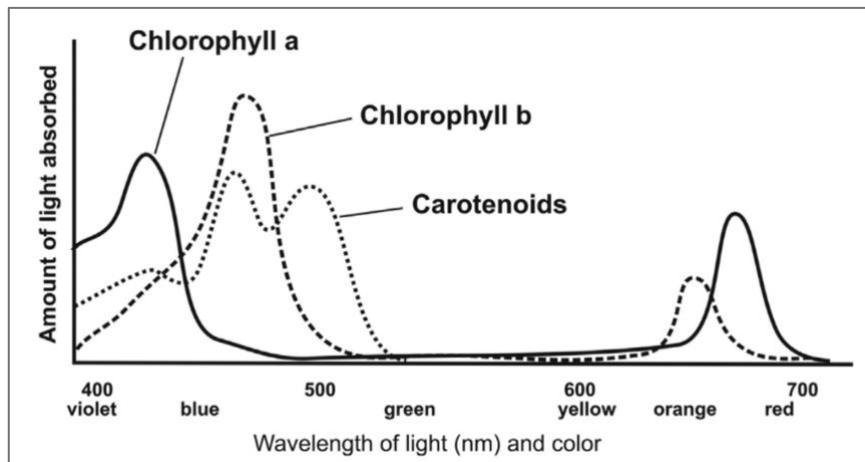


Figure 1.8 Spectres d'absorption des pigments photosynthétiques (Pareek *et al.*, 2017).

Les altérations de l'activité photosynthétique, telles que les changements dans les teneurs des pigments photosynthétiques, dans le rapport Chl *a/b* ou de la fluorescence de la chlorophylle, sont des biomarqueurs spécifiques de l'effet toxique de nombreux contaminants de l'eau, comme les métaux lourds (ions Ag, Cd, Cr, Cu, Zn; nanoparticules d'Ag et Cu), mais aussi les xénobiotiques organiques dont les herbicides (atrazine, diuron) et les anti-inflammatoires (diclophénac et paracétamol) (Ziegler *et al.*, 2016).

1.3.2 Les biomarqueurs biochimiques : Stress oxydant

Chez les plantes, un stress oxydant est généré en réponse à de nombreux facteurs, notamment des conditions environnementales défavorables, des organismes pathogènes et des polluants organiques et métalliques. Ces facteurs peuvent engendrer un stress qui modifie l'homéostasie cellulaire. Dans ce cas un déséquilibre se produit

entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités antioxydantes de l'organisme. Un stress oxydant peut provoquer des dommages progressifs de la croissance des plantes, tels que, la destruction des membranes et les pertes d'électrolytes. Ainsi, il peut causer un déséquilibre dans le métabolisme. En conséquence, il peut entraîner la mort des plantes (Parent *et al.*, 2008). Alors, le stress oxydant chez les plantes peut être évalué par trois approches, la mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) générés par différents contaminants, la mesure des réponses antioxydantes des plantes et la mesure des marqueurs des dommages aux protéines, lipides et acides nucléiques causés par les ROS.

1.3.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais pour Reactive Oxygen Species) sont générées comme un produit normal du métabolisme cellulaire des plantes à des niveaux non toxiques. Les plantes utilisent l'oxygène, via le métabolisme aérobie, pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement. Cependant, la réduction séquentielle de l'oxygène par l'addition d'électrons conduit à la formation d'un certain nombre de ces formes réactives de l'oxygène (ROS) (Parent *et al.*, 2008), y compris l'anion superoxyde, le radical superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène (figure 1.9).

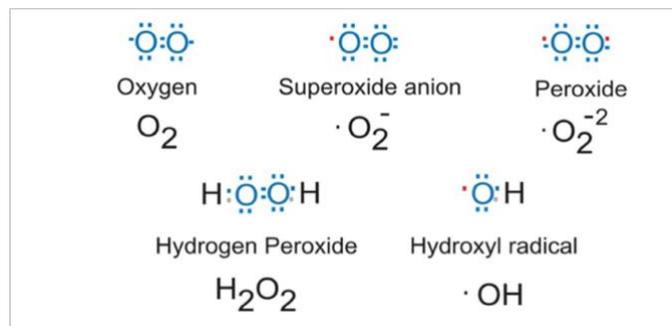


Figure 1.9 Structures électroniques des espèces réactives d'oxygène (ROS) les plus communes. L'oxygène atomique a deux électrons non appariés en orbitales séparées dans sa coque électronique externe. Le • désigne un électron non apparié (Held, 2012).

Les ROS sont produits normalement dans tous les compartiments cellulaires, tels que les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes, le cytosol, la membrane plasmique et la paroi cellulaire (l'apoplaste) (Fig. 1.10).

1.3.2.1.1 Les chloroplastes

Le chloroplaste est considéré comme étant la principale source des ROS chez les organismes photosynthétiques. Les ROS sont produits au niveau de la chaîne de transport d'électrons (CTE) dans les photosystèmes PSI et II. Dans les conditions normales, les électrons s'écoulent du PSI excité pour réduire le NADP en NADPH, qui entre alors dans le cycle de Calvin où le CO₂ est réduit en tant qu'accepteur d'électrons. À l'inverse, lorsqu'il y a une surcharge sur la CTE, cela entraîne une fuite d'électrons de la ferrédoxine vers l'oxygène (O₂) en produisant l'anion superoxyde (O₂^{•-}). De plus, ce dernier peut être transformé en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à l'aide de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Fig. 1.10) (Nadarajah, 2020).

1.3.2.1.2 Les mitochondries

Chez les plantes, la production de ROS est plus faible dans les mitochondries par rapport au chloroplaste. Dans cet organite, l'O₂ est réduit en O₂^{•-} via la NADPH déshydrogénase au niveau des complexes respiratoires (Fig. 1.10) (Nadarajah, 2020).

1.3.2.1.3 Les peroxysomes

Les peroxysomes génèrent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) lors de la réduction du glycolate en glyoxylate par la glycolate oxydase qui utilise l'O₂ pour donner le H₂O₂. Ainsi, le peroxysome produit O₂^{•-} dans la matrice peroxysomale où les xanthine oxydases convertissent la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique et en O₂^{•-} et au niveau de la membrane proximale l'O₂ est utilisé comme accepteur d'électrons par NADH et cytochrome b (Cytb) pour produire O₂^{•-} (Fig. 1.10) (Nadarajah, 2020).

1.3.2.1.4 Les membranes plasmiques et parois cellulaires (apoplaste)

Les peroxydases, les lipoxygénases, les oxydases et les polyamines localisées dans les parois cellulaires sont responsables de la génération de ROS. Par exemple, les NADPH oxydases localisées dans la membrane plasmique sont responsables de la génération d' $O_2^{\cdot -}$ par le transfert d'un électron du NADPH vers l' O_2 , qui est ensuite converti par la SOD en H_2O_2 (Fig. 1.10) (Nadarajah, 2020).

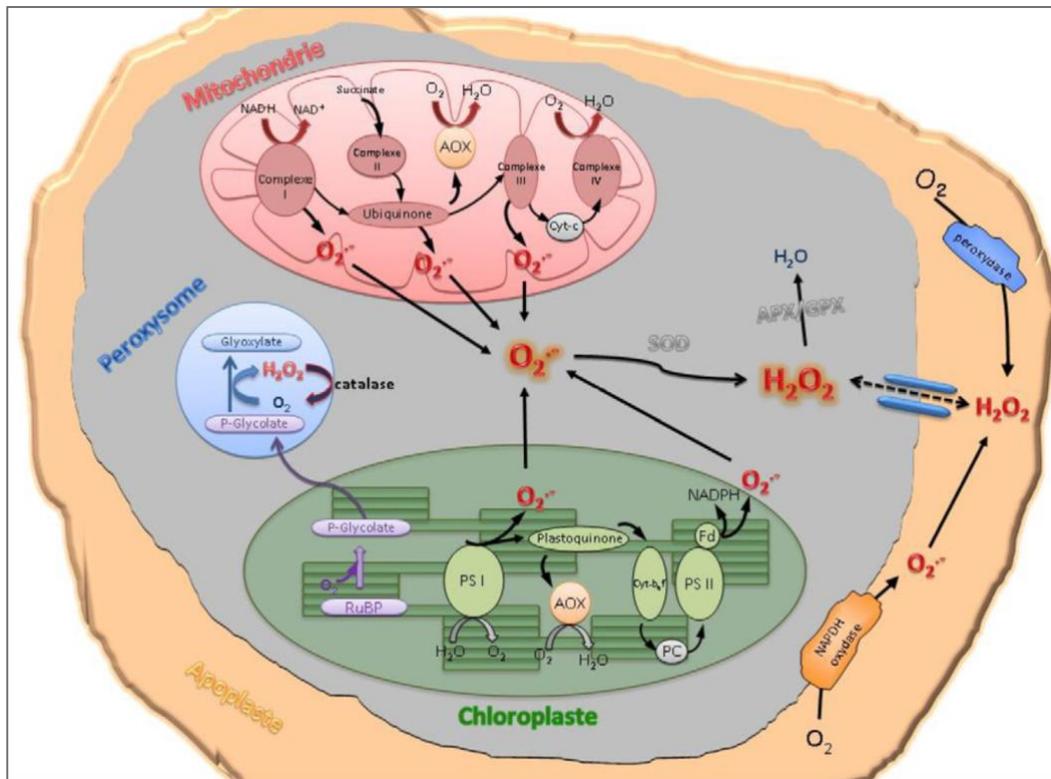


Figure 1.10 Les sites de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale. PSI: photosystème I; PSII : photosystème II; SOD : superoxyde dismutase (Parent *et al.*, 2008).

Les ROS sont également responsables de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés chez les plantes. De fait, une perte de l'intégrité des membranes cellulaires est le mécanisme qui apparaît le plus souvent impliqué dans la réponse aux stress. De plus, le malondialdéhyde (MDA) est l'un des composés les plus connus qui

résultent de la décomposition des peroxydes lipidiques. Les auteurs ont attribué un rôle important au cuivre dans l'initiation de la peroxydation des lipides membranaires, probablement à la suite de la formation directe des ROS dans la membrane. Ce processus pourrait être favorisé par le manque de groupements thiols, en particulier le glutathion, qui conduirait à une diminution du système de défense contre les radicaux libres (Vangronsveld *et al.*, 1997).

1.3.2.2 Les systèmes de détoxification antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ROS, les plantes disposent d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux types de mécanismes de détoxification antioxydants, des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques. Ainsi, ces systèmes de détoxification peuvent servir d'indicateurs importants du niveau de pollution de l'environnement (Vangronsveld *et al.*, 1997).

1.3.2.2.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques

- La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui joue un rôle essentiel dans la transformation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Elle est considérée comme la première ligne de défense contre les ROS. Les SOD sont un groupe caractérisé par le métal présent dans leur site actif : Cuivre, Zinc, Fer ou Manganèse. Elles ont été identifiées dans les chloroplastes (CuZn-SOD thylacoïdale, Fe-SOD stromatique), dans les mitochondries (Mn-SOD), dans les peroxysomes (CuZn-SOD) et dans le cytosol (CuZn-SOD).
- La catalase (CAT) se trouve surtout dans les peroxysomes et les glyoxysomes et peut aussi dismuter le H_2O_2 en H_2O et O_2 .
- Les peroxydases telles que l'ascorbate peroxydase (APX) est impliqué dans la conversion du H_2O_2 en eau et en déshydroascorbate (DHA). Ainsi, la glutathion peroxydase réduit le peroxyde d'hydrogène généré par la superoxydase et joue un rôle principal dans l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

1.3.2.2.2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Le système de défense non enzymatique contre le stress oxydant est constitué des molécules antioxydantes, tels que le glutathion, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, les caroténoïdes et les acides phénoliques (les polyphénols). Ces molécules jouent un rôle clé dans le piégeage des radicaux libres dans les plantes en donnant des électrons ou de l'hydrogène (Jaleel *et al.*, 2009).

- Le glutathion est un tripeptide (glutamyl-cystéinyl-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Le glutathion réduit (GSH) peut être régénéré à partir de disulfure de glutathion oxydé (GSSG) par l'activité catalytique du glutathion réductase (GR). Ainsi, le glutathion réduite (GSH) et les glutathions S-transférases (GST) sont impliqués dans la désintoxication des xénobiotiques dans les plantes. Les GST facilitent l'ajout du groupe thiol de GSH aux xénobiotiques. De plus, le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la capacité antioxydante de la cellule (Kanwar *et al.*, 2020).

Le stress oxydatif chez les plantes est indiqué par une formation accrue de ROS et par la peroxydation lipidique (généralement quantifiée en termes de teneur en MDA) qui en résulte. Ainsi, les changements dans les activités antioxydantes enzymatiques (SOD, CAT et divers POD) et les niveaux des antioxydants (glutathion, ascorbate, proline, composés phénoliques) se développent fréquemment pour combattre le stress causé par les ROS générés à cause de différents contaminants (Tableau. 1.5).

Tableau 1.5 Les biomarqueurs du stress oxydant provoqué par différents contaminants de l'eau chez les lentilles d'eau (Ziegler *et al.*, 2019).

Oxidative system component: Effect	Water contaminant
Reactive oxygen species (ROS): Increase in the concentration of H ₂ O ₂ and/or O ₂ ⁻	NH ₄ ⁺ Heavy metals: Cd, Cr, Cu Heavy metal nanoparticles: Ag-NPs, Cu-NPs Rare earth metals: Ce, Pr Natural organics: fluoranthene, 1,2-dihydroxyanthraquinone Industrial chemical: diethyl phthalate, 1-octyl-3-methylimidazolium bromide Herbicides: glyphosate, pethoxamide Fungicide: folpet Pharmaceuticals: diclophenac, paracetamol, ciprofloxacin
Lipid peroxidation: Increase in the content of MDA	NH ₄ ⁺ Heavy metals: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Zn Heavy metal nanoparticles: Ag-NPs Chalcogen: Se Rare earth metal: Ce Natural organic: fluoranthene Industrial chemicals: diethyl phthalate, 1-octyl-3-methylimidazolium bromide Herbicides: glyphosate, lactofen
Antioxidant enzymes: Increase in the activities of SOD, CAT, and/or various PODs	NH ₄ ⁺ Heavy metals: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn Heavy metal nanoparticles: Ag-NPs, Cu-NPs, Zn-NPs Metalloids: Bo, Se Rare earth metal: Pr Natural organics: fluoranthene, 1,2-dihydroxyanthraquinone Industrial chemicals: diethyl phthalate, Malachite Green, 1-octyl-3-methylimidazolium bromide Herbicides: pethoxamide, glyphosate, lactofen, Fungicide: folpet
Antioxidant solutes: Increase in the concentration of some or all of total thiols, glutathione, ascorbate, proline, phenolics	Heavy metals: Cd, Cu, Hg, Zn Rare earth metal: Pr Natural organic: fluoranthene Industrial chemicals: diethyl phthalate, metal-working fluid organics

1.4 Problématique générale et objectifs de la recherche

Le tétrabromobisphénol A (TBBPA) fait partie des retardateurs de flamme bromés (RFB) qui constituent un groupe de polluants émergents préoccupants pour l'environnement (De Wit, 2002 ; Ziegler *et al.*, 2019). L'utilisation intensive du TBBPA dans la production des produits électroniques et la détérioration de ces produits représentent une source de contamination de TBBPA pour l'environnement à l'échelle mondiale (Debenest *et al.*, 2010). Ainsi, plusieurs études ont montré une toxicité très élevée du TBBPA sur la survie, la reproduction et le développement de divers organismes aquatiques tels que les poissons, les invertébrés, les algues et les bactéries aquatiques, en agissant comme un perturbateur endocrinien et en induisant un stress oxydatif à de très faibles concentrations (Pittinger et Pecquet, 2018 ; Ronisz *et al.*, 2004). Cependant, peu de données sont disponibles sur la bioaccumulation et les effets toxiques du TBBPA sur les plantes aquatiques qui sont à la base de la chaîne alimentaire. De plus, en raison de la faible solubilité du TBBPA dans le milieu aquatique, il peut se présenter dans l'eau sous forme neutre ou ionisée et son potentiel de bioaccumulation dans le milieu aquatique est lié au pH du cours d'eau (He *et al.*, 2015). Cependant, presque toutes les études toxicologiques sur le TBBPA ont été réalisées à un pH proche du pKa₂ du TBBPA (8,5) ou ont été menées avec des cosolvants (Environnement Canada., 2013). De ce fait, il est nécessaire d'étudier la bioaccumulation et les effets toxicologiques du TBBPA dans différentes conditions de pH et à des concentrations dans la plage de son hydrosolubilité dans le milieu naturel. Pour cela, nous avons choisi la lentille d'eau *Lemna minor* comme modèle d'étude, elle est connue par sa sensibilité et sa capacité d'accumuler des composés chimiques présents dans le milieu aqueux (Mkandawire et Dudel, 2007). Donc visant à contribuer à une meilleure compréhension de la toxicologie du TBBPA, le principal objectif de ce travail consiste à déterminer la bioaccumulation intracellulaire du TBBPA et d'évaluer ces effets toxiques induits chez la plante aquatique *Lemna minor* lorsque les plantes seront exposées aux différentes conditions de pH, à différentes concentrations de

TBBPA pendant 7 jours. Pour ce faire, les trois objectifs spécifiques suivants ont été ciblés:

1. Étudier l'effet du pH sur le comportement du TBBPA dans les milieux aux différents pH et la capacité de la plante à absorber et accumuler le contaminant, lorsqu'elle est exposée aux différentes concentrations de TBBPA aux différents pH (6,5; 7,5 et 8,5). Nous supposant que la biodisponibilité (solubilité) et la bioaccumulation du TBBPA vont dépendre des conditions de pH du milieu.
2. Déterminer les effets du TBBPA sur les fonctions physiologiques (croissance et efficacité photosynthétique) et biochimiques (biosynthèse des pigments et niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)). L'hypothèse est que le TBBPA exerce une toxicité sur les fonctions physiologiques et biochimiques de la plante, et que cet effet toxique dépend de la concentration de TBBPA.
3. Évaluer les mécanismes de défense de la plante en réponse aux effets du TBBPA. Notre hypothèse est que les systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques sont déclenchés en réponse à l'effet du TBBPA.

Les résultats de cette étude permettront de mieux comprendre les mécanismes de toxicité à l'échelle moléculaire de ce contaminant émergent chez les plantes aquatiques. En conséquence, nous allons développer une nouvelle méthodologie de détection des effets du TBBPA en utilisant *L. minor* comme bioindicateur de toxicité aigüe dans ce projet.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation du matériel

Les récipients utilisés dans cette étude sont des fioles d'Erlenmeyer en verre (volume de 250 mL). Toute la verrerie a été trempée pendant 15 minutes dans une solution d'acide nitrique à 10 % (Sigma-Aldrich) et rincer trois fois avec de l'eau Milli-Q, obtenu à partir d'un système de purification d'eau (Barnstead™ Thermo Scientific (18,2 MΩ-cm). Tout le matériel a été stérilisé par l'autoclave avant l'utilisation pour les expériences.

2.2 Exigences préliminaires et incubation de la plante *Lemna minor*

2.2.1 Préparation du milieu de culture SIS

Le milieu de culture utilisé pour la croissance de *L. minor* est le milieu SIS, qui est la version modifiée du milieu créé par l'Institut suédois de normalisation de *Lemna minor*. Il a été préparé selon le protocole de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) pour les essais toxicologiques (Lignes directrices 22 de l'OCDE, 2006) (OECD Test, 2006). Sept (7) solutions mères ont été préparées dans le laboratoire selon la composition représentée dans le tableau (2.1). Le volume du milieu de culture a été complété avec de l'eau nanopure et le pH du milieu a été ajusté en utilisant des solutions diluées d'acide et de base comme le HCl et le NaOH (0,1 M). Ensuite, les milieux ont été stérilisés par filtration à travers une membrane poreuse avec 20 µm de diamètre. Enfin, ils ont été conservés dans un endroit frais et sombre. Trois plages de pH utilisés dans cette étude pH 6,5; pH 7,5 et pH 8,5 (± 0,2) ont été préparés. Ces plages de pH ont été choisi après une étude de l'effet du pH sur la plante *Lemna minor* (Tableau S.1. Annexe A), où la croissance de la plante était optimale entre pH 6,5 et 8,5. Ainsi, c'est une plage de la plupart des milieux naturels. De plus, nous n'avons pas travaillé avec des conditions acides (pH < 6) pour éviter la

sédimentation du TBBPA qui est moins soluble dans le milieu de culture à des pH inférieur au pKa du TBBPA (7,5 et 8,5).

Tableau 2.1 Composition du milieu de culture SIS pour *L. minor* (OCDE, 2006).

Solution mère	Substance	Concentration dans solution mère (g/L)	Concentration dans le milieu préparé (mg/L)	Volume de solution mère pour 1L milieu SIS (mL)
I	NaNO ₃	8,50	85	10
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	
II	MgSO ₄ . 7H ₂ O	15	75	5
III	CaCl ₂ . 2H ₂ O	7,2	36	5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	5
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,0	1
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,20	0,20	
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,010	0,010	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,050	0,050	
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0050	0,0050	
	Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,010	0,010	
VI	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,17	0,84	5
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	
VII	MOPS (tampon)	490	490	1

2.2.2 Culture de *Lemna minor* et acclimatation au conditions de laboratoire

Dans cette étude, les travaux expérimentaux ont été réalisés à partir des cultures des plantes aquatiques *Lemna minor* (Fig. 2.1). *L. minor* a été fournie par le laboratoire du professeur Philippe Juneau du Département des sciences biologiques à l'UQAM. Pour la culture et l'exposition des plantes aux substances d'essai, le test standard d'inhibition de la croissance de la lentille d'eau proposée par l'OCDE (2006) a été utilisé comme ligne directrice. Des plantes jeunes ont été cultivées pendant 7 jours dans des récipients contenant 150 mL du milieu SIS (pH 6,5 ± 0,2). La culture de stock a été placée dans une pièce climatisée à des conditions contrôlées (température 24 ± 2 °C, une humidité relative de 60 ± 5 % et une photopériode lumineuse de 16 heures du lumière et 8 heures d'obscurité). Des lampes à fluorescence blanche (Sylvania GroLux F36W) ont été

utilisées pour obtenir un éclairage continu avec une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le récipient a été recouvert pour éviter l'évaporation et la contamination et en permettant les échanges de l'air nécessaire à la croissance des plantes. Enfin, la culture a été renouvelée chaque semaine (7 jours) pour préserver la qualité de la croissance (OCDE, 2006). Le pH initial des milieux a été ajusté avec des solutions de HCl et de NaOH et la variation du pH de chaque ensemble expérimental a été surveillée quotidiennement dans des récipients témoins.

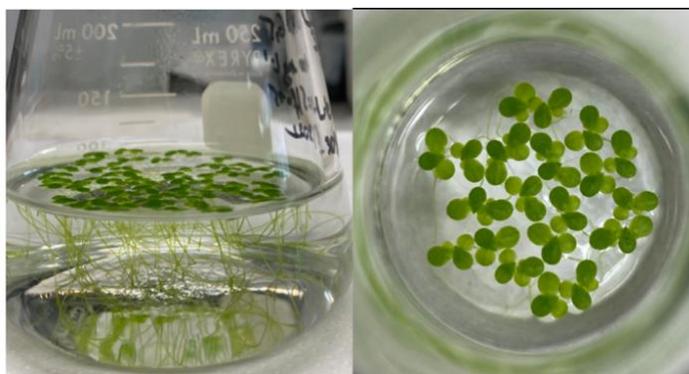


Figure 2.1 Cultures de la plante aquatique *Lemna minor*.

2.3 Préparation et analyse des solutions du TBBPA par UHPLC-UV

Des solutions mères fraîches de TBBPA (1 mg/L) ont été préparées en dissolvant le composé pur (TBBPA ≥ 98 % HPLC, CAS 79-94-7, Sigma-Aldrich) dans le milieu de culture SIS à différents pH (6,5; 7,5 et 8,5). Les solutions préparées ont été agitées à 600 tr/min pendant 2 h ou jusqu'à ce que les solutions ne contiennent plus de matière non dissoute. Des dilutions ont été effectuées à des concentrations de 10, 50, 100, 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$. Des échantillons des solutions expérimentales ont été filtrés à l'aide des seringues en PTFE de 0,22 μm et les concentrations de TBBPA dans les solutions d'exposition ont été déterminées à 0 h (solutions fraîchement préparées) dans tous les groupes. Pour la quantification du TBBPA dans l'échantillon, une solution standard de TBBPA (1 mg/mL) a été préparée dans de l'acétonitrile, les dilutions ont été effectuées à 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 et 1 $\mu\text{g/mL}$ afin d'obtenir une courbe d'étalonnage (Fig. S.

1. Annexe A). L'analyse quantitative de TBBPA a été réalisée selon la méthode de Hu *et al.* (2015) avec quelques modifications. Un appareil de chromatographie liquide à ultra haute performance (Agilent Technologie 1290 Infinity II) équipé d'un détecteur UV (UHPLC-UV) de longueur d'onde à 290 nm a été utilisée pour l'analyse du TBBPA. La séparation a été réalisée sur une colonne ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (4,6 × 150 mm × 5 µm) à une température de 40 °C. La phase mobile utilisée a été constituée d'acétonitrile/eau 85:15 (v/v). Le débit était maintenu à 0,500 mL/min et le volume d'injection était de 5 µL.

2.4 Essais de toxicité

Le test de toxicité du TBBPA a été réalisé dans une chambre avec un environnement contrôlé à $24 \pm 2^\circ\text{C}$, une lumière continue de $100 \pm 10 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et une photopériode 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Chaque récipient d'essai contenait 100 mL de solution d'essai et cinq plantes *Lemna minor*, chacune comprenant trois frondes. Trois répliqua ont été effectués pour chaque concentration (Fig. 2.2). Les solutions expérimentales aux concentrations de TBBPA (0, 10, 50, 100, 200, 500 et 1000 µg/L) ont été préparées par dilution des solutions stocks de TBBPA avec le milieu de culture SIS à pH (6,5; 7,5 et $8,5 \pm 0,2$) (Tableau 2.2).

Un renouvellement des solutions expérimentales (milieu de culture contaminé au TBBPA) a été effectué chaque deux jours (ou 48 h) pour maintenir une concentration initiale constante de TBBPA. Cette période a été choisie selon les essais de la stabilité du TBBPA (Fig. S. 2. Annexe A), qui montre que la concentration de TBBPA mesuré pendant les premiers jours d'exposition (48 h) ne peut être maintenue et tombe en dessous de 80% de la concentration mesurée initialement. Dans ce cas, les lignes directrices 22 de l'OCDE recommandent la méthode semi-statique (renouvellement des milieux expérimental) au moins deux fois durant l'essai (par exemple les troisième et cinquième jours) (OECD Test, 2006). L'expérience s'est déroulée pendant 7 jours. À la fin de l'expérience, les plantes ont été récoltées et les paramètres physiologiques et

biochimiques ont été immédiatement déterminés selon les lignes directrices 221 de l'OCDE (2006).

Tableau 2.2 Différentes conditions de traitement au TBBPA.

Condition	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5
Traitement			
Contrôle	Milieu de culture SIS pH 6,5	Milieu de culture SIS pH 7,5	Milieu de culture SIS pH 8,5
[TBBPA] ($\mu\text{g/L}$)	10 50 100 200 500 1000	10 50 100 200 500 1000	10 50 100 200 500 1000



Figure 2.2 Exposition des plantes *Lemna minor* au TBBPA dans des conditions contrôlées au laboratoire.

2.5 Analyse de la cinétique d'absorption du tétrabromobisphénol A par *Lemna minor* et quantification du TBBPA disponible dans le milieu

Des échantillons de solutions d'exposition à différentes concentrations pour les groupes traités au TBBPA (groupe pH (6,5); le groupe pH (7,5) et le groupe pH (8,5)), ont été prélevés tous les jours (0 et 7 jours) pour analyser la concentration de TBBPA par UHPLC-UV, selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.4.

2.6 Analyse de la bioaccumulation du tétrabromobisphénol A

Après 7 jours d'exposition au TBBPA, les plantes ont été récoltées, essuyées avec du papier absorbant et pesées immédiatement. L'extraction de TBBPA selon des modifications des méthodes décrites par Pop *et al.* (2021) et Sun *et al.* (2008) a été utilisée pour analyser la quantité de TBBPA accumulé dans le matériel végétal. Brièvement, les plantes entières ont été homogénéisées dans un mortier avec un volume d'acétonitrile (qualité HPLC). Par la suite, une ultrasonication de l'homogénat pendant 20 minutes a été effectuée à 25 °C (Pop *et al.*, 2021). L'extrait résultant a été filtré à travers un filtre PTFE de 0,2 µm, puis analysé par UHPLC-UV. Pour la quantification de TBBPA dans l'échantillon, une solution standard de TBBPA (1 mg/mL) a été préparée dans de l'acétonitrile, les dilutions ont été effectuées à 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 et 1 µg/mL afin d'obtenir une courbe d'étalonnage (Fig. S. 1. Annexe A).

L'analyse de TBBPA accumulé par les plantes a été déterminée à l'aide de la chromatographie liquide à ultra haute performance (Agilent Technologie 1290 Infinity II) équipé d'un détecteur UV (UHPLC-UV) de longueur d'onde à 230 nm. La séparation a été réalisée sur une colonne ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (4,6 × 150 mm × 5 µm) à une température de 40 °C. La phase mobile utilisée a été constituée d'acétonitrile et d'eau avec 70:30 (v/v). Le débit était maintenu à 0,500 mL/min et le volume d'injection était de 5 µL.

2.7 Identification du tétrabromobisphénol A dans le milieu et dans la plante par analyse chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Les échantillons prélevés des solutions expérimentales au début et à la fin d'exposition (temps 0 et 7 jours) et les extraits de la plante exposée au TBBPA pendant 7 jours ont été analysés par LC-MS/MS pour identifier le TBBPA. L'analyse LC-MS/MS a été effectuée sur un UHPLC Shimadzu Nexera couplé à un système Sciex 5600 TripleTOF, avec une source d'ionisation par électrospray (ESI) négatif. L'instrument a effectué une acquisition TOF-MS à partir du rapport masse/charge (m/z) de 120 à 970, suivie par TOF-MS/MS de m/z de 40 à 800. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne Phenomenex Biphenyl (2.1 x 100 mm, 2.6 μ m) et d'une élution en gradient avec de l'eau (avec 0,1 % d'acide formique) et d'ACN comme phases mobiles A et B, respectivement, à un débit de 0,25 mL/min. Le volume d'injection était de 2,5 μ L. Le gradient HPLC utilisé pour la détection du TBBPA était le suivant : 5 % de B à 0,5 min, augmenté linéairement à 50 % de B à 15 min et jusqu'à 95 % de B à 18,5 min.

2.8 Détermination de l'effet du TBBPA sur la croissance de la biomasse

2.8.1 Mesure du nombre de frondes

Au début de l'essai (temps 0 jour) et à la fin de l'essai (temps 7 jours), le nombre de frondes dans les récipients d'essai a été compté et enregistré, en tenant compte des frondes clairement visibles, les changements dans le développement des plantes, tels que la taille de la fronde, l'apparence de la chlorose ou de nécrose, la rupture de la colonie ou la perte de flottabilité, ont été notés.

2.8.2 Mesure du poids frais

Au début et à la fin de l'essai (0 et 7 jours), toutes les plantes ont été retirées du milieu et séchées sur une serviette en papier pour éliminer l'excès d'eau. Ensuite, elles ont été

pesées avec une balance analytique (Mettler Toledo AB135- S/FACT) pour obtenir leur poids frais.

2.8.3 Mesure du taux de croissance spécifique moyen

Cette variable de réponse est calculée sur la base logarithmique des changements du nombre de frondes et du poids frais dans le temps (exprimés par jour) chez les témoins et dans chaque groupe de traitement, en utilisant la formule suivante (OCDE, 2006) :

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

Où: μ_{i-j} : taux de croissance spécifique moyen du moment i à j; N_i : nombre de frondes dans le récipient d'essai ou de contrôle au temps i (temps initial); N_j : nombre de frondes dans le récipient d'essai ou de contrôle au temps j (temps final); t : période de temps de i à j; La valeur moyenne pour le taux de croissance a été calculée pour chaque groupe de traitement et groupe témoin.

2.8.4 Calcul du pourcentage d'inhibition de croissance

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_r) a été calculé pour chaque concentration testée selon la formule suivante (OCDE, 2006) :

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

Où: % I_r : le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen; μ_C : la valeur moyenne de μ dans le groupe témoin; μ_T : la valeur moyenne de μ dans le groupe traité.

2.9 Dosage des pigments photosynthétiques

Les plantes entières de *L. minor* ont été coupées en petits morceaux, mélangés avec une petite quantité de sable pour une meilleure macération et homogénéisés dans 5 ml de l'éthanol à 95% dans un tube en verre pendant 24 h dans l'obscurité. L'extrait a été centrifugé à $3000 \times g$ pendant 10 min à 4°C (Sumanta *et al.*, 2014) (Fig. 2.3). L'absorption du surnageant de l'extrait a été mesurée à l'aide d'un lecteur à microplaque Infinite M200 (TECAN®) à 665 nm (Chl *a*), à 648 nm (Chl *b*) et 470 nm (caroténoïdes). Les teneurs en Chl *a*, Chl *b* et en caroténoïdes ont été estimées à l'aide des équations décrites par Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987).

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

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

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

où Chl *a*, Chl *b* et C_{x+c} sont la teneur de Chlorophylle *a*, Chlorophylle *b* et caroténoïdes totaux respectivement, en ($\mu\text{g/ml}$) et A665, A649 et A470 représentent l'absorbance à 665, 649 et 470 nm. Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g/mg}$ de poids frais (PF).

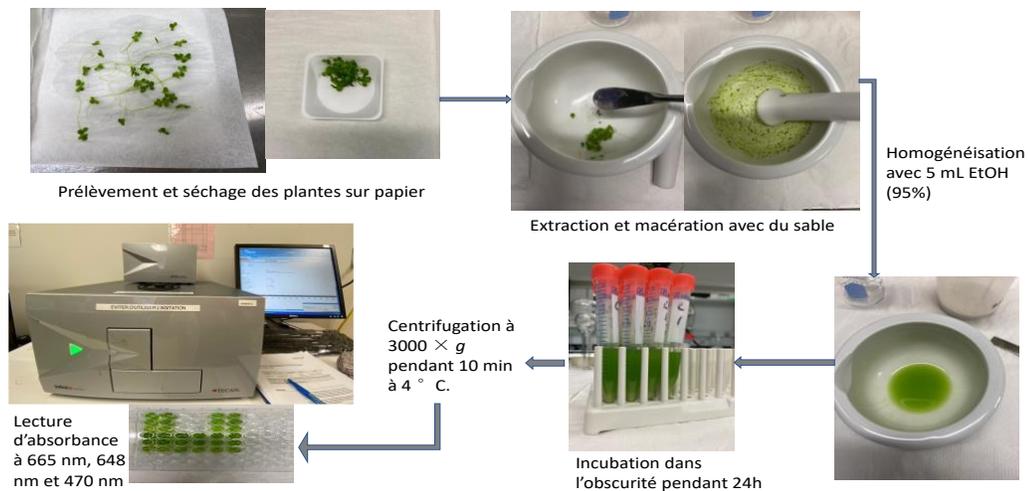


Figure 2.3 Schéma du protocole du dosage des pigments photosynthétiques par mesure d'absorbance.

2.10 Analyse du stress oxydant chez *Lemna minor*

2.10.1 La production des espèces réactives oxygénées (ROS)

La production de ROS a été mesurée sur des plantes à l'aide du réactif CellRox® Orange (Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific). CellRox® Orange est une sonde fluorogène pour mesurer le stress oxydatif dans les cellules vivantes. Ce colorant à pénétration cellulaire est non fluorescent lorsqu'il est dans un état réduit et présente une fluorescence orange vif lors de l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), avec des maxima d'absorption/émission de 545/565 nm (Bone *et al.*, 2013). Ce réactif permet de détecter la présence des ROS cytoplasmiques comme décrite par le fournisseur. Dans ce travail, les plantes entières ont été incubées dans une microplaque à 96 puits avec le réactif CellRox® Orange à 5µM. Après 30 minutes d'incubation, les plantes ont été lavées trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (1X) (PBS 1X) à température ambiante. Puis on réalise une lecture de la fluorescence à une longueur d'onde d'excitation 545 nm et une longueur d'onde émission de 565 nm, en utilisant le lecteur de microplaques à fluorescence Infinite M200 (TECAN®) (Jmii et Dewez, 2021). Les résultats ont été normalisés par poids frais et représentés en pourcentage par rapport au contrôle.

2.10.2 La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été déterminée à l'aide du kit de peroxydation lipidique Image-iT® (Life Technologies). Ce kit est basé sur le réactif C11-BODIPY® 581/591 (Fig. 2.4), qui est un dérivé fluorescent se localise sur les membranes. Il fournit une méthode simple pour détecter la dégradation oxydative des lipides dans les cellules. Le principe de réaction est basé sur l'oxydation de la partie butadiényle polyinsaturée du fluorophore de l'acide undécanoïque BODIPY® 581/591, qui entraîne un déplacement de l'émission de fluorescence de 590 nm à 510 nm (Held, 2012).

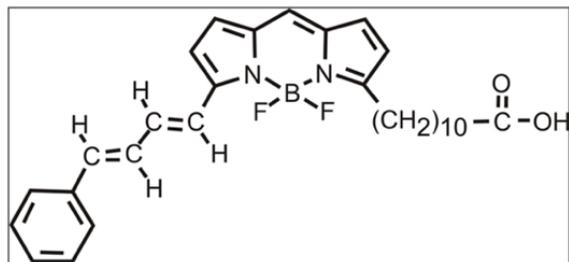


Figure 2.4 Structure de C11-BODIPY (581/591) (Held, 2012).

Pour la détermination de la peroxydation lipidique, les plantes entières ont été incubées avec le réactif Image-iT® Lipid Peroxidation (Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific) à 10 μ M pendant 30 minutes à 37°C. Après l'incubation, les plantes ont été lavées trois fois avec une solution PBS (1X). Puis on réalise une lecture de la fluorescence à des longueurs d'onde séparées; une à excitation/émission de 581/591 nm pour le colorant réduit et l'autre à excitation/émission de 488/510 nm pour le colorant oxydé. La lecture a été effectuée sur un lecteur de microplaques à fluorescence Infinite M200 (TECAN®). Le rapport des intensités de fluorescence d'émission à 590 nm sur 510 nm fournit une mesure de la peroxydation lipidique et les résultats ont été normalisés par poids frais et représentés en pourcentage par rapport au contrôle.

2.11 Analyse des activités antioxydantes de la plante

2.11.1 Analyse des niveaux du glutathion

L'analyse des niveaux de l'antioxydant, glutathion, a été effectuée par la méthode de fluorimétrie sur microplaque en utilisant une sonde fluorescente, ThiolTracker® Violet (glutathione detection reagent) (Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific). Cette sonde est hautement réactive aux thiols et peut être utilisée comme un indicateur pratique et efficace du GSH intracellulaire (Mandavilli et Janes, 2010). Elle contient des composés bimanés, qui sont essentiellement non fluorescents jusqu'à ce qu'ils soient conjugués, réagissent facilement avec les thiols de faibles poids moléculaires, y compris le glutathion pour former des adduits fluorescents avec une longueur d'onde d'excitation de 394 nm et une émission à 490 nm (Fig. 2.5). Ce réactif peut traverser

les membranes cellulaires vivantes, il est utile pour détecter la distribution des thiols protéiques dans les cellules avant et après la réduction chimique des disulfures. Il a été la sonde réactive aux thiols préférée pour quantifier les niveaux de glutathion dans les cellules (Held, 2012).

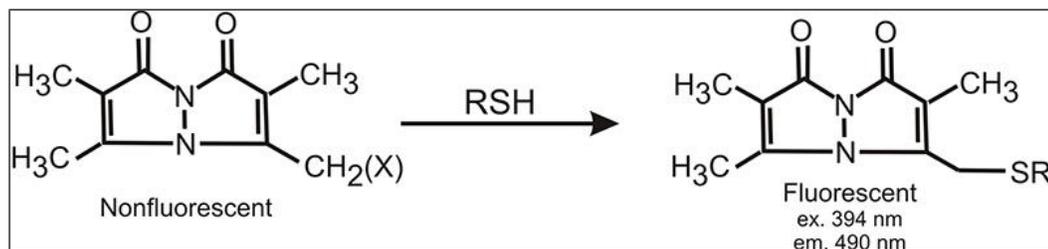


Figure 2.5 Structure du bimane et réaction avec les thiols (RSH). Ce réactif non fluorescent interagit avec les thiols de faible poids moléculaire pour former des adduits fluorescents (Held, 2012).

Dans ce travail, les plantes entières ont été incubées avec le réactif ThiolTracker™ Violet à 20 μ M, dans le tampon PBS, pendant 30 minutes à 37°C. Après l'incubation, les plantes ont été lavées avec une solution PBS (1X), le tampon a été remplacé par du PBS frais. Puis on réalise une lecture de la fluorescence à excitation / émission de 404/526 nm. La lecture a été effectuée sur un lecteur de microplaques à fluorescence Infinite M200 (TECAN®). Les résultats ont été normalisés par poids frais et représentés en pourcentage par rapport au contrôle.

2.11.2 Analyse de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité catalase a été évaluée selon la méthode décrite par Rouein *et al.* (2020), en utilisant les réactifs et les protocoles fournis dans le kit de dosage de la catalase Amplex® Red A22180 (Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific). Ce kit fournit un test ultrasensible et simple pour mesurer l'activité de la catalase, le principe de la réaction est montré dans la figure (2.6). Dans l'essai, la catalase réagit d'abord avec H₂O₂ pour produire de l'eau et de l'oxygène. Ensuite, le réactif Amplex Red réagit avec une stœchiométrie 1:1 avec tout le H₂O₂ non réagi en présence de la peroxydase de de

racines du raifort (horseradish peroxidase ou HRP) pour produire le produit d'oxydation hautement fluorescente, résorufine. Par conséquent, à mesure que l'activité de la catalase augmente, le signal de résorufine diminue. Les résultats sont généralement tracés en soustrayant la fluorescence observée de celle d'un contrôle sans catalase.

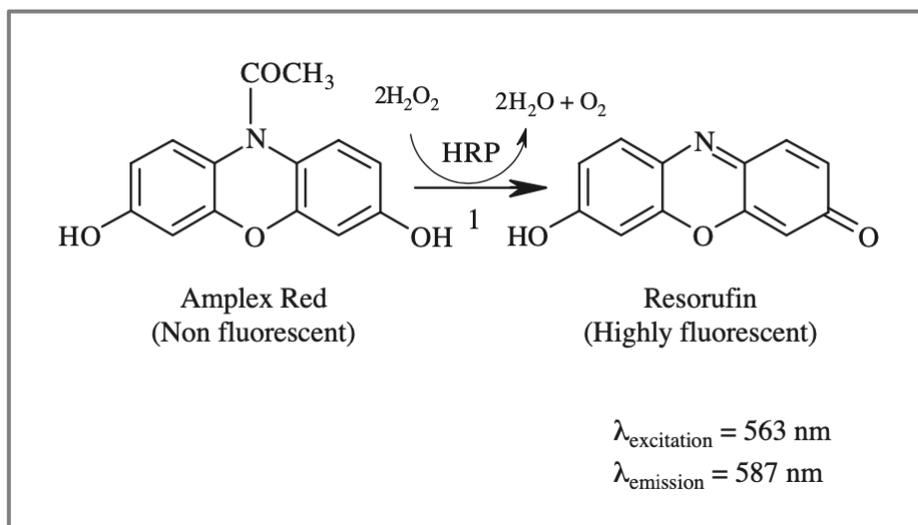


Figure 2.6 Schéma de réaction pour l'oxydation de l'Amplex Red catalysée par la peroxydase de racines du raifort (HRP) en présence de H_2O_2 (Gomes *et al.*, 2005).

Brièvement, les plantes ont été homogénéisées avec le tampon de réaction diluée 1X fournie avec le kit de test Amplex® Red. Ensuite, les homogénats ont été incubés avec 25 μl de H_2O_2 (40 μM) pendant 30 min à température ambiante. Finalement, 50 μl de solution de travail Amplex Red / HRP (horseradish peroxidase) ont été ajoutés et incubés pendant 30 min à 37 °C et à l'abri de la lumière. La courbe standard de catalase (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 mU/mL) a été préparée en diluant une quantité appropriée de la solution de catalase dans le kit (1000 U/mL) avec le tampon de réaction diluée 1X. Un tampon de réaction sans catalase a été utilisé comme contrôle négatif. La fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et à une longueur d'onde d'émission de 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence Infinite M200 (TECAN®). L'activité de la catalase est définie comme la

quantité d'enzyme décomposant 1,0 μ mol de peroxyde d'hydrogène selon le fabricant du kit (Rouein *et al.*, 2020). Les résultats ont été normalisés par poids frais et représentés en pourcentage par rapport au contrôle.

2.12 Analyses statistiques

Chaque contrôle et chaque condition de traitement ont été effectués en 3 répétitions avec 2 réplicats chacune (n=6) pour toutes les analyses. Les moyennes et les écarts-types ont été estimés pour chaque traitement. Le logiciel statistique GraphPad Prism (version 9.4.1) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les différences significatives entre les groupes traités et les contrôles ont été déterminées à l'aide d'une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) et des tests de comparaisons multiples post hoc de Tukey. Les différences étaient statistiquement significatives pour $p < 0,05$.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Analyse du tétrabromobisphénol A (TBBPA) dans le milieu SIS

L'analyse LC-MS/MS du TBBPA dans le milieu de culture (SIS) à différents pH (6,5; 7,5 et 8,5) a été effectuée sur les solutions d'exposition avant et après la culture de *Lemna minor* (c.-à-d. à temps 0 et 7 jours). Les chromatogrammes montrant le TBBPA ont été obtenus sous forme de diagrammes graphiques du temps de rétention par rapport à l'intensité du signal (Fig. 3.1 A, B et C).

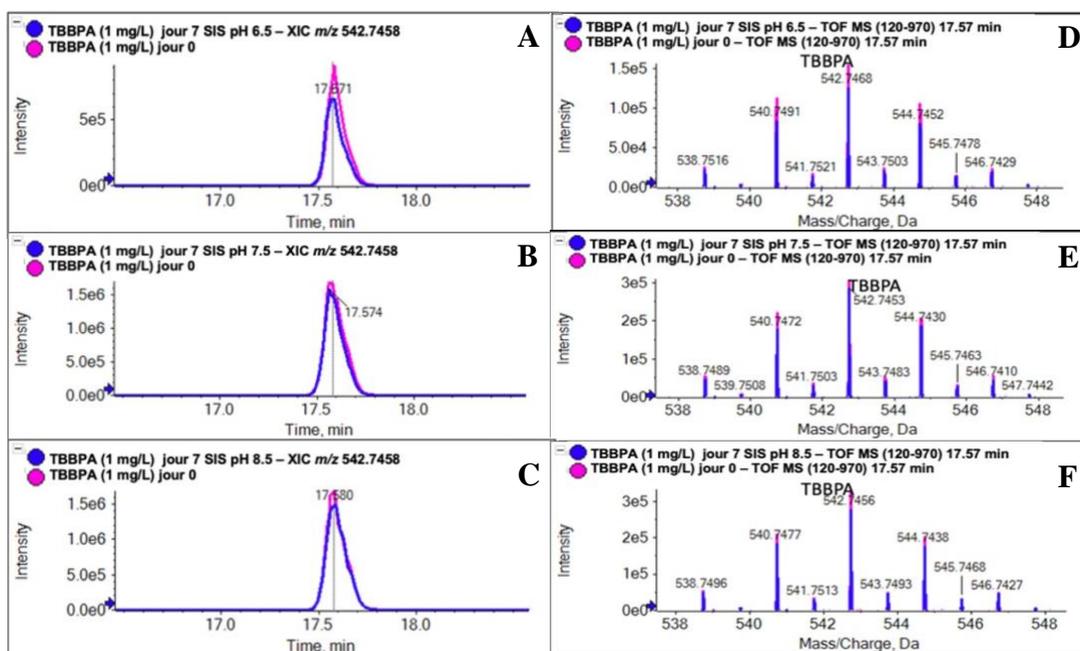


Figure 3.1 Chromatogrammes à ions extraits (XIC) et spectre MS de TBBPA (m/z 542.74) dans le milieu SIS à temps 0 (rose) et 7 (bleu) jours après la culture de *Lemna minor* à pH 6,5 (A, D); pH 7,5 (B, E) et pH 8,5 (C, F).

Le pic du TBBPA a été détecté dans tous les échantillons à un temps de rétention de 17,5 minutes (Fig. 3.1 et Fig. S.3 Annexe A). La somme de la surface sous le pic était proportionnelle à la concentration du TBBPA, qui a été représenté dans la figure (3.2

A). Selon les résultats de l'analyse chromatographique (UHPLC-UV) pour la quantification de TBBPA disponible dans le milieu SIS à différents pH, nous observons que le TBBPA est soluble dans le milieu SIS dans les trois conditions de pH. Cependant, il est plus soluble dans l'ordre suivant du pH 8,5 > 7,5 > 6,5. La différence entre les deux groupes 7,5 et 8,5 est faible, environ 10 %. En revanche, une différence d'environ 40 à 50 % entre le pH 6,5 et les pH 8,5 et 7,5. Les concentrations ont été calculées en utilisant la surface sous les pics pertinents. Nous observons une diminution du taux de TBBPA dans toutes les solutions d'exposition restantes après 7 jours d'exposition (Fig. 3.2 B). Après soustraction des quantités de TBBPA déterminées dans les solutions du traitement, dans les groupes à pH 6,5; 7,5 et 8,5 avec des concentrations de TBBPA de 10, 50, 100, 200, 500 et 1000 µg/L, nous observons une disparition d'environ 40% à 60% de TBBPA. Nous expliquons cette disparition par l'absorption de TBBPA par les plantes à partir du milieu pendant la période d'exposition.

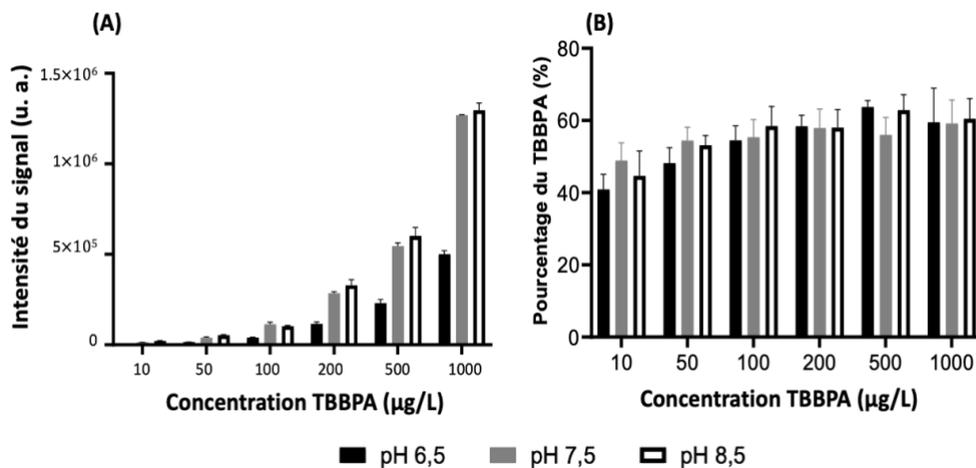


Figure 3.2 Le TBBPA disponible dans le milieu SIS à temps 0 jour (A) et après 7 jours (B) d'exposition aux plantes *Lemna minor* en fonction de la concentration nominale du TBBPA.

3.2 Détermination de la bioaccumulation du TBBPA par les plantes

L'analyse quantitative du TBBPA accumulé par les plantes *Lemna minor* exposé pendant 7 jours à différentes conditions de pH a été effectué par LC-MS/MS. Le TBBPA a été identifié en fonction de leur temps de rétention, de leurs poids moléculaires et de leurs schémas isotopiques. Leur spectre de masse montre la présence d'un pic à 17,5 minutes, avec un rapport masse/ charge (m/z) de 542.75 Da dans tous les échantillons de la plante exposée au TBBPA pour les différents pH (Fig. 3.1. D, E, F). Cependant, aucun pic de TBBPA n'a été détecté dans les groupes contrôles (Ctl), qui sont les extraits de *Lemna minor* cultivé dans les milieux sans TBBPA (0 µg/L) à pH 6,5 ; 7,5 et 8,5 (Fig. S. 4. A Annexe A). De plus, un autre composé a été détecté à 16,9 min avec (m/z 462.8373 Da), il est identifié par le tribromobisphénol A (TBBPA–Br + H ou C₁₅H₁₃Br₃O₂). L'intensité de ce dernier était faible par rapport au signal du produit parent au TBBPA (environ 40 fois plus faible) (Fig. S. 4. B, Fig. S. 5). Cependant, le pic du TBBPA–Br + H était détecté même dans les solutions d'exposition à temps 0 et 7 jours. La figure (3.3) montre que l'accumulation de TBBPA par les plantes augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu. Les niveaux de TBBPA accumulés dans les plantes sont augmentés de manière significative (p < 0,05). L'accumulation est plus importante dans les milieux avec 1000 µg/L de TBBPA, la plus forte accumulation est observée chez les plantes du groupe à pH 7,5, où elle atteint son maximum de 10,15 µg/g de PF, suivi du groupe à pH 8,5 avec 6,56 µg/g de PF et en dernier le groupe à pH 6,5 avec une teneur de TBBPA accumulé de 2,54 µg/g de PF. Cependant, une accumulation non significative est montrée lors de l'exposition des plantes à des concentrations au-dessous de 100 et 200 µg/L dans les groupes pH 7,5 et 6,5, respectivement. De plus, les faibles niveaux de TBBPA accumulé sont observés chez les plantes exposées à une concentration de 10 µg/L de TBBPA à pH 6,5; 7,5 et 8,5 avec les valeurs de 0,09; 0,97 et 1,28 µg/g de PF, respectivement. Ces résultats montrent la capacité de la plante *Lemna minor* à accumuler le TBBPA dans toutes les conditions de pH.

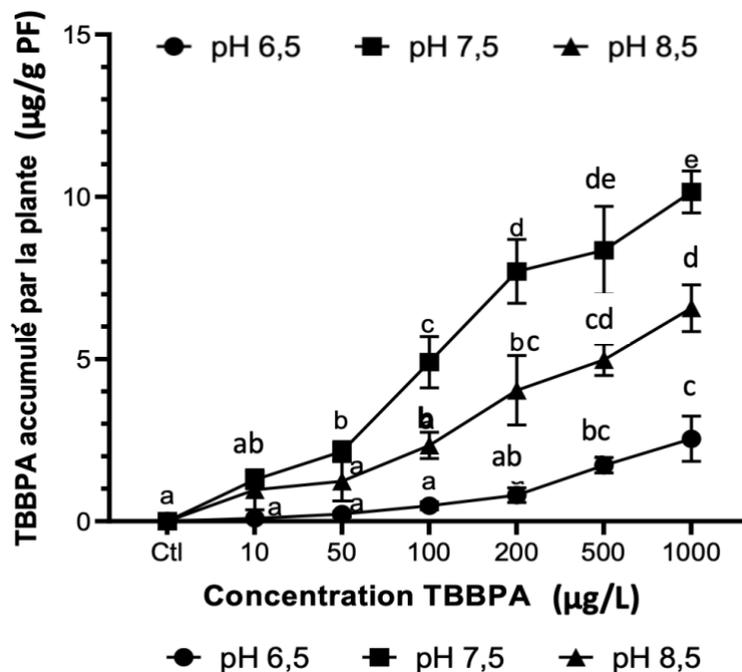


Figure 3.3 Bioaccumulation du TBBPA (en µg/g de poids frais) chez les plantes après exposition aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu de culture SIS à pH 6,5, 7,5 et 8,5. Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) (n=6).

3.3 Détermination de l'effet du TBBPA sur la croissance de la plante

Selon la norme OCDE 221 pour l'inhibition de la croissance de *Lemna sp*, l'un des paramètres recommandés est le taux de croissance des plantes basé sur le poids frais et le nombre de frondes. La toxicité du tétrabromobisphénol A sur la croissance de *Lemna minor* à la fin du septième jour était estimé en mesurant le poids frais et le nombre des frondes des plantes. Selon nos tests préliminaires de l'effet du pH sur la croissance des plantes *Lemna minor* (Tableau S1), les groupes contrôles cultivés dans le milieu SIS aux différents pH 6,5; 7,5 et 8,5 ont une croissance normale pendant 7 jours, avec des valeurs de taux de croissance spécifique moyen de 0,285; 0,297 et 0,270 par jour à pH

6,5; 7,5 et 8,5, respectivement. Ce qui est conforme à la limite de validation des tests recommandés par l'OCDE 221, qui est d'environ $0,275 \text{ j}^{-1}$ (OECD Test, 2006); pour cette raison, le test est valide. Les résultats du tableau (3.1) montrent une diminution du poids frais en fonction de l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu. Une diminution significative ($p < 0,05$) du poids frais par rapport aux contrôles est observée à partir d'une concentration de TBBPA de $50 \mu\text{g/L}$ dans le groupe pH 7,5 et 8,5, avec 12 et 18 %, respectivement. Cependant, une diminution significative de 13 % dans le poids frais chez le groupe pH 6,5 est observée à partir de $500 \mu\text{g/L}$. Ainsi, une légère augmentation du poids frais, 3,8 à 5,5 % sont observées pendant l'exposition à de faibles concentrations, 10 et $50 \mu\text{g/L}$ dans le même groupe (pH 6,5), mais cette augmentation est non significative par rapport au contrôle. Les variations les plus importantes sont observées à la concentration la plus élevée de TBBPA ($1000 \mu\text{g/L}$) avec une baisse de 18, 40 et 43 % du poids frais chez les groupes pH 6,5; 7,5 et 8,5, respectivement. De plus, nous observons des diminutions dans le nombre de frondes avec un effet significatif ($p < 0,05$) par rapport au contrôle, à partir de $50 \mu\text{g/L}$ à pH 8,5 et à partir de $100 \mu\text{g/L}$ à pH 7,5 et 6,5 avec une baisse dans le nombre de frondes de 19, 18 et 10 %, respectivement. La même remarque que le poids frais, la variation la plus importante dans le nombre de frondes est observée à une concentration de $1000 \mu\text{g/L}$, avec une baisse de 22, 37 et 40 % dans les groupes à pH 6,5; 7,5 et 8,5, respectivement. Donc, les diminutions du poids frais et du nombre de frondes sont en corrélation directe avec l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance calculé à partir du taux spécifique moyen de croissance après 7 jours est représenté dans la figure (3.4). Ces résultats ont montré un effet inhibiteur de TBBPA sur la croissance de la plante, qui augmente significativement en fonction de la concentration de TBBPA dans le milieu et en fonction du pH. Dans le groupe à pH 6,5 (Fig. 3.4 A), aucune inhibition de la croissance observée au-dessus du $100 \mu\text{g/L}$, l'augmentation d'inhibition commence à partir de $200 \mu\text{g/L}$ avec une valeur de 6,4 % jusqu'à 9,4 % à $1000 \mu\text{g/L}$, où elle était significative.

Cependant, dans le groupe à pH 7,5 et 8,5, l'inhibition de croissance augmente avec l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu (Fig. 3.4 B et C). Les pourcentages d'inhibition les plus importants sont observés à la concentration d'exposition la plus élevée (1000 µg/L), il était de 28,8 % dans le groupe à pH 8,5; suivi de 25,1 % à pH 7,5. Ces valeurs sont significatives par rapport aux contrôles ($p < 0,05$).

Tableau 3.1 Variations dans le poids frais (mg) et le nombre de frondes totales après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA à pH 6,5 (A); 7,5 (B) et 8,5 (C), chez la plante *Lemna minor*.

(A)

	Contrôle	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
Poids Frais (mg)	158,87 ± 10,55 a	167,6 ± 8,08 a	165,0 ± 8,72 a	157,6 ± 8,25 a	147,6 ± 14,16 ab	137,07 ± 10,56 b	130,77 ± 10,07 b
Nombre de frondes	138 ± 2,4 a	138 ± 4,2 a	135 ± 4,9 ab	124 ± 3,7 b	120 ± 2,4 b	117 ± 2,4 bc	107 ± 5,1 c

(B)

	Contrôle	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
Poids Frais (mg)	172,05 ± 10,22 a	169,8 ± 11,26 a	151,37 ± 12,86 ab	137,75 ± 7,12 b	122,67 ± 8,61 b	110,39 ± 8,40 bc	103,24 ± 10,64 c
Nombre de frondes	142 ± 3,7 a	140 ± 2,8 a	126 ± 4,6 ab	116 ± 7,3 b	106 ± 7,6 bc	92 ± 5,1 c	89 ± 1,4 c

(C)

	Contrôle	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
Poids Frais (mg)	150,03 ± 4,86 a	139,97 ± 3,59 ab	121,8 ± 3,79 b	112,76 ± 3,74 c	103,24 ± 9,98 cd	98,6 ± 7,40 d	84,68 ± 8,68 d
Nombre de frondes	129 ± 4,19 a	121 ± 3,09 ab	105 ± 3,27 b	100 ± 3,09 b	89 ± 8,60 c	85 ± 6,38 c	77 ± 3,30 c

Les résultats sont présentés en moyennes ± l'écart type (n=6). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative pour $p < 0,05$ entre les conditions testées pour le même paramètre.

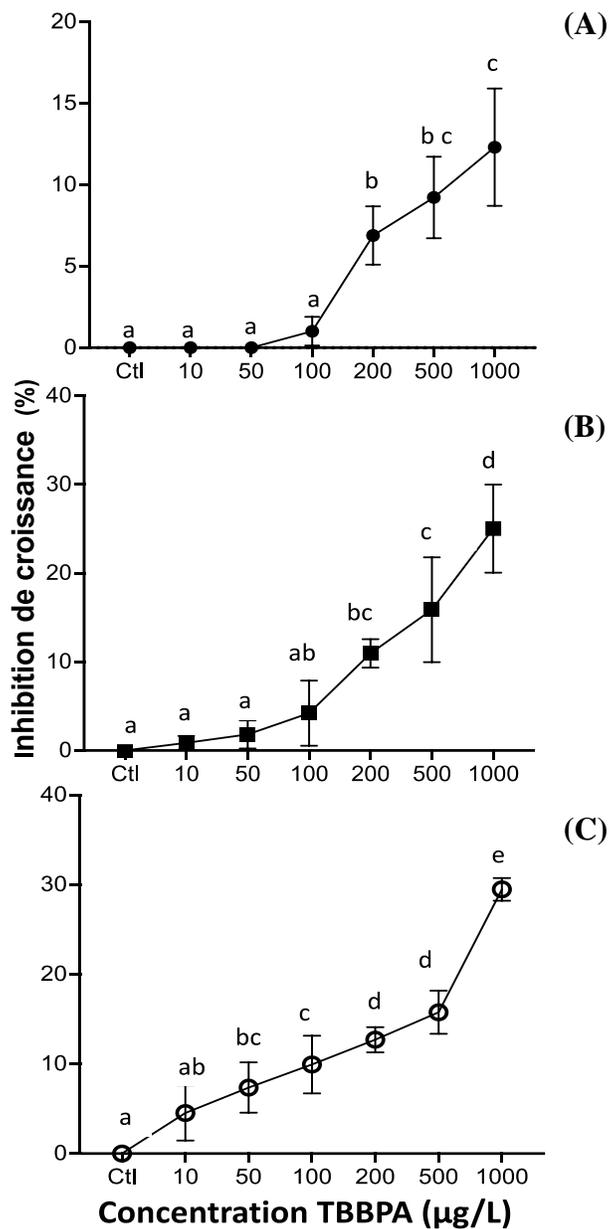


Figure 3.4 Effet inhibiteur du TBBPA sur la croissance de *Lemna minor* (en pourcentage %) après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA à pH 6,5 (A); 7,5 (B) et 8,5 (C). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) ($n=6$).

3.4 Effet du tétrabromobisphénol A sur les pigments photosynthétiques

Les teneurs en chlorophylles (*a* et *b*) et en caroténoïdes sont des biomarqueurs souvent utilisés dans l'évaluation de la toxicité des contaminants. L'analyse du contenu en pigments photosynthétiques chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition au TBBPA (Fig. 3.5) nous permet d'observer une faible réduction dans la teneur en chlorophylle *a* (Chl *a*) et chlorophylle *b* (Chl *b*). Dans le groupe à pH 6,5 (Fig. 3.5 A), nous observons une tendance similaire pour la Chl *a* et la Chl *b*. Le TBBPA à de faibles doses (10 et 50 µg/L) augmente légèrement le taux de Chl *a* et Chl *b* et cette variation est non significative par rapport au contrôle (0,57 et 0,17 µg/mg PF, respectivement). Ensuite, la Chl *a* diminué significativement ($p < 0,05$) pour atteindre une valeur minimale de 0,49 µg/mg PF à 1000 µg/L et la Chl *b* diminue à 0,11 µg/mg PF. Alors que, les variations de Chl *b* sont non significatives. Ainsi, les résultats dans le groupe à pH 7,5 (Fig. 3.5 B) et 8,5 (Fig. 3.5 C) montrent une baisse des teneurs en Chl *a* et *b*, pour atteindre son minimum à 1000 µg/L avec des valeurs respectives de 0,4 et 0,13 µg/mg PF à pH 7,5, et des valeurs de 0,38 et 0,12 µg/mg PF à pH 8,5. la variation dans la Chl *a* est significative à partir des concentrations de 100 et 200 µg/L de TBBPA pour pH 8,5 et 7,5 respectivement. Les teneurs en caroténoïdes dans les trois conditions de pH sont augmentées légèrement à 0,23 et 0,24 µg/mg PF pour les faibles concentrations de TBBPA (10 et 50 µg/L) par rapport au contrôle (0,21 µg/mg), mais c'est une variation non significative. Ensuite, les teneurs ont diminué à 0,15 µg/mg PF à pH 6,5, 0,17 µg/mg PF à pH 7,5 et 0,19 µg/mg PF à pH 8,5 pour la concentration de 1000 µg/L de TBBPA, cette diminution est significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$).

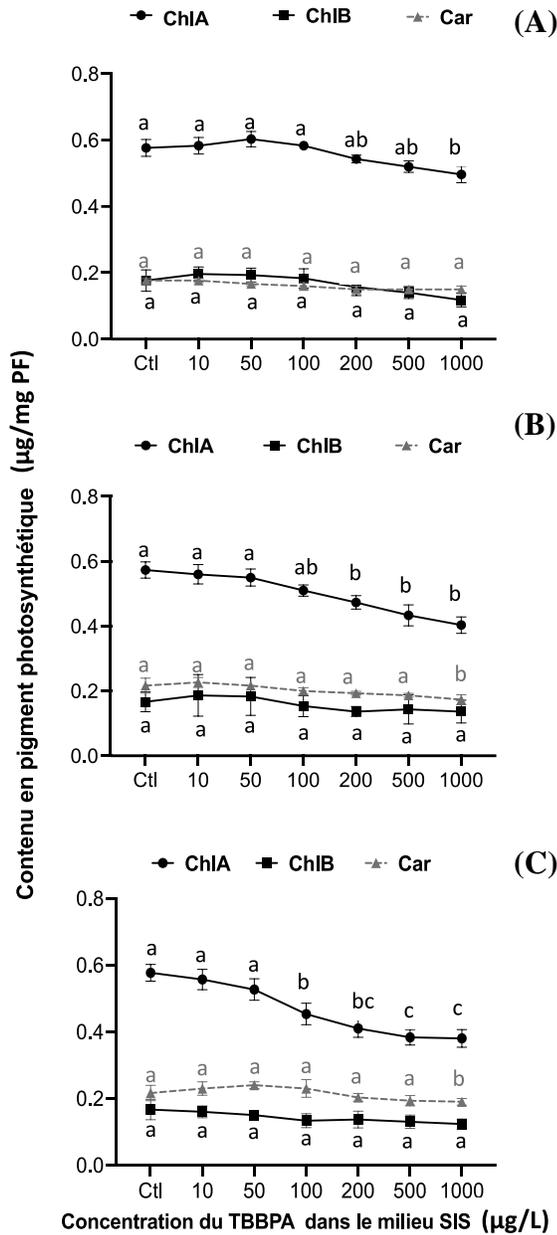


Figure 3.5 Variations du contenu en chlorophylle *a* (ChlA), en chlorophylle *b* (ChlB) et en caroténoïdes (Car) en ($\mu\text{g}/\text{mg PF}$) chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA à pH 6,5 (A); pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) ($n=6$).

3.5 Effet du tétrabromobisphénol A sur le stress oxydant

3.5.1 Effet du TBBPA sur la formation des espèces réactives oxygénées (ROS)

La formation des ROS est un biomarqueur sensible du stress oxydant cellulaire. L'utilisation des sondes fluorescentes CellROX pour la détection du stress oxydant nous permet de mesurer le niveau des ROS chez les plantes exposées au TBBPA aux différents pH (Fig. 3. 6). Après 7 jours d'exposition, les résultats de mesure de fluorescence montrent une augmentation de niveau des ROS dans tous les groupes en fonction de l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu. Une augmentation significative ($p < 0,05$) de 31 % par rapport au contrôle est observée à 1000 $\mu\text{g/L}$ dans le groupe pH 6,5 (Fig. 3.6 A). De plus, les niveaux les plus importants sont mesurés à la concentration de TBBPA la plus élevée (100 $\mu\text{g/L}$) dans les groupes pH 7,5 et 8,5 avec une augmentation de 50,6 % et 50,3 %, respectivement (Fig. 3.6 B et C). Cependant, les variations dans les niveaux des ROS étaient significatives dans ces groupes même à de faibles concentrations de TBBPA dans le milieu (10 et 50 $\mu\text{g/L}$).

3.5.2 Effet du TBBPA sur les niveaux de la peroxydation lipidique

L'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique pour la détection de la peroxydation lipidique (le réactif Image-iT® Lipid Peroxidation) chez les plantes exposées pendant 7 jours au TBBPA nous permet de déterminer les niveaux de peroxydation lipidique (Fig. 3.7). Les résultats ont également montré une augmentation similaire au ROS. Cependant, cette augmentation était légère et elle est significative par rapport aux contrôles à partir de 100 et 200 $\mu\text{g/L}$ pour les groupes de pH 6,5, 7,5 et 8,5. Les teneurs ont augmenté de 10 %, 17 % et 21 % pour les concentrations de 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$, respectivement à pH 6,5 (Fig. 3.7 A), cette augmentation est significative ($p < 0,05$). Ainsi, les niveaux de la peroxydation lipidique ont également augmenté significativement ($p < 0,05$) aux concentrations de TBBPA 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$ avec 12, 15 et 22 % d'augmentation par rapport au contrôle, respectivement dans le groupe à pH 7,5 (Fig. 3.7 B). Des valeurs proches ont déterminés dans le groupe à pH 8,5 avec

10, 18 et 21 % ($p < 0,05$) aux concentrations de 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$ de TBBPA, respectivement. De toute évidence, nous avons remarqué que l'exposition au TBBPA entraîne une augmentation des niveaux de la peroxydation lipidique chez la plante *Lemna minor*.

3.6 Effet du tétrabromobisphénol A sur les activités antioxydantes de la plante

Les changements dans les biomarqueurs de stress oxydatif mesuré, y compris les changements dans l'activité de l'enzyme antioxydante catalase (CAT) et les changements dans le niveau de l'antioxydant non enzymatique glutathion (GSH) ont été évalués à l'aide des sondes fluorescentes spécifiques pour la détection de catalase et le glutathion, qui sont Amplex® Red catalase Assay et ThiolTracker® Violet (glutathione detection reagent), respectivement. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures (3.8) et (3.9).

3.6.1 Effet du TBBPA sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Après 7 jours d'exposition (Fig. 8.3), les groupes traités au TBBPA aux différents pH ont montré de légères augmentations de l'activité CAT dans les groupes à pH 6,5 et 7,5 (Fig. 3.8. A et B) à de faibles concentrations d'exposition au TBBPA (50 et 100 $\mu\text{g/L}$) par rapport au contrôle non traité, avec des valeurs de 17 % et 12 % à pH 6,5 et 7,5, respectivement. Néanmoins, cette augmentation est significative ($p < 0,05$) seulement à pH 6,5 et non pas à pH 7,5. De plus, nous observons une diminution de l'activité CAT dans les deux groupes de pH 6,5 et 7,5, à partir de la concentration 200 jusqu'à 1000 $\mu\text{g/L}$, où elle atteint son minimum avec des valeurs de 9 et 8 % à pH 6,5 et 7,5, respectivement et cette diminution était significative ($p < 0,05$). Cependant, les résultats montrent une diminution progressive de l'activité CAT dans le groupe à pH 8,5 (Fig. 3.8 C). Ces variations étaient significatives ($p < 0,05$) à partir de la concentration d'exposition de 200 $\mu\text{g/L}$, avec des valeurs de 25, 24 et 32 % à 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$, respectivement.

3.6.2 Effet du TBBPA sur le niveau de l'antioxydant glutathion

Pour évaluer le potentiel de détoxification du TBBPA dans les plantes, les niveaux de l'antioxydant GSH ont été mesurés chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition aux différents pH et concentration de TBBPA (Fig. 3.9). Nous avons observé que la teneur en GSH augmente légèrement en fonction de l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu aux différents pH, avec des valeurs de 18, 21 et 13 % à pH 8,5, 7,5 et 6,5, respectivement. Cette augmentation était significative ($p < 0,05$) seulement à partir de 200 et 500 $\mu\text{g/L}$ à pH 7,5 et 6,5, respectivement. Ainsi, cette augmentation est suivie d'une légère diminution à pH 8,5 lors d'exposition à une concentration élevée de TBBPA, qui est 1000 $\mu\text{g/L}$, mais cette différence est non significative statistiquement.

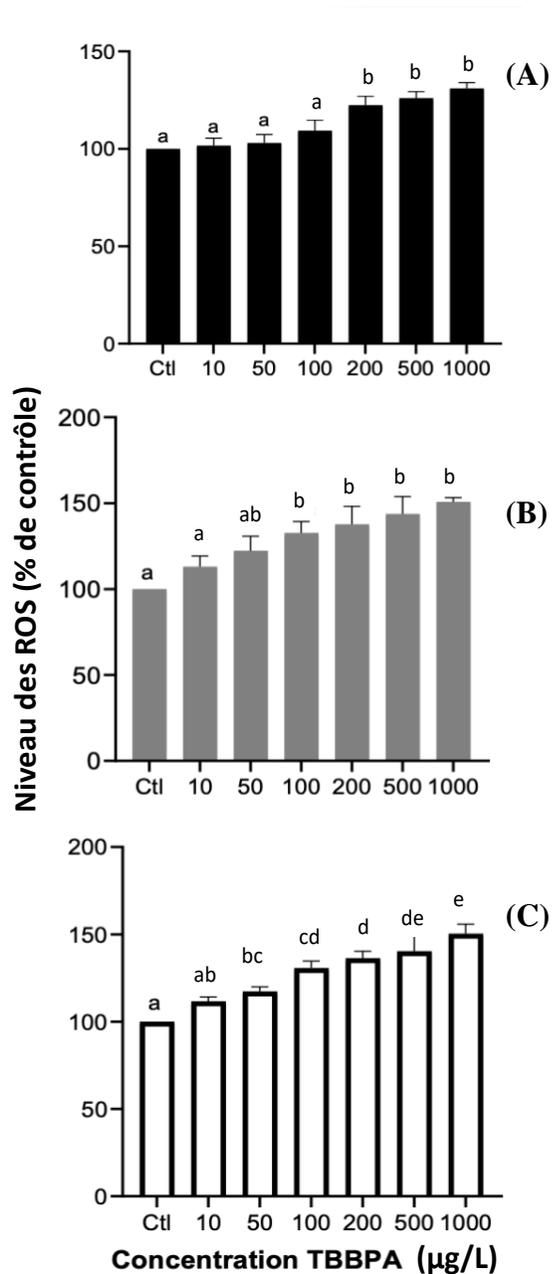


Figure 3.6 La production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) intracellulaires (en % de contrôle) chez *L. minor* exposé pendant 7 jours aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) ($n=6$).

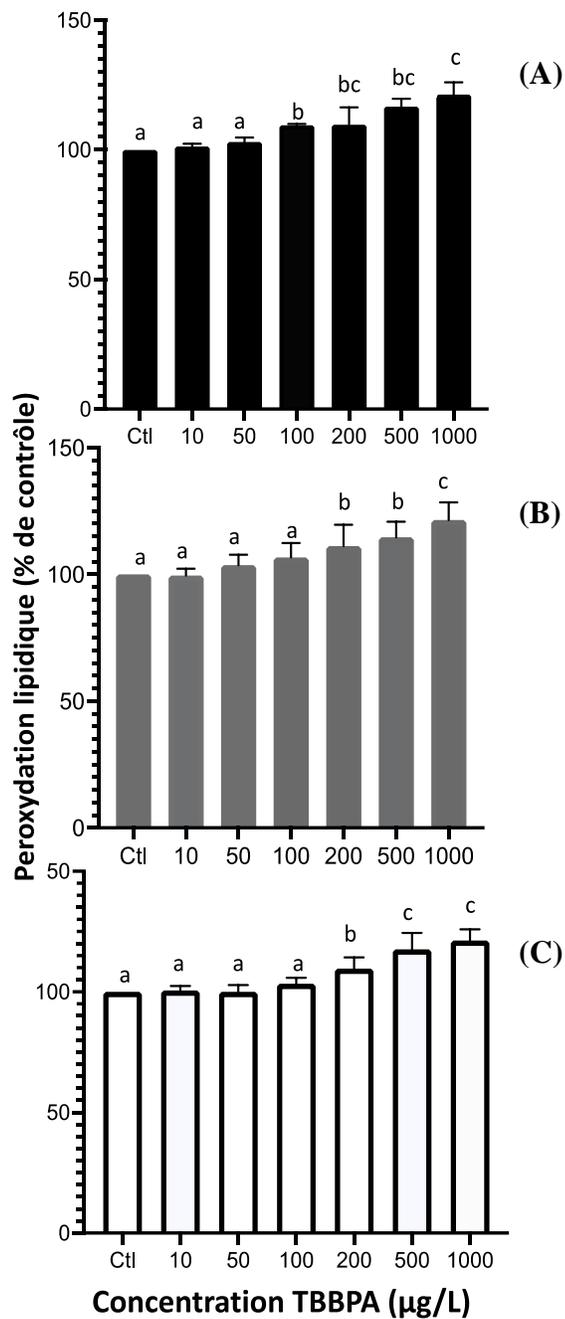


Figure 3.7 Le niveau de la peroxydation lipidique (en % de contrôle) chez *L. minor* exposé pendant 7 jours aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) ($n=6$).

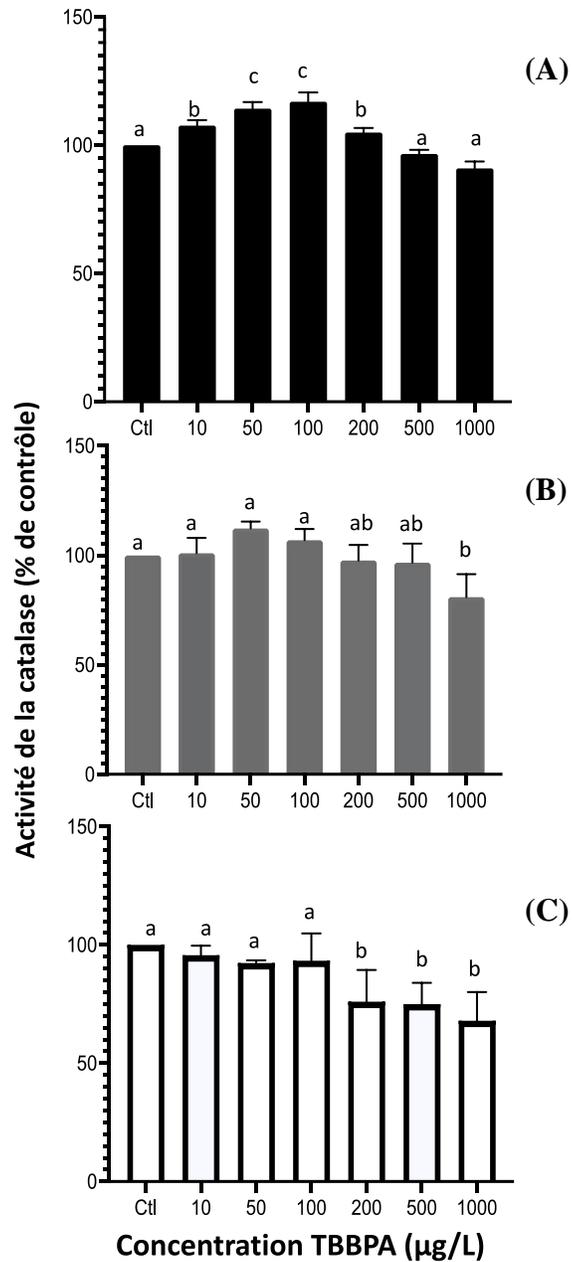


Figure 3.8 L'activité spécifique de la catalase (en % de contrôle) chez *L. minor* exposé pendant 7 jours aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) ($n=6$).

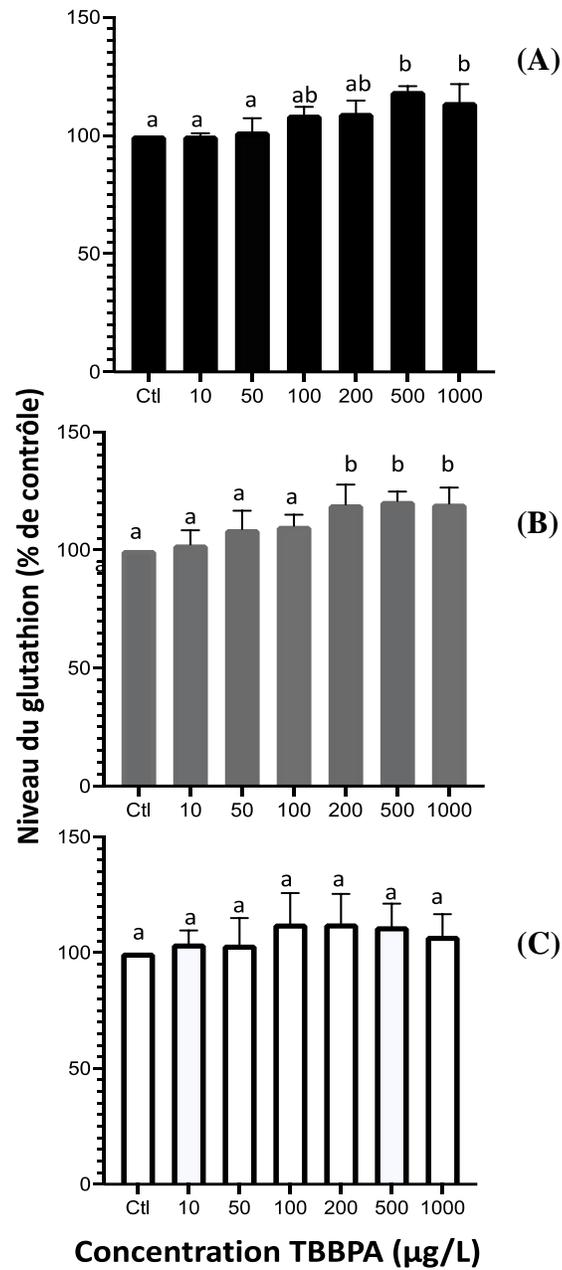


Figure 3.9 Niveaux du glutathion (en % de contrôle) chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition aux différentes concentrations de TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) et pH 8,5 (C). Lorsque les lettres minuscules associées aux valeurs sont les mêmes, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes conditions testées pour le même pH (ANOVA, test Tukey HSD) (n=6).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Le tétrabromobisphénol A (TBBPA) est le retardateur de flamme bromé produit en grandes quantités à l'échelle mondiale (De Wit, 2002). Ainsi, sa présence dans l'environnement aquatique a suscité des inquiétudes croissantes au cours de la dernière décennie, il a été détecté dans différents échantillons environnementaux (Malkoske *et al.*, 2016). De plus, il était évident que des effets toxiques étaient causés par le TBBPA chez différents organismes (He *et al.*, 2015; Kuiper *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012; Ronisz *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2008). Cette étude a été effectuée dans le cadre d'approfondir les données toxicologiques du TBBPA dans le milieu aquatique, en utilisant un modèle d'étude bien connu pour ses caractéristiques dans les essais toxicologiques en laboratoire, la plante aquatique *Lemna minor*.

Dans cette étude, nous avons évalué l'influence du pH sur la bioaccumulation du tétrabromobisphénol A. Ainsi, les effets du TBBPA ont été démontrés sur la plante aquatique *Lemna minor* aux différents pH pendant une période d'exposition de 7 jours. Les résultats de ce travail suggèrent que le TBBPA peut s'accumuler et avoir des effets néfastes sur la plante aquatique *Lemna minor*. En général, un effet dose-dépendant s'est produit pour la plupart des paramètres, la croissance est inhibée partiellement, et les teneurs en pigments chlorophylliens ont diminué. De plus, un stress oxydant a été généré par une augmentation dans la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) et les niveaux de la peroxydation lipidiques. Cependant, des systèmes de détoxification enzymatique, tel que la catalase (CAT) et non enzymatique comme le glutathion (GSH) ont été déclenchés chez les plantes *Lemna minor*.

4.1 Bioaccumulation du TBBPA par la plante *Lemna minor*

Les résultats de la quantification du TBBPA dans le milieu SIS à pH 6,5; 7,5 et 8,5 (Fig. 3.2 A) montrent que le TBBPA est plus soluble à pH 8,5 > 7,5 > 6,5. Le pH et la concentration du TBBPA dans le milieu sont directement liés l'un à l'autre. Nous avons expliqué ce résultat par l'effet du pH sur la solubilité du TBBPA. En fait, le pH du milieu pourrait influencer la solubilité du TBBPA en modifiant le comportement d'ionisation du TBBPA, qui est un composé ionique avec des constantes de dissociation pKa1 de 7,5 et un pKa2 de 8,5, ce qui signifie que les formes ionisées de TBBPA deviendront prédominantes à ce pH. À des valeurs de pH inférieures à 7,5, le TBBPA est présent essentiellement sous la forme non dissociée, et par conséquent, il est moins soluble dans les milieux acides (Macêdo *et al.*, 2021).

Dans la présente étude, les teneurs de TBBPA accumulées par les plantes *Lemna minor* ont augmenté avec l'augmentation de la concentration d'exposition. Ainsi, les valeurs sont variées entre 2,54; 6,56 et 10,15 µg/g de poids frais dans les différents groupes de pH (Fig. 3.3). Ces résultats ont démontré que *Lemna minor*, l'un des principaux producteurs primaires de l'écosystème aquatique, pouvait bioaccumuler le TBBPA, et la possibilité d'une bioamplification le long de la chaîne alimentaire aquatique ne doit pas être négligée. Un résultat similaire a été rapporté par Sun *et al.* (2008), qui ont montré que la plante aquatique *Ceratophyllum demersum*, ou connue sous le nom Cornifle immergé, pourrait largement absorber le TBBPA dans une expérience hydroponique de 14 jours, la teneur de TBBPA accumulé avait atteint environ 1,2 mg/g PS au niveau le plus élevé de TBBPA (1 mg/L) (Sun *et al.*, 2008).

D'autres études ont démontré que l'absorption et l'accumulation de TBBPA dépendaient de la concentration et étaient spécifiques aux tissus de l'organisme et aux espèces. Par exemple, Jiang *et al.* (2020) ont constaté que les racines des mangroves *Avicennia marina* et *Kandelia obovata*, présentait une grande capacité d'accumulation

de TBBPA et pouvant accumuler jusqu'à 50 et 80 µg/g PS à partir des milieux comportant 0,5 et 5 mg/L de TBBPA dans une expérience hydroponique de 14 jours (Jiang *et al.*, 2020). Il a été également signalé que des concentrations plus élevées de TBBPA et de ses métabolites s'accumulent dans les racines des semis de roseaux, de riz et de citrouille (Hou *et al.*, 2018). De plus, des recherches sur la bioaccumulation de TBBPA chez les autres organismes aquatiques ont montré que les poissons peuvent accumuler le TBBPA dans différents organes (tels que le foie, les muscles et les branchies) (Yang *et al.*, 2012a). Li *et al.* (2009) ont trouvé que le bisphénol A (BPA, un produit de débromation du TBBPA) pouvait s'accumuler dans les cellules d'une microalgue marine *Stephanodiscus hantzschii* et cette algue pouvait éliminer 61 jusqu'à 99 % de BPA pendant un traitement de 16 jours.

Il a été démontré que l'hydroxylation et la débromination du TBBPA chez les espèces de mangroves étaient un mécanisme de transformation significatif (Jiang *et al.*, 2020). Cependant, d'après nos résultats, aucun produit de transformation issu de ces voies n'a été détecté chez *Lemna minor* dans notre travail, à l'exception d'une faible quantité de tribromobisphénol A (TriBBPA), qui était détecté dans les plantes et dans le milieu avant et après la culture de la plante *Lemna* (Fig. S.2.B et S.3). Cette présence est expliquée par la composition du produit commercial TBBPA, qui est relativement pur, mais il y a toujours de petites quantités de TriBBPA. Une source possible de la présence du TriBBPA dans le milieu aqueux est la photodégradation du TBBPA (Eriksson *et al.*, 2004). On peut expliquer la bioaccumulation de TBBPA dans la plante aquatique *Lemna minor* à partir des milieux aux différents pH par son caractère lipophile. En tant que xénobiotique lipophile, le TBBPA avec un coefficient de partage octanol/eau (log KOW) d'environ 6,70 pourrait se lier facilement aux biomembranes, principalement la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Le TBBPA a tendance à s'accumuler dans les tissus riches en graisses comme beaucoup de contaminants organiques lipophiles. Par exemple, des travaux antérieurs ont démontré que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et le retardateur de flamme bromée (BDE-47) ont

également été associés à la bicouche lipidique de la membrane plasmique chez le soja et la lentille d'eau (Kreslavski *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2018). Dans la figure (3.3), on constate des différences dans la bioaccumulation de TBBPA en fonction du pH. On peut expliquer la faible bioaccumulation à pH 6,5 par la faible biodisponibilité de TBBPA dans le milieu, qui résulte de sa faible solubilité. Une autre hypothèse est la perte de TBBPA à cause d'une adsorption sur les parois ou d'une sédimentation sur le fond des récipients de culture.

4.2 Effet du TBBPA sur la croissance des plantes

La biomasse est utilisée comme indicateur clé des dommages causés à la croissance et au développement des plantes par un stress biotique ou abiotique. Dans notre étude, nous avons cultivé les plantes *Lemna minor* dans des milieux aux différentes valeurs de pH initiales (6,5; 7,5 et 8,5) et différentes concentrations de TBBPA (0, 10, 50, 100, 200, 500 et 1000 µg/L). Après 7 jours d'exposition, nous avons mesuré le poids frais et le nombre de frondes total pour déterminer l'effet du pH et de TBBPA sur la croissance de la plante. Les résultats montrent que la croissance de la plante en absence de TBBPA (Tableau S.1. Annexe A) est optimale et dans les normes établies par le test 221 (OECD Test, 2006). Nous avons déterminé un taux de croissance d'environ 0,275 j⁻¹ et un temps de doublement inférieur à 2,5 jours aux pH 6,5 et 7,5 contre un taux de croissance de 0,270 j⁻¹ et un temps de doublement de 2,59 jours au pH 8,5. Cela indique que le pH à ces valeurs n'a pas d'effet négatif sur la croissance de *Lemna minor*. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes qui montre que la plante *Lemna minor* est capable de survivre sur une large plage de pH, elle peut pousser dans un pH entre 3,5 et 10 (McLay, 1976 ; Uysal et Taner, 2010).

Après 7 jours d'exposition au TBBPA, le poids frais et le nombre des frondes total de *L. minor* ont diminués significativement (Tableau 3.1) avec l'augmentation de la concentration de TBBPA dans toutes les conditions de pH. Cela cause une inhibition de croissance des plantes (Fig. 3.4). Ainsi, nous avons remarqué une faible

augmentation non significative du poids frais aux faibles concentrations de TBBPA (10 et 50 µg/L) dans le groupe à pH 6,5. Ces résultats sont cohérents avec les études précédentes. Jiang *et al.* (2020) ont montré que l'exposition des mangroves *K. obovata* au TBBPA pendant 7 à 14 jours causait une diminution significative du poids frais (biomasse fraîche). Au contraire, le poids frais d'*A. marina* est augmenté légèrement lors du traitement aux faibles doses de TBBPA. Le même effet a été observé chez les plantes *Lemna minor* exposé au BPA (Liang *et al.*, 2022; Bourgeade *et al.*, 2021; Pop *et al.*, 2021), au BDE-47 (Qiu *et al.*, 2018) et au BDE-209 (Sun *et al.*, 2019). Ainsi, chez les plantes terrestres exposées au TBBPA et au BPA, telles que le pois chiche et le soja (Dogan *et al.*, 2010; Ge et Zhang, 2017). L'effet stimulant sur le poids frais de *L. minor* détecté à de faibles concentrations pourrait être dû à un phénomène hormétique, qui est un phénomène dose-réponse caractérisé par une stimulation à faible dose et une inhibition à forte dose (Liang *et al.*, 2022; Calabrese et Blain, 2009).

La production de biomasse est considérée comme un indicateur externe fiable de l'état interne du métabolisme des plantes. Cependant, une réponse rapide et visible ne se produit généralement que lorsque des doses létales de composés sont utilisées. Donc, les changements au niveau biochimique peuvent précéder les changements de physiologie et de croissance et pourraient servir d'indicateur précoce de l'effet toxique d'un contaminant (Kanwar *et al.*, 2020).

4.3 Effet du TBBPA sur la teneur des pigments photosynthétiques

La chlorophylle est le principal pigment impliqué dans la photosynthèse. La teneur en chlorophylle pouvait être utilisée comme indicateur clé pour surveiller les dommages liés à la croissance et au développement d'une plante induits par la présence de contaminants métalliques et organiques dans l'environnement (Li *et al.*, 2008). De plus, la pertinence de ce paramètre est élevée, car les teneurs en pigments photosynthétiques fournissent une estimation indirecte, mais précise de l'état nutritionnel des plantes. Dans cette étude, nous avons mesuré les teneurs en pigments chlorophylliens

(chlorophylle *a*, *b* et les caroténoïdes) chez *Lemna minor* après 7 jours d'exposition au TBBPA aux différentes conditions de pH. Les résultats obtenus (Fig. 3.5) montrent une faible diminution significative dans la teneur en chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et en caroténoïde lors d'exposition à des concentrations élevées de TBBPA (500 et 1000 µg/L). En revanche, nos résultats montrent une légère augmentation dans les teneurs des pigments photosynthétiques lors d'exposition à des concentrations de TBBPA inférieures à 200 µg/L. Les résultats de notre travail sont cohérents avec ceux des études précédentes. Par exemple, Jiang et al. (2020) ont montré que les teneurs en chlorophylle *a* et chlorophylle *b* dans les feuilles de mangrove *K. obovata* ont d'abord été stimulées par une faible concentration de TBBPA (0,5 mg/L) à 7 jours, puis réduites lors d'exposition au niveau élevé de TBBPA (5 mg/L). L'étude de Wang et al. (2019) a également trouvé que la teneur totale en Chl *a* était significativement réduite dans le maïs exposé à des concentrations de TBBPA de 3,75 à 75,00 mg/kg (Wang *et al.*, 2019). Ainsi, Ge et Zhang (2017) ont montré que 5 à 100 mg/kg de TBBPA réduisaient de manière significative la teneur en chlorophylle dans les semis de soja après 7 et 14 jours d'exposition (Ge et Zhang, 2017). D'autres études ont rapporté que l'exposition au BPA diminue la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes totaux dans les plantes, *Lemna minor* (Bourgeade *et al.*, 2021), *Arabidopsis thaliana* (Rapala *et al.*, 2017), et le soja (Jiao *et al.*, 2015).

Ces résultats indiquent que l'exposition aux concentrations élevées de TBBPA entraîne souvent une diminution de la teneur en chlorophylle. Cela pourrait être attribué à l'inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle, à la dégradation de la structure des chloroplastes, à la perturbation de la formation des photosystèmes et à la dégradation par photooxydation de la chlorophylle libre (Ge et Zhang, 2017). Ainsi, la dégradation de la chlorophylle pourrait se produire dans des conditions de peroxydation lipidique membranaire et d'activité photosynthétique sévèrement affectée. De plus, la teneur en caroténoïdes des plantes augmente généralement en présence de xénobiotiques prooxydants en raison de leurs propriétés antioxydantes. Ils protègent contre les

dommages oxydatifs causés par les ROS. Autres rôles des caroténoïdes incluent la protection des centres de réaction et du complexe d'antennes des photosystèmes pour éviter d'endommager l'appareil photosynthétique (Alkimin *et al.*, 2019 ; Lee *et al.*, 2021).

4.4 Effet du TBBPA sur le stress oxydant

Pendant la croissance, les plantes doivent faire face aux différents stress externes. Pour survivre aux changements environnementaux, les plantes ont développé des mécanismes élaborés pour manifester des réponses adaptatives avec les différents changements physiologiques et biochimiques. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) et les radicaux hydroxyles ($OH\bullet$), se produit à tout moment pendant la croissance et le développement des plantes, et augmente lorsque les plantes sont exposées aux divers stress biotiques et abiotiques. Des études antérieures ont indiqué que les ROS sont hautement réactifs et toxiques et peuvent entraîner la destruction oxydative des cellules (Zhu *et al.*, 2009).

Dans le présent travail, la toxicité des ROS générés par le TBBPA chez la plante aquatique *Lemna minor* a été étudié. Après exposition aux différentes concentrations de TBBPA, les niveaux des espèces réactives oxygénés (ROS) ont augmenté significativement par rapport au contrôle dans toutes les conditions de pH (Fig. 3.6). De plus, une corrélation a été obtenue entre la formation des ROS et l'accumulation de TBBPA dans la plante. Ces résultats suggèrent que la formation des ROS a été induite par le TBBPA chez les plantes. Nos résultats se concordent avec les études de Sun *et al.* (2008), qui montrent que l'exposition des plantes aquatiques *Ceratophyllum demersum* au TBBPA (0,05 – 1 mg/L) stimule la production de ROS. Ainsi, d'autres études ont montré que le TBBPA peut induire la production des ROS dans le foie de poisson, principalement le radical hydroxyle ($\bullet OH$) (Shi *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2009). Ainsi, l'induction des ROS est la manifestation générale de la toxicité du retardateur

de flamme bromé, BDE-47, sur *Lemna minor*. La teneur en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène dans les frondes de lentilles a augmenté progressivement avec l'augmentation de la concentration de BDE-47 dans le milieu de culture (Qiu *et al.*, 2018). On sait que lorsque les plantes sont exposées à des xénobiotiques, y compris le TBBPA, un stress oxydant est induit par une augmentation de la production des ROS. Les organites tels que les peroxysomes et le chloroplaste (site de la photosynthèse), où les ROS sont produits à un taux relativement élevé, sont particulièrement à risque (Sun *et al.*, 2008). En conséquence, les ROS produits par des plantes inhibent le développement des chloroplastes chez les plantes, réduisent la survie des graines et la croissance des racines, stimulent la séparation et la dessiccation des frondes et déclenchent la peroxydation des lipides membranaires essentiels dans les membranes plasmiques et les organites intracellulaires (Lee *et al.*, 2021). Ainsi, un autre site possible de formation des ROS est la mitochondrie. Grâce à la ressemblance des propriétés physicochimiques (lipophilie) de TBBPA aux PBDE (BDE-47 et BDE-100), qui ont de fortes interactions avec la membrane mitochondriale. Lors d'exposition aux PBDE, une fuite d'électrons se produit dans la chaîne de transport des électrons, ces électrons peuvent être transférés à l'oxygène pour former des ROS (Qiu *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2013).

L'un des effets les plus néfastes des ROS dans les cellules est la peroxydation des lipides membranaires. Le MDA est un produit important de la peroxydation lipidique chez les plantes dans des conditions de stress et est souvent utilisé pour évaluer la peroxydation des lipides membranaires des cellules végétales. Plusieurs études ont démontré que le TBBPA peut provoquer une peroxydation des lipides membranaires dans les cellules animales et végétales en induisant la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), même en cas d'exposition à court terme (Sun *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008). Dans notre étude, les niveaux de la peroxydation lipidique ont significativement été induits par des concentrations élevées de TBBPA (1 mg/L) (Fig.3.7), démontrant que la peroxydation lipidique chez les plantes est favorisée et

qu'elle dépend de l'augmentation de la concentration de TBBPA dans le milieu. Ce résultat est cohérent avec les résultats observés chez d'autres plantes aquatiques, tel que la *C. demersum* et les mangroves *K. obovata* et *A. marina*. Ainsi, chez les semis de blé et du soja après 7 et 14 jours d'exposition au TBBPA, la teneur en MDA a augmenté de manière significative (Jiang *et al.*, 2020; Li *et al.* 2008; Ge et Zhang, 2017). Cette augmentation dans le niveau de la peroxydation lipidique est étroitement liée à l'endommagement de la membrane plasmique et une altération de l'intégrité cellulaire. Nos résultats ont indiqué que la plante aquatique *Lemna minor* répondait au stress oxydant causé par l'exposition au TBBPA.

4.5 Effet du TBBPA sur les systèmes de détoxification antioxydants de la plante

Il est bien connu que les plantes peuvent développer des mécanismes pour se protéger contre les effets toxiques des ROS, en activant des systèmes de détoxification antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Dans des conditions de stress, un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'accumule puis endommage la cellule végétale. Afin de maintenir l'équilibre des ROS dans les plantes, les activités enzymatiques antioxydantes, tel que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les peroxydases (POD), augmentent pour éliminer les ROS excessifs et améliorer la résistance au stress des plantes. Cependant, lorsque le stress est supérieur au seuil de tolérance de la plante, les ROS ne peuvent pas être éliminés, entraînant la diminution des activités SOD, POD et CAT et inhibant davantage la croissance des plantes. Dans la présente étude, les changements dans les activités de la catalase (CAT) et les niveaux de glutathion réduit (GSH) ont été étudiés.

La catalase (CAT) peut être trouvée dans les peroxysomes et les mitochondries, elle élimine le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'activation et l'inhibition de l'enzyme ont été décrites dans les études précédentes. Dans notre étude, l'activité antioxydante enzymatique de la CAT dans les plantes *Lemna minor* a montré une légère

augmentation significative à de faibles doses de TBBPA (50 et 100 µg/L) à pH 6,5 et 7,5 par rapport au contrôle. Ensuite, nous observons une diminution progressive de l'activité CAT à partir de la concentration 200 et elle atteint son minimum de 32 % à 1000 µg/L (Fig. 3.8). Les résultats obtenus sont cohérents avec les études précédentes. Par exemple, Li et al. (2008) ont constaté que l'activité CAT dans les feuilles de blé exposées à des concentrations de TBBPA de 0,5 à 50 mg/kg était supérieure à celle du témoin au début, puis est devenue inférieure à celle du témoin à partir de 5 mg/kg. Ainsi, les résultats de Wu *et al.* (2016), qui ont montrés que l'activité CAT était réprimée après une exposition à 0,40, 0,70 et 1,00 mg/L de TBBPA chez les embryons et les larves de poisson zèbre, et ces résultats indiquent que le TBBPA induit un stress oxydatif chez le poisson zèbre (Wu *et al.*, 2016). On pourrait expliquer que l'activité CAT a été activée et induite pour éliminer les ROS afin de protéger les organismes des dommages oxydatifs. Cela suggère que la plante *Lemna minor* a la capacité de tolérer le stress oxydant causé par le TBBPA au premier stade, lorsque la concentration de TBBPA était inférieure à 100 µg/L, mais la capacité est perdue avec l'augmentation de la concentration d'exposition et cette diminution de l'activité CAT pourrait être causée par des dommages au système de défense antioxydant. Cela suggère que la formation et l'accumulation de H₂O₂ ont dépassé la capacité antioxydante de la plante, entraînant la diminution observée de l'activité de la CAT. Ce résultat est cohérent avec d'autres études (He *et al.*, 2015 ; Jiang *et al.*, 2020 ; Qiu *et al.*, 2018; Ge et Zhang, 2017).

Le glutathion réduit (GSH) est l'antioxydant le plus important dans les organismes, le GSH est un tripeptide thiol omniprésent qui agit comme un antioxydant important pour piéger les ROS par l'oxydation du GSH en GSSG. Ainsi, il joue un rôle important dans les réactions de détoxification par conjugaison avec des intermédiaires électrophiles sous l'action catalytique de la GST (He *et al.*, 2015). Dans cette étude, il a été constaté que les niveaux de GSH augmentaient légèrement avec l'augmentation de la concentration de TBBPA dans les milieux (Fig. 3.9). Des résultats similaires ont été trouvés dans les niveaux de GSH dans le foie du poisson *Carassius auratus* après une

exposition à 0,3 et 3 mg/L de TBBPA pendant 7 jours (He *et al.*, 2015). Ainsi, une étude précédente a également rapporté que l'exposition au BPA entraînait une augmentation de la teneur en GSH dans le soja et *Lemna minor* (Wang *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2022). Cependant, dans une autre étude chez la plante *C. demersum* exposée au TBBPA, le niveau en GSH a été significativement diminué avec le temps et les concentrations d'exposition. Dans ce cas, *C. demersum* peut subir un stress oxydatif sévère qui peut entraîner la diminution ou la suppression des niveaux de GSH en raison d'une perte de mécanismes adaptatifs et de l'oxydation du GSH en GSSG (Sun *et al.*, 2008). Dans cette étude, nous pouvons conclure que les niveaux de GSH chez la plante *Lemna minor* peuvent être augmentés en raison d'un mécanisme adaptatif réagissant au stress oxydatif léger par une augmentation de la synthèse du GSH pour piéger les ROS (Xue *et al.*, 2009).

En conclusion, notre étude démontre l'effet du pH sur la bioaccumulation du TBBPA par la plante *Lemna minor* dans un milieu aquatique. Ces résultats montrent une corrélation entre la biodisponibilité du TBBPA dans le milieu et sa bioaccumulation par la plante. Le TBBPA bioaccumulé par la plante sous différentes conditions de pH a provoqué un stress oxydant par la génération des ROS et la peroxydation lipidique. Ce stress a eu un effet négatif sur la croissance et les fonctions physiologiques de la plante (synthèse des pigments chlorophylliens). Cependant, l'activation des mécanismes de défense enzymatique (catalase) et non enzymatique (glutathion) est remarquée chez la plante surtout à de faibles concentrations de TBBPA.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail consiste à déterminer la bioaccumulation intracellulaire du retardateur de flamme bromé, le tétrabromobisphénol A (TBBPA) par la plante aquatique flottante *Lemna minor*. Ainsi, nous avons évalué ces effets toxiques induits chez *Lemna minor* lorsque les plantes sont exposées pendant 7 jours aux différentes conditions de pH (6,5; 7,5 et 8,5). Nous avons étudié l'effet du pH sur le comportement du TBBPA dans les milieux aux différents pH, et les résultats obtenus montrent que la solubilité du TBBPA augmente avec l'augmentation du pH. Par conséquent, les concentrations disponibles les plus importantes sont mesurées dans les milieux à pH supérieur à son pKa, c.-à-d. à pH 8,5 et 7,5 et les faibles concentrations dans le milieu à pH 6,5. Ainsi, nos résultats ont révélé que le TBBPA pouvait être absorbé et accumulé par la plante *Lemna minor* dans différentes conditions de pH. Les résultats obtenus dans cette étude montrent qu'à la concentration d'exposition au TBBPA la plus élevée, qui est 1 mg/L, des teneurs de TBBPA de 2,54; 6,56 et 10,15 µg/g de PF ont enregistré dans les groupes à pH 6,5; 8,5 et 7,5, respectivement. Cela provoque une augmentation des niveaux des ROS jusqu'à 50 %, et une augmentation du niveau de la peroxydation lipidique d'environ 21 %. Cela cause une inhibition de croissance des plantes de 25,1 et 28,8 % à pH 7,5 et 8,5, respectivement. Donc, nous avons observé un effet plus important sur la plante (tels que la synthèse des pigments chlorophylliens : Chl *a*, Chl *b*, et caroténoïdes). Cependant, la plante était capable de faire face à ces variations physiologiques et biochimiques en activant son système de détoxification antioxydant enzymatique et non enzymatique (catalase et glutathion), lors d'exposition à de faibles concentrations.

En conclusion, la plante aquatique *Lemna minor* est capable de bioaccumuler le TBBPA, et cette accumulation est augmentée significativement avec l'augmentation des concentrations de TBBPA dans le milieu sous l'effet du pH, qui joue un rôle dans la solubilité du TBBPA. Ainsi, le TBBPA peut induire un stress oxydant par la

surproduction des espèces réactives oxygénées et la peroxydation lipidique, ce qui inhibe la croissance de la plante mais sans avoir un effet létal aux concentrations testées. De plus, des variations dans les niveaux des pigments chlorophylliens, des antioxydants enzymatiques (CAT) et non enzymatiques (GSH) sont remarqués avec l'augmentation des teneurs de TBBPA accumulé par les plantes. La plante *Lemna minor* est considéré comme un bon indicateur de la contamination des milieux aquatiques. En raison de sa capacité d'accumulation de TBBPA et de sa tolérance contre les effets toxiques induits par des faibles concentrations de TBBPA, elle pourrait être une candidate appropriée pour la phytoremédiation de la contamination par le TBBPA.

En perspective, il serait intéressant d'étudier plus en détail les cibles moléculaires de l'effet du TBBPA dans les cellules végétales ainsi que la toxicité chronique du TBBPA et l'exposition de la plante *Lemna minor* à long terme à de faibles concentrations de TBBPA. De plus, l'étude de la présence d'une dégradation potentielle de TBBPA accumulé par la plante sera utilisée pour évaluer plus précisément la toxicologie du TBBPA.

ANNEXE A
Résultats supplémentaires

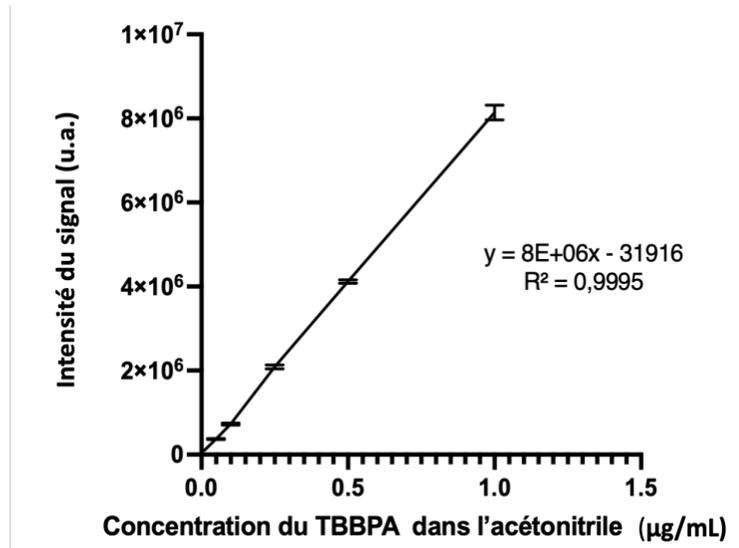


Figure S. 1 Courbe standard du tétrabromobisphénol A dans l'acétonitrile

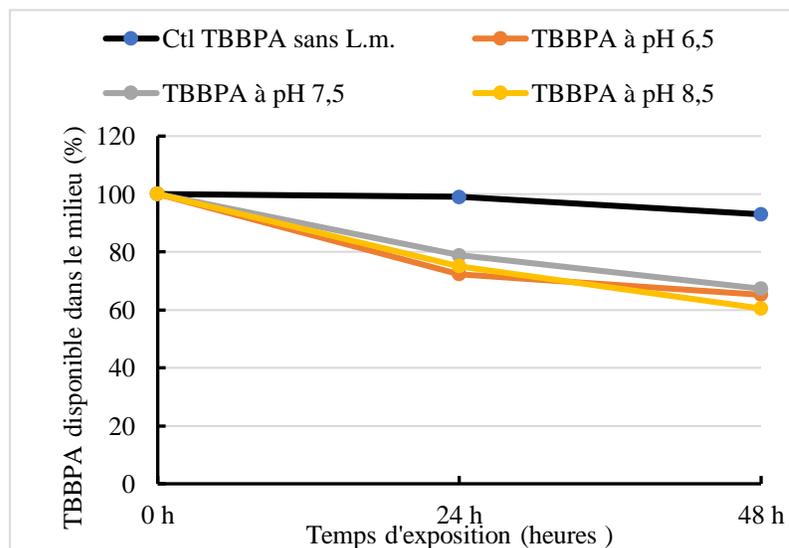


Figure S. 2 Essai de la stabilité du TBBPA (1 mg/L) après 48 heures d'exposition avec les plantes *Lemna minor* dans les milieux SIS à pH 6,5; 7,5 et 8,5 par rapport à un contrôle TBBPA sans *Lemna minor* (milieu SIS contenant 1 mg/L de TBBPA).

Tableau S.1 Paramètres de croissance de *Lemna minor* après acclimatation de 7 jours dans le milieu SIS aux différents pH.

	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5
Taux de croissance spécifique moyen (jour ⁻¹)	0,285 ± 0,012	0,297 ± 0,019	0,270 ± 0,034
Temps de doublement (Td) (jours)	2,48 ± 0,332	2,37 ± 0,278	2,59 ± 0,214

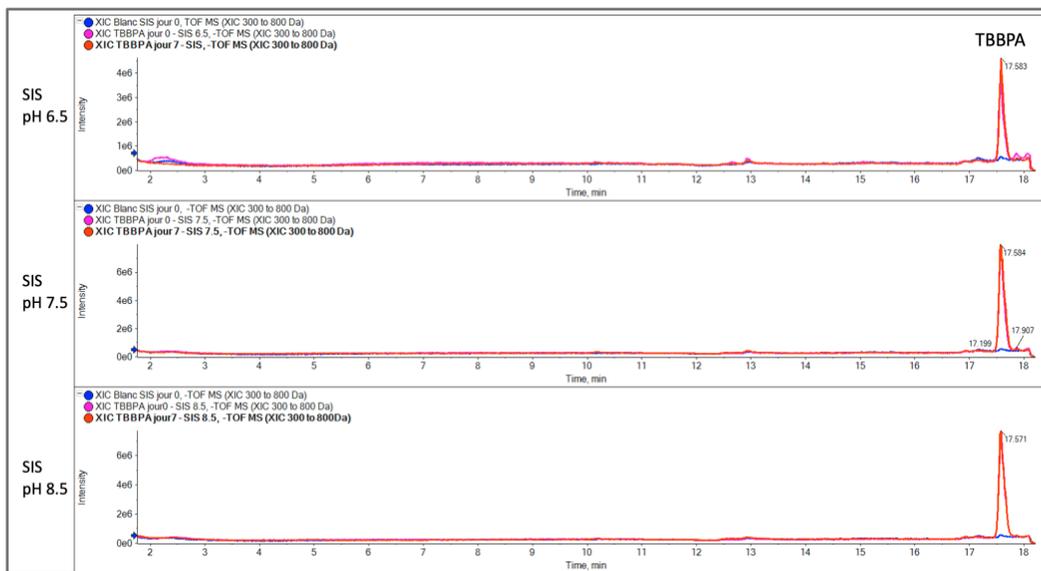


Figure S. 3 Chromatogramme (XIC) du TBBPA dans le milieu SIS culture avec *Lemna minor* à pH 6,5; 7,5 et 8,5.

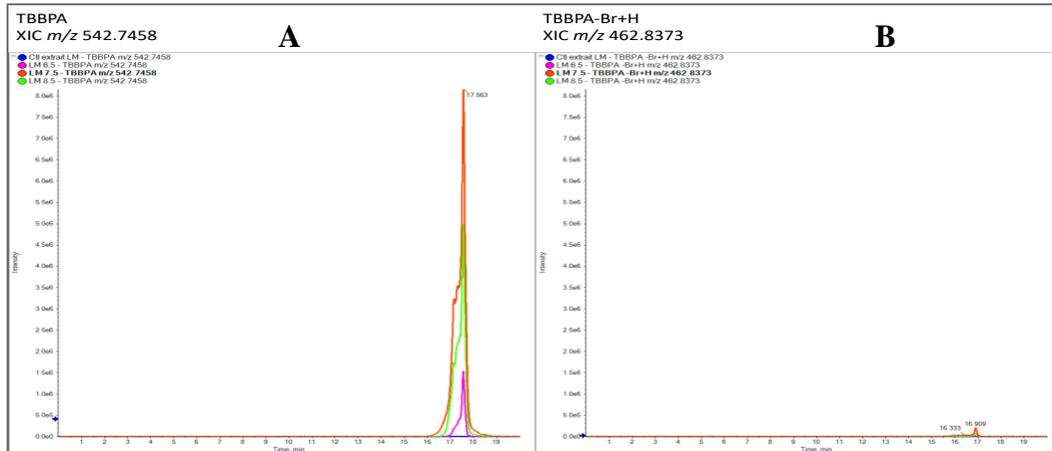


Figure S. 4 Chromatogramme (XIC) du TBBPA (m/z 542.74) (A) et du TBBPA-Br+H (m/z 462.83) (B) dans les extraits des plantes *Lemna minor*, Contrôle (0 TBBPA) et avec TBBPA à pH 6,5; pH 7,5 et pH 8,5.

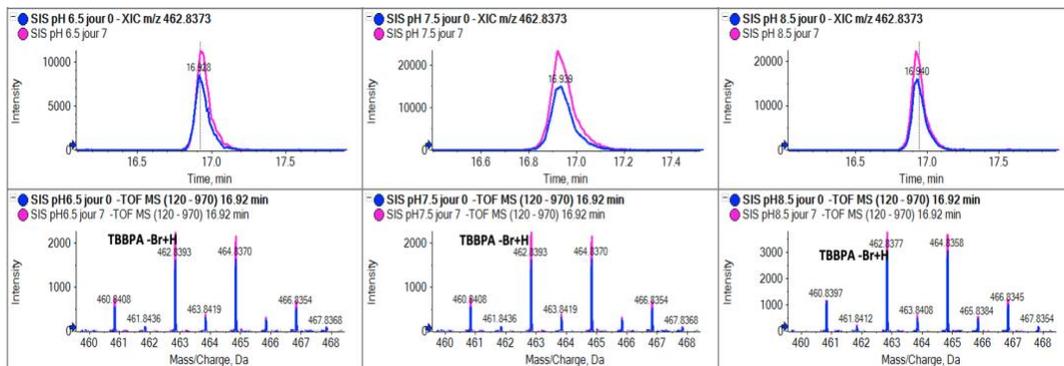


Figure S. 5 Chromatogramme (XIC) et spectre MS du TBBPA-Br+H (m/z 462.83) dans le milieu SIS avant et après la culture avec *Lemna minor* à pH 6,5; 7,5 et pH 8,5.

ANNEXE B

ANOVA- Test de comparaison multiple Tukey

Analyse Statistique de la Bioaccumulation du TBBPA à pH 6,5

ANOVA results					
Ordinary one-way ANOVA					
1	Table Analyzed	accum 6.5			
2	Data sets analyzed	A-G			
3					
4	ANOVA summary				
5	F	7.92			
6	P value	0.0007			
7	P value summary	***			
8	Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes			
9	R squared	0.772			
10					
11	Brown-Forsythe test				
12	F (DFn, DFd)	1.43 (6, 14)			
13	P value	0.2718			
14	P value summary	ns			
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)	No			
16					
17	Bartlett's test				
18	Bartlett's statistic (corrected)				
19	P value				
20	P value summary				
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)				
22					
23	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd) P value
24	Treatment (between columns)	8.54	6	1.42	F (6, 14) = 7.92 P=0.0007
25	Residual (within columns)	2.52	14	0.180	
26	Total	11.1	20		
27					
28	Data summary				
29	Number of treatments (columns)	7			
30	Number of values (total)	21			

ANOVA results							
ANOVA results							
Bioaccumulation de TBBPA							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	pH 6,5	Summary	pH 7,5	Summary	pH 8,5
6	Ctl vs. 10	ns	>0.9999	ns	0.4176	ns	0.5246
7	Ctl vs. 50	ns	0.9942	*	0.0442	ns	0.2758
8	Ctl vs. 100	ns	0.9909	****	<0.0001	**	0.0068
9	Ctl vs. 200	ns	0.8051	****	<0.0001	****	<0.0001
10	Ctl vs. 500	*	0.0301	****	<0.0001	****	<0.0001
11	Ctl vs. 1000	**	0.0018	****	<0.0001	****	<0.0001
12	10 vs. 50	ns	0.9997	ns	0.7868	ns	0.9984
13	10 vs. 100	ns	0.9994	***	0.0006	ns	0.1850
14	10 vs. 200	ns	0.9157	****	<0.0001	***	0.0006
15	10 vs. 500	*	0.0489	****	<0.0001	****	<0.0001
16	10 vs. 1000	**	0.0030	****	<0.0001	****	<0.0001
17	50 vs. 100	ns	>0.9999	**	0.0077	ns	0.3825
18	50 vs. 200	ns	0.9871	****	<0.0001	**	0.0013
19	50 vs. 500	ns	0.0928	****	<0.0001	****	<0.0001
20	50 vs. 1000	**	0.0057	****	<0.0001	****	<0.0001
21	100 vs. 200	ns	0.9915	**	0.0067	ns	0.0626
22	100 vs. 500	ns	0.1024	**	0.0010	**	0.0024
23	100 vs. 1000	**	0.0063	****	<0.0001	****	<0.0001
24	200 vs. 500	ns	0.2999	ns	0.9323	ns	0.5618
25	200 vs. 1000	*	0.0220	*	0.0185	**	0.0034
26	500 vs. 1000	ns	0.7132	ns	0.1194	ns	0.0897

ANOVA results							
ANOVA results							
Pourcentage d'inhibition de croissance de la plante							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	>0.9999	ns	0.9998	ns	0.7540
7	Ctl vs. 50	ns	>0.9999	ns	0.9940	*	0.0115
8	Ctl vs. 100	ns	0.4784	ns	0.3838	****	<-0.0001
9	Ctl vs. 200	****	<-0.0001	**	0.0097	****	<-0.0001
10	Ctl vs. 500	****	<-0.0001	***	0.0003	****	<-0.0001
11	Ctl vs. 1000	****	<-0.0001	****	<-0.0001	****	<-0.0001
12	10 vs. 50	ns	>0.9999	ns	>0.9999	ns	0.1559
13	10 vs. 100	ns	0.4784	ns	0.5736	**	0.0006
14	10 vs. 200	****	<-0.0001	*	0.0182	****	<-0.0001
15	10 vs. 500	****	<-0.0001	***	0.0006	****	<-0.0001
16	10 vs. 1000	****	<-0.0001	****	<-0.0001	****	<-0.0001
17	50 vs. 100	ns	0.4784	ns	0.7421	ns	0.0793
18	50 vs. 200	****	<-0.0001	*	0.0310	***	0.0003
19	50 vs. 500	****	<-0.0001	***	0.0009	****	<-0.0001
20	50 vs. 1000	****	<-0.0001	****	<-0.0001	****	<-0.0001
21	100 vs. 200	**	0.0011	ns	0.3613	ns	0.0824
22	100 vs. 500	****	<-0.0001	*	0.0137	***	0.0003
23	100 vs. 1000	****	<-0.0001	****	<-0.0001	****	<-0.0001
24	200 vs. 500	ns	0.6825	ns	0.4842	ns	0.0857
25	200 vs. 1000	*	0.0371	**	0.0011	****	<-0.0001
26	500 vs. 1000	ns	0.4673	*	0.0352	***	0.0008

ANOVA results							
ANOVA results							
Niveau de la production des ROS							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	0.9980	ns	0.3676	ns	0.1185
7	Ctl vs. 50	ns	0.9591	*	0.0284	**	0.0095
8	Ctl vs. 100	ns	0.1171	**	0.0013	****	<-0.0001
9	Ctl vs. 200	***	0.0001	***	0.0003	****	<-0.0001
10	Ctl vs. 500	****	<-0.0001	****	<-0.0001	****	<-0.0001
11	Ctl vs. 1000	****	<-0.0001	****	<-0.0001	****	<-0.0001
12	10 vs. 50	ns	0.9994	ns	0.7084	ns	0.7849
13	10 vs. 100	ns	0.2667	ns	0.0630	**	0.0044
14	10 vs. 200	***	0.0002	*	0.0140	***	0.0004
15	10 vs. 500	****	<-0.0001	**	0.0023	****	<-0.0001
16	10 vs. 1000	****	<-0.0001	***	0.0003	****	<-0.0001
17	50 vs. 100	ns	0.4640	ns	0.6120	ns	0.0578
18	50 vs. 200	***	0.0005	ns	0.2104	**	0.0044
19	50 vs. 500	****	<-0.0001	*	0.0384	***	0.0008
20	50 vs. 1000	****	<-0.0001	**	0.0046	****	<-0.0001
21	100 vs. 200	*	0.0152	ns	0.9767	ns	0.7849
22	100 vs. 500	**	0.0019	ns	0.5471	ns	0.2609
23	100 vs. 1000	***	0.0001	ns	0.1021	**	0.0033
24	200 vs. 500	ns	0.9018	ns	0.9453	ns	0.9458
25	200 vs. 1000	ns	0.1649	ns	0.3676	*	0.0429
26	500 vs. 1000	ns	0.7039	ns	0.8947	ns	0.2305

ANOVA results		Multiple comparisons		Niveau de la peroxydation lipidique			
ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results	
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	0.9991	ns	>0.9999	ns	>0.9999
7	Ctl vs. 50	ns	0.9165	ns	0.9782	ns	>0.9999
8	Ctl vs. 100	*	0.0493	ns	0.7376	ns	0.9264
9	Ctl vs. 200	*	0.0424	ns	0.2358	ns	0.0932
10	Ctl vs. 500	***	0.0005	ns	0.0653	**	0.0010
11	Ctl vs. 1000	****	<0.0001	**	0.0042	***	0.0002
12	10 vs. 50	ns	0.9936	ns	0.9630	ns	>0.9999
13	10 vs. 100	ns	0.1091	ns	0.6835	ns	0.9677
14	10 vs. 200	ns	0.0946	ns	0.2036	ns	0.1260
15	10 vs. 500	**	0.0011	ns	0.0551	**	0.0014
16	10 vs. 1000	****	<0.0001	**	0.0035	***	0.0002
17	50 vs. 100	ns	0.3008	ns	0.9916	ns	0.9324
18	50 vs. 200	ns	0.2667	ns	0.6492	ns	0.0966
19	50 vs. 500	**	0.0034	ns	0.2520	**	0.0011
20	50 vs. 1000	***	0.0002	*	0.0186	***	0.0002
21	100 vs. 200	ns	>0.9999	ns	0.9507	ns	0.4625
22	100 vs. 500	ns	0.2034	ns	0.5929	**	0.0070
23	100 vs. 1000	*	0.0107	ns	0.0636	***	0.0009
24	200 vs. 500	ns	0.2313	ns	0.9835	ns	0.2263
25	200 vs. 1000	*	0.0125	ns	0.3086	*	0.0317
26	500 vs. 1000	ns	0.6377	ns	0.7295	ns	0.8992

ANOVA results		Multiple comparisons		L'activité de la catalase			
ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results	
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	*	0.0134	ns	>0.9999	ns	0.9960
7	Ctl vs. 50	****	<0.0001	ns	0.3344	ns	0.9328
8	Ctl vs. 100	****	<0.0001	ns	0.8536	ns	0.9643
9	Ctl vs. 200	ns	0.1688	ns	0.9994	ns	0.0627
10	Ctl vs. 500	ns	0.5682	ns	0.9955	*	0.0492
11	Ctl vs. 1000	**	0.0036	*	0.0467	**	0.0087
12	10 vs. 50	*	0.0358	ns	0.4236	ns	0.9991
13	10 vs. 100	**	0.0026	ns	0.9210	ns	0.9999
14	10 vs. 200	ns	0.7728	ns	0.9955	ns	0.1708
15	10 vs. 500	***	0.0006	ns	0.9825	ns	0.1368
16	10 vs. 1000	****	<0.0001	*	0.0337	*	0.0255
17	50 vs. 100	ns	0.7728	ns	0.9529	ns	>0.9999
18	50 vs. 200	**	0.0026	ns	0.1786	ns	0.3365
19	50 vs. 500	****	<0.0001	ns	0.1331	ns	0.2778
20	50 vs. 1000	****	<0.0001	***	0.0008	ns	0.0579
21	100 vs. 200	***	0.0002	ns	0.6291	ns	0.2778
22	100 vs. 500	****	<0.0001	ns	0.5235	ns	0.2269
23	100 vs. 1000	****	<0.0001	**	0.0047	*	0.0454
24	200 vs. 500	**	0.0070	ns	>0.9999	ns	>0.9999
25	200 vs. 1000	****	<0.0001	ns	0.0981	ns	0.9194
26	500 vs. 1000	ns	0.0929	ns	0.1331	ns	0.9552

ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results	
ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results	
Le niveau du glutathion							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	>0.9999	ns	0.9986	ns	0.9985
7	Ctl vs. 50	ns	0.9987	ns	0.5583	ns	0.9993
8	Ctl vs. 100	ns	0.2368	ns	0.4004	ns	0.7027
9	Ctl vs. 200	ns	0.1696	*	0.0184	ns	0.6987
10	Ctl vs. 500	**	0.0016	*	0.0109	ns	0.7815
11	Ctl vs. 1000	*	0.0173	*	0.0164	ns	0.9643
12	10 vs. 50	ns	0.9986	ns	0.8296	ns	>0.9999
13	10 vs. 100	ns	0.2344	ns	0.6776	ns	0.9269
14	10 vs. 200	ns	0.1678	*	0.0447	ns	0.9248
15	10 vs. 500	**	0.0016	*	0.0266	ns	0.9619
16	10 vs. 1000	*	0.0171	*	0.0400	ns	0.9995
17	50 vs. 100	ns	0.4564	ns	>0.9999	ns	0.9067
18	50 vs. 200	ns	0.3474	ns	0.3766	ns	0.9043
19	50 vs. 500	**	0.0039	ns	0.2525	ns	0.9483
20	50 vs. 1000	*	0.0416	ns	0.3471	ns	0.9988
21	100 vs. 200	ns	>0.9999	ns	0.5307	ns	>0.9999
22	100 vs. 500	ns	0.1364	ns	0.3766	ns	>0.9999
23	100 vs. 1000	ns	0.7296	ns	0.4958	ns	0.9932
24	200 vs. 500	ns	0.1927	ns	>0.9999	ns	>0.9999
25	200 vs. 1000	ns	0.8390	ns	>0.9999	ns	0.9928
26	500 vs. 1000	ns	0.8359	ns	>0.9999	ns	0.9982

ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results	
ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results		ANOVA results	
La teneur en caroténoïdes							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	21					
3	Alpha	0.05					
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	0.9627	ns	0.9668	ns	0.9627
7	Ctl vs. 50	ns	0.6778	ns	>0.9999	ns	0.6778
8	Ctl vs. 100	ns	0.9627	ns	0.7419	ns	0.9627
9	Ctl vs. 200	ns	0.9627	ns	0.4041	ns	0.9627
10	Ctl vs. 500	ns	0.6778	ns	0.1700	ns	0.6778
11	Ctl vs. 1000	ns	0.5438	*	0.0210	ns	0.5438
12	10 vs. 50	ns	0.9910	ns	0.9668	ns	0.9910
13	10 vs. 100	ns	>0.9999	ns	0.2687	ns	>0.9999
14	10 vs. 200	ns	0.5438	ns	0.1037	ns	0.5438
15	10 vs. 500	ns	0.2192	*	0.0362	ns	0.2192
16	10 vs. 1000	ns	0.1525	**	0.0041	ns	0.1525
17	50 vs. 100	ns	0.9910	ns	0.7419	ns	0.9910
18	50 vs. 200	ns	0.2192	ns	0.4041	ns	0.2192
19	50 vs. 500	ns	0.0700	ns	0.1700	ns	0.0700
20	50 vs. 1000	*	0.0466	*	0.0210	*	0.0466
21	100 vs. 200	ns	0.5438	ns	0.9958	ns	0.5438
22	100 vs. 500	ns	0.2192	ns	0.8836	ns	0.2192
23	100 vs. 1000	ns	0.1525	ns	0.2687	ns	0.1525
24	200 vs. 500	ns	0.9910	ns	0.9958	ns	0.9910
25	200 vs. 1000	ns	0.9627	ns	0.5698	ns	0.9627
26	500 vs. 1000	ns	>0.9999	ns	0.8836	ns	>0.9999

ANOVA results		Multiple comparisons		La teneur en Chlorophylle α					
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	21							
3	Alpha	0.05							
4				pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	0.9996	ns	0.9943	ns	0.9718		
7	Ctl vs. 50	ns	0.6975	ns	0.9145	ns	0.3671		
8	Ctl vs. 100	ns	0.9996	ns	0.1004	**	0.0015		
9	Ctl vs. 200	ns	0.4705	**	0.0044	****	<0.0001		
10	Ctl vs. 500	ns	0.0558	***	0.0002	****	<0.0001		
11	Ctl vs. 1000	**	0.0046	****	<0.0001	****	<0.0001		
12	10 vs. 50	ns	0.8894	ns	0.9988	ns	0.8399		
13	10 vs. 100	ns	>0.9999	ns	0.2751	**	0.0071		
14	10 vs. 200	ns	0.2806	*	0.0138	***	0.0003		
15	10 vs. 500	*	0.0275	***	0.0005	****	<0.0001		
16	10 vs. 1000	**	0.0023	****	<0.0001	****	<0.0001		
17	50 vs. 100	ns	0.8894	ns	0.5084	ns	0.0749		
18	50 vs. 200	*	0.0393	*	0.0328	**	0.0025		
19	50 vs. 500	**	0.0032	**	0.0011	***	0.0003		
20	50 vs. 1000	***	0.0003	***	0.0001	***	0.0003		
21	100 vs. 200	ns	0.2806	ns	0.6001	ns	0.5210		
22	100 vs. 500	*	0.0275	*	0.0328	ns	0.0962		
23	100 vs. 1000	**	0.0023	**	0.0025	ns	0.0749		
24	200 vs. 500	ns	0.8032	ns	0.5084	ns	0.8985		
25	200 vs. 1000	ns	0.1532	ns	0.0579	ns	0.8399		
26	500 vs. 1000	ns	0.8032	ns	0.7790	ns	>0.9999		

ANOVA results		Multiple comparisons		La teneur en Chlorophylle b					
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	21							
3	Alpha	0.05							
4				pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	0.9422	ns	0.9969	ns	0.9996		
7	Ctl vs. 50	ns	0.9753	ns	0.9989	ns	0.9503		
8	Ctl vs. 100	ns	0.9998	ns	0.9997	ns	0.4765		
9	Ctl vs. 200	ns	0.9422	ns	0.9743	ns	0.5887		
10	Ctl vs. 500	ns	0.5340	ns	0.9928	ns	0.3740		
11	Ctl vs. 1000	ns	0.1044	ns	0.9743	ns	0.2138		
12	10 vs. 50	ns	>0.9999	ns	>0.9999	ns	0.9962		
13	10 vs. 100	ns	0.9920	ns	0.9578	ns	0.7024		
14	10 vs. 200	ns	0.4400	ns	0.7836	ns	0.8069		
15	10 vs. 500	ns	0.1273	ns	0.8712	ns	0.5887		
16	10 vs. 1000	*	0.0172	ns	0.7836	ns	0.3740		
17	50 vs. 100	ns	0.9983	ns	0.9743	ns	0.9503		
18	50 vs. 200	ns	0.5340	ns	0.8300	ns	0.9829		
19	50 vs. 500	ns	0.1677	ns	0.9064	ns	0.8918		
20	50 vs. 1000	*	0.0233	ns	0.8300	ns	0.7024		
21	100 vs. 200	ns	0.8169	ns	0.9989	ns	>0.9999		
22	100 vs. 500	ns	0.3547	ns	>0.9999	ns	>0.9999		
23	100 vs. 1000	ns	0.0581	ns	0.9989	ns	0.9962		
24	200 vs. 500	ns	0.9753	ns	>0.9999	ns	0.9996		
25	200 vs. 1000	ns	0.4674	ns	>0.9999	ns	0.9829		
26	500 vs. 1000	ns	0.9074	ns	>0.9999	ns	0.9996		

ANOVA results		Multiple comparisons					
ANOVA results		ANOVA results					
		Le poids frais de <i>Lemna minor</i>					
1	Number of families	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
2	Number of comparisons per family	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
3	Alpha	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	0.6549	ns	0.9996	ns	0.7131
7	Ctl vs. 50	ns	0.8979	*	0.0318	**	0.0091
8	Ctl vs. 100	ns	>0.9999	***	0.0004	***	0.0008
9	Ctl vs. 200	ns	0.3871	****	<0.0001	****	<0.0001
10	Ctl vs. 500	*	0.0139	****	<0.0001	****	<0.0001
11	Ctl vs. 1000	**	0.0016	****	<0.0001	****	<0.0001
12	10 vs. 50	ns	0.9986	ns	0.0649	ns	0.1433
13	10 vs. 100	ns	0.5158	***	0.0009	*	0.0122
14	10 vs. 200	*	0.0258	****	<0.0001	***	0.0009
15	10 vs. 500	***	0.0007	****	<0.0001	***	0.0003
16	10 vs. 1000	***	0.0001	****	<0.0001	****	<0.0001
17	50 vs. 100	ns	0.7937	ns	0.2613	ns	0.7965
18	50 vs. 200	ns	0.0623	**	0.0024	ns	0.1299
19	50 vs. 500	**	0.0017	****	<0.0001	*	0.0374
20	50 vs. 1000	***	0.0002	****	<0.0001	***	0.0008
21	100 vs. 200	ns	0.5158	ns	0.1762	ns	0.7582
22	100 vs. 500	*	0.0215	**	0.0037	ns	0.3615
23	100 vs. 1000	**	0.0025	***	0.0004	**	0.0095
24	200 vs. 500	ns	0.4596	ns	0.3645	ns	0.9893
25	200 vs. 1000	ns	0.0751	*	0.0474	ns	0.1299
26	500 vs. 1000	ns	0.8863	ns	0.8557	ns	0.3795

ANOVA results		Multiple comparisons					
ANOVA results		ANOVA results					
		Le nombre de frondes totaux de <i>Lemna minor</i>					
1	Number of families	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
2	Number of comparisons per family	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
3	Alpha	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
4		pH 6,5		pH 7,5		pH 8,5	
5	Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value	Summary	Adjusted P Value
6	Ctl vs. 10	ns	>0.9999	ns	0.9996	ns	0.6011
7	Ctl vs. 50	ns	0.9751	ns	0.0733	**	0.0034
8	Ctl vs. 100	*	0.0191	**	0.0022	***	0.0007
9	Ctl vs. 200	**	0.0025	***	0.0001	****	<0.0001
10	Ctl vs. 500	***	0.0006	****	<0.0001	****	<0.0001
11	Ctl vs. 1000	****	<0.0001	****	<0.0001	****	<0.0001
12	10 vs. 50	ns	0.9751	ns	0.1423	ns	0.0793
13	10 vs. 100	*	0.0191	**	0.0043	*	0.0147
14	10 vs. 200	**	0.0025	***	0.0002	***	0.0003
15	10 vs. 500	***	0.0006	****	<0.0001	****	<0.0001
16	10 vs. 1000	****	<0.0001	****	<0.0001	****	<0.0001
17	50 vs. 100	ns	0.0864	ns	0.4785	ns	0.9592
18	50 vs. 200	*	0.0114	*	0.0257	ns	0.0705
19	50 vs. 500	**	0.0025	***	0.0002	*	0.0166
20	50 vs. 1000	****	<0.0001	****	<0.0001	**	0.0011
21	100 vs. 200	ns	0.9088	ns	0.5526	ns	0.3168
22	100 vs. 500	ns	0.4693	**	0.0055	ns	0.0890
23	100 vs. 1000	**	0.0041	**	0.0019	**	0.0055
24	200 vs. 500	ns	0.9751	ns	0.1423	ns	0.9805
25	200 vs. 1000	*	0.0318	ns	0.0519	ns	0.2883
26	500 vs. 1000	ns	0.1390	ns	0.9962	ns	0.7172

BIBLIOGRAPHIE

- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A. et Bergman, Å. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international* 29: 683-689.
- Alkimin, G. D., Daniel, D., Frankenbach, S., Serôdio, J., Soares, A. M., Barata, C. et Nunes, B. (2019). Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Science of The Total Environment* 657: 926-937.
- Aznar, R., Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Martín-Girela, I. et Tadeo, J. L. (2017). Simultaneous determination of multiclass emerging contaminants in aquatic plants by ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion and GC-MS. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 7911-7920.
- Baroli, I., Gutman, B. L., Ledford, H. K., Shin, J. W., Chin, B. L., Havaux, M. et Niyogi, K. K. (2004). Photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 6337-6344.
- Berger, U., Herzke, D. et Sandanger, T. M. (2004). Two trace analytical methods for determination of hydroxylated PCBs and other halogenated phenolic compounds in eggs from Norwegian birds of prey. *Analytical chemistry* 76: 441-452.
- Birnbaum, L. S. et Staskal, D. F. (2004). Brominated flame retardants: cause for concern? *Environmental health perspectives* 112: 9-17.
- Bone, B., Seredick, B. et Olszowy, M. (2013). *Reactive oxygen probes-a broad range of colors with easier labeling and compatibility with fixation: novel CellROX® reagents from Molecular Probes®(P3295)*. The American Association of Immunologists.
- Böttcher, T. et Schroll, R. (2007). The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. *Chemosphere* 66: 684-689.
- Bourgeade, P., Aleya, E., Alaoui-Sosse, L., Herlem, G., Alaoui-Sosse, B. et Bouriou, M. (2021). Growth, pigment changes, and photosystem II activity in the aquatic macrophyte *Lemna minor* exposed to bisphenol A. *Environmental Science and Pollution Research* 28: 68671-68678.
- Calabrese, E. J. et Blain, R. B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, 157: 42-48.

- Chang, B. V., Yuan, S. Y. et Ren, Y. L. (2012a). Aerobic degradation of tetrabromobisphenol-A by microbes in river sediment. *Chemosphere* 87: 535-541.
- Chang, B.-V., Yuan, S.-Y. et Ren, Y.-L. (2012b). Anaerobic degradation of tetrabromobisphenol-A in river sediment. *Ecological Engineering* 49: 73-76.
- Cheng, H., Hua, Z., Wang, L., Wang, Y., Xie, Z. et Zhu, T. (2019). Relative effects of wind-induced disturbances and vegetation on tetrabromobisphenol A cycling in shallow lakes: Direct and indirect effects. *Environmental pollution* 252: 794-803.
- Chu, S., Haffner, G. D. et Letcher, R. J. (2005). Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1097: 25-32.
- Covaci, A., Voorspoels, S., Abdallah, M. A.-E., Geens, T., Harrad, S. et Law, R. J. (2009). Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. *Journal of Chromatography A* 1216: 346-363.
- Darnerud, P. O. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment international* 29: 841-853.
- De Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46: 583-624.
- De Wit, C. A., Alaee, M. et Muir, D. C. (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic. *Chemosphere* 64: 209-233.
- Debenest, T., Gagné, F., Petit, A.-N., André, C., Kohli, M. et Blaise, C. (2010). Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152: 407-412.
- Debenest, T., Petit, A.-N., Gagné, F., Kohli, M., Nguyen, N. et Blaise, C. (2011). Comparative toxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) on microalgae with single and multi-species bioassays. *Chemosphere* 85: 50-55.
- Dogan, M., Yumrutas, O., Saygideger, S., Korkunc, M., Gulnaz, O. et Sokmen, A. (2010). Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on chickpea roots in

- germination stage. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 9: 186-192.
- Dosnon-Olette, R., Couderchet, M. et Eullaffroy, P. (2009). Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate. *Ecotoxicology and environmental safety* 72: 2096-2101.
- 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.
- Ensley, H., Sharma, H., Barber, J. et Polito, M. (1996). Metabolism of chlorinated phenols by *Lemna gibba*, duckweed. *Washington DC*: 238-253.
- Environment et Health Canada. (2013). *Screening assessment report: Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene) bis[2,6-dibromo-, Chemical Abstracts Service registry number 79-94-7; Ethanol, 2,2'-[(1-methylethylidene) bis[(2,6,-dibromo-4,1-phenylene)oxy]]bis, Chemical Abstracts Service registry number 4162-45-2; Benzene, 1,1'-(1-methylidene)bis[3,5-dibromo-4-(2-propenyloxy)-, Chemical Abstracts Service registry number 25327-89-3.* <https://central.bac-lac.gc.ca/.item?id=En14-110-2013-eng&op=pdf&app=Library>
- Eriksson, J., Rahm, S., Green, N., Bergman, Å. et Jakobsson, E. (2004). Photochemical transformations of tetrabromobisphenol A and related phenols in water. *Chemosphere* 54:117-126.
- Feiteiro, J., Mariana, M. et Cairrão, E. (2021). Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure. *Environmental Pollution* 285: 117475.
- Feng, A.-H., Chen, S.-J., Chen, M.-Y., He, M.-J., Luo, X.-J. et Mai, B.-X. (2012). Hexabromocyclododecane (HBCD) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) in riverine and estuarine sediments of the Pearl River Delta in southern China, with emphasis on spatial variability in diastereoisomer- and enantiomer-specific distribution of HBCD. *Marine Pollution Bulletin* 64: 919-925.
- Gao, J., Garrison, A. W., Hoehamer, C., Mazur, C. S. et Wolfe, N. L. (2000). Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6114-6120.
- Ge, H. et Zhang, F. (2017). Effects of tetrabromobisphenol A stress on growth and physiological characteristics of soybean seedling. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 98: 141-146.

- Gomes, A., Fernandes, E. et Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods* 65: 45-80.
- Gomes, M. P., Gonçalves, C. A., de Brito, J. C. M., Souza, A. M., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Figueredo, C. C. et Garcia, Q. S. (2017). Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. *Journal of hazardous materials* 328: 140-149.
- Gu, S.-Y., Ekpeghere, K. I., Kim, H.-Y., Lee, I.-S., Kim, D.-H., Choo, G. et Oh, J.-E. (2017). Brominated flame retardants in marine environment focused on aquaculture area: Occurrence, source and bioaccumulation. *Science of the Total Environment* 601:1182-1191.
- Hakk, H. et Letcher, R. J. (2003). Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants—a review. *Environment international* 29: 801-828.
- He, M.-J., Luo, X.-J., Yu, L.-H., Wu, J.-P., Chen, S.-J. et Mai, B.-X. (2013). Diastereoisomer and enantiomer-specific profiles of hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A in an aquatic environment in a highly industrialized area, South China: vertical profile, phase partition, and bioaccumulation. *Environmental pollution* 179: 105-110.
- He, Q., Wang, X., Sun, P., Wang, Z. et Wang, L. (2015). Acute and chronic toxicity of tetrabromobisphenol A to three aquatic species under different pH conditions. *Aquatic Toxicology* 164: 145-154.
- Held, P. (2012). An introduction to reactive oxygen species. *Tech Resources-App Guides* 802: 5-9.
- Hou, R., Lin, L., Li, H., Liu, S., Xu, X., Xu, Y., Jin, X., Yuan, Y. et Wang, Z. (2021). Occurrence, bioaccumulation, fate, and risk assessment of novel brominated flame retardants (NBFRs) in aquatic environments—A critical review. *Water Research* 198: 117168.
- Hou, X., Yu, M., Liu, A., Li, Y., Ruan, T., Liu, J., Schnoor, J. L. et Jiang, G. (2018). Biotransformation of tetrabromobisphenol A dimethyl ether back to tetrabromobisphenol A in whole pumpkin plants. *Environmental Pollution* 241: 331-338.
- Hu, F., Pan, L., Xiu, M., Jin, Q., Wang, G. et Wang, C. (2015). Bioaccumulation and detoxification responses in the scallop *Chlamys farreri* exposed to

- tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Environmental toxicology and pharmacology* 39: 997-1007.
- Hwang, I.-K., Kang, H.-H., Lee, I.-S. et Oh, J.-E. (2012). Assessment of characteristic distribution of PCDD/Fs and BFRs in sludge generated at municipal and industrial wastewater treatment plants. *Chemosphere* 88: 888-894.
- Jakobsson, K., Thuresson, K., Rylander, L., Sjödin, A., Hagmar, L. et Bergman, Å. (2002). Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians. *Chemosphere* 46: 709-716.
- Jaleel, C. A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. et Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 427-436.
- Jiang, Y., Lu, H., Wang, Y., Hong, H., Wang, Q., Liu, J. et Yan, C. (2020). Uptake, biotransformation and physiological response of TBBPA in mangrove plants after hydroponics exposure. *Marine Pollution Bulletin* 151: 110832.
- Jiao, L., Wang, L., Qiu, Z., Wang, Q., Zhou, Q. et Huang, X. (2015). Effects of bisphenol A on chlorophyll synthesis in soybean seedlings. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 5877-5886.
- Jmii, S. et Dewez, D. (2021). Toxic Responses of Palladium Accumulation in Duckweed (*Lemna minor*): Determination of Biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40: 1630-1638.
- Kanwar, M. K., Xie, D., Yang, C., Ahammed, G. J., Qi, Z., Hasan, M. K., Reiter, R. J., Yu, J.-Q. et Zhou, J. (2020). Melatonin promotes metabolism of bisphenol A by enhancing glutathione-dependent detoxification in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of hazardous materials* 388: 121727.
- Kotthoff, M., Rüdell, H. et Jürling, H. (2017). Detection of tetrabromobisphenol A and its mono- and dimethyl derivatives in fish, sediment and suspended particulate matter from European freshwaters and estuaries. *Analytical and bioanalytical chemistry* 409: 3685-3694.
- Kowalski, B. et Mazur, M. (2014). The simultaneous determination of six flame retardants in water samples using SPE pre-concentration and UHPLC-UV method. *Water, Air, & Soil Pollution* 225: 1-9.
- Kreslavski, V. D., Brestic, M., Zharmukhamedov, S. K., Lyubimov, V. Y., Lankin, A. V., Jajoo, A. et Allakhverdiev, S. I. (2017). Mechanisms of inhibitory effects

of polycyclic aromatic hydrocarbons in photosynthetic primary processes in pea leaves and thylakoid preparations. *Plant Biology* 19: 683-688.

- Kuester, R. K., Sólyom, A. M., Rodriguez, V. P. et Sipes, I. G. (2007). The effects of dose, route, and repeated dosing on the disposition and kinetics of tetrabromobisphenol A in male F-344 rats. *Toxicological Sciences* 96: 237-245.
- Kuiper, R. V., Van den Brandhof, E. J., Leonards, P. E. G., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W. et Vos, J. G. (2007). Toxicity of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in zebrafish (*Danio rerio*) in a partial life-cycle test. *Archives of toxicology* 81: 1-9.
- Kuramochi, H., Kawamoto, K., Miyazaki, K., Nagahama, K., Maeda, K., Li, X.-W., Shibata, E., Nakamura, T. et Sakai, S.-I. (2008). Determination of physicochemical properties of tetrabromobisphenol A. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 27: 2413-2418.
- Kutschera, U. et Niklas, K. J. (2015). Darwin-Wallace Demons: survival of the fastest in populations of duckweeds and the evolutionary history of an enigmatic group of angiosperms. *Plant Biology* 17: 24-32.
- Labadie, P., Tlili, K., Alliot, F., Bourges, C., Desportes, A. et Chevreuil, M. (2010). Development of analytical procedures for trace-level determination of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A in river water and sediment. *Analytical and bioanalytical chemistry* 396: 865-875.
- Lee, H., Depuydt, S., Shin, K., Choi, S., Kim, G., Lee, Y. H., Park, J. T., Han, T. et Park, J. (2021). Assessment of Various Toxicity Endpoints in Duckweed (*Lemna minor*) at the Physiological, Biochemical, and Molecular Levels as a Measure of Diuron Stress. *Biology* 10: 684.
- Lee, H.-B. et Peart, T. E. (2002). Organic Contaminants in Canadian Municipal Sewage Sludge. Part I. Toxic or Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds. *Water Quality Research Journal* 37: 681-696.
- Lee, I.-S., Kang, H.-H., Kim, U.-J. et Oh, J.-E. (2015). Brominated flame retardants in Korean river sediments, including changes in polybrominated diphenyl ether concentrations between 2006 and 2009. *Chemosphere* 126: 18-24.
- Li, J., Bai, J., Zhou, B. et Hu, X. (2013). Solubility of 2, 2', 6, 6'-Tetrabromo-4, 4'-isopropylidene Phenol in Aqueous Pollutant Solutions. *Journal of Chemical & Engineering Data* 58: 3150-3154.
- Li, Y., Zhou, Q., Li, F., Liu, X. et Luo, Y. (2008). Effects of tetrabromobisphenol A as

- an emerging pollutant on wheat (*Triticum aestivum*) at biochemical levels. *Chemosphere* 74: 119-124.
- Liang, J., Li, Y., Xie, P., Liu, C., Yu, L. et Ma, X. (2022). Dualistic effects of bisphenol A on growth, photosynthetic and oxidative stress of duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Science and Pollution Research* 29: 87717-87729.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- Liu, H., Yu, Y., Kong, F., He, L., Yu, H., Giesy, J. P. et Wang, X. (2008). Effects of tetrabromobisphenol A on the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 43: 1271-1278.
- Lu, Q., Zhang, T., Zhang, W., Su, C., Yang, Y., Hu, D. et Xu, Q. (2018). Alleviation of cadmium toxicity in *Lemna minor* by exogenous salicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety* 147: 500-508.
- Macêdo, W. V., Sánchez, F. E. et Zaiat, M. (2021). What drives Tetrabromobisphenol A degradation in biotreatment systems? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 20: 729-750.
- Malkoske, T., Tang, Y., Xu, W., Yu, S. et Wang, H. (2016). A review of the environmental distribution, fate, and control of tetrabromobisphenol A released from sources. *Science of the Total Environment* 569:1608-1617.
- Mandavilli, B. S. et Janes, M. S. (2010). Detection of intracellular glutathione using ThiolTracker violet stain and fluorescence microscopy. *Current Protocols in Cytometry* 53: 9.35. 1-9.35. 8.
- Masojídek, J., Torzillo, G. et Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in microalgae. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*: 21-36.
- McLay, C. L. (1976). The effect of pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*. *Freshwater Biology* 6: 125-136.
- Mkandawire, M. et Dudel, E. G. (2007). Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability* 1: 56-71.
- Morris, S., Allchin, C. R., Zegers, B. N., Haftka, J. J., Boon, J. P., Belpaire, C., Leonards, P. E., Van Leeuwen, S. P. et De Boer, J. (2004). Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs. *Environmental science & technology* 38: 5497-5504.

- Mouzaki-Paxinou, A.-C., Foudoulakis, M. et Arapis, G. (2016). *The Use of the Biomarkers Chlorophylls and Carotenoids, for the Interpretation of the Effects in Lemna minor after Exposure of two Herbicides with Different Mode of Action.*
- Nadarajah, K. K. (2020). ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences* 21: 5208.
- Nyholm, J. R. (2009). Persistency, bioaccumulation and toxicity assessment of selected brominated flame retardants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1035-1042.
- OECD Test. (2006). 221: Lemna sp. growth inhibition test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*: 1-22.
- Ogunbayo, O. A., Jensen, K. T. et Michelangeli, F. (2007). The interaction of the brominated flame retardant: Tetrabromobisphenol A with phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768: 1559-1566.
- Ohta, S., Okumura, T., Nishimura, H., Nakao, T., Aozasa, O., Miyata, H., Shimizu, Y. et Ochiai, F. (2004). *Levels of PBDEs, TBBPA, TBP, PCDDs/DFs, PXDDs/DFs and PBDDs/DFs in human milk of nursing women and dairy milk products in Japan.*
- Okeke, E. S., Huang, B., Mao, G., Chen, Y., Zhengjia, Z., Qian, X., Wu, X. et Feng, W. (2022). Review of the environmental occurrence, analytical techniques, degradation and toxicity of TBBPA and its derivatives. *Environmental Research* 206: 112594.
- Pareek, S., Sagar, N. A., Sharma, S., Kumar, V., Agarwal, T., González-Aguilar, G. A. et Yahia, E. M. (2017). Chlorophylls: Chemistry and biological functions. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition*: 269-284.
- Parent, C., Capelli, N. et Dat, J. (2008). Reactive oxygen species, stress and cell death in plants. *Comptes rendus biologies* 331: 255-261.
- Peng, F.-Q., Ying, G.-G., Yang, B., Liu, Y.-S., Lai, H.-J., Zhou, G.-J., Chen, J. et Zhao, J.-L. (2014). Biotransformation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBPA) by freshwater microalgae. *Environmental toxicology and chemistry* 33: 1705-1711.
- Pereira, L. C., de Souza, A. O. et Dorta, D. J. (2013). Polybrominated diphenyl ether

- congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 112: 418-424.
- Pittinger, C. A. et Pecquet, A. M. (2018). Review of historical aquatic toxicity and bioconcentration data for the brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA): effects to fish, invertebrates, algae, and microbial communities. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 14361-14372.
- Pop, C.-E., Draga, S., Măciucă, R., Niță, R., Crăciun, N. et Wolff, R. (2021). Bisphenol A effects in aqueous environment on *Lemna minor*. *Processes* 9: 1512.
- Qiu, N., Wang, R., Sun, Y., Wang, X., Jiang, D., Meng, Y. et Zhou, F. (2018). Toxic effects and mechanism of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) on *Lemna minor*. *Chemosphere* 193: 711-719.
- Quade, S., Alaei, M., Marvin, C., Hale, R. et Solomon, K. (2003). Determination of tetrabromobisphenol-a in detroit river sediment and sewage sludge. *Organohalogen compounds*: 327-330.
- Ramaswamy, R., Zhao, S., Bae, S. et He, J. (2021). Debromination of TetraBromoBisphenol-A (TBBPA) depicting the metabolic versatility of *Dehalococcoides*. *Journal of Hazardous Materials* 419: 126408.
- Rapała, M., Pluciński, B. et Jedynek, P. (2017). The effect of bisphenol A on growth, pigment composition and photosystem II activity of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biochimica Polonica* 64.
- Ravit, B., Ehrenfeld, J. G. et Häggblom, M. M. (2005). Salt marsh rhizosphere affects microbial biotransformation of the widespread halogenated contaminant tetrabromobisphenol-A (TBBPA). *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1049-1057.
- Ronen, Z. et Abeliovich, A. (2000). Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Applied and environmental microbiology* 66: 2372-2377.
- Ronisz, D., Finne, E. F., Karlsson, H. et Förlin, L. (2004). Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquatic Toxicology* 69: 229-245.
- Rouein, S., Ghasemi, F. et Badiee, P. (2020). Compare catalase activity between *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus*, isolated from clinical and environmental specimens. *Jundishapur Journal of Microbiology* 13.

- Saint-Louis, R. et Pelletier, E. (2004). LC-ESI-MS-MS method for the analysis of tetrabromobisphenol A in sediment and sewage sludge. *Analyst* 129: 724-730.
- Shi, H., Wang, X., Luo, Y. et Su, Y. (2005). Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus*. *Aquatic toxicology* 74: 365-371.
- 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. *Research Journal of Chemical Sciences* 2231: 606X.
- Sun, F., Kolvenbach, B. A., Nastold, P., Jiang, B., Ji, R. et Corvini, P. F.-X. (2014). Degradation and metabolism of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in submerged soil and soil-plant systems. *Environmental science & technology* 48: 14291-14299.
- Sun, Y., Guo, H., Yu, H., Wang, X., Wu, J. et Xue, Y. (2008). Bioaccumulation and physiological effects of tetrabromobisphenol A in coontail *Ceratophyllum demersum* L. *Chemosphere* 70: 1787-1795.
- Sun, Y., Sun, P., Wang, C., Liao, J., Ni, J., Zhang, T., Wang, R. et Ruan, H. (2019). Growth, physiological function, and antioxidant defense system responses of *Lemna minor* L. to decabromodiphenyl ether (BDE-209) induced phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 139: 113-120.
- Suzuki, S. et Hasegawa, A. (2006). Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers and tetrabromobisphenol A in water and sediment by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical sciences* 22: 469-474.
- Uysal, Y. et Taner, F. (2010). Bioremoval of cadmium by *Lemna minor* in different aquatic conditions. *CLEAN-Soil, Air, Water* 38: 370-377.
- Vangronsveld, J., Mocquot, B., Mench, M. et Clijsters, H. (1997). Biomarqueurs du stress oxydant chez les végétaux. *Biomarqueurs en écotoxicologie*/Aspects fondamentaux*. Masson Edit, Paris, 419.
- Wang, Q., Wang, L., Han, R., Yang, L., Zhou, Q. et Huang, X. (2015). Effects of bisphenol A on antioxidant system in soybean seedling roots. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34: 1127-1133.
- Wang, Y., Zhang, M., Zhao, L., Zhang, W., Zhao, T., Chu, J., Qiu, Y., Gong, H. et Li, R. (2019). Effects of tetrabromobisphenol A on maize (*Zea mays* L.) physiological indexes, soil enzyme activity, and soil microbial biomass.

Ecotoxicology 28: 1-12.

- Wollenberger, L., Dinan, L. et Breitholtz, M. (2005). Brominated flame retardants: activities in a crustacean development test and in an ecdysteroid screening assay. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 24: 400-407.
- Xiong, J., An, T., Zhang, C. et Li, G. (2015). Pollution profiles and risk assessment of PBDEs and phenolic brominated flame retardants in water environments within a typical electronic waste dismantling region. *Environmental geochemistry and health* 37: 457-473.
- Xu, J., Zhang, Y., Guo, C., He, Y., Li, L. et Meng, W. (2013). Levels and distribution of tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane in Taihu Lake, China. *Environmental toxicology and chemistry* 32: 2249-2255.
- Xue, Y., Gu, X., Wang, X., Sun, C., Xu, X., Sun, J. et Zhang, B. (2009). The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology* 18: 693-699.
- Yang, S., Wang, S., Liu, H. et Yan, Z. (2012a). Tetrabromobisphenol A: tissue distribution in fish, and seasonal variation in water and sediment of Lake Chaohu, China. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 4090-4096.
- Yang, S., Xu, F., Zheng, B., Wu, F. et Wang, S. (2013). Multibiomarker responses upon exposure to tetrabromobisphenol A in the freshwater fish *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* 142: 248-256.
- Yang, S., Yan, Z., Xu, F., Wang, S. et Wu, F. (2012b). Development of freshwater aquatic life criteria for Tetrabromobisphenol A in China. *Environmental pollution* 169: 59-63.
- Zezulka, Š., Kummerová, M., Babula, P. et Váňová, L. (2013). Lemna minor exposed to fluoranthene: growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic toxicology* 140: 37-47.
- Zhang, J., He, S., Ren, H., Wang, L. et Tian, L. (2009). Removal of tetrabromobisphenol-A from wastewater by ozonation. *Procedia Earth and Planetary Science* 1: 1263-1267.
- Zhou, H., Yin, N. et Faiola, F. (2020). Tetrabromobisphenol A (TBBPA): a controversial environmental pollutant. *Journal of Environmental Sciences* 97: 54-66.

- Zhou, X., Guo, J., Zhang, W., Zhou, P., Deng, J. et Lin, K. (2014). Tetrabromobisphenol A contamination and emission in printed circuit board production and implications for human exposure. *Journal of hazardous materials* 273: 27-35.
- Zhu, W., Zhao, D.-X., Miao, Q., Xue, T.-T., Li, X.-Z. et Zheng, C.-C. (2009). Arabidopsis thaliana metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. *Journal of Plant Biology* 52: 585-592.
- Ziegler, P., Sree, K. S. et Appenroth, K.-J. (2016). Duckweeds for water remediation and toxicity testing. *Toxicological & Environmental Chemistry* 98: 1127-1154.
- Ziegler, P., Sree, K. S. et Appenroth, K.-J. (2019). Duckweed biomarkers for identifying toxic water contaminants? *Environmental Science and Pollution Research* 26: 14797-14822.