

Évaluation de l'incidence du L-Tryptophane sur la
toxicologie de l'acide perfluorooctanoïque chez *Daphnia*
magna

par

Mathieu VERHILLE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION DE LA MAÎTRISE
AVEC MÉMOIRE EN GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT
M. Sc. A

MONTRÉAL, LE 10 DÉCEMBRE 2024

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

©Tous droits réservés

Cette licence signifie qu'il est interdit de reproduire, d'enregistrer ou de diffuser en tout ou en partie, le présent document. Le lecteur qui désire imprimer ou conserver sur un autre media une partie importante de ce document, doit obligatoirement en demander l'autorisation à l'auteur.

PRÉSENTATION DU JURY

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

M. Robert Hausler, directeur de mémoire
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Fausto Errico, président du jury
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Mathias Glaus, membre du jury
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 28 NOVEMBRE 2024

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, M. Robert Hausler, pour son temps, ses conseils et ses idées. Son encadrement, tant sur le plan méthodologique que conceptuel, ainsi que ses remarques constructives ont été déterminants dans l'amélioration de la qualité de ce travail. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée, qui a nourri ma motivation et m'a permis de dépasser les défis rencontrés au cours de cette recherche.

Je remercie particulièrement Mme Geneviève Farley, analyste en écotoxicologie aquatique, au sein du *Laboratoire des essais environnementaux du Québec d'Environnement et Changement climatique Canada*, pour son expertise concernant l'étude de *Daphnia magna* et sans qui ce projet n'aurait pas pu être possible.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce projet. Je remercie le professeur Fausto Errico de présider le jury. Je remercie aussi le professeur Mathias Glaus d'avoir accepté d'évaluer ce projet comme membre du jury.

Un grand merci à l'ensemble du personnel de la STEPPE, pour le cadre, les conseils et le support que vous m'avez fournis tout au long de mes expérimentations au sein des locaux de l'ÉTS.

Finalement, je remercie toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien durant ces deux dernières années de maîtrise. Une pensée particulière pour mes parents qui n'ont pas hésité à m'encourager à poursuivre mes rêves au Canada malgré l'océan qui nous sépare aujourd'hui.

Évaluation de l'Incidence du L-Tryptophane sur la Toxicologie de l'Acide Perfluorooctanoïque chez *Daphnia magna* : Caractérisation et Perspectives

Mathieu VERHILLE

RÉSUMÉ

L'acide perfluorooctanoïque (APFO) est une substance qui préoccupe le milieu scientifique en raison de sa présence dans l'environnement et de ses effets toxiques sur les humains et les animaux. Connu pour son potentiel protéinophile, il a fait l'objet de recherches pour évaluer sa capacité d'addition à des agrégats biologiques ou des macromolécules. Cependant, il existe peu de rapport de recherche s'intéressant à la contribution individuelle des molécules clés, tel que les acides aminés, dans ce processus. Pour combler cette lacune, des essais de toxicité aiguë en 48 heures sur *Daphnia magna*, ainsi que des analyses de spectroscopie de fluorescence et infrarouge ont été menées en laboratoire.

Cette étude a évalué pour la première fois la capacité du L-tryptophane (L-Trp) à réduire la toxicité de l'APFO et a étudié la nature des interactions dans cette réaction. Les résultats montrent que la présence de L-Trp dans une eau contaminée en APFO a conduit à la diminution de la toxicité aiguë chez *D. magna*. Une atténuation maximale des effets toxicologique a été observée pour un ratio aux alentours de 0,5 en L-Trp, signifiant qu'une molécule de L-Trp se lie à deux molécules d'APFO. L'interaction entre le L-Trp et l'APFO révèle que les interactions non-covalentes jouent un rôle crucial dans la formation du complexe. Plus précisément, les forces de van der Waals et les liaisons hydrogène sont les interactions dominantes du complexe. D'autre part, l'existence d'effets hydrophobes au niveau du groupement indole et d'interactions électrostatiques entre les groupes carbonyles et amines a également été constatée au sein du complexe Trp-APFO. La formation de ces complexes expliquerait la diminution de toxicité chez *D. magna* par l'influence du L-Trp sur la biodisponibilité et/ou la distribution de l'APFO. Cette étude précise le mécanisme de réaction entre le L-Trp et l'APFO et relève également des inquiétudes quant à sa réversibilité et sa généralisation aux substances per- et polyfluoroalkylées (SPFA) de toute taille.

Mots-clés : Acide perfluorooctanoïque; Tryptophane; *Daphnia magna*; Toxicité; Interactions non-covalentes

Evaluation of the impact of L-Tryptophan on the toxicology of Perfluorooctanoic Acid in *Daphnia magna*: characterization and perspectives

Mathieu VERHILLE

ABSTRACT

Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a widespread environmental contaminant with known toxic effects on humans and animals, attracting significant scientific concern. Its proteinophilic nature has prompted research into its interactions with biological macromolecules, yet the role of specific molecules like amino acids remains underexplored. This study addresses this gap by conducting 48-hour acute toxicity tests on *Daphnia magna*, and utilizing fluorescence and infrared spectroscopy to investigate the interaction mechanisms involved between PFOA and L-tryptophan (L-Trp).

Results indicate that L-Trp presence in PFOA-contaminated water significantly reduces acute toxicity in *D. magna*. Optimal attenuation of toxic effects occurred at an L-Trp to PFOA ratio of approximately 0.5, indicating that one molecule of L-Trp binds with two molecules of PFOA. The study reveals that non-covalent interactions, particularly van der Waals forces and hydrogen bonds, are central to the L-Trp-PFOA complex formation. Additionally, hydrophobic effects at the indole group and electrostatic interactions between carbonyl and amine groups contribute to the complex. These interactions likely reduce PFOA's toxicity by altering its bioavailability and/or distribution. While, this study provides insights into the reaction mechanism between L-Trp and PFOA, it also raises considerations regarding the reversibility of this interaction and its applicability to other per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs).

Keywords : Perfluorooctanoic acid; Tryptophan; *Daphnia magna*; Toxicity effect; Non-covalent interactions

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 L'acide perfluorooctanoïque (APFO).....	5
1.1.1 Histoire et généralités	5
1.1.2 Aspects industriels	7
1.1.3 Devenir environnemental	8
1.1.3.1 Exposition	8
1.1.3.2 Éléments de toxicocinétique	10
1.1.3.3 Toxicité	12
1.1.4 Cadre réglementaire	14
1.1.5 Paysage mondial	16
1.2 Comportement de l'APFO en milieu protéique	19
1.2.1 Potentiel d'interaction APFO-protéines	20
1.2.2 Spécificité de la liaison APFO-protéines	21
1.2.2.1 Sites réactionnels	21
1.2.2.2 Tryptophane	23
1.2.3 Suivi de la réactivité des composés protéiques	24
1.2.3.1 Principe de fluorescence	25
1.2.3.2 Thermodynamie des liaisons protéines-ligands.....	27
1.2.3.3 Principe de la spectroscopie infrarouge	31
1.3 Modalité d'appréciation d'un impact écotoxicologique	32
1.3.1 Écotoxicologie.....	32
1.3.2 Évaluation écotoxicologique	33
1.3.3 Bioessais	34
1.3.3.1 Tests mono-spécifiques.....	35
1.3.3.2 Types de toxicité	37
1.3.3.3 Mesures de la toxicité.....	37
1.3.4 Cas d'étude : <i>Daphnia magna</i>	39
1.3.4.1 Organisme modèle pour l'évaluation des risques.....	39
1.3.4.2 Biologie et morphologie	40
1.3.4.3 Cycle de vie	42
1.3.4.4 Effets mesurés sur l'individu	43
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE	47
2.1 Substances d'essai	47
2.2 Élevage de <i>Daphnia magna</i>	47
2.2.1 Conditions d'élevage	48
2.2.2 Culture d'algues	49
2.2.3 Entretien de l'élevage d'essai.....	51
2.3 Toxicité aiguë de l'APFO	52

2.3.1	Essais de sensibilité-conformité.....	52
2.3.2	Détermination des CE ₅₀ – 48h et CL ₅₀ – 48h.....	53
2.3.3	Incidence du L-Tryptophane sur la toxicité de l'APFO	53
2.3.4	Critères d'acceptabilité.....	54
2.4	Approche analytique	55
2.4.1	Suivi de la fluorescence.....	56
2.4.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	57
2.5	Traitements statistiques des données.....	57
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		59
3.1	Résultats contrôle-qualité.....	59
3.2	Mesures de la toxicité aiguë de l'APFO chez <i>D. magna</i>	60
3.3	Validation expérimentale du complexe Trp-APFO.....	63
3.3.1	Analyse des spectres d'excitation et d'émission.....	63
3.3.2	Mesure du mode de complexation.....	64
3.4	Nature du mode de liaison et paramètres thermodynamiques du complexe.....	67
3.5	Identification des groupements de liaison du complexe	70
CHAPITRE 4 DISCUSSION		73
4.1	Signification toxicologique.....	73
4.1.1	Mécanisme de complexation.....	73
4.1.2	Équilibre structurel	74
4.1.3	Impact sur la toxicocinétique	77
4.2	Implications de l'étude.....	79
4.2.1	Variabilité de la toxicité	79
4.2.2	Traitements biologiques	81
4.2.3	Généralisation du phénomène.....	83
CONCLUSION		85
ANNEXE I DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES		89
ANNEXE II SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DES ESSAIS DE TOXICITÉ AIGUË CHEZ DAPHNIA MAGNA		91
LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		92

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1	Caractéristiques physico-chimiques de l'APFO 7
Tableau 1.2	Caractéristiques physico-chimiques du L-tryptophane 24
Tableau 1.3	Exemples d'espèces utilisées en milieu aquatique pour des applications écotoxicologiques..... 36
Tableau 2.1	Ration de nourriture (algues et YCT) à ajouter au milieu d'élevage 48
Tableau 2.2	Solutions-mères préparées pour la culture d'algues servant à l'alimentation des daphnies..... 50
Tableau 2.3	Routine quotidienne pour l'entretien d'un lot de daphnies 51
Tableau 3.1	Constante de vitesse d'extinction de Stern-Volmer, coefficient du taux de désactivation et constante extinction apparente de Stern-Volmer pour l'interaction entre le Trp et L'APFO selon les équations de Stern- Volmer non-modifiée et modifiée à 293, 298 et 308 K. R^2 est le coefficient de corrélation..... 66
Tableau 3.2	Paramètres de liaison, y compris la constante de liaison (Kb), le coefficient de Hill (n) et les paramètres thermodynamiques relatifs (énergie libre de Gibbs ΔG , enthalpie ΔH et entropie ΔS pour l'interaction entre le L-Trp et l'APFO à 293, 298 et 308 K. R^2 est le coefficient de corrélation..... 69

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Synthèse des voies de migration des SPFA dans les eaux de surface 9
Figure 1.2	Concentrations en SPFO et APFO (moyenne par pays) dans les eaux de surface..... 17
Figure 1.3	Cartes mondiales (a) des émissions annuelles totales d'APFO via les AEM et (b) des dépôts annuels totaux d'APFO transportés vers l'environnement terrestre par les AEM. 18
Figure 1.4	Répartition géographique (a) des sites de prélèvement d'eau du robinet et (b) des niveaux d'APFO (ng.L ⁻¹ , moyenne par site) dans l'eau du robinet incluant 376 municipalités du Québec, Canada 19
Figure 1.5	Spectre IRTF des SPE vierges extraits de boues aérobies, de boues anaérobies et de boues EBPR, et leur état de liaison avec 1000 ng.L ⁻¹ d'APFO..... 23
Figure 1.6	Diagramme de Jablonski 26
Figure 1.7	Illustration des forces non-covalentes en milieu protéique 30
Figure 1.8	Spectre IRTF du L-Tryptophane..... 32
Figure 1.9	Différentes approches expérimentales en écotoxicologie 35
Figure 1.10	Exemple de relation dose-réponse et valeurs de référence d'un bioessai .. 38
Figure 1.11	Anatomie fonctionnelle détaillée des daphnies..... 41
Figure 1.12	Cycle de reproduction des espèces <i>Daphnia</i> 43
Figure 3.1	Diagramme de contrôle des essais de sensibilité de <i>D. magna</i> avec le chlorure de sodium (NaCl)..... 59
Figure 3.2	Relations de concentration-réponse de <i>D. magna</i> après 48 h d'exposition selon le rapport Trp:APFO, a) pour l'observation de la mortalité et b) pour l'observation de l'immobilité. c) Moyennes des effets observés selon le rapport Trp:APFO. Toutes les relations différaient significativement ($p < 0,005$) de la relation de référence..... 61
Figure 3.3	Spectres (a) d'excitation et (b) d'émission de l'interaction entre le L-Trp et l'APFO à 293 K 63

Figure 3.4	Digramme de (a) Stern-Volmer et (b) Stern-Volmer modifié pour l'extinction de L-Trp en présence d'APFO à 293,298 et 308 K.....	65
Figure 3.5	Comparaison des tracés de Stern-Volmer théorique et expérimentale pour une gamme de concentration étendue à 293 K.....	67
Figure 3.6	(a) Diagramme de Hill modifiée pour la liaison du L-Trp avec l'APFO à 293, 298 et 308 K; (b) Tracé de Van't Hoff de $\ln Kb$ en fonction de $1/T$ pour la liaison de Trp avec l'APFO	68
Figure 3.7	Spectres IRTF de L-Trp pur, d'APFO pur, d'un mélange Trp-APFO (1:1) et d'un mélange Trp-APFO (1:2) récupéré sous forme de poudres par lyophilisation	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

3M	Minnesota Mining and Manufacturing Company
8:2 FTOH	1H,1H,2H,2H-perfluorooctan-1-ol
8:2 FTCA	2H,2H,3H,3H-perfluorodécanoate
ACS	American Chemical Society
ACPF	Acide carboxylique perfluoré
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination
APFO	Acide perfluorooctanoïque
ASTM	American Society for Testing and Materials
C	Carbone
CaCO ₃	Carbonate de calcium
CaSO ₄	Sulfate de calcium
C ₈ HF ₁₅ O ₂	Acide perfluorooctanoïque
CIRC	Centre international de Recherche sur le Cancer
CE	Concentration d'effet
CL	Concentration létale
CO ₂	Dioxyde de carbone
COOH	Groupe carboxylique
C _n F _{2n}	Groupe perfluoroalkyles
DL	Dose létale
ECCC	Environnement et Changement climatique Canada
F	Fluore
FABP	Protéine de liaison des acides gras

XVIII

FEC	Fluoration électrochimique
H	Hydrogène
H ₂ O	Eau
Hb	Hémoglobine
HCl	Acide chlorhydrique
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
ISO	Organisation internationale de normalisation
KCl	Chlorure de potassium
LEEQ	Laboratoire des essais environnementaux du Québec
LCPE	Loi canadienne sur la protection de l'environnement
LIC	Limite inférieur de contrôle
LIA	Limite inférieure d'avertissement
LSA	Limite supérieure d'avertissement
LSC	Limite supérieure de contrôle
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
N	Azote
NH ₂	Groupe amine
O ₂	Dioxygène
OAT4	Transporteur d'Anions Organiques 4
pH	Potentiel hydrogène

PPAR- α	Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxysomes
POP	Polluants organiques persistants
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
REACH	Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques
RNase A	Ribonucléase A
SeO ₂	Dioxyde de sélénium
SPE	Substances polymères extracellulaires
SPFA	Substances perfluoroalkylées et polyfluoroalkylées
SPFO	Sulfonate de perfluorooctane
STEP	Stations d'épuration
Trp	Tryptophane
URAT-1	Transporteur d'Anions Urate 1
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultraviolet
YCT	Levure, Cerophyll ^{MC} , Truite

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

Concentration

$\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$	cellules par millilitre
$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	gramme par litre
$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	milligramme par litre
$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	mole par litre
$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	nanogramme par litre
$\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$	picogramme par litre
N	normalité
$\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}$	unité internationale par millilitre
μM	micromolaire
$\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	microlitre par litre

Distance

cm^{-1}	nombre d'onde
mm	millimètre
nm	nanomètre

Énergie

$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	kilojoule par mole
$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	joule par mole par kelvin

Masse

g	gramme
$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	gramme par mole
$\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$	nanogramme par Kilogramme

Pression

mbar	millibar
------	----------

Temps

h	heure
s	seconde

Température

$^{\circ}\text{C}$	degré Celsius
K	kelvin

Volume

L	litre
$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	litre par mole
$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	litre par mole par seconde
mL	millilitre
$\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	millilitre par kilogramme

Autre

lx	lux
$\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$	tours par minute
u. a.	unité arbitraire
%	pourcentage

Symbole

f	facteur de dilution
$h\nu$	énergie d'un photon
p	probabilité critique
R^2	coefficient de corrélation
σ	écart-type
γ	photon

INTRODUCTION

L'acide perfluorooctanoïque (APFO), de formule $C_8HF_{15}O_2$, est une molécule de synthèse de la famille des acides carboxyliques perfluorés (ACPF), caractérisé par une chaîne perfluoroalkyle et un groupe terminal carboxylate. Populaire pour ces propriétés de résistance chimique et thermique, ainsi que pour son caractère amphipathique, l'APFO fut largement utilisé dans une variété d'applications industrielles et domestiques (Buck et al., 2011 ; Sajid & Ilyas, 2017 ; Siegemund et al., 2000). La grande stabilité des liaisons C–F et son utilisation pendant près de six décennies en ont fait l'une des substances perfluoroalkylées et polyfluoroalkylées (SPFA) les plus détectées dans l'environnement mondial et chez l'être humain (Kunacheva et al., 2012 ; Manojkumar, Pilli, Rao, & Tyagi, 2023). Cette large distribution, cumulée à sa rémanence environnementale (Prevedouros, Cousins, Buck, & Korzeniowski, 2006), suscite encore de nombreuses inquiétudes quant à ses effets toxiques, nécessitant un besoin urgent à comprendre et limiter les impacts écologiques d'un tel composé (Ankley et al., 2021).

Les effets toxicologiques (hépatotoxiques, immunotoxiques, malformations ...) des SPFA sont de nos jours établis (Abbott et al., 2012 ; Lau et al., 2007 ; Pérez et al., 2013). Cependant, les mécanismes mis en jeu sont quant à eux encore peu documentés (Ankley et al., 2021). L'observation de leur taux croissant le long des réseaux trophiques (Houde, Martin, Letcher, Solomon, & Muir, 2006), corrélés à leur caractère amphiphile, a suggéré leur capacité à se bioaccumuler. Il a notamment été prouvé que la bioaccumulation des SPFA augmente avec la longueur de la chaîne perfluoroalkyle (Bertin et al., 2014 ; Du et al., 2021). En ce sens, certaines études se sont intéressées à leur propriété protéinophile (Han, Snow, Kemper, & Jepson, 2003 ; Wen et al., 2016 ; Yan, Qian, Zhang, Wang, & Zhou, 2021 ; Zhao et al., 2023). Des études *in situ* et *in vivo* ont montré que certaines SPFA, comme l'APFO, présentent une affinité élevée pour l'albumine sérique, ainsi que les protéines liées aux acides gras et s'accumulent dans les organes riches en protéines tels que le foie et les reins (John L. Butenhoff et al., 2004 ; Stahl, Mattern, & Brunn, 2011). D'autres auteurs, comme Hernandez et al. (2022) ; Xia, Rabearisoa, Jiang, & Dai, (2013), ont démontré que la présence de

protéines en solution pouvait réduire les concentrations biodisponibles et les taux d'absorption d'APFO dissout chez les crustacés platoniques, tels que *D. magna*.

Pour l'heure, aucune technologie de traitement n'est adaptée à grande échelle. Les eaux usées industrielles et municipales issues des stations d'épuration (STEP) étant les principales sources ponctuelles de SPFA entrant dans les milieux naturels (Sun et al., 2011). En revanche, il a été observé que plusieurs SPFA, dont l'APFO, pouvaient être adsorbées par les agrégats biologiques lors de traitements par boues activées au sein des STEP (T. Zhou et al., 2024). L'étude de ces boues a permis de démontrer que la proportion protéique constituant les substances polymères extracellulaires (SPE) joue un rôle important dans la capacité de la boue à adsorber les SPFA (Gravesen, Lee, Choi, Silveira, & Judy, 2023). Au sein de la structure complexe de ces boues, Yan et al. (2021) ont démontré que les composés aromatiques, tels que le tryptophane (Trp), étaient capables de se lier par effet hydrophobe à l'APFO au sein des SPE. Le processus d'adsorption constitue une étape clé à la fois pour les mécanismes de toxicité et pour le traitement des contaminations en SPFA (Hernandez et al., 2022).

Très peu d'études ont exploré la contribution individuelle des acides aminés, tel que le Trp, à atténuer les effets toxicologiques de l'APFO. Afin d'apporter une compréhension du comportement entre le Trp et l'APFO, cette étude a évalué l'influence de la présence du L-Trp sur l'effet toxicologique de l'APFO chez *D. magna*, démontré la formation d'un complexe Trp-APFO et étudié la structure du complexe.

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres. Le premier chapitre offre une revue de littérature qui contextualise le projet et identifie les besoins scientifiques et pratiques dans le domaine. Le deuxième chapitre détaille les bioessais, la méthodologie et les paramètres analytiques utilisés pour étayer la méthode scientifique de cette étude. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que leur interprétation, visant à expliciter la cohérence entre la baisse de toxicité observée et les phénomènes physico-chimiques qui en sont à l'origine. Le quatrième et dernier chapitre discute ces résultats en établissant un lien entre la

littérature scientifique existante et les observations faites au cours de cette recherche, en mettant particulièrement l'accent sur les conséquences de la formation du complexe Trp-APFO. Enfin, la conclusion résume les principales contributions et propose des recommandations pour les domaines de la toxicologie, des traitements biologiques, et de la réglementation, en lien avec les implications du phénomène observé dans ce mémoire.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre vise à introduire les concepts essentiels à la compréhension du présent projet de recherche. Tout d'abord, ce chapitre présente des informations générales sur l'acide perfluorooctanoïque ainsi que les problèmes toxicologiques qui lui sont actuellement associés. Par la suite, la capacité de réaction de l'acide perfluorooctanoïque vis-à-vis des composés protéiques, ainsi que les outils de suivi capable de décrire ces réactions seront exposés. Enfin, les paramètres écotoxicologiques et l'organisme d'étude utilisés dans le cadre de ce travail y seront présentés.

1.1 L'acide perfluorooctanoïque (APFO)

Cette première section présente l'ensemble des informations générales relatives à l'acide perfluorooctanoïque (APFO), nécessaires à l'ancrage et à la compréhension des enjeux environnementaux que ce dernier occasionne à l'heure actuelle.


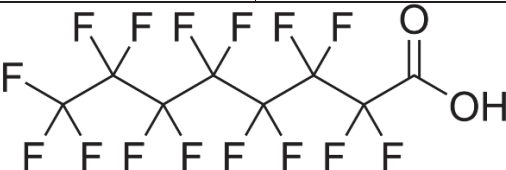
1.1.1 Histoire et généralités

L'utilisation de l'APFO s'est démocratisée lors des années 1940, après la première synthèse accidentelle du polytétrafluoroéthylène (PTFE ou Téflon®) par le chimiste Roy Plunkett à partir de celui-ci en 1938, pour le compte de la société *Éleuthère Irénée du Pont de Nemours et compagnie* (Prevedouros et al., 2006). Ce n'est que des années plus tard, en 1968, que les travaux de Taves ont démontré la présence de deux composés fluorés dans le sérum humain pour la première fois (Taves, 1968). Il a fallu attendre huit ans de plus pour identifier l'un de ces composés comme étant de l'APFO (Taves, Guy, & Brey, 1976). Ainsi, c'est en 1978 qu'une campagne d'analyse de sang auprès des ouvriers du principal producteur de l'époque *Minnesota Mining and Manufacturing Company*, appelé 3M, mit en évidence la présence d'APFO (Lindstrom, Strynar, & Libelo, 2011). Cependant, 3M n'arrêta sa production d'APFO et de sulfonate de perfluorooctane (SPFO), son homologue sulfuré, qu'à partir de

mai 2000 sous la pression de l'*United States Environmental Protection Agency* (USEPA) (3M, 2000). Après cette mise en lumière, de nombreuses analyses environnementales ont pointé du doigt la grande distribution environnementale de ces composés, et ce, jusqu'en Antarctique (Jin et al., 2009 ; Kunacheva et al., 2012 ; Post, Cohn, & Cooper, 2012 ; Manojkumar et al., 2023 ; Munoz, Liu, Vo Duy, Liu, & Sauvé, 2023).

L'APFO, de formule $C_8HF_{15}O_2$, est une molécule de synthèse de la famille des substances per- et polyfluoroalkylées (SPFA), anciennement dénommées « *composés perfluorés* ». Elles se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs groupements perfluoroalkyles de la forme $-C_nF_{2n}-$ (Buck et al., 2011). L'APFO, appartenant au sous-groupe des tensioactifs fluorés, se présente sous la forme d'une chaîne linéaire de huit atomes de carbone, dont sept sont reliés à des atomes de fluor et le huitième relié à un groupe carboxylate conjugué (Tableau 1.1). Il tire sa propriété amphipathique de sa « queue » fluorocarbonée hydrophobe et de sa « tête » hydrophile (Kissa, 2001 ; Lehmler, 2005). Le caractère hydrophobe de la « queue » fluorocarbonée étant prédominant, son potentiel lipophile n'est pas négligeable et permet à l'APFO de se lier préférentiellement aux protéines (X. Han et al., 2003 ; Kudo et al., 2007). De plus, en raison de la grande stabilité des liaisons C-F et de l'encombrement stérique, l'APFO possède une structure très stable et difficilement attaquable dans un environnement naturel, le qualifiant ainsi lors de ces dernières années de « *polluant éternel* » (Langenbach & Wilson, 2021).

Tableau 1.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'APFO

Structure chimique	$C_8HF_{15}O_2$
N°CAS	335-67-1
Masse molaire	$414,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
pK_a	2 - 3
Solubilité (25°C)	$9,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Demi-vie sérique	3,8 ans
Pictogrammes SGH	
	

1.1.2 Aspects industriels

Deux méthodes sont historiquement utilisées pour synthétiser l'APFO : la fluoration électrochimique (ECF), basée sur la substitution d'atomes d'hydrogène par des atomes de fluor sur une chaîne hydrocarbonée; et la télomérisation, consistant à la formation successive de télomères intermédiaires pour donner naissance au fluorotélomère par réaction avec le trioxyde de soufre et oxydation (Savu, 2000 ; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2017). Bien que peu onéreuse, l'ECF finit par être abandonnée au profit de la télomérisation en raison de son taux d'impuretés (isomères ramifiés) pouvant atteindre près de 30 % (OCDE, 2007).

Les SPFA ont été reconnues dans le milieu industriel pour leurs propriétés remarquables, comme une très bonne résistance aux attaques chimiques et thermiques. Pour les tensioactifs, tel que l'APFO, leurs propriétés varient en fonction du nombre d'atomes de fluor et leur positionnement sur la chaîne (Kissa, 2001). Leur utilisation trouve une variété d'applications, allant de l'industrie au domaine domestique. Parmi elles, figure son utilisation comme additif

dans les fluides hydrauliques, dans les peintures ou encore en tant que retardateur de flamme. Il est également présent dans la formulation de cosmétiques, dans la composition de certains désherbants et de certains régulateurs de croissance (Siegemund et al., 2000 ; Place & Field, 2012). Mais son usage le plus connu reste son emploi pour la synthèse de nombreux polymères fluorés, dont le plus célèbre : le Téflon® (Sajid & Ilyas, 2017).

Ces matériaux sont à leur tour largement utilisés dans divers domaines tels que le câblage, les conduites, les jointures et l'isolation, principalement dans les industries automobile, aérospatiale et électronique (Lin, Panchangam, & Lo, 2009 ; Zhu & Kannan, 2020). De plus, ils jouent un rôle essentiel dans les revêtements protecteurs des capteurs solaires, conçus pour résister aux intempéries (H.-C. Han et al., 2012), ainsi que dans les plastiques alimentaires et les produits de nettoyage anti-graisse (Siegemund et al., 2000). Ils trouvent également leur place dans les cuisines, agissant comme revêtement antiadhésif pour les ustensiles, et même dans le domaine médical comme composants pour les implants médicaux (Roina, Auber, Hocquet, & Herlem, 2022). Enfin, ils sont employés dans les revêtements antitaches et les imperméabilisants de certains cuirs et tissus (Paul, Jones, & Sweetman, 2009).

1.1.3 Devenir environnemental

Le devenir environnemental d'une substance chimique fait référence à ce qui lui arrive une fois qu'elle est introduite dans l'environnement. Cela inclut toutes les transformations, les déplacements et les interactions que l'espèce chimique peut subir dans l'air, l'eau, le sol ou les organismes vivants (Faburé, Mougin, Rivet, & Siaussat, 2022). L'APFO possédant quelques particularités, l'éclaircissement des processus d'exposition, de toxicocinétique et de toxicité se révèlent nécessaires.

1.1.3.1 Exposition

L'ensemble des SPFA peuvent être émis dans l'environnement à n'importe quel moment de leur cycle de vie. (Buck et al., 2011). Dans le cas de l'APFO, sa distribution dans l'environnement mondial est avant tout le résultat des rejets directs (émission lors du cycle de

vie) et indirects (émission de précurseurs) provenant de la production de fluoropolymères (Wang, Cousins, Scheringer, Buck, & Hungerbühler, 2014). Une fois introduit dans l'environnement, l'APFO présente une très bonne résistance à la biodégradation (Prevedouros et al., 2006). Il est très peu présent dans l'atmosphère, car très peu volatile, mais il se retrouve facilement dans les compartiments terrestres et *in fine* systématiquement dans les eaux de surface (Figure 1.1), en raison de sa bonne mobilité dans les milieux poreux et aquatiques (Xing et al., 2021). Ces différentes caractéristiques et ses propriétés physico-chimiques lui permettent de se rendre facilement biodisponible pour les organismes vivants, et ce, sur une très longue durée. De nombreuses études ont montré son potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, à tous les niveaux trophiques (Suja, Pramanik, & Zain, 2009 ; Pérez et al., 2013 ; Lewis et al., 2022). Par ailleurs, des phénomènes de bioamplification le long de la chaîne trophique ont pu également être observés (Du et al., 2021 ; Geng et al., 2021).

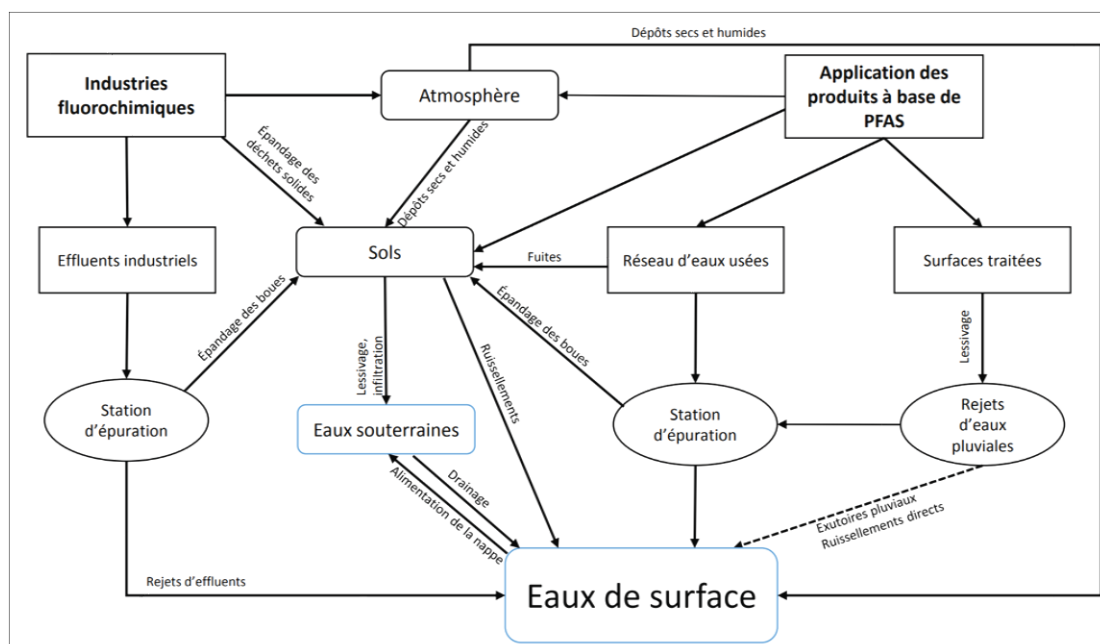


Figure 1.1 Synthèse des voies de migration des SPFA dans les eaux de surface
Adaptée de Ahrens & Bundschuh (2014)

En ce qui concerne l'être humain, les individus les plus à risque sont les habitants proches des sites de production de l'APFO comme en témoignent les affaires de *DuPont* en 1980 ou plus récemment *Solvay* depuis 2008 (Nicole, 2013 ; Horel, 2023). Importé pour la première fois dans les produits de consommation en 1949, l'APFO n'a jamais été synthétisé sur le sol canadien (Steenland, Fletcher, & Savitz, 2010). Néanmoins, l'importation depuis l'étranger a fait de l'alimentation la principale voie d'exposition de la population canadienne au SPFA, en raison de leur utilisation dans les emballages antiadhésifs. L'exposition moyenne estimée reste bien inférieure à la concentration considérée comme nocive pour l'humain, évaluée à $20 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (Environnement Canada et Santé Canada, 2021).

1.1.3.2 Éléments de toxicocinétique

La toxicocinétique est l'étude de la circulation, des transformations et de l'élimination des substances toxiques dans l'organisme permettant de comprendre comment ces substances se comportent et affectent la santé (Van Coillie & Parent, 2011). Elle se réalise selon quatre étapes, à savoir : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME).

Absorption

Les travaux actuels laissent penser que la voie orale est le principal mécanisme d'absorption (Lau et al., 2007). Par exemple, chez le rat des taux d'assimilation par voie orale supérieurs à 90 % ont pu être observés pour l'APFO (Vanden Heuvel, Kuslikis, & Peterson, 1992 ; Cui et al., 2010), tandis que les autres voies semblent être négligeables (Kudo & Kawashima, 2003). Cependant, les différences taxonomiques et la nature de la molécule sont des éléments importants dans le processus d'absorption d'un toxique. Des larves de chironomes *Chironomus riparius* exposées à différentes SPFA ont démontré une assimilation plus importante par voie tégumentaire (eau et sédiments) pour des molécules à chaîne courte, alors que l'alimentation était prédominante pour les chaînes longues ($C \geq 7$) (Bertin et al., 2014).

Distribution

Après avoir été absorbé, le toxique se répand dans les diverses parties de l'organisme (organes de métabolisation, de stockage et d'excrétion) grâce à la circulation systémique. La distribution des xénobiotiques dans les tissus est influencée par cinq principaux facteurs : (1) les propriétés physico-chimiques des composés, (2) le gradient de concentration transmembranaire, (3) le flux circulatoire des organes, (4) l'affinité du contaminant pour le fluide biologique (sang ou hémolymphe) et les tissus, (5) l'activité des protéines spécifiques de transport membranaire (Van Coillie & Parent, 2011 ; Faburé et al., 2022). Concernant l'APFO, avec un volume de distribution estimé à $170 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ de poids corporel (John L. Butenhoff et al., 2004) et une forte affinité pour l'albumine sérique, ainsi que les protéines liées aux acides gras, ce dernier est distribué dans l'organisme par le plasma (Stahl et al., 2011). De plus, il est préférentiellement accumulé dans les organes riches en protéines tels que le foie et les reins (John L. Butenhoff et al., 2004). Des études ont également démontré l'accumulation d'APFO dans les os et les poumons d'êtres humains exposés de manière chronique (Koskela et al., 2017). Cependant, là aussi, la distribution tissulaire dépend de l'espèce et du composé. À titre d'exemple, chez l'ours polaire (*Ursus maritimus*), les niveaux les plus élevés d'acides carboxyliques perfluorés (ACPF) ont été détectés principalement dans le foie, suivi du sang, du cerveau et des muscles, par ordre décroissant. Dans le foie et le sang, la contamination était principalement due aux C₇-C₁₁ ACPF, tandis que dans le cerveau et les tissus adipeux, les C₁₃-C₁₅ ACPF prédominaient. Ces résultats suggèrent que la répartition des SPFA dépend de la longueur de la chaîne perfluoroalkyle (Greaves, Letcher, Sonne, Dietz, & Born, 2012). Il a également été démontré chez les mammifères que l'APFO pouvait se distribuer lors de grossesses et dans le lait maternel pendant l'allaitement (Cui et al., 2010 ; Van Beijsterveldt et al., 2022).

Métabolisme

La métabolisation désigne le processus de biotransformation d'un xénobiotique, visant à le rendre plus soluble dans l'eau afin de faciliter son élimination du corps (Van Coillie & Parent, 2011). Or, l'APFO étant un produit final de dégradation de précurseurs (ex : 8:2

FTOH, 8:2 FTCA), ce dernier ne se métabolise pas et ne subit aucune réaction chimique dans un organisme (Stahl et al., 2011).

Élimination

L'élimination d'un xénobiotique est directement corrélée à son temps de demi-vie dans l'organisme, c'est-à-dire le laps de temps nécessaire pour que la moitié d'une substance absorbée soit éliminée de l'organisme ou ait perdu son activité biologique (Faburé et al., 2022). Les études montrent que ce temps est indépendant de la voie d'absorption (Kissa, 2001 ; Suja et al., 2009). Il peut également varier de manière conséquente selon l'espèce étudiée, par exemple : 3,8 ans chez l'homme (Olsen et al., 2007), 30 jours chez le singe (J. L. Butenhoff et al., 2004) ou encore 15 jours chez la souris (Lou et al., 2009) pour l'APFO. Dans le cas de ce dernier, ne pouvant pas être métabolisé, il est éliminé uniquement par excrétion, à savoir, par l'urine en majorité, mais aussi par les fèces et le lait maternel dans une moindre mesure (Lau et al., 2007). Cependant, un xénobiotique n'est pas totalement éliminé d'un organisme de façon systématique et identique. En effet, de nombreuses différences biologiques et physiologies interfèrent dans ce processus. Des mécanismes de rétention, comme la réabsorption tubulaire au niveau du tube proximal dans le rein chez l'homme, peuvent favoriser la conservation de xénobiotiques dans l'organisme (Kudo & Kawashima, 2003). De même, des différences sexuelles (menstruations, ...) et le vieillissement peuvent influencer sur l'efficacité d'élimination (Environnement Canada et Santé Canada, 2021). En outre, étant donné que l'APFO a tendance à s'accumuler dans les compartiments corporels à forte teneur en protéines (Suja et al., 2009); chez des organismes comme *Daphnia magna* possédant une teneur en protéines jusqu'à 50 % en poids sec (Ebert, 2022), des phénomènes de stockage peuvent rendre difficile l'élimination et engendrer des effets chroniques (Dai, Xia, Guo, & Jiang, 2013).

1.1.3.3 Toxicité

Depuis la mise en lumière de l'exposition de l'homme à l'APFO en 1976, de nombreux chercheurs se sont intéressés à ses effets toxiques. Toutefois, la communauté scientifique n'a

pas encore statué sur les mécanismes de toxicité de l'APFO, principalement en raison de son regain d'intérêt tardif, rendu possible par les avancées analytiques récentes (Ankley et al., 2021). Des études ont rapporté chez le rat et le singe des effets hépatotoxiques, immunotoxiques et des malformations (Lau et al., 2007). Il serait notamment responsable de l'augmentation de proliférateurs de peroxysomes dans le foie conduisant à une stéatose hépatique lors d'un stockage excessif de lipides (Lau et al., 2007). Le mécanisme sous-jacent pourrait être lié soit directement à l'action agoniste de l'APFO sur les récepteurs PPAR- α (induisant la production de peroxysomes), ou de façon indirecte en perturbant la réaction des lipides avec des protéines essentielles pour leur métabolisme (Abbott et al., 2012). Au niveau immunologique, Grandjean et al. (2012) ont montré qu'une exposition précoce à l'APFO chez de jeunes enfants âgés de 7 ans entraînait une baisse de la protection clinique de l'ordre de $0,1 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ pour les anticorps contre le tétanos et la diphtérie. Parallèlement, plusieurs données indiquent une toxicité maternelle et développementale de l'APFO chez la souris, entraînant une perte de grossesse précoce, une survie postnatale compromise et des retards de croissance (Lau et al., 2006). Différents effets ont pu également être observés sur les fonctions thyroïdienne et rénale (J. L. Butenhoff et al., 2004 ; Cui et al., 2010).

Les recherches sur les effets toxiques de l'APFO, et de manière générale sur les SPFA demeurent encore à ce jour insuffisantes. En écotoxicologie, pour déterminer la dangerosité d'une substance, les valeurs de références les plus utilisées sont les $\text{DL}_{50}/\text{CL}_{50}$ aiguës, c'est-à-dire les doses/concentrations létales pour 50 % de mortalité sur une période de 96h maximale (Faburé et al., 2022). Ces valeurs expérimentales sont presque systématiquement supérieures aux $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, et ce, pour l'ensemble des espèces aquatiques (Lau et al., 2007 ; Stahl et al., 2011). Cependant, il convient de noter que ces données sont basées sur le niveau de contamination du milieu et ne tiennent pas compte des concentrations présentes dans les tissus des organismes ou de tout autre phénomène complexe lié au milieu naturel.

Parmi les effets toxiques, ceux survenant à la suite d'expositions chroniques sont de loin les moins documentés, du fait des protocoles expérimentaux coûteux et des difficultés de mise en œuvre, bien qu'ils soient davantage représentatifs de la réalité (Faburé et al., 2022). Avec

des effets sur la thyroïde, la capacité d'altérer la régulation hormonale et des effets multigénérationnels sont fortement soupçonnés chez les SPFA. Pour soutenir ces hypothèses, Chaparro-Ortega et al. (2018) ont montré que la stimulation de cellules ovariennes porcines à des concentrations de 1,2 μ M de SPFO et d'APFO inhibe la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Sur le plan multigénérationnel, Ji et al. (2008) ont conduit des essais d'exposition au SPFO et à l'APFO sur deux générations de médakas (*Oryzias latipes*). Les capacités des parents (génération F0) ont été considérablement altérées, même à des concentrations minimales. Les descendants de la première génération non exposée (F1) ont présenté une mortalité élevée et des altérations de la structure des tissus, cependant, ces effets étaient encore plus prononcés chez les descendants de la première génération exposée (F1 des générations exposées) (Ji et al., 2008). D'autres études pourraient être citées dans ce sens, cela étant, la littérature actuelle n'est pas suffisante pour se prononcer sur l'étendue des effets chroniques et sublétaux des SPFA (Ankley et al., 2021).

Enfin, depuis le 1^{er} décembre 2023, l'APFO est classé par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme ayant un potentiel de cancérogénicité de groupe 1, c'est-à-dire « *un agent cancérogène certain pour l'homme selon la solidité des preuves scientifiques actuelles* » (Centre international de Recherche sur le Cancer, 2023).

1.1.4 Cadre réglementaire

C'est en 2019 que l'APFO a été inscrit à la *Convention de Stockholm* sur les polluants organiques persistants (POP). Créée en 2001 et comportant 186 pays membres, dont 152 signataires, il oblige chaque signataire à mettre en place des restrictions importantes en matière de réglementation nationale.

Canada

En 2006, le Canada, sous les directives d'*Environnement et Changement climatique Canada*, a commencé à enquêter sur les risques écologiques à l'échelle nationale pour le SPFO, l'APFO et les ACPF à longue chaîne ($C \geq 7$), ainsi que leurs sels et précurseurs. Les

conclusions de ces études ont révélé que, dans la plupart des cas, les SPFA pénètrent dans l'environnement à des concentrations ou dans des conditions susceptibles de provoquer des effets néfastes à court et à long terme sur les écosystèmes et la biodiversité (Environnement et Changement climatique Canada, 2012). Ces résultats ont conduit à l'inscription des SPFA sur la liste des substances toxiques de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), suivie de la mise en œuvre de mesures de gestion des risques, telles que des restrictions, une surveillance accrue et la gestion des déchets. Dès 2008, le Canada a interdit la fabrication, l'utilisation, la vente et l'importation de SPFO ou de produits en contenant (Environnement et Changement climatique Canada, 2010). Huit ans supplémentaires ont été nécessaires pour que l'APFO et les autres composés perfluorés à longues chaînes soient également visés par ces interdictions (Environnement et Changement climatique Canada, 2023). Toutefois, quelques rares applications subsistent encore à ce jour. En effet, une nouvelle proposition de modification du *Règlement sur certaines substances toxiques interdites* a été faite en 2022, mais celle-ci est toujours en discussion (Environnement et Changement climatique Canada, 2023). Par prévention, *Santé Canada* a décidé de s'aligner sur les recommandations de l'USEPA en adoptant un objectif seuil de $30 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la somme des concentrations en SPFA (Santé Canada, 2023).

États-Unis

Du côté des États-Unis, en 2019, un premier plan d'action pour la gestion des risques liés aux SPFA a été proposé par l'USEPA. La santé humaine était au centre des directives préconisées. Néanmoins, certaines mesures, comme le contrôle à la source, la réduction des déversements dans les cours d'eau et les actions correctives, auront également des avantages pour les écosystèmes. En outre, le plan englobait également des initiatives à plus long terme spécifiquement liées aux menaces environnementales, telles que l'identification d'espèces sensibles, le développement d'une compréhension plus approfondie de la bioaccumulation au sein des réseaux trophiques, ou encore l'établissement de seuils basés sur les risques écologiques (US Environmental Protection Agency, 2019). À ce jour, il n'existe aucune valeur restrictive au niveau du gouvernement fédéral des États-Unis. Celles proposées par l'USEPA ne font l'objet que de recommandations. En dépit de cela, les principaux SPFA,

comme l'APFO et le SPFO, ne sont plus produits aux États-Unis à la suite d'un accord convenu avec les producteurs (Lindstrom et al., 2011), mais l'importation de produits en contenant est encore d'actualité.

Europe

Au niveau de l'Europe, après l'application d'un nouveau règlement en 2017, la fabrication, l'utilisation, la vente et l'importation de l'APFO sont devenues interdites sauf pour certaines applications très spécifiques, telle que les dispositifs médicaux implantables conformément à la directive 93/42/CEE (Commission européenne, 2017). L'Europe réglemente davantage les SPFA, notamment au travers de cinq axes législatifs principaux : (1) le *règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques* (REACH), (2) le *règlement sur les polluants organiques persistants*, (3) la *directive cadre sur l'eau*, (4) la *directive relative aux eaux souterraines* et (5) la *directive sur les substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques* (Agence européenne des produits chimiques, 2023).

Asie

En ce qui concerne les pays d'Asie, avant son ajout à la *Convention de Stockholm* l'APFO était peu réglementé, même chez les plus gros producteurs (Japon et Chine). La République de Singapour et l'Indonésie ont été les premiers pays d'Asie à mettre des mesures de restrictions en œuvre, dès 2019. Cependant, il existe encore trop peu de données et de normes pour juger de l'efficacité des initiatives actuelles (Envilience ASIA, 2023).

1.1.5 Paysage mondial

L'identification presque systématique de SPFA à l'état de trace dans les prélèvements d'eaux océaniques, de surface et du robinet a constitué un facteur important dans la prise de conscience du problème environnemental (Ankley et al., 2021). En effet, même si des études à l'échelle mondiale sont relativement compliquées, la compilation de données locales a permis de mettre en relief l'étendue de cette contamination. De 2004 à 2010, Kunacheva et al. (2012) ont réalisé une enquête menée dans 15 pays avec au total 539 échantillons prélevés

dans les rivières de 41 villes. Les résultats de cette étude ont permis de réaliser l'une des premières estimations de la contamination mondiale de l'époque (Figure 1.2). Le SPFO et l'APFO ont été détectés dans les 41 villes non seulement dans les villes industrialisées, mais aussi dans les villes non industrialisées, ce qui confirme que ces composés sont transportés sur de longues distances dans l'environnement. La concentration moyenne d'APFO dans chaque ville était comprise entre 0,2 et 1 630,2 ng·L⁻¹ avec des niveaux exceptionnellement élevés à Osaka (1 630,2 ng·L⁻¹), tandis que la concentration moyenne d'APFO dans d'autres villes était inférieure à 100 ng·L⁻¹ (Kunacheva et al., 2012).

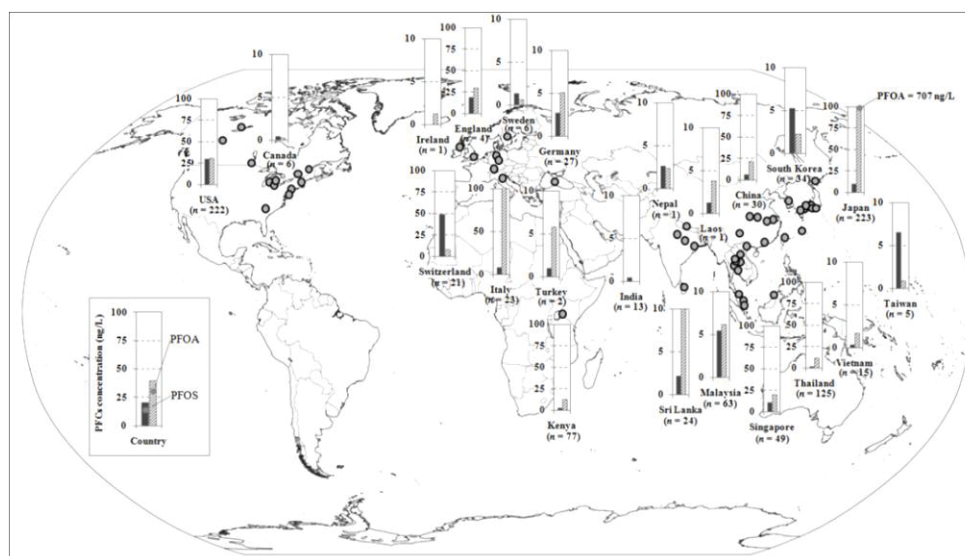


Figure 1.2 Concentrations en SPFO et APFO (moyenne par pays) dans les eaux de surface
Tirée de Kunacheva et al. (2012)

Avec une mobilité importante dans l'eau et une présence dans les tissus des poissons, la destination logique des SPFA est l'océan. La dilution extrême des polluants dans l'océan a rendu difficile leur détection pendant des années. De 2002 à 2004, Yamashita et al. (2005) ont essayé une nouvelle méthode d'analyse sur des échantillons provenant des océans et mers du monde entier. À l'époque, l'APFO était le principal contaminant détecté, avec des niveaux allant de plusieurs milliers de pg·L⁻¹ dans des échantillons d'eau prélevés dans les zones côtières du Japon, à quelques dizaines de pg·L⁻¹ dans le centre de l'océan Pacifique. Des années plus tard, des chercheurs se sont intéressés aux émissions annuelles mondiales de

cette substance dans l'atmosphère par les aérosols d'embruns marins (Figure 1.3) (Johansson et al., 2019). Cette étude a permis d'estimer les tendances de répartition de l'APFO dans les océans suivant les grands courants marins, comme celui de l'océan Austral. Les océans constituent la plus grande réserve naturelle de SPFA au monde (Prevedouros et al., 2006). Ils pourraient donc être actuellement une source importante de ces substances dans l'atmosphère.

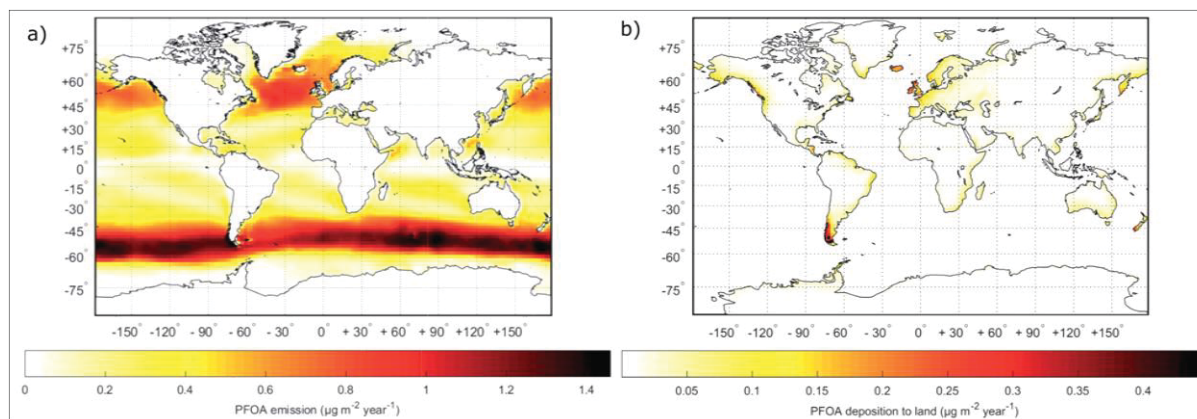


Figure 1.3 Cartes mondiales (a) des émissions annuelles totales d'APFO via les AEM et (b) des dépôts annuels totaux d'APFO transportés vers l'environnement terrestre par les AEM.
Tirée de Johansson et al. (2019)

Plus localement, au Québec, le constat est sans appel, malgré l'absence de site de production sur le territoire, la présence de SPFA se fait ressentir jusque dans l'eau potable. Récemment, Munoz et al. (2023) ont validé une nouvelle procédure de détection pour 42 SPFA avec des limites de détection individuelles de 0,001 à 0,082 ng·L⁻¹. Cette procédure a été appliquée à des échantillons provenant de 376 municipalités du Québec (Figure 1.4). Au total, ce sont 54 composés qui ont été détectés, avec dans l'ensemble, 99,3 % des échantillons d'eau du robinet qui étaient positifs à au moins une SPFA.

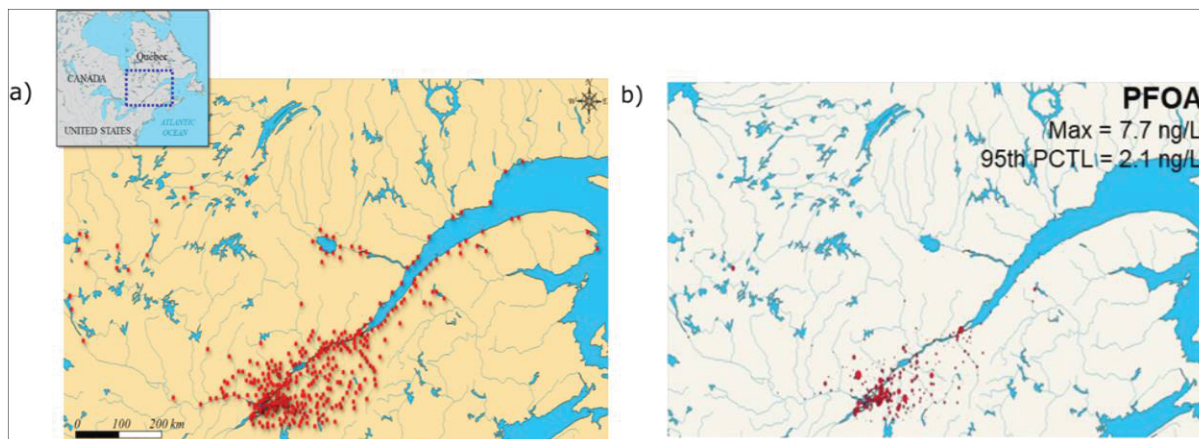


Figure 1.4 Répartition géographique (a) des sites de prélèvement d'eau du robinet et (b) des niveaux d'APFO ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, moyenne par site) dans l'eau du robinet incluant 376 municipalités du Québec, Canada
Tirée de Munoz et al. (2023)

Pour conclure, ces observations mettent en évidence deux aspects importants : la rémanence et le transport sur de longues distances de l'APFO; mais aussi et surtout le manque d'efficacité des procédés actuels en matière d'élimination des SPFA. En effet, la persistance des SPFA dans l'eau traitée montre que les technologies en place ne suffisent pas à éliminer ou à récupérer ces éléments qui subsistent maintenant depuis des années.

1.2 Comportement de l'APFO en milieu protéique

L'interaction de l'APFO avec les protéines est une étape cruciale pour appréhender sa biodistribution et sa persistance dans les organismes. Les protéines jouent un rôle central dans l'absorption, le transport et la détoxification des contaminants (Quinnell, Hulsman, & Davie, 2004). La distribution et la persistance de l'APFO dans un organisme sont directement dépendantes par sa capacité à se lier à différentes protéines (Wen et al., 2016). En particulier, les caractéristiques de liaisons, telles que l'affinité de l'APFO pour certains sites de liaison sur les protéines (Yan et al., 2021) et les changements conformationnels induits (Zhao et al., 2023), sont des paramètres clés qui modulent l'efficacité de cette interaction et de ses effets. Cette section exposera la capacité de l'APFO à interagir avec des composés protéiques, tant bien en milieu biotique qu'abiotique, et mettra en lumière les molécules clés

impliquées dans ces interactions. De plus, les principales voies d'analyse des protéines, telles que la fluorescence et la spectroscopie infrarouge, ainsi que les paramètres thermodynamiques de ces liaisons seront présentés.

1.2.1 Potentiel d'interaction APFO-protéines

La capacité d'interaction de l'APFO avec les protéines a particulièrement été étudiée chez les mammifères. Les recherches sur les mécanismes de toxicité ont révélé trois caractéristiques clés concernant sa distribution et ses interactions avec les protéines : (1) l'APFO s'accumule dans le plasma sanguin, où ils montrent une forte affinité de liaison avec l'albumine sérique (Alesio, Slitt, & Bothun, 2022); (2) son transport cellulaire se fait par diffusion passive et transport actif (lié à une protéine), certaines protéines (OAT4 et URAT-1) jouant un rôle clé dans la réabsorption des anions organiques et contribuant à la prolongation de la demi-vie d'élimination de l'APFO (Perera, Betancourt, Miksovska, & O'Shea, 2023); (3) l'APFO interagit avec les protéines de liaison aux acides gras (FABP), présentes dans de nombreux types cellulaires, agissant ainsi comme des réservoirs de ce dernier dans les tissus (Lianying Zhang, Ren, & Guo, 2013). Parmi ces interactions, la liaison de l'APFO à l'albumine sérique est considérée comme la plus importante sur le plan toxicologique, étant donné que l'albumine est la protéine la plus abondante dans le sang des mammifères (Carter & Ho, 1994). L'albumine sérique, grâce à sa capacité à se lier réversiblement à divers ligands, est donc couramment utilisée pour étudier le devenir physiologique de l'APFO et son potentiel à concurrencer les ligands endogènes.

D'un point de vue écologique, il existe encore peu de rapport de recherche sur l'effet des protéines environnementales sur le comportement des SPFA en milieu aquatique. Xia, Rabearisoa, Jiang, & Dai (2013) ont montré que la présence de protéines, telles que l'albumine bovine et la peptone de soja, pouvait réduire de manière significative la bioaccumulation de l'APFO chez *D. magna*. Toutefois, la présence de faible concentration ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) améliore la bioaccumulation de l'APFO; suggérant que les protéines réduiraient non seulement les concentrations biodisponibles et les taux d'absorption, mais aussi les taux

d'élimination de l'APFO chez *D. magna* (Xia et al., 2013). De manière plus générale, Hernandez et al. (2022) ont également démontré que le lysozyme, la RNase A, la caséine et l'albumine de blanc d'œuf étaient capables d'adsorber les résidus d'APFO dans différents types d'eau (Mili-Q, robinet, ruisseau, tamponnée, ect...). La liaison APFO-protéine montre de fortes interférences en fonction du pH et la salinité de l'eau (Hernandez et al., 2022). À l'instar, la présence d'acides humiques en milieu aqueux est connue pour avoir une incidence sur la biodisponibilité des polluants organiques, en raison de leur forte capacité à sorber les polluants organiques cationiques et hydrophobes (Chianese, Fenti, Iovino, Musmarra, & Salvestrini, 2020). Geng et al. (2024) ont récemment observé que la présence d'acides humiques diminuait l'absorption de SPFO chez *Mytilus unguiculatus*, mais l'inverse se produisait pour une faible concentration de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2.2 Spécificité de la liaison APFO-protéines

L'interaction entre l'APFO et les protéines, observée dans divers processus biologiques, souligne l'importance des liaisons spécifiques dans la bioaccumulation et l'adsorption de ce composé (Dai et al., 2013 ; Hernandez et al., 2022 ; Lewis et al., 2023 ; Xu, Chen, & Jiang, 2015). À cet égard, l'identification des sites de liaison est nécessaire pour mieux comprendre l'environnement local des réactions.

1.2.2.1 Sites réactionnels

La facilité d'interaction de l'APFO avec les composés protéiques a suscité un intérêt dans le traitement biologique pour l'élimination des SPFA. Différents auteurs ont montré que la concentration en APFO pouvait augmenter ou diminuer après avoir traversé les traitements biologiques (Yu, Hu, Tanaka, & Fujii, 2009 ; Zhou et al., 2010). Cette augmentation peut notamment se justifier par la décomposition des précurseurs de l'APFO (Zhou et al., 2010). De plus, étant réfractaire à la biodégradation, sa concentration dans les effluents est directement dépendante de ses interactions avec les boues activées des stations d'épuration (STEP) (Zhou et al., 2010). En ce sens, il a été constaté que l'adsorption était le moyen

prédominant d'élimination de l'APFO dans les STEP (Arvaniti, Andersen, Thomaidis, & Stasinakis, 2014 ; Yan et al., 2021 ; Zhou et al., 2010).

Dans le cas de l'APFO, Zhou et al. (2010) ont démontré que la capacité de sorption d'une boue était directement corrélée à sa teneur en protéines. Au niveau moléculaire, il a été constaté que les polluants se liant aux protéines des substances polymériques extracellulaires (SPE) entraînent souvent un changement de conformation des matrices extracellulaires (Zhang et al., 2018). La spectroscopie UV-visible a mis en évidence une absorbance réduite à 254 nm (Yan et al., 2021). Un tel phénomène est généralement associé à l'énergie de l'orbite de liaison dans les groupes phényles (Brandstetter, Sletten, Mentler, & Wenzel, 1996). Cette absorbance a émis l'hypothèse que l'APFO est combiné avec des groupes phényle (Yan et al., 2021). Des investigations plus poussées ont révélé par des études d'extinction de fluorescence que deux acides aminés, le tryptophane et la tyrosine étaient corrélée négativement avec le dosage de l'APFO (Tang et al., 2022 ; S. Zhang et al., 2023). Ainsi, l'extinction de la fluorescence a été attribuée à l'interaction hydrophobe entre la chaîne C-F de l'APFO et les groupes aromatiques des SPE (Tang et al., 2022). De telles interactions hydrophobes avaient déjà été observées entre les SPFA et certains matériaux par le passé (Bao et al., 2014 ; Chen et al., 2015). Yan et al. (2021) ont réalisé une analyse spectrale infrarouge dans le but d'identifier les liaisons spécifiquement impliquées dans la sorption de l'APFO (Figure 1.5). Il a été suggéré que les fonctions alcools ($1032-1092\text{ cm}^{-1}$) par le biais de liaisons hydrogène et amides protonées ($1637 - 1647\text{ cm}^{-1}$) fournissent des sites de liaison actifs pour la tête carboxylique de l'APFO (Yan et al., 2021). De même, avec un rapport protéines/polysaccharides élevé chez les boues EBPR (Long et al., 2021), l'abondance relative de protéines couplée à l'intensité réduite de la double liaison aromatique C=C (1259 cm^{-1}), confirmerait que l'APFO forme une interaction hydrophobe avec les groupes aromatiques (Long et al., 2021 ; Yan et al., 2021).

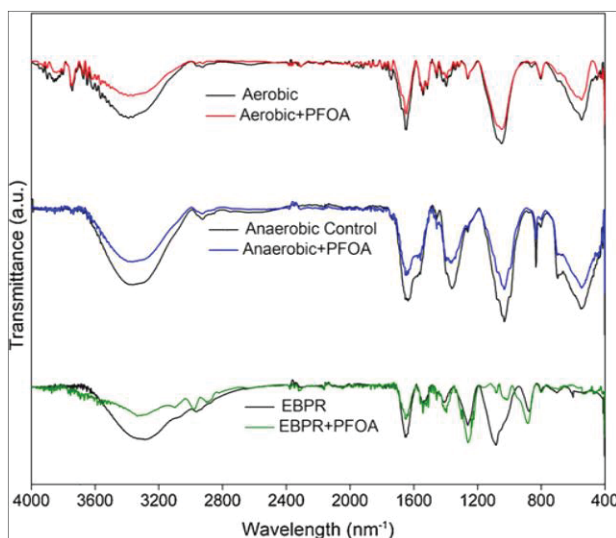


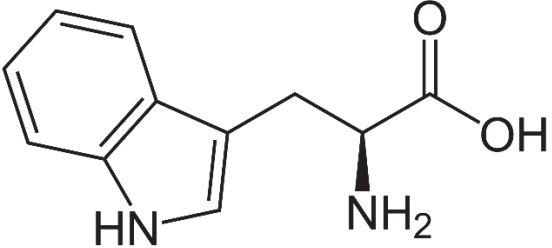
Figure 1.5 Spectre IRTF des SPE vierges extraits de boues aérobies, de boues anaérobies et de boues EBPR, et leur état de liaison avec 1000 ng·L⁻¹ d'APFO
Tiré de Yan et al. (2021)

1.2.2.2 Tryptophane

Le tryptophane est un acide α -aminé utilisé dans la biosynthèse des protéines. Il est constitué d'un groupe α -amino, d'un groupe acide α -carboxylique et d'un indole à chaîne latérale, ce qui en fait une molécule polaire avec un substituant carbone bêta aromatique non polaire (Tableau 1.2). L'hétérocycle indole est responsable de sa réactivité spécifique, de sa sensibilité au clivage oxydatif et de sa fluorescence (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$) (Palego, Betti, Rossi, & Giannaccini, 2016). Son spectre d'excitation s'étendant de 250 à 350 nm, avec un maximum à 280 nm. En solution aqueuse, il présente un spectre de fluorescence large et non structuré, avec un maximum situé à 350 nm (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Le tryptophane confère des propriétés uniques aux protéines et aux peptides, grâce aux forces de van der Waals qui favorisent les effets hydrophobes protéines-protéines nécessaires à la stabilisation des structures conformationnelles secondaires et tertiaires (Bellmaine, Schnellbaecher, & Zimmer, 2020). Comme beaucoup de molécules biologiques, le tryptophane est un acide aminé chiral, dont la prédominance des acides L-aminés dans toutes les formes de vie est reconnue (Wei, Wang, Shuang, & Dong, 2010). Bien que celui-ci soit un acide aminé relativement rare dans les protéines, il occupe un rôle significatif sur le plan structural et

fonctionnel. Par exemple, les résidus de tryptophane et de tyrosine jouent un rôle particulièrement important dans l'ancrage des protéines aux membranes cellulaires (Bellmaine et al., 2020). La synthèse du tryptophane peut se produire à la fois chez les procaryotes et certains eucaryotes (Lili Zhang, Feng, Zhu, & Chen, 2007). En effet, chez les eucaryotes, comme les animaux, les plantes et les champignons, la situation varie. Certains eucaryotes sont capables de synthétiser leur propre tryptophane, tandis que d'autres doivent l'obtenir à partir de leur alimentation (Palego et al., 2016).

Tableau 1.2 Caractéristiques physico-chimiques du L-tryptophane

Structure chimique	$C_{11}H_{12}N_2O_2$
N°CAS	73-22-3
Masse molaire	$204,23 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
pK_a	2,38 (groupe carboxylique) ; 9,39 (groupe aminé)
Solubilité (25 °C)	$11,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
	

1.2.3 Suivi de la réactivité des composés protéiques

Différentes méthodologies, telles que la résonance magnétique nucléaire, la diffraction des rayons X, ou la dialyse à l'équilibre, peuvent être employées pour étudier la réactivité des composés protéiques (Alesio & Bothun, 2024). Toutefois, lorsqu'une protéine est constituée d'acides aminés fluorescents, l'analyse de l'extinction de fluorescence est privilégiée (Ghisaidoobe & Chung, 2014 ; Lakowicz, 2006 ; Stockert & Blazquez-Castro, 2017). De même, la spectroscopie infrarouge s'avère essentielle pour décrypter la structure et les

propriétés des complexes inconnus; révélant la nature des liaisons chimiques et des groupes fonctionnels présents (Barth, 2007 ; Bellamy, 1975).

1.2.3.1 Principe de fluorescence

La fluorescence est un processus radiatif, qui se produit lorsque des électrons dans l'état fondamental singulet (S_0) absorbent un photon ($h\nu_A$), les propulsant vers un état singulet excité de plus haute énergie, tel que S_1 (Figure 1.6). Bien que les électrons puissent initialement occuper plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle dans cet état excité, ils se stabilisent rapidement, en environ 10^{-12} s, au niveau vibrationnel le plus bas de S_1 grâce à une relaxation vibrationnelle rapide (Lakowicz, 2006). Une fois dans cet état, l'électron peut se détendre et revenir à l'état fondamental (S_0) en émettant un photon avec une énergie légèrement inférieure à celle absorbée, ce qui constitue la fluorescence ($h\nu_F$). Ce processus se déroule sur une échelle de temps extrêmement rapide, de l'ordre des picosecondes à quelques nanosecondes (Lakowicz, 2006). Alternativement, l'électron peut subir une conversion de spin, le menant à un état triplet excité (T_1), où il peut soit émettre un photon par phosphorescence ($h\nu_P$), soit revenir à l'état fondamental par une transition non radiative, ou encore subir un photoblanchiment (Stockert & Blazquez-Castro, 2017).

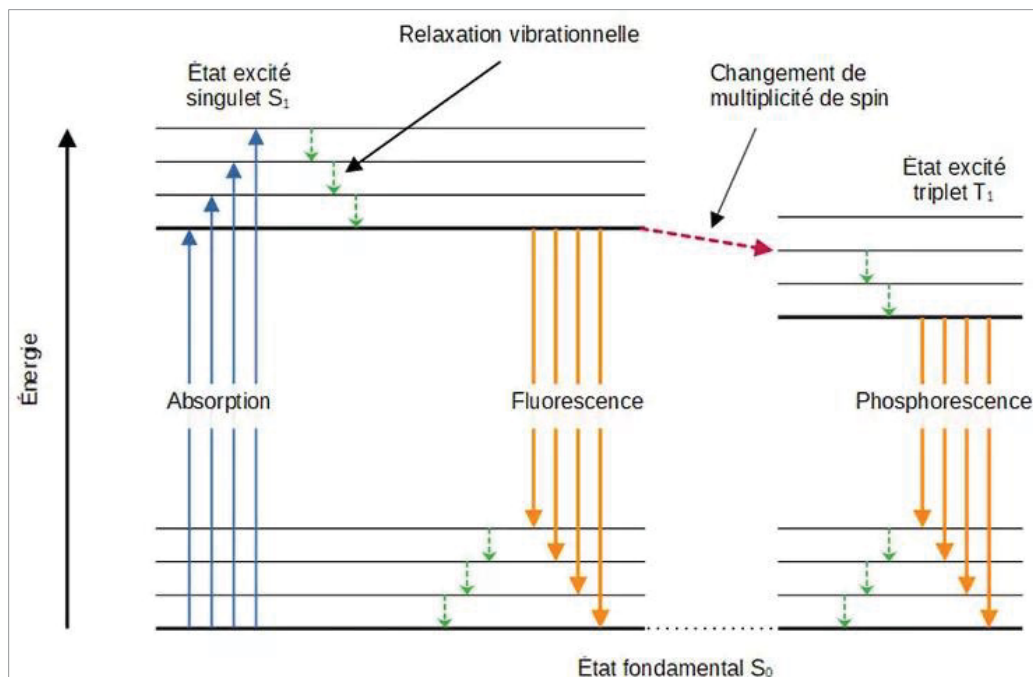


Figure 1.6 Diagramme de Jablonski

Un élément clé dans l'étude de la fluorescence d'une biomolécule est son extinction en présence d'un agent extingueur, un phénomène désigné par le terme anglais « *quenching* » (Lakowicz, 2006). Le processus d'extinction de fluorescence est généralement associé à deux mécanismes sous-jacents : l'extinction dynamique et l'extinction statique. L'extinction dynamique se produit lorsqu'il y a une collision entre le fluorophore et l'extincteur à l'état excité; tandis que l'extinction statique résulte de la formation d'un complexe non fluorescent entre le fluorophore et l'extincteur avant excitation sous l'influence de forces externes (Pan et al., 2010). Ces phénomènes sont illustrés de manière simplifiée par les équations suivantes.



Où, M représente le fluorophore; Q représente l'agent extingueur « *quencheur* »;

* représente l'état excité; γ représente l'apport d'un photon.

Pour l'étude de l'extinction de fluorescence des protéines, Otto Stern et Max Volmer ont formulé la relation suivante afin de décrire l'extinction dynamique dans des conditions d'illumination constante (Stern & Volmer, 1919).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1.3)$$

Où, F_0 et F sont l'intensité du fluorophore sans et avec extincteur;

τ_0 est la durée de vie de fluorescence du fluorophore en l'absence d'extincteur;

$[Q]$ est la concentration de l'extincteur ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);

K_{SV} est la constante de vitesse d'extinction de Stern-Volmer ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$);

K_q est la constante de vitesse biomoléculaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

L'équation de Stern-Volmer permet d'analyser la diminution de la fluorescence en fonction de la concentration de l'agent extincteur. Cette équation est valable pour l'extinction dynamique, où la diminution de fluorescence est proportionnelle au raccourcissement du temps de vie du fluorophore (Stern & Volmer, 1919). Un tracé de Stern-Volmer linéaire indique généralement une seule classe de fluorophores, tous également accessibles à l'extincteur. Toutefois, un tel tracé ne confirme pas nécessairement une extinction collisionnelle, car une extinction statique peut également produire un tracé linéaire (Lakowicz, 2006). Des températures plus élevées favorisent une diffusion plus rapide et augmentent l'extinction collisionnelle, tout en réduisant l'extinction statique en dissociant les complexes faiblement liés (Lakowicz, 2006). Cependant, si le mécanisme d'extinction inclut une composante statique, la courbe de Stern-Volmer peut présenter des déviations positives (D. Wei et al., 2015).

1.2.3.2 Thermodynamie des liaisons protéines-ligands

En biochimie, un ligand est une molécule qui se lie spécifiquement à un site sur une autre molécule, telle qu'une protéine, pour former un complexe (Ross & Subramanian, 1981). Ce phénomène est responsable de nombreux réseaux d'interactions clés, tels que la signalisation

hormonale ou la neurotransmission (Cortés, Pak, & Özkan, 2023 ; Egea, Klaholz, & Moras, 2000). Une différence apparemment modeste dans la structure chimique d'une protéine, d'un acide aminé ou d'un ligand peut significativement altérer son affinité et entraîner des changements notables dans son comportement biologique (Bi, Yan, Sun, & Zhang, 2011). Ces interactions biomoléculaires sont régies par la thermodynamique, dans laquelle la constante de liaison (K_b), est dictée par le changement de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) lors de la liaison. À une température donnée, l'affinité est représentée thermodynamiquement par la variation de l'énergie libre de liaison de Gibbs (ΔG_b), calculée à partir de K_b selon l'équation suivante (Ross & Subramanian, 1981) :

$$\Delta G_b = -RT * \ln K_b \quad (1.4)$$

Où, ΔG_b est la variation de l'énergie libre de liaisons de Gibbs ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$);

R est la constante universelle des gaz parfaits ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$);

T est la température absolue (K);

K_b est la constante de liaison K_b ;

En théorie, les réactions spontanées, c'est-à-dire favorables, sont celles où l'énergie libre est minimisée, de sorte que la variation d'enthalpie (ΔH) est négative et la variation d'entropie (ΔS) positive, conformément à la formulation première de la variation de l'énergie libre de Gibbs :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.5)$$

Où, T est la température absolue (K);

ΔG est la variation l'enthalpie libre ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$);

ΔH est la variation l'enthalpie ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$);

ΔS est la variation l'entropie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

La compréhension des mécanismes et des principes qui définissent l'affinité peut être obtenue en comprenant les facteurs physiques qui définissent le signe et l'amplitude de ΔH et ΔS (Bi et al., 2011). Ainsi, Némethy & Scheraga (1962) et Ross & Subramanian (1981) ont décrit la

relation entre les paramètres thermodynamiques et le mode de liaison selon trois situations : (1) lorsque $\Delta H < 0$ ou $\Delta H \approx 0$ et $\Delta S > 0$, la principale force agissante est la force électrostatique ; (2) lorsque $\Delta H < 0$ et $\Delta S < 0$, les principales forces agissantes sont celles de van der Waals ou la liaison hydrogène; et (3) lorsque $\Delta H > 0$ et $\Delta S > 0$, la principale interaction agissante est l'effet hydrophobe.

Ces interactions constituent les principales forces non-covalentes, ne nécessitant pas le partage de paires d'électrons entre les molécules (Hobza & Müller-Dethlefs, 2010). Elles sont essentielles à la cohésion et à la dynamique des structures biologiques et se définissent comme suit :

Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques, ou interactions ioniques jouent un rôle crucial dans la stabilisation, l'affinité des liaisons et les propriétés chimiques des protéines. Elles se produisent entre des groupements chargés positivement (comme la lysine, l'arginine et l'histidine) et négativement (comme les acides aspartique et glutamique), ainsi qu'entre les résidus terminaux $-\text{NH}_2$ et $-\text{COOH}$ des chaînes polypeptidiques (Sharp, 2002). Ces charges, principalement situées à la surface des protéines où elles interagissent avec l'eau, contribuent à la structure de la protéine (Karshikoff, 2006).

Interactions de van der Waals

Les interactions de Van der Waals sont des forces à courte portée, non covalentes, qui se produisent entre des atomes ou molécules neutres et non polaires. Elles se classent en trois catégories : les forces de Keesom, qui impliquent des dipôles permanents entre molécules polaires; les forces de Debye, où un dipôle permanent induit un dipôle dans une autre molécule; et les forces de London, résultant de dipôles instantanés entre deux molécules, surtout apolaires (Karshikoff, 2006). Ces interactions, bien que faibles, deviennent significatives à de courtes distances et dépendent de facteurs comme la polarisation et la température, avec des énergies allant de 0,5 à 30 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Hobza & Müller-Dethlefs, 2010).

Liaisons hydrogène

Une liaison hydrogène se forme lorsque l'atome d'hydrogène, chargé positivement, interagit avec un atome électronégatif comme l'azote, l'oxygène ou un halogène. Dans les chaînes polypeptidiques, ces liaisons se créent entre les groupes N-H (donneur) et C=O (accepteur), souvent renforcées par des chaînes latérales polaires d'acides aminés (Stickle, Presta, Dill, & Rose, 1992). Ces liaisons, avec les interactions électrostatiques, influencent la structure et la stabilité des protéines avec une énergie allant de 8,0 à 21,0 kJ·mol⁻¹ (Hobza & Müller-Dethlefs, 2010). Les ponts salins, un type particulier de liaison impliquant des charges formelles, jouent un rôle clé dans la stabilisation électrostatique des protéines, bien qu'ils ne soient pas des liaisons hydrogène fortes.

Effet hydrophobe

L'effet hydrophobe est la principale force motrice du repliement des protéines. Les acides aminés, avec leurs chaînes latérales polaires ou non polaires, influencent ce processus : les résidus polaires, hydrophiles, interagissent fortement avec l'eau, tandis que les résidus non polaires, comme ceux de la leucine, de l'alanine et de la phénylalanine, forment des interactions hydrophobes en se regroupant dans des environnements non polaires (Karshikoff, 2006). Ce repliement minimise les interactions non polaires avec l'eau, concentrant les résidus hydrophobes à l'intérieur de la protéine et les résidus hydrophiles à sa surface (Karshikoff, 2006).

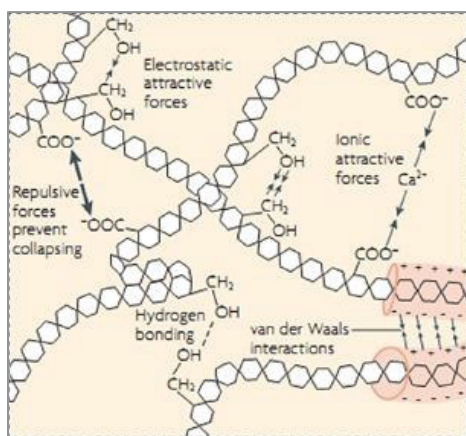


Figure 1.7 Illustration des forces non-covalentes en milieu protéique

1.2.3.3 Principe de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une méthode rapide et non destructive capable de détecter une large gamme de groupes fonctionnels et les variations de structure moléculaire (Bellamy, 1975). Elle peut être utilisée tant pour les acides aminés solubles que pour les grandes protéines membranaires. Le spectre infrarouge d'une molécule contient des informations sur la conformation du squelette, la structure des chaînes latérales, ainsi que l'environnement moléculaire (Barth & Zscherp, 2002). De plus, elle nécessite peu ou pas de préparation d'échantillon. La technique la plus utilisée est la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), en raison de son extrême sensibilité aux changements de structure secondaire, avec des résolutions temporelles allant jusqu'à la nanoseconde. La spectroscopie IRTF n'est pas limitée par la taille des protéines ou par la présence de ligands. Ces derniers peuvent également faire l'objet d'études simultanées, fournissant ainsi des informations sur les interactions protéines-ligands (Barth, 2007). Cette technique est particulièrement utilisée pour l'étude de la formation des complexes (Bellamy, 1975).

Par convention, les spectres d'études en infrarouges sont présentés en nombres d'onde (cm^{-1}), en se concentrant principalement sur une région moyenne allant de 400 à 4000 cm^{-1} . Les résultats d'analyse donnent les vibrations des liaisons moléculaires, fournissant un spectre unique pour chaque molécule. La Figure 1.8 illustre un résultat type de spectre IRTF pour le L-Tryptophane. Au-delà de l'identification qualitative basée sur la longueur d'onde d'absorption, la spectroscopie infrarouge suit la loi de Beer-Lambert, où l'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration, fournissant ainsi des informations quantitatives (Barth & Zscherp, 2002). Différents modes de vibration, comme l'étirement, le cisaillement, le balancement, et la torsion, sont utilisés pour caractériser les liaisons chimiques (Bellamy, 1975).

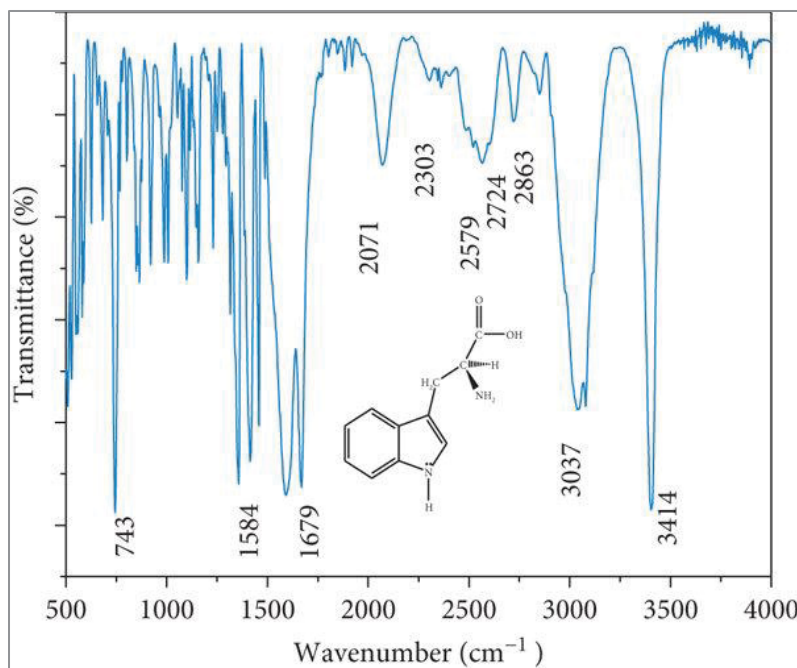


Figure 1.8 Spectre IRTF du L-Tryptophane

1.3 Modalité d'appréciation d'un impact écotoxicologique

Puisque la contamination des systèmes environnementaux par les SPFA est maintenant à l'état de fait, et que leurs effets toxiques le sont tout autant, les nouvelles pistes permettant l'atténuation ou l'inhibition de leurs effets revêtent un intérêt certain pour répondre à l'inefficacité des procédés contemporains (Ankley et al., 2021). Cette dernière section se propose de revenir dans un premier temps, sur les notions et les objectifs soutenus par la science de l'écotoxicologie. Puis, d'explicitier plus précisément les démarches d'évaluation et de bioessais. Et enfin, de conclure par la présentation de l'organisme d'étude *Daphnia magna*.

1.3.1 Écotoxicologie

L'écotoxicologie est un domaine de la science qui relie l'écologie et la toxicologie. Ce terme fut introduit pour la première fois par le toxicologue français René Truhaut, qui la définissait comme la discipline qui étudie les effets toxiques des substances naturelles ou synthétiques

sur les fonctions des organismes biologiques dans un contexte intégral (Truhaut, 1977). L'émergence et le développement de ce domaine de recherche sont liés à l'emploi excessif d'espèces chimiques, aux accidents industriels et écologiques d'ampleur, aux cas d'intoxication humaine, ainsi qu'aux progrès de la recherche en toxicologie humaine qui ont eu lieu lors du 20^{ème} siècle (Rattner, 2009). Au cours de ces mêmes années, la définition de Truhaut, jugée trop vague par le monde académique, a connu plusieurs changements (Butler, 1984 ; Moriarty, 1988). Aujourd'hui, celle de Forbes & Forbes (1997) fait davantage l'unanimité dans la communauté scientifique. En effet, puisque l'écotoxicologie est une science transversale intégrant des dimensions spatiales et temporelles importantes, il semble plus judicieux de la définir comme la discipline qui intègre les répercussions écologiques et nocives des polluants (physiques ou chimiques) sur les individus, les populations et les écosystèmes, ainsi que leur devenir environnemental. De ce fait, l'objectif fondamental de l'écotoxicologie est de fournir des informations essentielles à l'évaluation des risques et à la gestion environnementale (Faburé et al., 2022). Cela inclut en particulier, des recherches pour l'élaboration de réglementations visant à protéger l'environnement, la conception de tests de routine, ainsi que la mise en place de principes empiriques ou théoriques pour approfondir notre compréhension du comportement des espèces chimiques et de leurs effets sur les systèmes biologiques (Van Coillie & Parent, 2011).

1.3.2 Évaluation écotoxicologique

L'appréciation de l'efficacité d'un biotraitement à réduire les effets d'un toxique peut être réalisée par une évaluation écotoxicologique (Faburé et al., 2022 ; Rattner, 2009 ; Van Coillie & Parent, 2011). L'évaluation écotoxicologique, également connue sous le nom d'évaluation du risque environnemental, permet de mesurer le risque pour l'environnement causé par une source de contamination, appelée « *stress* », en utilisant des analyses chimiques, biologiques, toxicologiques et/ou écologiques (Faburé et al., 2022). Cette dernière repose sur une approche « *systémique* », qui vise à examiner de manière interdisciplinaire les écosystèmes dans leur intégralité, en explorant les niveaux d'organisation biologique ainsi que plusieurs échelles de temps et d'espace (Van Coillie & Parent, 2011). Plusieurs niveaux

d'études sont généralement mis en place lors d'une évaluation complète. D'un côté, les études de terrain fournissent des données plus intégristes que les expériences en conditions contrôlées. Cependant, elles sont souvent plus complexes à interpréter en raison de la pluralité des sources de contamination environnementale, de l'exposition des organismes et de la diversité des réponses biologiques (Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, 2002). Ces études sont généralement coûteuses, et ne conviennent pas à la surveillance de la toxicité pendant un processus de décontamination. Les mesures en laboratoire viennent compléter cette première approche en donnant un diagnostic fiable des effets des polluants à court ou long terme, au travers d'études ponctuelles par le biais de bioessais standardisés (Pelletier, Campbell, & Denizeau, 2004). Le cheminement classique d'une démarche écotoxicologique est donc le suivant : identification de la source, cheminement du toxique, toxicité du toxique, danger du toxique, exposition des organismes, estimation du risque (Faburé et al., 2022).

1.3.3 Bioessais

Les bioessais englobent une variété de méthodes qui varient en fonction du niveau d'organisation étudié et de la durée d'exposition (Figure 1.9). Ces méthodes sont utilisées pour établir un lien entre la concentration d'une substance polluante (ou plusieurs) et les effets toxiques qu'elle peut avoir sur une (mono-spécifique) ou plusieurs (multi-spécifiques) espèces (Van Coillie & Parent, 2011). Il existe différents tests de toxicité normalisés élaborés par des organismes nationaux, voire internationaux (CEAEQ, 2021). Ces tests évaluent la toxicité aiguë ou chronique sur une espèce représentative d'un groupe d'organismes et d'un niveau trophique donné (Forbes & Forbes, 1997). Les résultats de ces essais permettent une meilleure analyse comparative des données entre différentes institutions de recherche. De plus, ils permettent de quantifier la relation entre les effets observés et les concentrations testées en établissant une courbe dose-réponse (Faburé et al., 2022). Dans ce contexte, la reproductibilité du test revêt un rôle crucial, puisque les résultats seront ultérieurement comparés pour évaluer l'efficacité d'un traitement donné (Van Coillie & Parent, 2011). Il est essentiel non seulement de sélectionner l'espèce avec précision, mais également de veiller à ce que tous les résultats proviennent d'essais réalisés avec la même souche, car des études ont

montré que la sensibilité pouvait varier au sein d'une même espèce (Baird, Barber, Bradley, Soares, & Calow, 1991).

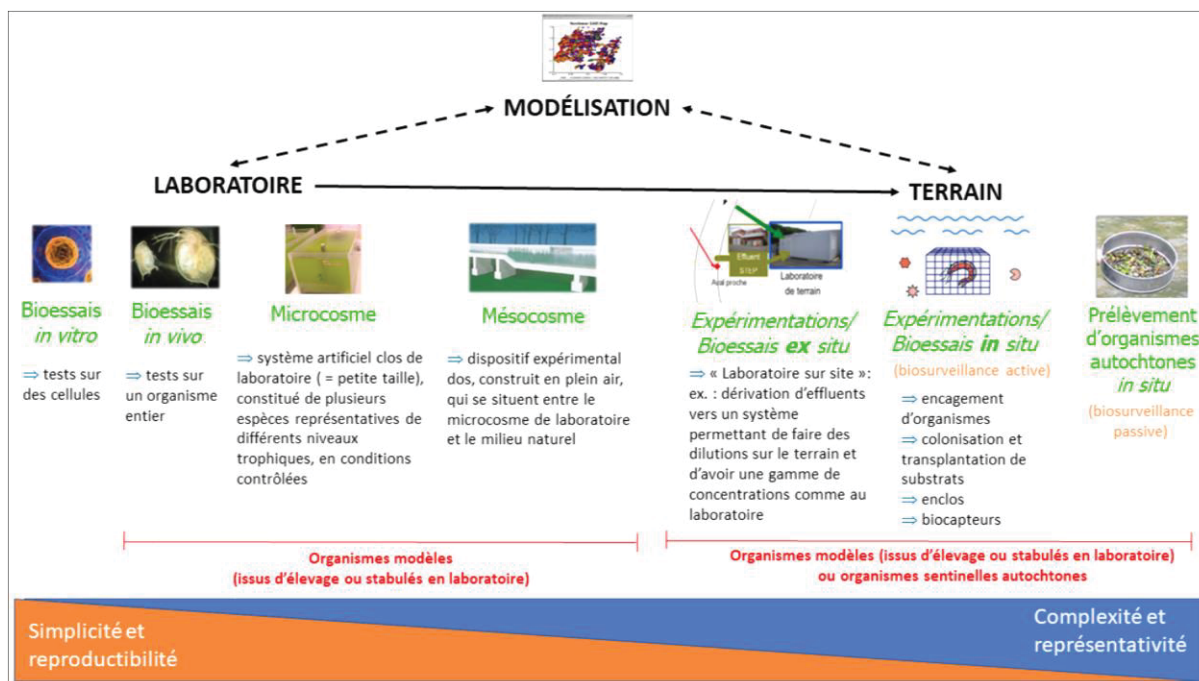


Figure 1.9 Différentes approches expérimentales en écotoxicologie
Tiré de (Lecomte, 2024)

1.3.3.1 Tests mono-spécifiques

Les tests de toxicité mono-spécifiques sont des tests réalisés en conditions contrôlées et standardisées où une seule espèce est exposée à stress chimique (Faburé et al., 2022). Ils consistent à utiliser des espèces sensibles dont l'élevage en laboratoire est simple (Tableau 1.3). Ils offrent une approche pratique, permettant d'obtenir rapidement une réponse sans ambiguïté à l'aide d'un grand nombre de réplicats. Ces tests se distinguent par leur simplicité, leur rapidité, leur reproductibilité, leur fiabilité et leur faible coût (Van Coillie & Parent, 2011). Les résultats ainsi obtenus peuvent être ensuite exploités par l'ensemble de la communauté scientifique grâce aux contrôles et la standardisation des paramètres biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, durée d'exposition, ...). La discrimination de ce

type de bioessais repose principalement sur les critères d'effets mesurés et la durée d'exposition par rapport au cycle de vie de l'organisme (Rattner, 2009).

Tableau 1.3 Exemples d'espèces utilisées en milieu aquatique pour des applications écotoxicologiques

Niveau de toxicité	Organisme	Critère d'effet
Aiguë	Daphnie	Immobilité
	Cériodaphnie	Immobilité
	Rotifère (marin ou eau douce)	Survie
	Copépode (marin et eau douce)	Survie
	Poisson	Survie
Chronique	Daphnie	Reproduction
	Cériodaphnie	Reproduction
	Rotifère	Reproduction
	Copépode	Reproduction
	Algue (marine ou eau douce)	Croissance de la population, activité enzymatique

Toutefois, les tests de toxicité mono-spécifiques ne permettent d'exposer qu'une seule espèce à la fois, ce qui les rend peu adaptés à l'évaluation des impacts à un niveau trophique supérieur. Les tentatives visant à extrapoler les effets sur l'écosystème sont sujettes à de nombreuses approximations et erreurs en raison de la complexité et de la dynamique inhérentes aux écosystèmes (Forbes & Forbes, 1997).

1.3.3.2 Types de toxicité

Une distinction est faite entre les bioessais en fonction de leur mesure terminale, c'est-à-dire leur critère d'effet mesuré, et de la période sur laquelle cette mesure souhaite être observée. Cette distinction amène à classer les bioessais selon le type de toxicité observé, tel que : aiguë, létale, chronique, sublétales.

Toxicité aiguë

Les essais de toxicité aiguë sont couramment employés pour examiner de nouvelles substances ou mélanges en vue de détecter leurs effets, ainsi que pour évaluer les conséquences éventuelles d'une pollution ponctuelle (Faburé et al., 2022). Les organismes sont soumis à une exposition de courte durée, allant de quelques heures à plusieurs jours, et à une large gamme de concentration. Ces derniers nécessitent une concentration suffisamment élevée en polluant pour provoquer une réponse biologique rapide, dont le caractère létal est la principale finalité (Forbes & Forbes, 1997).

Toxicité chronique

Les tests de toxicité chronique sont prolongés et couvrent une période équivalente à plus de 10 % de la durée de vie de l'organisme, et généralement plusieurs étapes de son cycle de vie (Faburé et al., 2022). La réponse biologique mesurée résulte de l'exposition unique, continue ou répétée à de faibles concentrations de contaminants, une situation qui se présente plus fréquemment lors de la contamination des écosystèmes naturels. L'utilisation de ce genre d'essai constitue souvent l'une des premières étapes de l'évaluation du risque environnemental induit par l'introduction d'un polluant (Van Coillie & Parent, 2011).

1.3.3.3 Mesures de la toxicité

L'utilisation d'un bioessai permet d'établir une relation entre la quantité de contaminants présents et les effets toxiques observés (Figure 1.10), appelée relation dose-réponse (Forbes & Forbes, 1997). La dose peut se présenter sous différentes formes, telles que la concentration dans l'environnement ou la quantité quotidienne ingérée (Pelletier et al., 2004).

Pour évaluer la toxicité d'un échantillon de contamination mixte ou inconnue, la dose représente l'exposition, c'est-à-dire la quantité de la substance contaminante par rapport à un milieu de référence. Les effets toxiques peuvent être de deux types : dichotomiques, comme la mortalité ou la germination qui donnent lieu à des fréquences; ou gradués, tels que la croissance d'une plante qui montre un changement progressif (Moe, Benestad, & Landis, 2022). Les réponses graduées peuvent ensuite être converties en pourcentage d'inhibition par rapport à un témoin, pour faciliter la comparaison avec les réponses dichotomiques. Les relations dose-réponse peuvent varier en forme, et il est possible d'observer des effets de stimulation ou d'hormèse en plus de la toxicité (Sebastiano, Messina, Marasco, & Costantini, 2022). À partir de la courbe dose-réponse, plusieurs variables de mesure peuvent être calculées : la gravité de la réponse à la dose maximale, la dose d'effet (dose à laquelle un pourcentage d'effet est observé), la dose seuil d'effet observé (dose en dessous de laquelle aucun effet n'est détectable), la dose médiane (où la réponse atteint son point de transition maximale) et la pente de la courbe (Faburé et al., 2022).

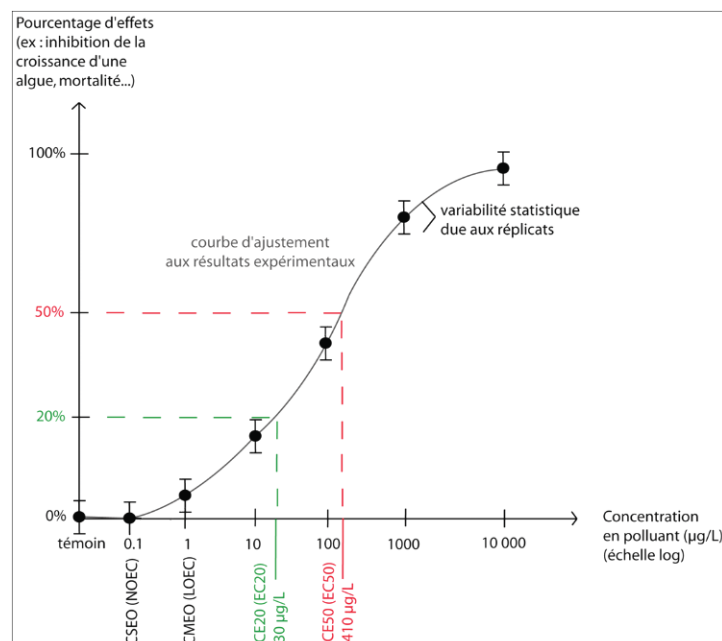


Figure 1.10 Exemple de relation dose-réponse et valeurs de référence d'un bioessai
Tiré de (Lecomte, 2024)

1.3.4 Cas d'étude : *Daphnia magna*

Daphnia magna est un microcrustacé d'eau douce appartenant à la famille des cladocères (puces d'eau), qui est largement préconisé comme une espèce modèle pour évaluer les risques liés aux espèces chimiques (CEAEQ, 2021 ; ISO, 2012 ; OECD, 2012). Parmi les données de toxicité disponibles, celles les plus exhaustives portent sur la toxicité d'une espèce chimique spécifique et sur la toxicité globale des effluents. Ainsi, cette dernière semble être un organisme d'intérêt dans l'objectif de ce présent travail.

1.3.4.1 Organisme modèle pour l'évaluation des risques

La daphnie, aux côtés des poissons et des algues, occupe une place centrale dans les tests conventionnels pour évaluer la toxicité aiguë et chronique des espèces chimiques. Parmi les crustacés d'eau douce, *D. magna* joue un rôle de premier plan dans de nombreuses recherches biologiques et est devenue un organisme modèle essentiel pour les études écotoxicologiques (Dai et al., 2013 ; Duquesne & Küster, 2010 ; Ebert, 2022 ; Reilly et al., 2023). Le choix de cette espèce en tant que bio-indicateur repose souvent sur sa facilité de culture, sa sensibilité aux facteurs de stress et sa réaction prévisible à ces derniers (Yang et al., 2019). Elle présente diverses réponses naturelles aux stress environnementaux, qu'ils soient physiologiques, biochimiques ou comportementaux (Ebert, 2005). Son élevage en laboratoire est facilité par son cycle de vie court et à sa forte capacité de reproduction. Sa carapace transparente facilite l'observation des organes internes, simplifiant ainsi les mesures. Un aspect intéressant de la daphnie est sa reproduction parthénogénétique, supposant que la descendance de chaque femelle lui est génétiquement identique (Innes & Singleton, 2000). Cette caractéristique réduit la variabilité des résultats, notamment en ce qui concerne le comportement, qui peut être sujet à des variations.

De surcroît, elle est une espèce représentative des organismes vivant en eau douce, occupant une position centrale dans les chaînes alimentaires aquatiques (Vanni, 1988). Elle est souvent l'une des espèces de zooplancton dominantes dans les lacs et les étangs d'eau douce. Par conséquent, les fluctuations de sa population peuvent avoir des répercussions significatives

sur les communautés phytoplanctoniques, influençant les réseaux alimentaires aquatiques (Koivisto, 1995). En somme, la daphnie joue un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre écologique des écosystèmes aquatiques et est un outil précieux pour l'évaluation des risques liés aux espèces chimiques dans ces environnements.

1.3.4.2 Biologie et morphologie

Les daphnies sont des organismes mesurant entre 3 et 5 mm au stade adulte et protégées par une carapace transparente. Elles possèdent une tête légèrement arrondie et courbée ventralement composée de 2 yeux latéraux fusionnés, de la bouche et de 2 antennes en forme de rameaux dressées de chaque côté de la tête, qui servent à la locomotion. Ce moyen de déplacement provoque une avancée saccadée, ce qui explique pourquoi elles sont surnommées les *puces d'eau* (Ebert, 2005). Le thorax, quant à lui, constitue la plus grande portion du corps, abritant 5 appendices thoraciques responsables de l'aspiration de l'eau à travers un filtre de soie pour le transport de la nourriture et de l'oxygène jusqu'à la bouche et les branchies. La nourriture est capturée par ce filtre de soie et est maintenue dans une rainure alimentaire ventrale avant d'être dirigée vers la bouche (Mittmann, Ungerer, Klann, Stollewerk, & Wolff, 2014). Le cœur occupe une position dorsale dans la partie antérieure du thorax. Les gonades sont situées de part et d'autre de l'intestin qui traverse tout le corps de haut en bas. Chez les femelles, l'ovaire s'ouvre dorsalement par un oviducte dans une chambre de maturation (Grebelnyi, 1996). Elles possèdent une grande poche incubatrice sous la carapace dorsale, où les œufs sont incubés jusqu'à ce qu'ils achèvent leur développement embryonnaire pour devenir des daphnies juvéniles. L'abdomen se compose de l'anus à l'extrémité postérieure, ainsi que d'une paire de griffes abdominales ayant pour rôle de nettoyer les appendices thoraciques.

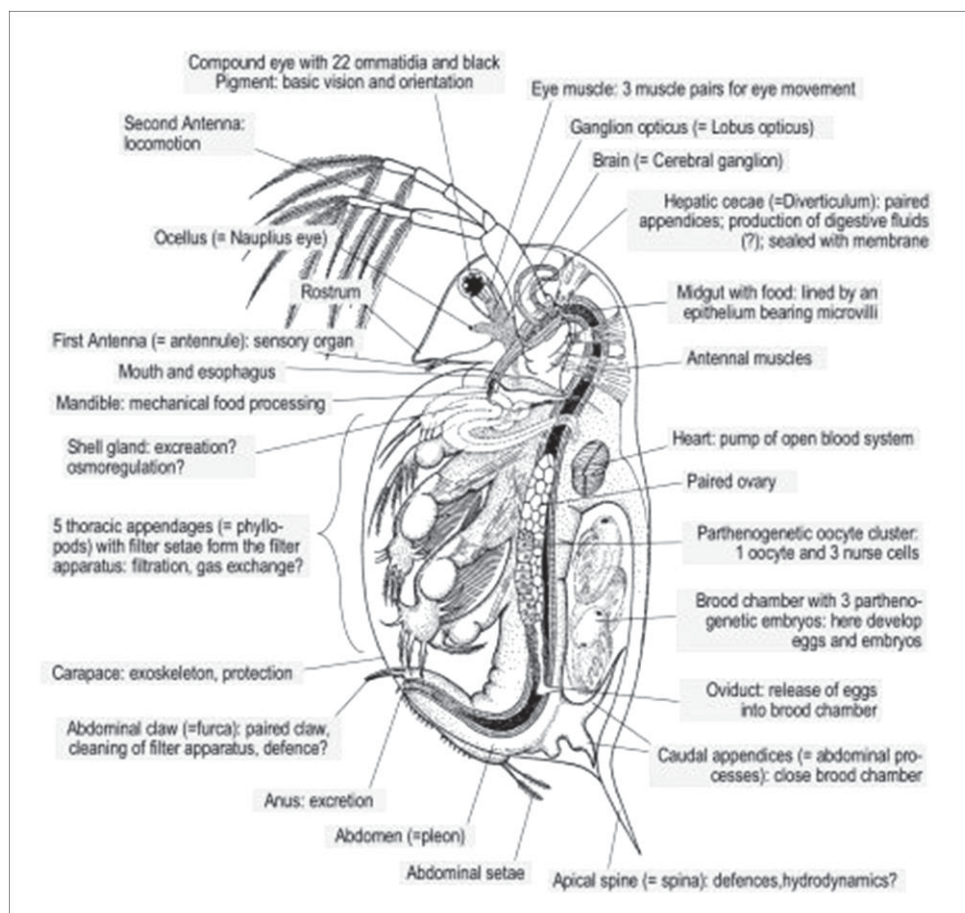


Figure 1.11 Anatomie fonctionnelle détaillée des daphnies
Tiré de Ebert (2005)

Le système nerveux de la daphnie se compose du cerveau et des nerfs ventraux qui établissent des connexions entre le cerveau, les appendices et le corps de la daphnie. Le cerveau lui-même est subdivisé en trois parties distinctes, chacune étant responsable d'une région spécifique du corps : le *protocerebrum* (qui gère les yeux et les neuropiles optiques), le *deutocerebrum* (associé à l'antenne sensorielle) et le *tritocerebrum* qui est connecté à l'antenne, aux nerfs nabraux et aux intestins (Weiss, Tollrian, Herbert, & Laforsch, 2012). Les daphnies possèdent un système circulatoire ouvert et utilisent l'hémoglobine (Hb), une protéine respiratoire extracellulaire, pour le transport de l'oxygène (Ebert, 2005). Elles ont la capacité d'absorber des ions grâce à des glandes spécialisées dans l'absorption des chlorures, tandis que l'excrétion et l'osmorégulation sont régulées par les glandes coquilles.

1.3.4.3 Cycle de vie

D. magna comme beaucoup d'autres espèces de daphnies, possède un cycle de vie relativement rapide. Une femelle adulte est capable de pondre des œufs (10 en moyenne) tous les 2 à 3 jours jusqu'à sa mort, pourvu que les conditions environnementales soient favorables (Ebert, 2005). Le taux de croissance de ces organismes est particulièrement rapide pendant leur phase juvénile, avec la possibilité que leur taille double après chaque mue, grâce à la souplesse de leur nouvelle coquille. La phase juvénile est de courte durée, car les daphnies atteignent leur maturité sexuelle en seulement 5 à 10 jours (Viganò, 1993). En conditions contrôlées, les daphnies sont en mesure de vivre entre 6 et 8 semaines. Toutefois, leur durée de vie augmente à mesure que la température diminue en raison de la réduction de leur activité métabolique, atteignant 40 jours à 25 °C et 56 jours à 20 °C (Mittmann et al., 2014). Une femelle adulte peut avoir entre 6 et 22 cycles de reproduction (Ebert, 2022), mais le nombre de descendants par cycle varie considérablement en fonction de la disponibilité de la nourriture et des conditions environnementales.

Les femelles et les mâles se différencient principalement par leur taille, leur couleur et leur vitesse de déplacement. En effet, les mâles sont de taille plus petite que les femelles, arborent une première paire d'antennes plus volumineuse, présentent une teinte orangée, et nagent sensiblement plus rapidement que leurs homologues féminins (Ebert, 2005). La reproduction au sein des espèces de *Daphnia* suit un cycle de parthénogenèse, caractérisé par une alternance des phases asexuées et sexuées (Figure 1.12) selon les conditions environnementales (Grebelnyi, 1996). Lorsque les conditions sont favorables, les femelles se reproduisent de manière asexuée par parthénogenèse, engendrant ainsi une descendance génétiquement identique d'elles-mêmes, grâce à des œufs diploïdes qui se développent directement dans la chambre de maturation (Viganò, 1993). En laboratoire, les femelles privilégient la reproduction par parthénogenèse. En revanche, la reproduction sexuée survient dans des conditions environnementales défavorables, telles qu'une faible disponibilité de nourriture, des températures extrêmes ou une densité de population élevée.

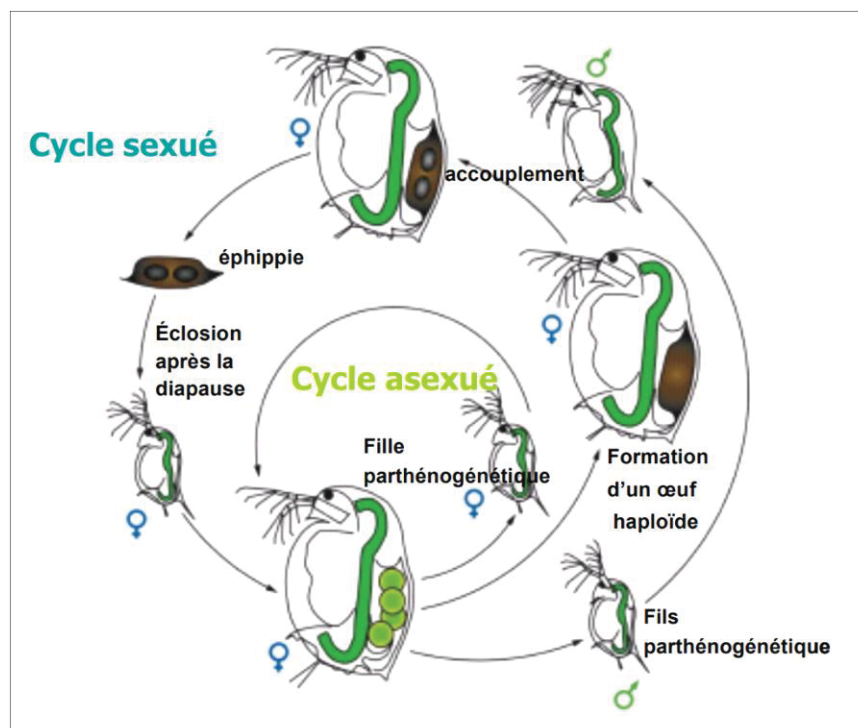


Figure 1.12 Cycle de reproduction des espèces *Daphnia*
Tiré et adapté de Ebert (2005)

1.3.4.4 Effets mesurés sur l'individu

En écotoxicologie, les études sont menées dans le but d'analyser les impacts d'une substance sur les écosystèmes. À la différence de la toxicologie humaine, l'objectif principal n'est pas de protéger l'individu, mais plutôt de préserver la population et son environnement biologique (Van Coillie & Parent, 2011). Pour développer des modèles de dynamique de population robustes, il est essentiel de comprendre les mécanismes sous-jacents régissant les interactions entre les organismes et les agents polluants à des niveaux d'organisation inférieurs. Lors de la réalisation de tests de toxicité impliquant des daphnies, l'accent est généralement mis sur l'évaluation des effets observables au niveau de l'individu, en raison des applications spécifiques (Reilly et al., 2023). Les effets peuvent englober divers aspects, qu'il s'agisse de la daphnie adulte, des œufs ou même des nouveau-nés (appelées « *neonates* » en anglais). Cette approche méthodologique vise à établir un lien entre les réponses

biologiques individuelles et la modélisation de la dynamique de population, offrant ainsi une évaluation plus précise des impacts écotoxicologiques.

Au niveau des œufs

Dans ces tests, les œufs sont prélevés de la chambre de maturation et surveillés jusqu'au stade juvénile. Les principaux critères d'effet examinés sont les anomalies de développement et les retards de croissance (Sobral et al., 2001). Sobral et al. (2001) avancent l'idée que ces tests axés sur le développement des œufs pourraient permettre une évaluation rapide des effets sublétaux généralement étudiés de manière conventionnelle au cours de tests de 21 jours menés sur des adultes. Néanmoins, l'utilisation de ce type de bioessais *in vitro* est peu courante en raison de la complexité des manipulations.

Au niveau des juvéniles

Les tests conventionnels effectués sur les juvéniles sont conçus et normalisés pour évaluer les effets immédiats d'une substance (CEAEQ, 2021 ; ISO, 2012 ; OECD, 2012). Ces tests visent à déterminer la concentration d'une substance, entraînant 50 % de mortalité après 24 ou 48 heures d'exposition (CL_{50} : concentration entraînant une mortalité de 50 % ou DL_{50} : concentration entraînant une mortalité de 50 %) dans un environnement statique sous des conditions contrôlées. Pendant ces essais, on considère que les nouveau-nés sont décédés s'ils restent immobiles malgré une stimulation et qu'aucun signe cardiaque n'est observé. Pour calculer cette dose/concentration, les nouveau-nés sont exposés à une série de concentrations croissantes de la substance. À la fin de la période d'exposition de 24 ou 48 heures, le nombre de daphnies survivantes est comptabilisé, et le pourcentage de mortalité est calculé. Ces essais sont largement utilisés en tant qu'outil initial pour évaluer les effets immédiats des substances sur les écosystèmes aquatiques, car ils présentent plusieurs avantages : ils sont relativement simples à mettre en œuvre et permettent d'analyser un grand nombre de conditions en peu de temps (Pelletier et al., 2004).

Au niveau des daphnies adultes

Enfin, pour évaluer la toxicité à long terme d'une substance, des essais sont généralement effectués pendant les 21 premiers jours de la vie des daphnies (OCDE, 2012). Au cours de ces tests, les daphnies sont exposées à différentes concentrations de la substance, et divers paramètres sont examinés, tels que la mortalité, la capacité de reproduction ou la croissance. Plus spécifiquement, le critère couramment utilisé pour évaluer les effets à long terme est le nombre de juvéniles produits par une daphnie au cours des 21 jours (Persoone et al., 2009). Contrairement aux tests précédents réalisés sur les juvéniles, ces derniers consistent à déterminer la CE_{50} de reproduction, qui représente la concentration nécessaire pour provoquer une réduction de 50 % de la capacité de reproduction.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

Dans le but de démontrer l'effet du L-tryptophane sur la toxicité de l'APFO, des séries de tests de toxicité aiguë et d'analyses ont été menées en laboratoire sur *Daphnia magna*. Ce chapitre présente les conditions d'élevage et d'entretien de *D. magna*, les méthodes biologiques et analytiques utilisées pour caractériser les effets observés, ainsi que les critères d'acceptabilité et les méthodes statistiques employées pour la validation des résultats.

2.1 Substances d'essai

L'acide perfluorooctanoïque (APFO, $C_8HF_{15}O_2$, CAS no. 335-67-1, $\geq 95\%$) et le L-tryptophane (L-Trp, $C_{11}H_{12}N_2O_2$, CAS no. 73-22-3, $\geq 98\%$) ont été achetés auprès de *MilliporeSigma Canada Ltée*. (Etobicoke, ON). Tout autre réactif utilisé était conforme ou supérieur aux normes de l'*American Chemical Society* avec la mention ACS. Chaque solution d'essai a été préparée en diluant les substances d'étude avec de l'eau de culture de daphnies (constituée de $102,0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $NaHCO_3$, $4,3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl , $63,8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $MgSO_4$, $63,8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $CaSO_4\cdot 2H_2O$ et de $2,0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeO_2) reconstituée et aérée selon les lignes directrices formulées par *Environnement et Changement climatique Canada* (ECCC) (LEEQ, 2023a). L'eau de culture utilisée pour l'élevage des daphnies a été préparée en utilisant de l'eau distillée de haute qualité de laboratoire et stabilisée à $pH = 7,8 \pm 0,2$.

2.2 Élevage de *Daphnia magna*

Pour garantir un approvisionnement constant en sujets d'étude, un élevage de *D. magna* a été réalisé en laboratoire. L'amorçage, l'alimentation et la gestion de l'élevage ont été conformes aux recommandations de l'*American Society for Testing and Materials* (ASTM) *International* et de l'ECCC (ASTM International, 2014 ; LEEQ, 2023a). Les spécificités de chacune de ces étapes sont détaillées dans cette section.

2.2.1 Conditions d'élevage

La souche de *Daphnia magna* utilisée dans le cadre de ce projet a été fournie par le département d'écotoxicologie du *Laboratoire des essais environnementaux du Québec* (LEEQ) d'ECCC. Chaque cycle d'élevage expérimental a été réalisé dans de l'eau reconstituée et enrichie en vitamine B₁₂ à hauteur de 100,0 µL·L⁻¹. Une ration d'algues vertes et un mixte de moulée de levure, de Cerophyll^{MC} et de truite (YCT), acheté chez *Aquatic Research Organism Inc.* (Hampton, USA), ont été incorporés quotidiennement au milieu selon l'âge des génitrices (voir Tableau 2.1). Les paramètres de la qualité de l'eau : dureté (80 à 100,0 mg-CaCO₃·L⁻¹), alcalinité, pH (6,8 à 8,5), conductivité, température et oxygène dissous, ont été régulièrement surveillés à l'aide de méthodes standards, précisées dans le Tableau-A I-1 (APHA, 2017). Les élevages ont été maintenus à une température de 20,0 ± 2,0 °C et exposés à une luminosité comprise entre 400 et 800 lx, ainsi qu'une photopériode de 16 heures. Chaque élevage a été utilisé au maximum sur une période de 5 semaines.

Tableau 2.1 Ration de nourriture (algues et YCT) à ajouter au milieu d'élevage
Tiré et adapté de LEEQ (2023a)

Âge (en jours)	Quantité d'algues (en mL)	Quantité d'YCT (en mL)	Volume de l'élevage (en mL)
Élevage d'essai			
1 à 6	4,0	3,9	750
7 à 13	12,0	3,9	
14 à 41	20,0	3,9	
Critère de santé			
1 à 6	0,5	0,5	100
7 à 13	1,6	0,5	
14 à 41	2,7	0,5	
Back-up			
N/A	20,0	3,9	1 000

L'initiation d'un élevage expérimental a été réalisée à travers la progéniture de daphnies isolées, en utilisant exclusivement des nouveau-nées de moins de 24 heures. Un élevage expérimental est établi à partir des nouveau-nés provenant de la troisième ponte ou de pontes ultérieures, pour s'assurer d'une bonne réserve énergétique. Lorsque la descendance d'une des daphnies atteint une abondance notable (15 nouveau-nées ou plus) et présente un état de santé optimal, exempt de *ephippium* et de comportements liés au stress (par exemple, léthargie ou agitation), elle est sélectionnée pour amorcer un élevage expérimental.

2.2.2 Culture d'algues

Les algues d'eau douce constituent l'alimentation principale de *Daphnia magna* (Ebert, 2005). Lors de ce travail, les élevages ont été nourris avec un mixte d'algues fraîchement cultivées en laboratoire, composé de *Ankistrodesmus* et *Raphidocelis subcapitata*, obtenues auprès *Merlan Scientific* (Toronto, ON). Le milieu de culture utilisé est une variante modifiée du milieu Bristol préparé à partir de dix solutions-mères (Tableau 2.2). Les solutions-mères sont préparées à partir d'eau distillée de haute qualité et peuvent être conservées jusqu'à 6 mois à l'obscurité et 4,0 °C. Lors de la préparation d'un litre de solution, les dix solutions-mères sont ajoutées successivement selon les volumes préconisés par le Tableau 2.2. Le pH du milieu a été ajusté à $7,0 \pm 0,2$, en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl) préparée à une concentration de 1,0 N. Le milieu ainsi reconstitué est ensuite mis à l'autoclave pendant 15 minutes à 121,0 °C, avec l'ensemble du matériel nécessaire pour la stérilisation.

Tableau 2.2 Solutions-mères préparées pour la culture d'algues servant à l'alimentation des daphnies

Tiré et adapté de CEAEQ (2021)

Solution-mère	Produits	Quantité ajoutée à 500 mL d'eau distillée	Volume à ajouter pour préparer 1 L de milieu
1	NaNO ₃	25,0 g	2,5 mL
2	CaCl ₂ •2H ₂ O	2,5 g	2,5 mL
3	MgSO ₄ •7H ₂ O	7,5 g	2,5 mL
4	K ₂ HPO ₄	7,5 g	2,5 mL
5	KH ₂ PO ₄	17,5 g	2,5 mL
6	NaCl	2,5 g	0,5 mL
7	Na ₂ EDTA•2H ₂ O KOH	25,0 g 15,5 g	0,5 mL
8	FeCl ₃ •6H ₂ O (+1,0 mL de H ₂ SO ₄)	2,4 g	0,5 mL
9	H ₃ BO ₃	5,7 g	0,5 mL
10	MnCl ₂ •4H ₂ O ZnSO ₄ •7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O CuSO ₄ •5 H ₂ O Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0,4 g 2,2 g 0,3 g 0,4 g 0,1 g	2,0 mL

Les cultures algales ont été réalisées dans des bouteilles en verre stérilisées et amorcées à partir d'un inoculum pur et axénique d'une densité cellulaire d'environ 10 000 cell·mL⁻¹. Celles-ci sont placées dans un incubateur muni d'un plateau rotatif et maintenues à une température de 24,0 ± 2,0 °C pendant sept jours. Un flux d'air et une agitation constante de 100 tr.min⁻¹ ont été appliqués pour prévenir une déplétion en dioxyde de carbone (CO₂) et la précipitation des algues. De plus, les cultures ont été exposées à une photopériode de 16

heures et 8 heures d'obscurité, à une intensité de $4\,300\text{ lx} \pm 10\%$. Enfin, le concentré algale finale a été obtenu par centrifugation et remis en suspension dans de l'eau reconstituée pour daphnie. Un compteur de particules *Beckman Coulter série Z* a été utilisé pour déterminer le facteur de dilution nécessaire à l'obtention d'une densité cellulaire de $30 \cdot 10^6\text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.2.3 Entretien de l'élevage d'essai

Pour prévenir tout stress sur les élevages et les maintenir en phase de reproduction parthénogénétique, une routine a été appliquée sur leur alimentation et leur régulation. Lors de l'entretien de l'élevage, une attention particulière est accordée pour vérifier : l'absence d'*ephippium* dans les élevages, une première ponte au plus tard de 12 jours pour les génitrices, une mortalité maximale de 25 % chez les génitrices pendant les sept jours précédant l'essai, le maintien du milieu à $20,0 \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et une moyenne de 15 nouveau-nées lors des pontes des génitrices.

Tableau 2.3 Routine quotidienne pour l'entretien d'un lot de daphnies

Chronologie	Entretien <i>Élevage d'essai</i>	Entretien <i>Critère de santé</i>	Ration de nourriture
Jours 1	Renouvellement du milieu	Renouvellement du milieu	Oui
Jours 2	Aucun	Dénombrement des nouveau-nées	Non
Jours 3	Retrait des nouveau-nées	Dénombrement des nouveau-nées	Oui
Jours 4	Aucun	Dénombrement des nouveau-nées	Non
Jours 5	Retrait des nouveau-nées	Dénombrement des nouveau-nées	Oui
Jours 6	Aucun	Aucun	Non
Jours 7	Aucun	Aucun	Oui

2.3 Toxicité aiguë de l'APFO

Un ensemble de dilutions et une estimation des pourcentages d'effet ont été réalisées pour chacune des concentrations de l'échantillon après 48 heures d'exposition. Les essais expérimentaux ont suivi les lignes directrices préconisées par la méthode normalisée LB-DAP-9 d'ECCC et de la norme ISO 6341:2012 de l'*Organisation internationale de normalisation* (ISO, 2012 ; LEEQ, 2023a). Les spécificités de chaque procédure expérimentale sont décrites dans cette section.

2.3.1 Essais de sensibilité-conformité

Pour chaque élevage d'essai, un test de conformité des daphnies est réalisé avec un toxique de référence pour vérifier leur sensibilité et l'absence de variation significative des réponses biologiques entre les différents élevages au cours du temps. Pour ce faire, le chlorure de sodium (NaCl) a été utilisé comme toxique de référence dans le cadre d'un test de toxicité aiguë en 48 heures conformément aux recommandations d'ECCC. En accord avec les tendances observées au sein du LEEQ, la $CL_{50} - 48h$ doit se situer entre $4,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ et $6,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pour attester de la conformité des sujets.

Les essais de conformité ont été réalisés dans de l'eau de culture reconstituée avec une gamme de concentration de 4,1, 4,9, 5,9, 7,1 et $8,5 \text{ g} \cdot \text{NaCl} \cdot \text{L}^{-1}$. Cette gamme n'a pas besoin de donner lieu à trois pourcentages d'effet observé compris entre 10 % et 90 %, à condition que la $CL_{50} - 48h$ observée avoisine les $5,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (moyenne observée par le LEEQ). L'eau de culture seule a été considérée comme témoin. Les milieux de traitement et de contrôle ont été soumis à une analyse de la température, de la conductivité, du pH et de l'oxygène dissous. Dix nouveau-nés ont été relâchés dans un b  cher de 250 mL contenant 100 mL d'échantillon, de manière à ne pas dépasser une charge maximale d'organismes vivants de $0,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (LEEQ, 2023a). De plus, des précautions ont été prises pour éviter de diluer la concentration préparée lors de la libération des daphnies. Les b  chers ont été exposés sous une intensité lumineuse de 700 lx avec une photopériode de 16 heures et 8 heures d'obscurité à $20,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48 ± 1 heure. Pendant la période d'exposition, les daphnies ne sont pas nourries. Les

paramètres de l'eau sont analysés le premier et le dernier jour de l'expérience. Les daphnies ont été observées pour leur immobilisation ou mort en agitant légèrement le b cher; celles ne savant pas nager après 15 secondes et ne présentant aucun signe cardiaque ont été comptabilisées.

2.3.2 Détermination des CE₅₀ – 48h et CL₅₀ – 48h

Dans le cadre de ces essais, les objets d'étude étant des substances chimiques pures, les résultats sont exprimés en milligrammes par litre. Ici, la gamme a été choisie afin de donner lieu à au moins trois pourcentages d'effet observé compris entre 10 % et 90 %, en se basant sur des résultats d'essais préliminaires. Un facteur de dilution approprié (*f*) de 0,72 a été retenu (Yang et al., 2019). Ainsi, les essais ont été réalisés dans de l'eau de culture reconstituée avec une gamme de concentration de 80,0, 112,0, 156,0, 216,0 et 300,0 mg L⁻¹ en APFO. La procédure a été réalisée de manière statique et dans les mêmes conditions (nombre d'organismes, témoin, volumes, photopériode, prises de mesures) que celles décrites dans la sous-section 2.3.1. Chaque traitement a été répété six fois. La distinction entre les deux mesures a été réalisée au moment de l'évaluation des statuts d'immobilité et de mortalité au bout de 48 heures et la toxicité a été exprimée en pourcentage d'effet et de mortalité. En détail, les daphnies d'essai présentant des mouvements anormaux (membres paralysés, incapacité à nager, réflexes manquants) par rapport aux groupes témoins après une agitation répétée du milieu ont été classées comme immobiles. Par la suite, pour distinguer la mort de l'immobilité, chaque daphnie a été observée à l'aide d'un microscope binoculaire. *D. magna* a été class e comme morte si aucun battement de cœur n'a pu être détecté dans les 15 s suivant l'agitation. Un ajustement de courbe concentration-réponse a été appliqué sur les données observées selon le modèle de Hill (voir 2.5) pour établir les valeurs de CE₅₀ – 48h et CL₅₀ – 48h.

2.3.3 Incidence du L-Tryptophane sur la toxicité de l'APFO

Afin de déterminer l'influence du Tryptophane sur la toxicité de l'APFO, une seconde phase de bioessais a été conduite en présence de ce dernier. Pour ce faire, chaque échantillon a été

préparé avec de l'eau de culture reconstituée, enrichie en L-tryptophane à hauteur de 14,8, 74,0 et 148,0 mg·L⁻¹. Cette gamme a été choisie afin de respecter des ratios (*Trp:APFO*) de 0,1:1, 0,5:1 et 1:1. L'élaboration d'un groupe témoin visait à valider l'absence d'effet dû à la présence de protéines, et un essai à blanc sans ajout d'APFO et d'acide aminé a également été mené. Chaque traitement a été répété six fois. Ici, les concentrations nominales en APFO ont été préparées de manière identique à celles présentées dans la sous-section 2.3.2. De même, les statuts d'observation et les ajustements de calcul ont suivi la même logique qu'énoncée précédemment.

2.3.4 Critères d'acceptabilité

Pour satisfaire aux différents aspects de contrôle-qualité, cinq éléments de contrôles ont été considérés (LEEQ, 2023b), à savoir : l'acceptabilité des groupes contrôles, la conformité du résultat de l'essai avec toxique de référence, la qualité de la relation concentration-réponse, l'état de santé et de conformité de l'organisme et le respect des conditions d'essai.

Validité du groupe témoin

Dans les groupes de contrôle, la proportion de décès ou de comportements inhabituels, comme l'immobilité ou d'autres comportements anormaux, est de 5 % ou moins. Tout pourcentage dépassant cette limite entraîne le rejet automatique de l'essai et une investigation vérifiant que le mode opératoire d'essai a été strictement appliqué.

Validité du test de sensibilité

Les résultats de l'essai avec le toxique de référence doivent se situer dans une plage de ± 2 l'écart-type (σ). Si les résultats se trouvent en dehors de la plage de $\pm 3\sigma$, le résultat de l'essai est rejeté. De plus, une investigation est menée sur l'élevage pour déceler tout signe de mauvaises conditions (stress, présence d'*ephippium*, maladie ou autre). Le cas échéant, l'évènement est consigné et l'élevage est renouvelé. Cependant, dans le cas où, ils se situent entre $\pm 2\sigma$ (limite d'avertissement) et $\pm 3\sigma$ (limite de contrôle), les résultats de l'essai peuvent

être acceptés sous réserve de démontrer qu'il ne représente pas une tendance hors de contrôle, selon les circonstances.

Validité de la relation concentration-réponse

La plage de dilution doit être conçue de manière à permettre la détection d'effets partiels. Si la plage de dilution ne révèle que des effets classés comme « *nuls* » ou « *totaux* », cela indique généralement qu'il existe un écart trop important entre les concentrations en raison d'un facteur de dilution excessif (Faburé et al., 2022). Le cas échéant, la gamme de concentration est réajustée de manière à observer au moins trois pourcentages d'effet observé compris entre 10 % et 90 %. De plus, aucune différence significative entre des essais consécutifs ne doit être observée pour l'établissement de la relation concentration-réponse.

Validité de la santé et de la conformité des daphnies

Les daphnies utilisées dans les essais doivent être des nouveau-nés âgés de 24 heures ou moins. L'âge moyen des femelles lors de leur première ponte ne doit pas excéder 12 jours. Ces femelles doivent présenter un taux moyen de ponte d'au moins 15 nouveau-nés lorsqu'elles ont entre 12 et 37 jours d'âge. La mortalité des génitrices au cours des 7 jours précédant l'essai ne doit pas excéder 15 %. Enfin, aucun *ephippium* et aucun mâle ne doit être observé dans l'élevage.

Validité des conditions d'essai

Chaque paramètre énoncé dans la section 2.3 doit satisfaire aux exigences de la méthode. Aucune variation de ces paramètres, hors des marges de tolérance énoncées, n'est acceptée pendant tout le long des expérimentations (sauf indication contraire et justifiée).

2.4 Approche analytique

À la suite des bioessais, une série d'analyses complémentaires a été effectuée pour expliquer la diminution de toxicité observée chez *D. magna*. L'extinction de fluorescence a été utilisée pour démontrer l'interaction entre l'APFO et le L-Trp, et pour préciser la nature de cette

interaction. Parallèlement, la spectroscopie infrarouge a servi à confirmer la formation d'un complexe Trp-APFO, en identifiant les groupes fonctionnels impliqués et en mettant en évidence les modifications du micro-environnement lors de la formation du complexe.

2.4.1 Suivi de la fluorescence

L'étude des interactions entre le L-Trp et l'APFO a été réalisée par analyse de l'extinction de la fluorescence du L-Trp à l'aide d'un spectromètre de fluorescence *Cary Eclipse* (Argilent, USA). Le balayage a été effectué à une longueur d'onde d'excitation de 200 à 400 nm avec un incrément de 2 nm et l'émission a été détectée à une longueur d'onde de 305 à 600 nm. Les données d'extinction de fluorescence ont ensuite été quantitativement analysées à l'aide de l'équation de Stern-Volmer (1.3), présentée dans la sous-section 1.2.3.1. Pour approfondir la compréhension des mécanismes d'extinction, ces résultats ont été soumis à un ajustement à l'aide de l'équation de Stern-Volmer modifiée (Lakowicz, 2006):

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2.1)$$

Où,

F_0 et F sont l'intensité de fluorescence du L-Trp sans et avec la présence de l'APFO;

f_a est la fraction de la fluorescence initiale correspondant au L-Trp de liaison;

K_a est la constante d'extinction effective ($L \cdot mol^{-1}$);

$[Q]$ est la concentration d'APFO ($mol \cdot L^{-1}$).

De même, pour un mécanisme d'extinction statique impliquant une liaison, où l'extinction de la fluorescence résulte de la formation d'un complexe entre un fluorophore et un extincteur, l'équilibre entre la molécule libre et la molécule liée peut être décrit par l'équation de Hill modifiée (D. Wei et al., 2015) :

$$Log \frac{F_0 - F}{F} = Log K_b + n Log [Q] \quad (2.2)$$

Où,

F_0 et F sont l'intensité de fluorescence du L-Trp sans et avec la présence de l'APFO;

K_b est la constante de liaison ($L \cdot mol^{-1}$);

n est le coefficient de Hill;

$[Q]$ est la concentration d'APFO ($mol.L^{-1}$).

Cette seconde équation a permis de déterminer le nombre de sites de liaison du L-Trp pour l'APFO et d'étudier les paramètres thermodynamiques associés à la formation du complexe Trp-APFO.

2.4.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'étude des groupes fonctionnels mis en jeu dans le complexe Trp-APFO a été réalisée à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (PerkinElmer, USA). Le complexe a été formé en solution par ajout du L-Trp après la dissolution totale de l'APFO dans un milieu de culture de *D. magna*, puis congelé et récupéré sous forme de poudre par lyophilisation avant analyse. Le processus de lyophilisations a été réalisé à température de $-106,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et à une pression de 0,3 mbar pendant 72 heures. L'analyse des échantillons a été réalisée à une résolution de 4 cm^{-1} dans une plage de 400 à $4\ 000\text{ cm}^{-1}$ en mode transmittance.

2.5 Traitements statistiques des données

L'ensemble des données de toxicité collectées dans cette étude ont été modélisées à l'aide de la macro Microsoft Excel *Regtox* version 7.1.2, développée par Vindimian, Robaut, & Fillion (1983). Ce programme de régression utilise un algorithme basé sur une technique d'itération successive (régression non linéaire) pour déterminer les solutions optimales, en intégrant le modèle de Hill (voir équation (2.3)). Il permet d'estimer les paramètres initiaux ainsi que les concentrations d'effet (CE_x) avec des intervalles de confiance à 95 %, calculés à l'aide d'une

méthode de « *bootstrap* » comportant 500 simulations de type Monte-Carlo (Vindimian et al., 1983).

$$Effet_{observé} = Bas + (Haut - Bas) * \frac{[A]^H}{[A]^H + CE_{50}^H} \quad (2.3)$$

Où,

Bas désigne l'effet observé pour une concentration nulle ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

Haut désigne l'effet simulé lorsque la concentration tend vers l'infini ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

$[A]$ est la concentration nominale de la substance testée ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

H est le nombre de Hill qui caractérise la pente de la relation dose-réponse au point d'inflexion;

CE_{50} est la concentration d'effet médian ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

En complément, une analyse de variance (ANOVA, unidirectionnelle) suivie d'un test post-hoc de Tukey a été appliquée aux données pour évaluer les différences significatives entre les traitements et les contrôles à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 10.2.2 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>). Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart type avec le coefficient de détermination R^2 associé. Toutes les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Ce chapitre des résultats, présente d'abord les essais de toxicité réalisés sur *Daphnia magna* pour évaluer l'impact de l'APFO en présence de L-Trp. Ensuite, ce chapitre explore les caractéristiques thermodynamiques de ces interactions grâce à une analyse de spectroscopie de fluorescence, mettant en évidence la formation du complexe Trp-APFO. Enfin, les interactions moléculaires entre le L-Trp et l'APFO sont caractérisées à l'aide d'une analyse de spectroscopie IRTF.

3.1 Résultats contrôle-qualité

Les résultats des essais de sensibilité réalisés sur les différents élevages de *D. magna* sont présenté sur la Figure 3.1.

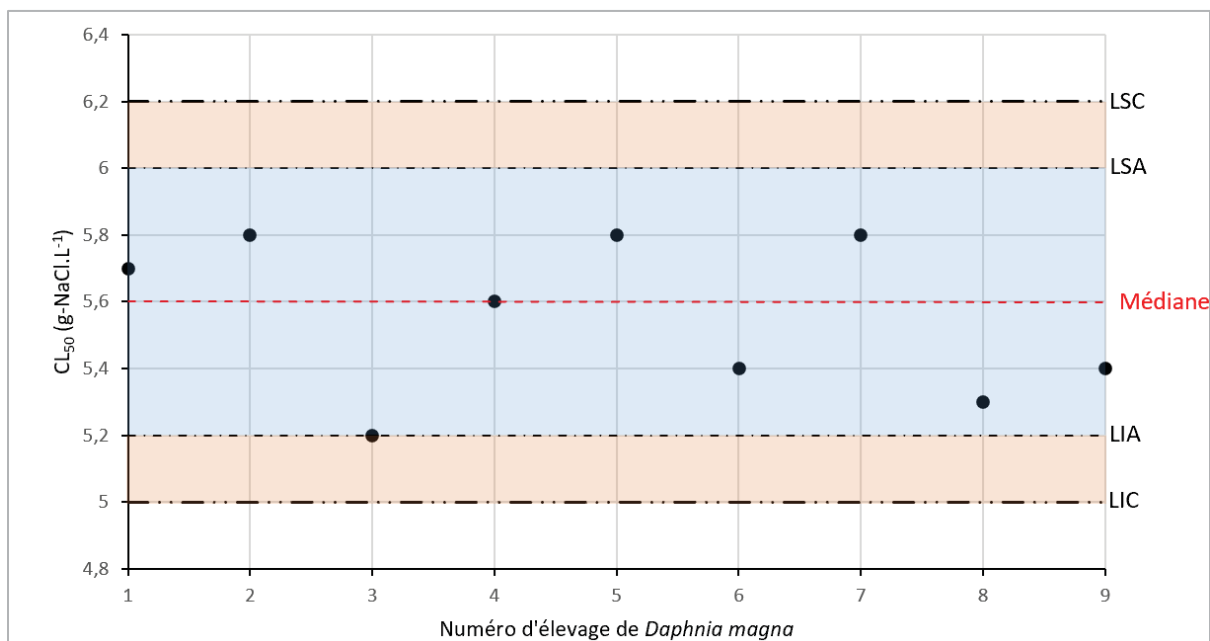


Figure 3.1 Diagramme de contrôle des essais de sensibilité de *D. magna* avec le chlorure de sodium (NaCl)

Les limites inférieures et supérieures d'avertissement (LIA, LSA) et de contrôles (LIC, LSC) ont été établies à 5,2, 6,0, 5,0 et 6,2 g-NaCl·L⁻¹, respectivement. La médiane des essais avec le toxique de référence a été déterminée à 5,6 g-NaCl·L⁻¹. Comme le montre le diagramme de contrôle, aucun essai n'a été mesuré en dehors des LIA et LSA (zone bleue). Ces observations indiquent que les résultats des essais sont restés dans une plage de variabilité acceptable, ce qui implique que les conditions expérimentales étaient stables et que les bioessais ont été réalisés de manière contrôlée, sans dérive ni anomalie notable chez les sujets d'étude. Par ailleurs, aucune apparition indésirable de mâles ou de comportements atypiques n'a été faite au sein des élevages de *D. magna*, ce qui indique une stabilité génétique et physiologique des populations. Lors des essais de toxicité (référence ou avec APFO), aucun décès ou comportement inhabituel n'a été observé dans les groupes témoins. Chaque nouveau-né utilisé était âgé de moins de 24 heures et les génitrices présentaient un état de santé acceptable (pas de mortalité, âge et taux de pontes). De plus, aucun paramètre physico-chimique n'a dépassé les limites de tolérance de l'organisme, que ce soit avant ou après les essais, minimisant ainsi les risques de biais potentiels.

3.2 Mesures de la toxicité aiguë de l'APFO chez *D. magna*

Des relations concentration-réponse ont été obtenues pour des ratios molaires (*Trp:APFO*) de 0:1, 0,1:1, 0,5:1 et 1:1 (Figure 3.2), à partir desquelles les valeurs de CL₅₀ – 48h (mortalité) et de CE₅₀ – 48h (immobilité) ont été estimées. Les valeurs de CL₅₀ – 48h, CE₅₀ – 48h, intervalles de confiance et coefficients de corrélation (R²) sont présentés en Annexe (Tableau-A II-1). Chaque point sur les Figure 3.2.a et 3.2.b, représente le pourcentage d'effet moyen observé et l'intervalle de confiance associé selon la concentration d'APFO. Les valeurs de CL₅₀ – 48h et CE₅₀ – 48h de référence ont été évaluées respectivement à 137,0 et 109,0 mg·L⁻¹. Ces valeurs concordent avec celles communément rapportées dans la littérature, environ 130,0 mg·L⁻¹ (Ji et al., 2008 ; Yang et al., 2019) , ce qui valide la fiabilité de la méthodologie employée et confirme que les essais ont été réalisés dans des conditions comparables à celles des études antérieures. Comme l'indiquent les valeurs de R² ≥ 0,80

(Tableau-A II-1), l'ensemble des mesures ont montré une corrélation satisfaisante avec le modèle de relation concentration-réponse décrit par l'équation (2.3).

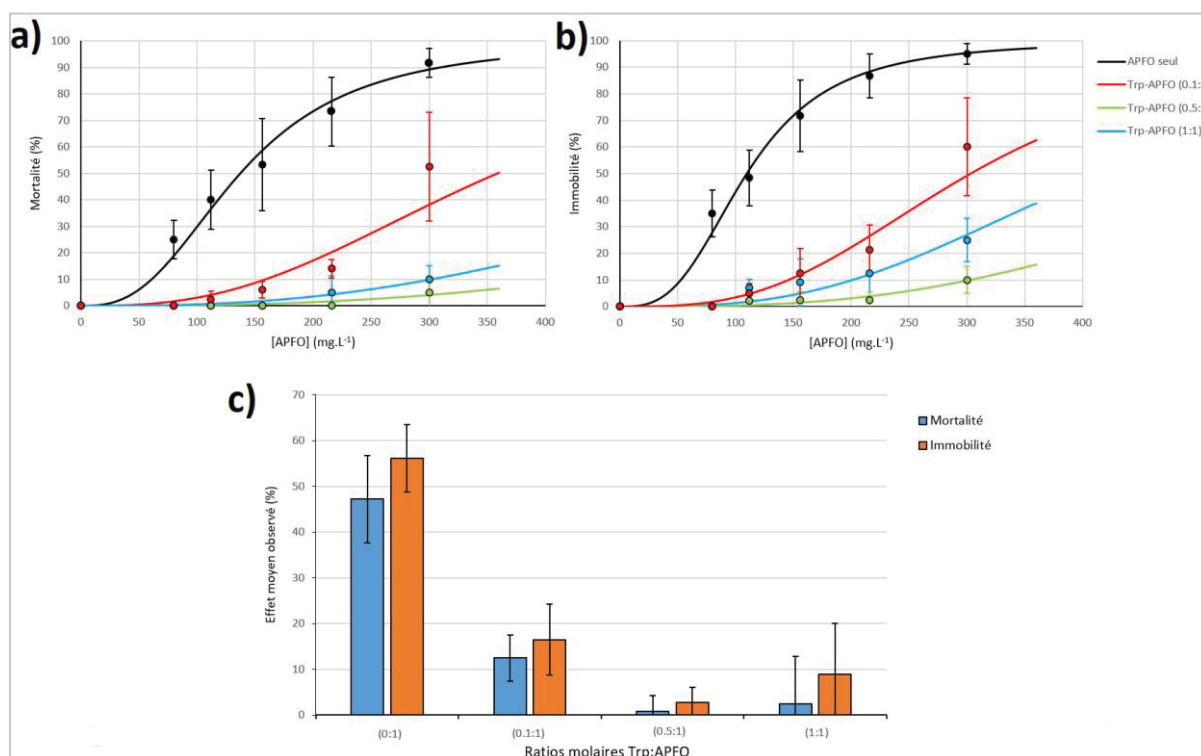


Figure 3.2 Relations de concentration-réponse de *D. magna* après 48 h d'exposition selon le rapport Trp:APFO, a) pour l'observation de la mortalité et b) pour l'observation de l'immobilité. c) Moyennes des effets observés selon le rapport Trp:APFO. Toutes les relations différaient significativement ($p < 0,005$) de la relation de référence

Les résultats des analyses de toxicité aiguë montrent que le L-Trp a conduit à une diminution de la toxicité de l'APFO. En effet, toutes les valeurs de CL50 – 48h et CE50 – 48h en présence de L-Trp ont été supérieures aux valeurs de référence (Tableau-A II-1). Après 48 h d'exposition, l'effet du L-Trp sur la mortalité et de l'immobilité chez *D. magna* était bien associé à la présence de l'acide aminé. Cependant, les relations concentration-réponse ne présentent pas de corrélation linéaire entre les rapports molaires. Cette observation suggère que l'interaction entre le L-Trp et l'APFO n'est pas directement dose-dépendante. Au contraire, elle suggère la présence d'un ratio molaire optimal aux alentours de 0,5 en L-Trp (Figure 3.2.c), pour lequel le L-Trp réduit le plus efficacement la toxicité de l'APFO. Au-

delà de ce rapport, l'efficacité du L-Trp pour atténuer la toxicité de l'APFO ne varie plus de manière monotone, possiblement en raison de la formation d'interactions transitoires, d'effets de saturation, d'interactions compétitives, voire d'une limite dans le rendement de la réaction. Ces observations révèlent un équilibre stœchiométrique spécifique entre le L-Trp et l'APFO, avec un rapport optimal équivalent de 1:2, où chaque molécule de L-Trp semble pouvoir se lier à deux molécules d'APFO. Un excès de L-Trp pourrait perturber cet équilibre en provoquant l'aggrégation non désirée de L-Trp ou des effets de compétition, ce qui diminue l'efficacité de la liaison et augmente la proportion d'APFO libre ou partiellement lié, accroissant ainsi sa biodisponibilité et sa toxicité. Cette dynamique expliquerait la réaugmentation de la toxicité comme le montre le passage au ratio 1:1.

Comme le montrent les Figure 3.2.a et 3.2.b, la présence de L-Trp a conduit à une diminution des pentes des relations concentration-réponse, provoquant un aplatissement des courbes de traitement par rapport à la courbe de référence (courbe noire). Cette modification de la pente reflète une moins grande sensibilité des organismes aux concentrations croissantes d'APFO en présence de L-Trp. Cette moindre sensibilité a de forte chance d'être due à l'association entre le L-Trp et l'APFO, modifiant la biodisponibilité, la capacité d'interaction et de migration de ce dernier. Les tests de toxicité ont révélé que les trois ratios 0,1:1, 0,5:1 et 1:1 conduisent à une baisse significative de la mortalité ($p = 0,0036$, $p < 0,0001$ et $p < 0,0001$) et de l'immobilité ($p = 0,0029$, $p < 0,0001$ et $p = 0,0001$). L'atténuation des effets toxicologiques de l'APFO s'est révélée plus marquée pour la mortalité que l'immobilité chez *D. magna*. Cette différence indique que l'immobilité est un indicateur plus sensible que la mortalité pour détecter les effets toxiques aigus de l'APFO, et que les mécanismes sous-jacents à l'immobilité pourraient être affectés à des concentrations plus faibles que celles provoquant la mortalité. En outre, bien que l'ajout de L-Trp réduise la toxicité, la persistance d'effets nocifs, semble indiquer qu'une fraction d'APFO reste libre et biologiquement active malgré la présence de L-Trp ou que certains mécanismes de toxicité de l'APFO ne sont pas affectés par sa liaison avec le L-Trp.

3.3 Validation expérimentale du complexe Trp-APFO

Cette section décrit les différentes étapes du suivi de l'extinction de la fluorescence du L-Trp, aboutissant à la mise en évidence de la formation d'un complexe Trp-APFO.

3.3.1 Analyse des spectres d'excitation et d'émission

L'application de la spectroscopie de fluorescence permet d'obtenir les spectres d'excitation et d'émission du L-Trp en absence et présence d'APFO à 293 K (Figure 3.3). Comme le montre la Figure 3.3, les intensités maximales d'étude ont été détectées à 300 nm et 362 nm, respectivement pour l'excitation et l'émission. Un léger décalage vers les infrarouges a été observé par rapport aux valeurs théoriques (280 et 350 nm). Ce décalage vers le rouge montre la formation de liaisons hydrogène entre le L-Trp et le solvant (Ghisaidoobe & Chung, 2014).

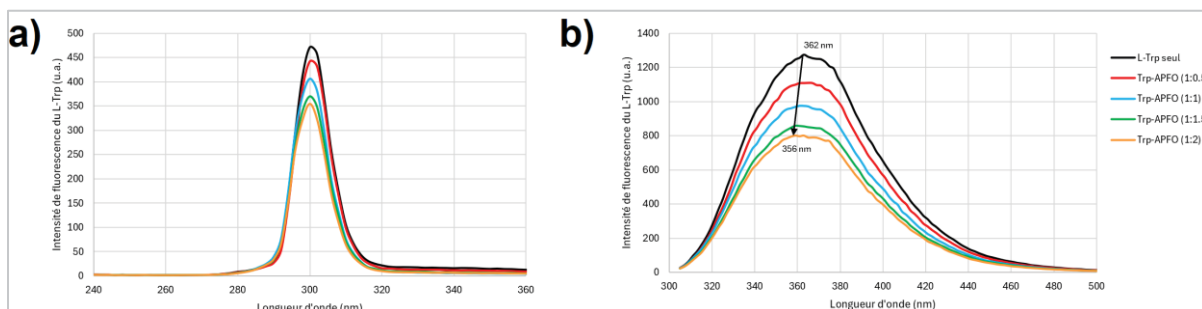


Figure 3.3 Spectres (a) d'excitation et (b) d'émission de l'interaction entre le L-Trp et l'APFO à 293 K

De la même manière, les Figure 3.3.a et Figure 3.3.b montrent que les intensités d'excitation et d'émission ont progressivement diminué avec l'augmentation du dosage en APFO. Cette diminution indique une interaction directe entre l'APFO et le groupement indole du L-Trp, modifiant son comportement de fluorescence. La réduction des intensités de fluorescence suggère que l'APFO altère l'état électronique du L-Trp, possiblement en influençant les transitions électroniques ou en perturbant l'organisation moléculaire. Ces observations corroborent les études antérieures (Jiao, Zou, Yang, Tsang, & Chen, 2022 ; Yan et al., 2021)

qui ont documenté l'interaction entre l'APFO et le L-Trp. De plus, l'augmentation du ratio molaire a conduit à des diminutions respectives de 13, 24, 33 et 37 % par rapport à l'intensité de référence. Cette diminution non-uniforme, avec un ajout constant en APFO, démontre une relation non-linéaire entre la concentration en APFO et la diminution de la fluorescence. Ce phénomène tend à montrer une limite dans le rendement de la réaction.

En outre, l'augmentation du dosage en APFO a conduit à un décalage progressif de la longueur d'onde du pic d'émission vers le bleu de 362 à 356 nm. Ce déplacement vers le bleu indique une hydrophobicité accrue dans le micro-environnement du L-Trp, ce qui montre que l'APFO induit un repliement ou un regroupement plus hydrophobe des molécules de L-Trp, réduisant ainsi leur exposition aux solvants polaires (Chen & Guo, 2009). Ce changement spectral confirme que l'interaction entre l'APFO et le L-Trp affecte non seulement l'intensité de la fluorescence, mais aussi la nature du micro-environnement du L-Trp, ce qui pourrait avoir des implications pour la stabilité et la réactivité de ces complexes dans des conditions environnementales similaires.

3.3.2 Mesure du mode de complexation

Pour comprendre le mécanisme impliqué dans l'extinction de la fluorescence du L-Trp, l'équation de Stern-Volmer (1.3) a été utilisée pour ajuster les données expérimentales à différentes températures (293, 298, et 308 K) (Figure 3.4). Cette gamme de température a été choisie pour minimiser les variations enthalpiques et pour des raisons de pertinence environnementale. Cette approche permet de distinguer les contributions potentielles des mécanismes d'extinction dynamique (par collision) et statique (par formation de complexes non fluorescents) à la perte de fluorescence observée. Comme le montre la Figure 3.4.a, les modélisations des données de fluorescence ont montré une corrélation de $R > 0,99$ avec l'équation de Stern-Volmer, ce qui confirme que le modèle est approprié pour décrire les interactions entre le L-Trp et l'APFO dans les conditions expérimentales. L'élévation de la température a entraîné une hausse du coefficient de Stern-Volmer (K_{SV}), indiquant que les

collisions moléculaires à haute température augmentent la probabilité d'extinction de fluorescence par collision.

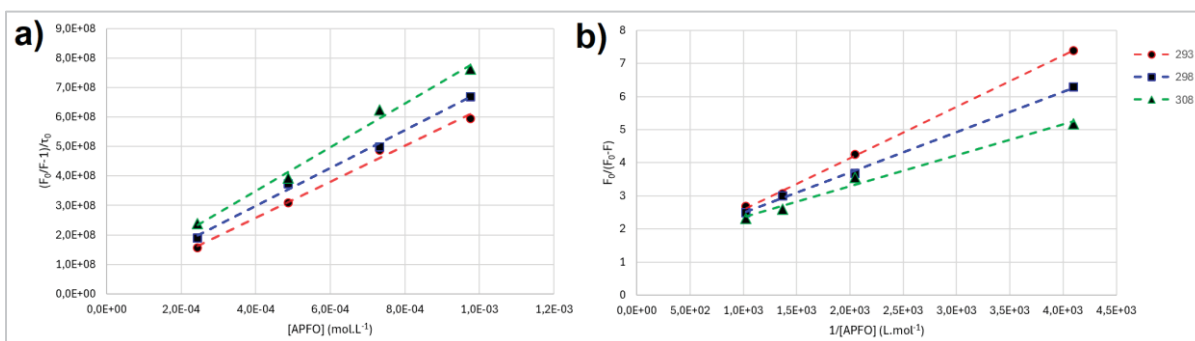


Figure 3.4 Digramme de (a) Stern-Volmer et (b) Stern-Volmer modifié pour l'extinction de L-Trp en présence d'APFO à 293, 298 et 308 K

L'analyse plus approfondie des coefficients du taux de désactivation (K_q) obtenus (Tableau 3.1), révèle une situation plus complexe. Les valeurs de K_q , qui reflète l'impact des collisions ou de la diffusion moléculaire sur le taux de décroissance de la fluorescence, ont toutes été évalué au-dessus de la constante de vitesse d'extinction maximale par collision diffusive ($2,0 \cdot 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Pan et al., 2010). Cette observation indique que l'extinction ne peut pas être expliquée uniquement par un processus dynamique basé sur les collisions, car les vitesses observées dépassent les limites physiques d'un mécanisme purement diffusif. Elle suggère fortement qu'un mécanisme d'extinction statique est également impliqué dans les interactions entre le L-Trp et l'APFO. Ainsi, l'APFO semble interagir avec le L-Trp pour former un complexe stable qui empêche la fluorescence du L-Trp. La coexistence de ces deux mécanismes démontre que la réaction de complexation entre le L-Trp et l'APFO n'est pas totale. Si la complexation était totale, toutes les molécules de L-Trp seraient liées à l'APFO, entraînant uniquement une extinction statique due à la formation de complexes non fluorescents. Cependant, la présence d'extinction dynamique révèle qu'une fraction des molécules de L-Trp reste libre en solution et peut encore interagir par collision avec l'APFO. Ces observations reflètent un équilibre dynamique entre les formes libres et complexées du L-Trp, soulignant la nature partielle et réversible de leur interaction avec l'APFO.

Tableau 3.1 Constante de vitesse d'extinction de Stern-Volmer, coefficient du taux de désactivation et constante extinction apparente de Stern-Volmer pour l'interaction entre le Trp et L'APFO selon les équations de Stern-Volmer non-modifiée et modifiée à 293, 298 et 308 K. R^2 est le coefficient de corrélation

T (K)	K_{SV} (L·mol ⁻¹)	K_q (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)	R^2	K_a (L·mol ⁻¹)	R^2
293	$6,1 \times 10^4$	$6,1 \times 10^{12}$	0,99	$6,3 \times 10^2$	0,99
298	$6,4 \times 10^4$	$6,4 \times 10^{12}$	0,99	$8,3 \times 10^2$	0,99
308	$7,4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^{12}$	0,99	$1,1 \times 10^3$	0,99

Pour déterminer le mécanisme dominant, les données ont été soumises à un deuxième ajustement à l'aide de l'équation de Stern-Volmer modifiée (2.1). Dans ce contexte, étant donné que le L-Trp est libre en solution, la fraction de fluorophores accessibles (f_a) a été fixée à 1 (Wei et al., 2015), signifiant que l'ensemble des molécules de L-Trp sont entièrement accessibles pour interagir avec les molécules d'APFO. Cette hypothèse simplifie l'analyse en considérant que chaque fluorophore a une probabilité égale d'interagir avec l'extincteur. Comme le montre la Figure 3.4.b, les résultats obtenus confirment une augmentation de la constante d'extinction apparente Stern-Volmer (K_a) avec l'augmentation de la température (Tableau 3.1). Ce résultat met en évidence un mécanisme d'extinction dynamique prépondérant. À mesure que la température s'élève, la diffusion moléculaire s'accélère, augmentant la fréquence des collisions entre le L-Trp et l'APFO, ce qui conduit à une extinction de fluorescence par collision plus prononcée. Cette analyse révèle également que l'élévation de la température favorise la dissociation de complexes faiblement liés et réciproquement. Cette observation est particulièrement intéressante, car elle suggère que l'augmentation de la température affaiblit les forces responsables de la formation du complexe Trp-APFO, conduisant ainsi à la dissociation de ces complexes et réduisant l'impact de l'extinction statique au profit d'un mécanisme d'extinction dynamique.

Pour valider la présence d'un mode d'extinction statique, des expériences à des concentrations extrêmes ont été réalisées à 293 K (Figure 3.5). Comme l'illustre la Figure 3.5, les résultats montrent que le tracé expérimental de Stern-Volmer s'écarte significativement du modèle linéaire attendu pour une extinction purement dynamique ou

statique, indiquant une combinaison des deux mécanismes. La courbure progressive observée démontre la coexistence des mécanismes d'extinction dynamique et statique, confirmant que l'APFO forme des complexes avec le L-Trp. À des concentrations plus élevées, ces complexes deviennent plus prédominants, renforçant l'extinction globale. La formation de ces complexes indique une interaction spécifique entre les deux molécules, qui a nécessairement des implications importantes pour comprendre comment le L-Trp peut influencer la toxicologie de l'APFO.

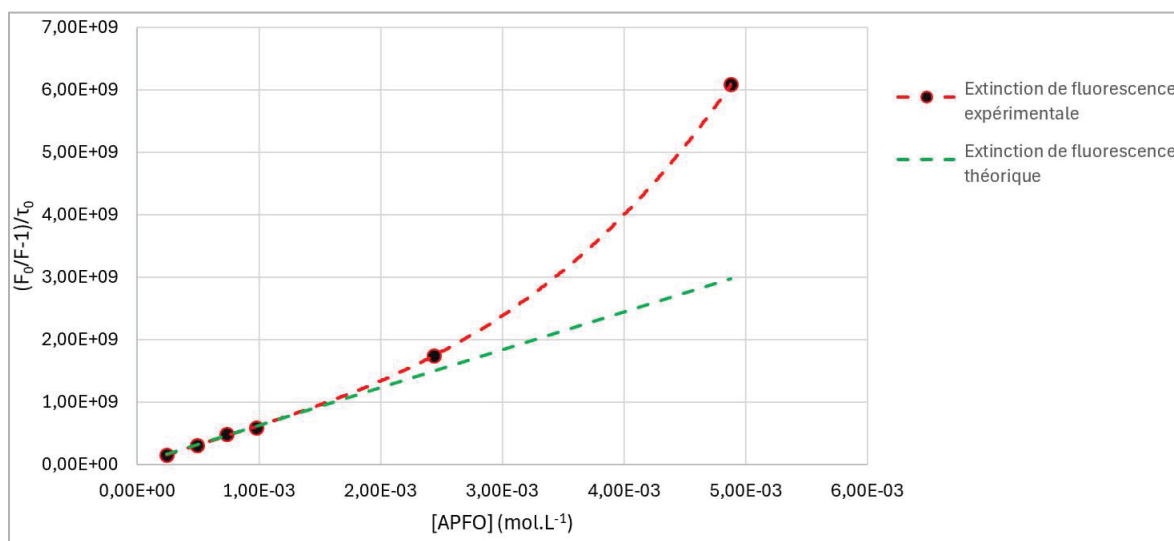


Figure 3.5 Comparaison des tracés de Stern-Volmer théorique et expérimentale pour une gamme de concentration étendue à 293 K

3.4 Nature du mode de liaison et paramètres thermodynamiques du complexe

Afin de déterminer la nature des liaisons impliquées dans l'équilibre du complexe Trp-APFO, l'équation de Hill modifiée (2.2) a été utilisée pour la modélisation des données à 293, 298 et 308 K. D'après la Figure 3.6.a, la modélisation a de nouveau révélé une correspondance entre les données expérimentales et le modèle de liaison de site décrit par l'équation de Hill modifiée. L'augmentation de la température a conduit à une diminution de l'inclinaison des droites modélisées, ce qui se traduit par une baisse de la constante de liaison (K_b) du complexe Trp-APFO. Cette observation est en accord avec les résultats précédents et

suggère que les interactions qui stabilisent le complexe Trp-APFO sont sensibles à l'élévation de la température.

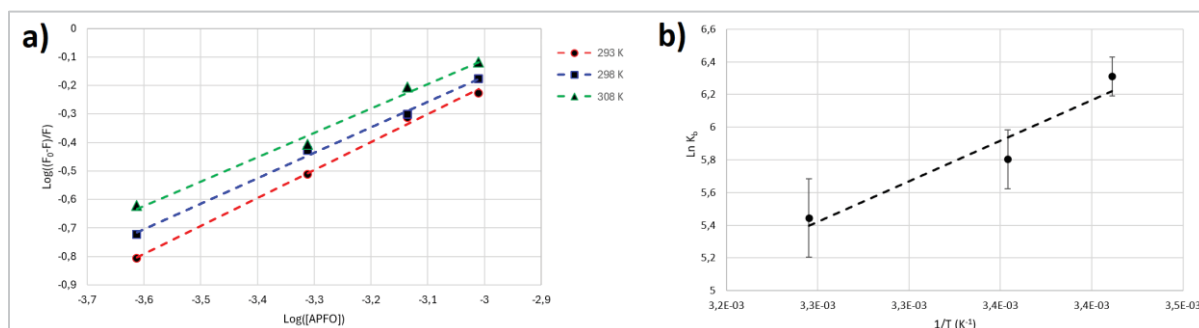


Figure 3.6 (a) Diagramme de Hill modifiée pour la liaison du L-Trp avec l'APFO à 293, 298 et 308 K; (b) Tracé de Van't Hoff de $\ln K_b$ en fonction de $1/T$ pour la liaison de Trp avec l'APFO

Selon le Tableau 3.2, les valeurs du coefficient de Hill (n) sont proches de 1, ce qui confirme que l'indole du L-Trp constitue effectivement un site de liaison spécifique pour les molécules d'APFO. En outre, ces valeurs de n très proches de 1 suggèrent que la liaison est non-coopérative, voire indépendante. Une liaison indépendante signifie que la fixation d'une molécule d'APFO à l'indole du L-Trp ne modifie pas de manière significative l'affinité du site de liaison pour d'autres molécules d'APFO. Ce type de liaison implique que chaque site de liaison agit de manière autonome, sans influence mutuelle, ce qui est caractéristique de certaines interactions spécifiques indépendantes (non allostériques). Par conséquent, bien la valeur de n ne permet pas conclure sur le nombre de liaisons possible, il n'exclut pas la possibilité que l'indole puisse offrir plusieurs sites de liaison équivalents. Dans le cadre des essais de toxicité réalisés sur *D. magna* à 293 K, ces observations soutiennent l'hypothèse que le L-Trp est capable de former des liaisons indépendantes de part et d'autre du plan de l'indole avec les molécules d'APFO. Ce schéma réactionnel serait cohérent avec l'existence d'un rapport molaire optimal aux alentours de 0,5, ce qui correspondrait une nouvelle fois à l'atténuation optimale des effets toxiques observés chez *D. magna*.

Tableau 3.2 Paramètres de liaison, y compris la constante de liaison (K_b), le coefficient de Hill (n) et les paramètres thermodynamiques relatifs (énergie libre de Gibbs ΔG , enthalpie ΔH et entropie ΔS pour l'interaction entre le L-Trp et l'APFO à 293, 298 et 308 K. R^2 est le coefficient de corrélation

T (K)	K_b (L·mol ⁻¹)	n	R^2	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)	R^2
293	$5,0 \times 10^2$	0,98	0,99	-46,2	-88,1	-20,4	0,93
298	$3,2 \times 10^2$	0,90	0,98			-20,0	
308	$2,5 \times 10^2$	0,86	0,99			-19,0	

D'après la Figure 3.6.b, le tracé de Van't Hoff révèle que l'enthalpie du système n'a pas connu de variations significatives, ce qui montre que les interactions thermodynamiques entre le L-Trp et l'APFO sont suffisamment stables sur la plage de températures étudiée. Cette stabilité enthalpique relative indique que les forces impliquées dans la formation du complexe Trp-APFO ne changent pas radicalement avec la température. D'après le Tableau 3.2, la spontanéité de la réaction, indiquée par les valeurs de $\Delta G < 0$ entre 293 et 308 K, confirme que l'association entre le L-Trp et l'APFO se produit naturellement et sans besoin d'apport énergétique externe. Cette observation renforce l'idée que le complexe formé est thermodynamiquement favorable. En approfondissant l'analyse, les valeurs de ΔH et ΔS négatives suggèrent que les interactions principales stabilisant le complexe Trp-APFO sont de nature attractive, telles que les interactions de van der Waals et les liaisons hydrogène. L'ordre de grandeur de ΔH est également en accord avec la contribution combinée de ces deux types d'interactions. La négativité de ΔH indique que la formation du complexe est exothermique, ce qui signifie que l'énergie est libérée lors de la formation des liaisons. Tandis que la négativité de ΔS suggère une diminution du désordre du système, typiquement associée à la formation de liaisons hydrogène où les molécules deviennent plus ordonnées. De même, la valeur négative de ΔH combinée à la diminution de K_b avec l'augmentation de la température, démontre que le complexe Trp-APFO est déstabilisé à des températures plus élevées.

3.5 Identification des groupements de liaison du complexe

Une analyse spectrale IRTF a été réalisée pour identifier les groupes fonctionnels impliqués dans l'interaction entre le L-Trp et l'APFO. Comme le montre la Figure 3.7, des pics caractéristiques ont été obtenus pour l'identification de chaque molécule dans la plage d'étude. Pour le L-Trp, les bandes situées à $\sim 3402\text{ cm}^{-1}$ (étirement -N-H du groupe amine); $\sim 3012\text{ cm}^{-1}$ et $\sim 2728\text{ cm}^{-1}$ (étirement C-H); $\sim 2076\text{ cm}^{-1}$ (étirement -C=N-); $\sim 1661\text{ cm}^{-1}$ et $\sim 1584\text{ cm}^{-1}$ (étirement antisymétrique de -COO^- associé aux modes de flexion antisymétriques $\text{H}_2\text{N-H}$); $\sim 1455\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1404\text{ cm}^{-1}$ et $\sim 1355\text{ cm}^{-1}$ (étirement C=C aromatique); et $\sim 742\text{ cm}^{-1}$ (courbure C-H du cycle benzénique ortho-substitué) peuvent être observés. De même pour l'APFO, les bandes situées à $\sim 3545\text{ cm}^{-1}$ (étirement O-H); $\sim 1755\text{ cm}^{-1}$ (étirement C=O); et à $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1145\text{ cm}^{-1}$ et $\sim 1018\text{ cm}^{-1}$ (étirement C-F) peuvent être observés.

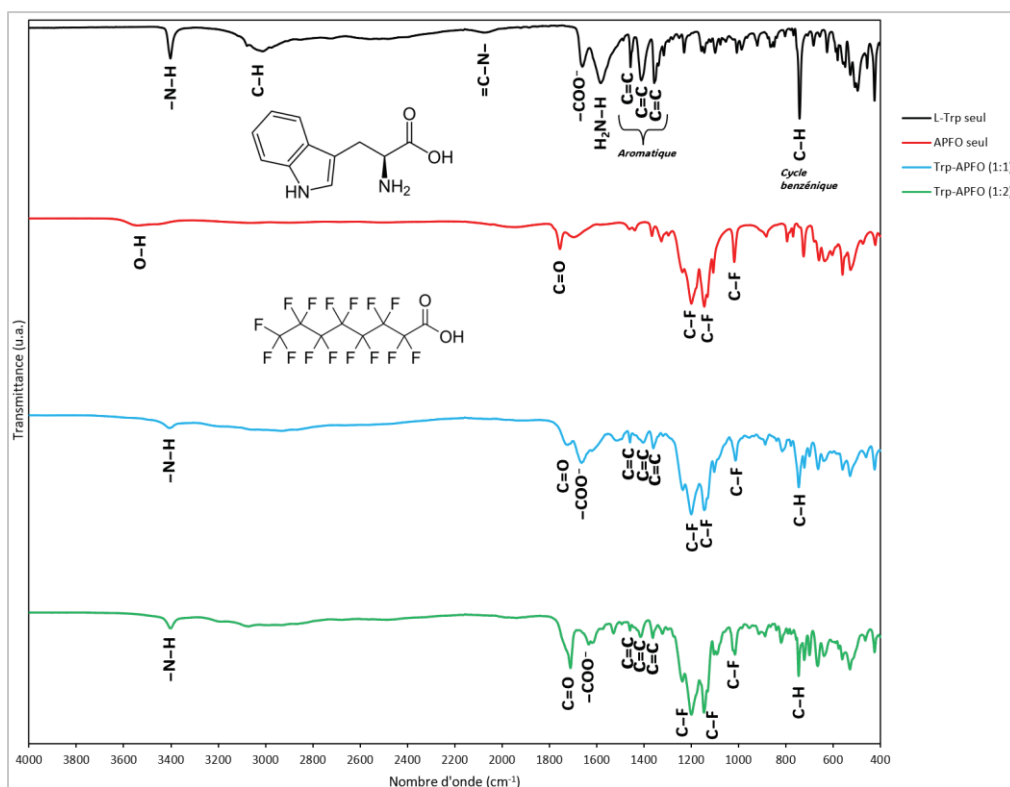


Figure 3.7 Spectres IRTF de L-Trp pur, d'APFO pur, d'un mélange Trp-APFO (1:1) et d'un mélange Trp-APFO (1:2) récupéré sous forme de poudres par lyophilisation

Selon la Figure 3.7, les bandes d'absorption caractéristiques des deux molécules ont globalement connu un déplacement dans les mélanges molaires, confirmant qu'une interaction entre le L-Trp et l'APFO s'est produite. Seules les bandes caractéristiques du L-Trp ont diminué en intensité avec le dosage en APFO, ce qui démontre que l'APFO a perturbé la structure ou la conformation du L-Trp, réduisant ainsi la force ou la présence de certaines liaisons dans les conditions étudiées. L'observation des bandes caractéristiques des groupes carbonyles, qui ont montré un déplacement de 1755 cm^{-1} et 1661 cm^{-1} vers 1710 cm^{-1} et 1633 cm^{-1} , suggère fortement leur implication dans la formation de liaisons hydrogène avec l'APFO. Ce déplacement vers des fréquences plus basses est typique de l'implication des groupes carbonyles dans des liaisons hydrogène, ce qui réduit leur fréquence vibratoire. En outre, la diminution et le déplacement des bandes caractéristiques des liaisons C=C aromatiques vers de plus grandes fréquences, couplées à la variation et la disparition de celles des liaisons C-H et --C=N-- , suggèrent une baisse locale des liaisons hydrogène ou une réorganisation de l'environnement électronique autour de ces groupes fonctionnels. L'augmentation des fréquences vibratoires des liaisons C=C aromatiques peut indiquer une diminution de la polarité locale ou une rigidification du cycle aromatique, potentiellement attribuable à une interaction plus forte avec l'APFO. Ce phénomène confirme, en outre, que l'APFO forme une interaction hydrophobe avec le groupement indole du L-Trp. La disparition ou la variation des bandes C-H et --C=N-- , pourrait également indiquer une perturbation significative de la structure du L-Trp, suggérant que ces groupes sont directement impliqués dans l'interaction avec l'APFO. Ce phénomène pourrait affecter la stabilité et la réactivité des molécules dans leurs environnements physiologiques ou environnementaux.

Par ailleurs, l'intensité réduite de la bande à 3402 cm^{-1} et la disparition de celle à 1582 cm^{-1} pourraient probablement être attribuées à une attraction électrostatique formée entre l'amine protonée du L-Trp et le groupe carboxylique chargé négativement de l'APFO. Cette interaction électrostatique suggère que le groupe amine du L-Trp joue un rôle clé dans la formation et la stabilisation du complexe Trp-APFO, en agissant comme un site d'interaction supplémentaire. Cette attraction électrostatique pourrait non seulement renforcer les liaisons

hydrogène déjà présentes, mais aussi introduire une nouvelle dynamique dans l'interaction, en modifiant la conformation du L-Trp ou l'alignement spatial des molécules. Ainsi, outre les interactions précédemment relevées, le groupe amine présent dans le L-Trp semble fournir un site d'interaction additionnel pour l'APFO, qui contribue à la formation et à la stabilisation du complexe Trp-APFO. La présence de ces forces électrostatiques pourrait faciliter ou inhiber d'autres processus moléculaires, tels que l'adsorption, la distribution ou la réactivité, ce qui est essentiel pour comprendre les comportements toxiques et écotoxicologiques de l'APFO dans les systèmes biologiques.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Signification toxicologique

Cette section présente une discussion des éléments de recherche en synthétisant et en analysant progressivement le lien entre les effets physico-chimiques observés et leurs implications biologiques.

4.1.1 Mécanisme de complexation

Les essais de toxicité aiguë réalisés sur *D. magna* révèlent un équilibre stœchiométrique spécifique entre le L-Trp et l'APFO, avec un ratio optimal de 0,5:1. Ce ratio suggère que chaque molécule de L-Trp se lie à deux molécules d'APFO, probablement de manière symétrique ou équivalente. Deux scénarios peuvent expliquer cette configuration : soit le L-Trp possède deux sites de liaison indépendants pour l'APFO, soit un phénomène de structuration supramoléculaire en couches alternées se produit. Des exemples de ce type de structuration en couches existent dans divers systèmes, tels que les membranes à base de polymères et de copolymères blocs (Kravchenko, Abetz, & Potemkin, 2021), les assemblages supramoléculaires de cyclodextrines (Tan, Ladewig, Fu, Blencowe, & Qiao, 2014) ou encore les systèmes de bicouches dans les membranes biologiques (Alberts et al., 2002). Ces systèmes se caractérisent par des interactions non covalentes répétées, qui favorisent l'organisation en couches et dépendent fortement de la géométrie moléculaire, de leur capacité à former des interactions spécifiques, et des conditions expérimentales (Alberts et al., 2002).

Dans le cas du complexe Trp-APFO, plusieurs éléments suggèrent une compatibilité avec ces modèles de structuration. La présence de surfaces moléculaires complémentaires favorisant une alternance régulière, des interactions non covalentes spécifiques et des conditions expérimentales contrôlées soutiennent cette hypothèse. Les analyses IRTF renforcent

également cette perspective, montrant des déplacements significatifs des bandes d'absorption associées aux groupes fonctionnels impliqués dans les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, caractéristiques d'une organisation structurée (Barth, 2007 ; Bellamy, 1975). Toutefois, pour confirmer si ces interactions non-covalentes sont suffisamment directionnelles et spécifiques pour établir une organisation en couches, des investigations supplémentaires seraient nécessaires, notamment pour évaluer les interactions compétitives avec les autres molécules de L-Trp présentes dans le milieu. Les mesures de fluorescence utilisées dans cette étude ne permettent pas de préciser ce phénomène, car elles se concentrent sur les interactions au niveau de l'indole du L-Trp, sans fournir d'informations directes sur l'organisation globale des molécules d'APFO dans le complexe.

En raison des limitations des méthodes de fluorescence et d'IRTF, qui se concentrent sur les interactions locales au niveau de l'indole du L-Trp (Lakowicz, 2006) et des groupes fonctionnels spécifiques (Barth, 2007), il n'est pas possible de confirmer l'organisation globale du complexe Trp-APFO. Bien qu'il ait été démontré que les mécanismes d'extinction dynamique et statique coexistent dans ce système, la quantification précise de la contribution de chacune de ces composantes n'est pas évidente. Étant donné que la réaction entre le L-Trp et l'APFO n'est pas totale, il serait pertinent de déterminer la constante d'extinction statique (K_s), pour quantifier plus précisément la proportion de complexe Trp-APFO. Par exemple, une analyse des écarts quadratiques et la décomposition des résidus, comme décrite par Lakowicz (2006), permettrait de séparer les contributions dynamiques et statiques à l'extinction. Dans le cadre de cette étude, l'appréciation globale du phénomène a été privilégiée en raison de l'accumulation des incertitudes de mesure et de l'objectif principal, qui était de comprendre qualitativement les interactions entre le L-Trp et l'APFO plutôt que de quantifier précisément chaque mécanisme d'extinction.

4.1.2 Équilibre structurel

Le milieu où se trouve le L-Trp exerce une influence significative sur les forces en présence lors de l'interaction indole-APFO. Contrairement aux résultats de cette étude, Tang et al.

(2022) ; Yan et al. (2021) ont mis en avant l'implication prépondérante des forces électrostatiques et de l'effet hydrophobe dans la sorption de l'APFO au sein des matrices extracellulaires de boues activées. Cette divergence s'expliquerait par les différences substantielles entre le milieu complexe et hydrophobe des boues et le milieu plus simplifié et hydrophile de cette recherche. Dans un environnement tel que celui des boues activées, les interactions hydrophobes et électrostatiques sont souvent amplifiées en raison de la présence de nombreuses molécules organiques et de la nature compacte de la matrice (Arvaniti et al., 2014). Les liaisons hydrogène, qui dépendent fortement de la polarité du milieu (Karshikoff, 2006), peuvent être désavantagées dans un environnement hydrophobe. Cependant, d'autres interactions, telles que l'effet hydrophobe et les interactions π - π , peuvent stabiliser le complexe Trp-APFO dans ce milieu.

Cette adaptabilité de la liaison indole-APFO souligne non seulement la spécificité, mais aussi la flexibilité de l'interaction en fonction du milieu. Le fait que cette liaison soit présente dans un milieu aussi complexe que les boues activées (Yan et al., 2021), témoigne de la capacité de l'interaction à exploiter différentes forces pour stabiliser le complexe. Ainsi, même dans des environnements biologiquement et chimiquement complexes, l'interaction entre l'indole et l'APFO est suffisamment spécifique pour survenir. Cette constatation peut avoir des implications importantes pour la biodisponibilité et la distribution de l'APFO dans des systèmes naturels. De la même manière, ces observations ouvrent des perspectives intéressantes pour d'autres molécules présentant des similitudes structurales avec le L-Trp. Par exemple, d'autres acides aminés aromatiques comme la tyrosine ou la phénylalanine (Hernandez et al., 2022 ; Yan et al., 2021), ou même des peptides (Dai et al., 2013) contenant ces résidus pourraient interagir de manière similaire avec les SPFA ou d'autres polluants organofluorés. Cela peut permettre le développement de nouvelles stratégies de remédiation basées sur la complexation de ces polluants avec des biomolécules spécifiques, en tirant parti de la flexibilité des interactions en fonction du milieu. De telles stratégies pourraient être particulièrement efficaces dans des environnements variés, où la modulation des interactions entre les polluants et les biomolécules cibles peut être exploitée pour améliorer la capture et la détoxification des contaminants (Ankley et al., 2021).

L'analyse IRTF de la réaction entre le L-Trp et l'APFO confirme la formation d'un complexe, exclusivement par des forces non-covalentes, ce qui suggère une réversibilité de la réaction. En effet, plusieurs paramètres expérimentaux et observations suggèrent que la réaction entre le L-Trp et l'APFO a de fortes chances d'être réversible. La nature des interactions non-covalentes qui stabilisent le complexe Trp-APFO, telle que les liaisons hydrogène et l'effet hydrophobe sont par essence réversibles (Karshikoff, 2006). Ces interactions sont généralement moins énergétiquement favorables que les liaisons covalentes, ce qui signifie qu'elles peuvent être perturbées par des changements dans les conditions environnementales (Hobza & Müller-Dethlefs, 2010).

Les résultats des essais de toxicité montrent que la stabilité du complexe est sensible aux variations du rapport molaire. L'observation d'une réduction non-monotone de la toxicité en fonction du rapport *Trp:APFO*, suggère que l'équilibre entre le L-Trp et l'APFO peut être affecté par la concentration relative des composants. Cet effet de la concentration peut être un signe de réactions réversibles (Hobza & Müller-Dethlefs, 2010). En effet, dans certaines réactions réversibles, un excès de réactif perturbe l'équilibre en créant de nouvelles interactions non productives (F.-Y. Liu, Lo, & Shu, 2019). Dans le cas de la présente étude, un excès de L-Trp peut favoriser l'agrégation de L-Trp, qui ne seront pas efficaces pour lier l'APFO, ce qui limite l'équilibre optimal de complexation. Par ailleurs, la déstabilisation du complexe Trp-APFO avec une élévation de la température est un autre indicateur de réversibilité (Fang, Sheng, Wang, Ye, & Yu, 2015). Comme les données thermodynamiques le montrent, une élévation de la température entraîne la déstabilisation des complexes, probablement en affaiblissant les liaisons hydrogène et les interactions de van der Waals, tout en augmentant la mobilité moléculaire, ce qui facilite la dissociation des complexes. De même, les limites des méthodes de détection utilisées, notamment la fluorescence qui ne quantifie que ce qui se passe au niveau de l'indole (Lakowicz, 2006), laissent supposer que la réversibilité pourrait également être sous-estimée ou non totalement capturée par les techniques employées. Il est possible que des changements subtils dans la structure du complexe ou des interactions transitoires ne soient pas pleinement détectés, renforçant l'idée

que la liaison est transitoire et que la réaction soit réversible. D'autres analyses telles que la cinétique chimique, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ou la microscopie électronique à transmission, sont recommandées pour apporter une expertise complémentaire et pour statuer sur les paramètres confondant (rendement de réaction, présence ou non d'agrégat de L-Trp, etc...) à cette recherche.

4.1.3 Impact sur la toxicocinétique

Il a été démontré que l'ajout de L-Trp dans une eau contaminée en APFO réduit la toxicité de ce dernier par la formation spontanée d'un complexe Trp-APFO. La formation de complexes joue nécessairement un rôle sur les propriétés toxicologiques de l'APFO. Lorsque l'APFO se lie au L-Trp, il est probable que cette interaction masque les groupes fonctionnels actifs de l'APFO, qui sont responsables de son interaction avec les membranes cellulaires, les enzymes, ou d'autres cibles biologiques. En se complexant avec le L-Trp, l'APFO pourrait devenir moins accessible pour ces interactions biologiques critiques, ce qui se traduit par une toxicité réduite. Ce mécanisme est soutenu par les résultats spectroscopiques (IRTF et fluorescence) qui démontrent que les liaisons hydrogène, les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et l'effet hydrophobe stabilisent le complexe, limitant ainsi la disponibilité de l'APFO dans sa forme libre, plus toxique. L'ensemble de ces interactions non-covalentes, connues pour leurs impacts sur les propriétés, le comportement et le devenir environnemental de nombreux polluants (Hobza & Müller-Dethlefs, 2010), offre une piste pour développer des stratégies d'atténuation de la toxicité de l'APFO dans les milieux aquatiques. Par exemple, l'utilisation contrôlée de L-Trp ou de composés similaires pourrait être envisagée pour réduire la biodisponibilité de l'APFO dans les eaux contaminées (Fang et al., 2015 ; Kern, Škulj, & Rožman, 2022).

Comme l'ont montré Dai et al. (2013), l'absorption cuticulaire (interface carapace/extérieur) est la voie principale de sorption des SPFA chez *Daphnia magna*, tandis que l'ingestion n'a pas d'effet significatif. L'une des explications aux observations de la présente étude est la diminution de la proportion biodisponible d'APFO libre pénétrant les barrières cuticulaires

de *D. magna*. En effet, la formation de complexes est une stratégie couramment utilisée pour réduire la contamination par les polluants organiques (Liu et al., 2022 ; Polubesova et al., 2005). Ces complexes modifient les propriétés des polluants, les rendant souvent moins solubles, moins biodisponibles, et donc moins toxiques pour les organismes vivants. Cependant, l'absorption n'est pas le seul facteur toxicocinétique en jeu, comme en témoigne la non-monotonie de la décroissance de la toxicité en fonction du L-Trp. Des résultats similaires ont été observés au niveau protéique du point de vue de la bioaccumulation de l'APFO chez *D. magna* après trois jours d'exposition; avec des taux de charge corporelle en APFO plus importants chez *D. magna* dans les milieux d'essais les plus concentrés en protéines (Xia et al., 2013). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'influence simultanée des composés protéiques sur l'absorption et les taux d'élimination des SPFA chez *D. magna* (Dai et al., 2013). Ces résultats soutiennent le fait que le L-Trp est en mesure de se lier à l'APFO pour donner une entité carbonée de plus grande étendue. Cette interaction engendrerait une absorption modifiée du complexe par des mécanismes d'exclusion stérique et/ou de répulsion électrostatique (McCarthy, 1988 ; Van der Bruggen, Schaep, Wilms, & Vandecasteele, 1999), tant à l'extérieur qu'à l'intérieur de l'organisme.

De plus, la formation du complexe Trp-APFO ne modifie pas seulement la biodisponibilité de l'APFO, mais peut également influencer sa distribution dans l'organisme. En réduisant la fraction de l'APFO disponible pour la distribution au sein de l'organisme (distribution systémique), le complexe limite l'accumulation de l'APFO dans les organes cibles critiques, tels que le foie ou les reins, où il pourrait autrement causer des dommages importants. Cette redistribution potentielle peut non seulement réduire la toxicité aiguë de l'APFO, mais aussi atténuer les effets toxiques à long terme, en réduisant l'exposition chronique des tissus à des concentrations toxiques d'APFO. Par analogie avec le milieu médicale, le L-Trp pourrait constituer un effet micellaire similaire aux micelles polymères. Celles-ci sont reconnues comme des vecteurs modulables d'administration de médicaments qui réduisent la toxicité et améliorent l'efficacité thérapeutique des médicaments libres selon leur taille, leur biocompatibilité, leur stabilité thermodynamique et leur cinétique (Ke et al., 2014). De cette façon, le L-Trp a de fortes chances d'agir directement sur la biodisponibilité de l'APFO libre,

voire d'influencer son comportement et/ou sa distribution chez l'organisme. À l'avenir, des recherches complémentaires doivent être réalisées en approfondissant les mécanismes de toxicité internes liés à la formation de ce complexe pour déterminer plus précisément son comportement toxicologique chez différents organismes.

4.2 Implications de l'étude

La réversibilité de la réaction entre le L-Trp et l'APFO pose un certain nombre d'interrogations sur les conséquences de ce phénomène, en particulier d'un point de vue de la toxicité, des solutions de traitement et de la réglementation actuelle des SPFA.

4.2.1 Variabilité de la toxicité

La réversibilité du complexe Trp-APFO présente des implications profondes en termes de toxicité des SPFA, particulièrement lorsqu'on considère la complexité des environnements biologiques et aquatiques. L'omniprésence des composés protéiques et des acides aminés libres dans ces milieux (Quinnell et al., 2004), suggère que la formation et la dissociation réversible des complexes Trp-APFO pourraient constituer un facteur modulateur sous-estimé pour le passage des SPFA aux barrières cuticulaires et épithéliales.

L'une des caractéristiques centrales de la réversibilité du complexe Trp-APFO est sa capacité à moduler la biodisponibilité de l'APFO en fonction des conditions locales. Dans des environnements où les concentrations de protéines et d'acides aminés sont élevées (Quinnell et al., 2004), tel que dans les eaux naturelles ou les fluides biologiques, l'APFO peut se lier de manière réversible à ces biomolécules (Hernandez et al., 2022 ; Karshikoff, 2006 ; Némethy & Scheraga, 1962), réduisant temporairement sa biodisponibilité. Toutefois, lorsque l'APFO migre vers des environnements où ces concentrations sont plus faibles, ou lorsqu'ils rencontrent des barrières biologiques comme les membranes lipidiques (Karshikoff, 2006 ; Quinnell et al., 2004), il pourrait se détacher des complexes, augmentant sa biodisponibilité locale et sa capacité à interagir avec les membranes cellulaires. Un phénomène analogue est observé avec certains métaux lourds, comme le mercure, qui

forment des complexes réversibles avec les protéines et les peptides dans les systèmes biologiques (Parks & Smith, 2016). Par exemple, le mercure peut se lier au glutathion dans le sang, réduisant ainsi sa toxicité immédiate. Cependant, ce complexe peut se dissocier dans des tissus cibles (Parks & Smith, 2016), libérant le mercure sous une forme bioactive et potentiellement toxique. Ce mécanisme dynamique de liaison et de dissociation influence la distribution et l'accumulation du mercure dans l'organisme, tout comme le complexe Trp-APFO pourrait influencer la distribution et la toxicité de l'APFO.

La réversibilité du complexe Trp-APFO pourrait également expliquer la variabilité observée dans les études de toxicité des SPFA. Dans des environnements différents, où les concentrations de L-Trp et d'autres biomolécules varient, le degré de complexation et, par conséquent, la proportion de SPFA biodisponibles pourrait fluctuer. Cette variabilité peut conduire à des résultats erratiques dans les études de toxicité (Ankley et al., 2021 ; T. Zhou et al., 2024), car la toxicité des SPFA ne serait pas seulement une fonction de leur concentration totale, mais aussi de l'équilibre dynamique entre les formes liées et libres. Par exemple, dans des environnements aquatiques riches en matières organiques dissoutes, les SPFA pourraient être largement complexés, réduisant leur toxicité apparente. En revanche, dans des environnements pauvres en matières organiques, les SPFA seraient principalement sous forme libre, présentant une toxicité plus élevée.

Cette réversibilité implique que les modèles de prédiction de la toxicité des SPFA doivent prendre en compte non seulement les concentrations globales des SPFA, mais aussi la dynamique des complexes formés avec les biomolécules présentes dans l'environnement. Les modèles statiques, qui considèrent les concentrations de SPFA comme fixes, pourraient ne pas refléter fidèlement les risques réels (Ankley et al., 2021 ; T. Zhou et al., 2024), en particulier dans des environnements hétérogènes. Des modèles plus sophistiqués, intégrant la cinétique de formation et de dissociation des complexes, ainsi que les conditions locales, seraient nécessaires pour une évaluation plus précise du risque.

Du point de vue de la gestion environnementale, la réversibilité des complexes Trp-APFO suggère que des stratégies visant à manipuler les concentrations de biomolécules dans l'environnement pourraient être utilisées pour moduler la toxicité des SPFA. Par exemple, l'augmentation de la disponibilité de ligands spécifiques, comme le L-Trp ou d'autres acides aminés, pourrait être envisagée comme une méthode pour réduire temporairement la toxicité des SPFA dans les eaux contaminées, en favorisant la formation de complexes réversibles. Cependant, cette approche nécessiterait une compréhension approfondie de la cinétique de la complexation et de la dissociation, ainsi que de l'impact potentiel sur d'autres processus écologiques. De plus, ces stratégies présentent des limites importantes, car elles ne peuvent être mises en œuvre que dans des conditions spécifiques contrôlées par l'homme, rendant leur application en milieu naturel difficilement réalisable.

4.2.2 Traitements biologiques

La réversibilité de la réaction entre l'indole du L-Trp et l'APFO pose également des interrogations sur l'efficacité des traitements biologiques visant à éliminer les SPFA de l'environnement. Les boues activées, largement utilisées dans les procédés de traitement des eaux usées, reposent principalement sur leur capacité à adsorber et à immobiliser les contaminants grâce à leur teneur en protéines (Arvaniti et al., 2014 ; Yan et al., 2021 ; Q. Zhou et al., 2010) et en composés aromatiques (Tang et al., 2022 ; Yan et al., 2021 ; S. Zhang et al., 2023), tels que le tryptophane et la tyrosine. Si la liaison entre les SPFA et ces composés aromatiques est réversible, cela pourrait avoir des implications significatives pour l'efficacité des procédés de traitement. En effet, la réversibilité suggère que les SPFA adsorbés pourraient se détacher des sites de liaison dans des conditions spécifiques, par exemple lors des fluctuations de pH, de température, ou de la concentration en solutés dans l'environnement. Ce détachement pourrait réduire l'efficacité de l'adsorption à long terme, augmentant le risque que les SPFA retournent dans l'eau traitée, compromettant ainsi la qualité de l'effluent. Ce phénomène, souvent mentionné dans la littérature, est principalement associé à la dégradation des précurseurs de l'APFO dans les boues (Arvaniti et al., 2014 ; Q.

Zhou et al., 2010). Cependant, le mécanisme observé ici pourrait offrir une explication complémentaire aux observations rapportées dans la littérature.

Lors des processus de post-traitement, tels que le lavement ou l'incinération des boues, la réversibilité des liaisons Trp-APFO pourrait également entraîner le relargage des SPFA adsorbés. Ce phénomène a été observé dans d'autres systèmes de traitement des polluants (T. Zhou et al., 2024), où des contaminants précédemment capturés sont réintroduits dans l'environnement sous des formes potentiellement plus mobiles et bioactives (Ankley et al., 2021), après des changements dans les conditions chimiques ou physiques des boues. Un phénomène similaire pourrait se produire avec les SPFA, où des changements dans les conditions des boues activées pourraient entraîner la dissociation des complexes, réintroduisant ainsi les SPFA dans l'environnement sous des formes potentiellement plus biodisponibles. Ce relargage secondaire pourrait non seulement réduire l'efficacité des traitements biologiques, mais aussi poser un risque accru de contamination des milieux naturels, en particulier si les SPFA retournés sont plus difficilement dégradables ou plus toxiques.

Face à ces risques, il serait pertinent de réévaluer les stratégies actuelles de gestion des SPFA en tenant compte de la réversibilité de leurs interactions. Les méthodes de traitement doivent non seulement viser à capturer efficacement les SPFA, mais aussi à garantir la stabilité des complexes formés tout au long du processus, y compris lors des étapes de post-traitement. Pour cela, des techniques supplémentaires pourraient être nécessaires, telles que l'ajout de stabilisants chimiques ou l'optimisation des conditions de pH et de température, afin de minimiser le risque de dissociation des complexes protéines-SPFA. En réponse à ces défis, l'exploration d'approches innovantes pourrait s'avérer utile pour renforcer la rétention des SPFA dans les boues activées. Par exemple, l'utilisation de polymères modifiés, capables de créer des liaisons plus robustes et moins réversibles avec les SPFA, pourrait représenter une solution prometteuse. Par ailleurs, le développement de technologies comme les membranes à haute affinité pour les SPFA (Zhao et al., 2023) ou les biofiltres enrichis en biomolécules

spécifiques (Fu et al., 2023) pourrait améliorer la séquestration et l'immobilisation des SPFA, tout en réduisant les risques de relargage.

4.2.3 Généralisation du phénomène

L'affinité bien documentée des SPFA de grande taille ($C \geq 7$) pour les protéines (Dai et al., 2013 ; Du et al., 2021 ; Geng et al., 2021 ; Lewis et al., 2022, 2023), suggère que le phénomène de réversibilité observé dans le complexe Trp-APFO pourrait s'étendre à d'autres interactions entre les SPFA et diverses biomolécules. Cette capacité des SPFA à former des complexes réversibles avec des protéines dans des environnements biologiques et environnementaux complexes ne laisse guère de doute sur la généralisation de ce phénomène à une large gamme de SPFA, en particulier ceux à longue chaîne. L'interprétation est plus délicate pour les SPFA à courtes chaînes. En raison de leur affinité hydrophobe plus faible (Brendel et al., 2018), la formation de complexes avec des biomolécules pourrait être moins fréquente ou moins stable. Cela implique que les SPFA à courtes chaînes pourraient malgré tout former une entité carbonée plus étendue, augmentant leur biodisponibilité et leur toxicité potentielle. Ces SPFA pourraient bénéficier d'interactions transitoires avec des biomolécules, influençant leur distribution et leur accumulation dans les tissus. La réversibilité de ces interactions pourrait entraîner des temps de rétention prolongés ou des concentrations locales plus élevées, comme cela a été observé pour l'APFO (Xia et al., 2013).

Les résultats de cette étude mettent en évidence la nécessité de reconsidérer les approches réglementaires actuelles pour les SPFA, tant à longues qu'à courtes chaînes. La toxicité des SPFA ne peut plus être interprétée de manière absolue, car elle est fortement influencée par des facteurs environnementaux et biologiques, tels que la réversibilité des interactions avec les biomolécules, les différences de milieu, et les conditions moléculaires locales (Hernandez et al., 2022). Ces facteurs introduisent une variabilité significative dans les effets toxiques des SPFA, nécessitant une approche réglementaire plus nuancée et dynamique. Les futures politiques réglementaires devront intégrer ces considérations, en particulier la réversibilité des interactions et la variabilité des effets en fonction des conditions environnementales. Cela

pourrait inclure le développement de modèles de toxicité qui prennent en compte les interactions réversibles et la dynamique des complexes SPFA-biomolécules, ainsi que l'adoption de seuils d'exposition plus flexibles, adaptés à la variabilité des milieux. Néanmoins, il est crucial de maintenir le principe de précaution, car une toxicité sous-estimée des molécules alternatives à l'APFO, qui sont encore en production, reste une possibilité à ne pas négliger. De plus, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour comprendre pleinement les implications de ces interactions réversibles et pour développer des méthodes d'évaluation du risque qui reflètent la complexité des interactions entre les SPFA et leur environnement.

CONCLUSION

Cette étude avait pour objectif de répondre à une problématique centrale : comprendre et évaluer l'impact du L-tryptophane (L-Trp) sur la toxicologie de l'acide perfluorooctanoïque (APFO) dans un environnement aquatique. Pour y répondre, des essais de toxicité aiguë en 48 heures sur *D. magna*, ainsi que des études de spectroscopie de fluorescence et infrarouge ont été menés en laboratoire. Les résultats de cette étude montrent la capacité du L-Trp à diminuer significativement la mortalité et l'immobilité aiguë chez *D. magna* par la formation d'un complexe Trp-APFO. Les essais de toxicité aiguë ont mis en évidence l'existence d'un rapport molaire optimal aux alentours de 0.5 entre L-Trp et l'APFO, pour l'atténuation des effets toxicologiques de l'APFO. Ce rapport suggère la capacité du L-Trp à réagir avec deux molécules d'APFO. Les analyses d'extinction de fluorescence du L-Trp révèlent que les interactions non-covalentes jouent un rôle majeur dans la formation du complexe Trp-APFO. La détermination des paramètres thermodynamiques montre que les forces de van der Waals et les liaisons hydrogène sont les composantes dominantes dans cette réaction. En outre, les analyses IRTF ont confirmé la présence d'effets hydrophobes et d'interactions électrostatiques au sein du complexe Trp-APFO. La présence de telles interactions suppose une réversibilité de la réaction.

La liaison entre l'APFO et le L-Trp tend à démontrer des variations significatives dans la biodisponibilité et la distribution de l'APFO en solution. Bien que dans ce cas, ce phénomène semble avoir un effet bénéfique en réduisant la toxicité par des mécanismes d'exclusion stérique ou d'inactivation. Il est également essentiel de considérer la généralisation de ce mécanisme à d'autres SPFA. Notamment, les SPFA à chaînes plus longues, qui possèdent une forte affinité pour les biomolécules, pourraient présenter des comportements similaires, tandis que ceux à chaînes plus courtes, avec une affinité hydrophobe moindre, pourraient voir leur toxicité modifiée différemment. Des temps de rétention allongés et des concentrations locales plus élevées dans les tissus en fonction des fluctuations environnementales sont notamment soupçonnés. Cette complexité met en évidence la nécessité de développer une

compréhension plus approfondie pour prévoir avec précision les risques associés à l'exposition aux SPFA dans des environnements divers et dynamiques.

Les résultats de cette étude soulignent la nécessité urgente de ré-évaluer les stratégies de traitement des SPFA, en tenant compte de la réversibilité des interactions avec les biomolécules. La capacité des SPFA à former des complexes réversibles avec des composés tels que le L-Trp peut réduire l'efficacité des traitements biologiques actuellement utilisés, comme les boues activées. Ces systèmes dépendent largement de la capacité des biomolécules à adsorber et à immobiliser les contaminants pour les éliminer efficacement des eaux usées. Cependant, si ces complexes peuvent se dissocier sous certaines conditions environnementales, il est possible que les SPFA relargués retournent dans l'eau traitée, compromettant ainsi la qualité de l'effluent. Ce phénomène pourrait entraîner des conséquences particulièrement néfastes lors des processus de post-traitement, comme le lavage ou l'incinération des boues, où les conditions chimiques ou physiques modifiées pourraient entraîner une désorption des SPFA adsorbés, les rendant à nouveau disponibles et potentiellement toxiques dans l'environnement. Par conséquent, il est nécessaire de réviser les procédés actuels pour garantir non seulement l'efficacité immédiate du traitement, mais aussi la stabilité à long terme des complexes formés. Cela pourrait impliquer l'intégration de techniques supplémentaires pour stabiliser ces complexes, telles que l'ajout de stabilisants chimiques ou l'optimisation des conditions de pH et de température, afin de minimiser le risque de dissociation et d'assurer une gestion plus sûre et plus efficace des SPFA dans les processus de traitement des eaux usées.

En reconsidérant la problématique initiale, il devient évident que les interactions réversibles entre les SPFA et les biomolécules telles que le L-Trp posent des défis pour la gestion environnementale et la réglementation de ces substances. Les approches traditionnelles de régulation, qui ne prennent pas en compte la nature dynamique de ces interactions, risquent de sous-estimer les risques liés aux SPFA, notamment en ce qui concerne leur toxicité. La réversibilité des complexes SPFA-biomolécules, comme celle observée avec le complexe Trp-APFO, démontre que ces substances peuvent facilement alterner entre des formes liées

moins toxiques et des formes libres plus toxiques, en fonction des conditions environnementales. Cette dynamique rend la prévision de la toxicité des SPFA particulièrement complexe et nécessite une révision des cadres réglementaires existants pour intégrer ces comportements. Une solution proposée dans cette étude, qui consiste à réviser les cadres réglementaires pour mieux intégrer ces dynamiques complexes, apparaît donc essentielle pour une gestion plus efficace et adaptée des SPFA. En outre, il est important de souligner que les réglementations actuelles, souvent basées sur des seuils statiques de concentration, pourraient ne pas être suffisamment flexibles pour s'adapter aux variations de toxicité observées en fonction des conditions environnementales. Une approche plus nuancée, incorporant des modèles prédictifs capables de simuler les effets de la réversibilité des interactions, pourrait offrir une meilleure protection de l'environnement et de la santé publique. Cela pourrait inclure le développement de modèles de toxicité qui prennent en compte les interactions réversibles et la dynamique des complexes SPFA-biomolécules, ainsi que l'adoption de seuils d'exposition plus flexibles, adaptés à la variabilité des milieux. Enfin, bien que ces recommandations représentent une avancée, il est crucial de maintenir le principe de précaution, car une toxicité sous-estimée des molécules alternatives à l'APFO, qui sont encore en production, demeure une possibilité non négligeable.

En somme, cette étude contribue à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la toxicité de l'APFO et propose des pistes pour améliorer la gestion de ces substances dans les écosystèmes aquatiques. Les futures recherches devront approfondir ces connaissances et explorer de nouvelles applications pour minimiser les risques associés aux SPFA, en assurant ainsi une meilleure protection de l'environnement et de la santé publique.

ANNEXE I

DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

Tableau-A I-1 Résumé des procédures expérimentales pour la détermination des paramètres physico-chimiques

Paramètres de qualité	Méthodes de référence (APHA, 2017)	Équipement	Méthode
Alcalinité totale	Méthode 2320 B.	/	Titrimétrie
Conductivité	Méthode 2510 B.	Conductimètre	Électrométrie
Dureté totale	Méthode 2340 C.	/	Titrimétrie
Oxygène dissous	/	Oxymètre	Spectroscopie
pH	Méthode 4500-H ⁺ B.	Électrode pH	Électrométrie
Température (°C)	Méthode 2550 B.	Thermomètre	Thermométrie

ANNEXE II

SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DES ESSAIS DE TOXICITÉ AIGUË CHEZ DAPHNIA MAGNA

Tableau-A II-1 Concentrations léthales et d'effets, intervalles de confiance, coefficients de corrélation et probabilités critiques des essais de toxicité aiguë chez *Daphnia magna*.

Ratio (Trp:APFO)	CL₅₀ – 48h (mg·L⁻¹)	CE₅₀ – 48h (mg·L⁻¹)	IC à 95 % (mg·L⁻¹)	R²	<i>p</i>
<i>Mortalité</i>					
0:1	137	/	113 – 161	> 0.99	/
0.1:1	359	/	293 – 424	> 0.87	= 0.0036
0.5:1	965	/	477 – 1 453	> 0.80	< 0.0001
1:1	708	/	560 – 855	> 0.95	< 0.0001
<i>Immobilité</i>					
0:1	/	109	93 – 126	> 0.99	/
0.1:1	/	303	260 – 347	> 0.95	= 0.0029
0.5:1	/	615	515 – 714	> 0.92	< 0.0001
1:1	/	418	356 – 481	> 0.91	= 0.0001

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 3M. (2000). *Phase-Out Plan for POSF-based products*. (Rapport No. OPPT-2002-0043). St. Paul, MN : 3M. Repéré à <https://www.fluoridealert.org/wp-content/pesticides/pfos.fr.final.docket.0009.pdf>
2. Abbott, B. D., Wood, C. R., Watkins, A. M., Tatum-Gibbs, K., Das, K. P., & Lau, C. (2012). Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and nuclear receptor-regulated genes in fetal and postnatal CD-1 mouse tissues. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 33(4), 491-505. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.005>
3. Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse. (2002). *Pollution toxique et écotoxicologie: notions de base*. Lyon : Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse. Repéré à <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb40061296c>
4. Agence européenne des produits chimiques. (2023). Substances perfluoroalkylées (PFAS) - ECHA. [En ligne]. Repéré à <https://echa.europa.eu/fr/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas>
5. Ahrens, L., & Bundschuh, M. (2014). Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9), 1921-1929. <https://doi.org/10.1002/etc.2663>
6. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). The Lipid Bilayer. Dans *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. (S.l.) : Garland Science. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
7. Alesio, J., & Bothun, G. D. (2024). Differential scanning fluorimetry to assess PFAS binding to bovine serum albumin protein. *Scientific Reports*, 14(1), 6501. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57140-9>
8. Alesio, J. L., Slitt, A., & Bothun, G. D. (2022). Critical new insights into the binding of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) to albumin protein. *Chemosphere*, 287, 131979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131979>
9. Ankley, G. T., Cureton, P., Hoke, R. A., Houde, M., Kumar, A., Kurias, J., ... Valsecchi, S. (2021). Assessing the Ecological Risks of Per- and Polyfluoroalkyl Substances: Current State-of-the Science and a Proposed Path Forward. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(3), 564-605. <https://doi.org/10.1002/etc.4869>
10. APHA. (2017). *Standard Methods For the Examination of Water* (23 éd.). Washington, DC : American Public Health Association.

11. Arvaniti, O. S., Andersen, H. R., Thomaidis, N. S., & Stasinakis, A. S. (2014). Sorption of Perfluorinated Compounds onto different types of sewage sludge and assessment of its importance during wastewater treatment. *Chemosphere*, 111, 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.087>
12. ASTM International. (2014). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. [Standard guide], Philadelphia, PA, USA : Annual Book of ASTM Standards. Repéré à <https://compass.astm.org/document/?contentCode=ASTM%7CE0729-96R14%7Cen-US&proxycl=https%3A%2F%2Fsecure.astm.org&fromLogin=true>
13. Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Soares, A. M. V. M., & Calow, P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21(3), 257-265. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(91\)90064-V](https://doi.org/10.1016/0147-6513(91)90064-V)
14. Bao, Y., Niu, J., Xu, Z., Gao, D., Shi, J., Sun, X., & Huang, Q. (2014). Removal of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) from water by coagulation: Mechanisms and influencing factors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 434, 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.07.041>
15. Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
16. Barth, A., & Zscherp, C. (2002). What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(4), 369-430. <https://doi.org/10.1017/s0033583502003815>
17. Bellamy, L. J. (1975). *The infra-red spectra of complex molecules*. (S.I.): London : Chapman and Hall; New York : Wiley. Repéré à http://archive.org/details/infraredspectrao0000bell_q3v3
18. Bellmaine, S., Schnellbaecher, A., & Zimmer, A. (2020). Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 160, 696-718. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.002>
19. Bertin, D., Ferrari, B. J. D., Labadie, P., Sapin, A., Garric, J., Budzinski, H., ... Babut, M. (2014). Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 189, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.018>
20. Bi, S., Yan, L., Sun, Y., & Zhang, H. (2011). Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1), 410-414. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.11.002>

21. Brandstetter, A., Sletten, R. S., Mentler, A., & Wenzel, W. W. (1996). Estimating dissolved organic carbon in natural waters by UV absorbance (254 nm). *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 159(6), 605-607. <https://doi.org/10.1002/jpln.1996.3581590612>
22. Brendel, S., Fetter, É., Staude, C., Vierke, L., & Biegel-Engler, A. (2018). Short-chain perfluoroalkyl acids: environmental concerns and a regulatory strategy under REACH. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0134-4>
23. Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., de Voogt, P., ... van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4), 513-541. <https://doi.org/10.1002/ieam.258>
24. Butenhoff, J. L., Kennedy, G. L., Hinderliter, P. M., Lieder, P. H., Jung, R., Hansen, K. J., ... Thomford, P. J. (2004). Pharmacokinetics of perfluorooctanoate in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 82(2), 394-406. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh302>
25. Butenhoff, John L., Gaylor, D. W., Moore, J. A., Olsen, G. W., Rodricks, J., Mandel, J. H., & Zobel, L. R. (2004). Characterization of risk for general population exposure to perfluorooctanoate. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 39(3), 363-380. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.03.003>
26. Butler, G. C. (1984). Developments in Ecotoxicology. *Ecological Bulletins*, (36), 9-12.
27. Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45, 153-203. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60640-3)
28. CEAEQ. (2021, 21 septembre). Détermination de la toxicité : létalité (CL50 48h) chez la daphnie *Daphnia magna*. [Rapport technique], Québec : Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec. Repéré à <https://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/ma500dmag11.pdf>
29. Centre international de Recherche sur le Cancer. (2023). Monographies du CIRC : classification des dangers – IARC. Repéré à <https://www.iarc.who.int/fr/infographies/iarc-monographs-classification/>
30. Chaparro-Ortega, A., Betancourt, M., Rosas, P., Vázquez-Cuevas, F. G., Chavira, R., Bonilla, E., ... Ducolomb, Y. (2018). Endocrine disruptor effect of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on porcine ovarian cell steroidogenesis. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 46, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.030>

31. Chen, H., He, P., Rao, H., Wang, F., Liu, H., & Yao, J. (2015). Systematic investigation of the toxic mechanism of PFOA and PFOS on bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling. *Chemosphere*, 129, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.040>
32. Chen, Y.-M., & Guo, L.-H. (2009). Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. *Archives of Toxicology*, 83(3), 255-261. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0359-x>
33. Chianese, S., Fenti, A., Iovino, P., Musmarra, D., & Salvestrini, S. (2020). Sorption of Organic Pollutants by Humic Acids: A Review. *Molecules*, 25(4), 918. <https://doi.org/10.3390/molecules25040918>
34. Commission européenne. *Règlement (UE) 2017/1000 de la Commission du 13 juin 2017 modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne l'acide pentadécafluorooctanoïque (PFOA), ses sels et les substances apparentées au PFOA (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.)* (OJ L) (2017). Repéré à <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/1000/oj/fra>
35. Cortés, E., Pak, J. S., & Özkan, E. (2023). Structure and evolution of neuronal wiring receptors and ligands. *Developmental Dynamics*, 252(1), 27-60. <https://doi.org/10.1002/dvdy.512>
36. Cui, L., Liao, C., Zhou, Q., Xia, T., Yun, Z., & Jiang, G. (2010). Excretion of PFOA and PFOS in male rats during a subchronic exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(1), 205-213. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9336-5>
37. Dai, Z., Xia, X., Guo, J., & Jiang, X. (2013). Bioaccumulation and uptake routes of perfluoroalkyl acids in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 90(5), 1589-1596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.026>
38. Du, D., Lu, Y., Zhou, Y., Li, Q., Zhang, M., Han, G., ... Jeppesen, E. (2021). Bioaccumulation, trophic transfer and biomagnification of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in the marine food web of the South China Sea. *Journal of Hazardous Materials*, 405, 124681. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124681>
39. Duquesne, S., & Küster, E. (2010). Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 353-359. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.11.008>

40. Ebert, D. (2005). Introduction to Daphnia Biology. Dans *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia [Internet]*. (S.l.) : National Center for Biotechnology Information (US). Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>
41. Ebert, D. (2022). Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>
42. Egea, P. F., Klaholz, B. P., & Moras, D. (2000). Ligand–protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Letters*, 476(1-2), 62-67. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01672-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01672-0)
43. Envilience ASIA. (2023). PFOA regulations in Asian countries |. *Envilience ASIA*. Repéré à <https://envilience.com/regions/others/asia-pfoa>
44. Environnement Canada et Santé Canada, S. (2021, 14 décembre). Les substances perfluoroalkyliques et polyfluoroalkyliques (PFAS) dans la population canadienne. [ensembles de données;sondages]. Repéré à <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/ressources-biosurveillance-humaine/per-polyfluoroalkyl-population-canadienne.html>
45. Environnement et Changement climatique Canada. (2010, 1 juin). Rapport d'évaluation écologique préalable sur le sulfonate de perfluorooctane, ses sels et ses précurseurs. [En ligne]. Repéré à <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/registre-environnemental-loi-canadienne-protection/publications/rapport-evaluation-ecologique-sulfonate.html>
46. Environnement et Changement climatique Canada. (2012, 20 février). Risk management strategy for perfluorooctane sulfonate and its salts and precursors. [assessments;consultations]. Repéré à <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/canadian-environmental-protection-act-registry/publications/risk-management-strategy-perfluorooctane-sulfonate.html>
47. Environnement et Changement climatique Canada. (2023, 19 mai). Draft state of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) report. [assessments]. Repéré à <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/evaluating-existing-substances/draft-state-per-polyfluoroalkyl-substances-report.html>
48. Faburé, J., Mougin, C., Rivet, D., & Siaussat, D. (2022). *Écotoxicologie*. Malakoff : Dunod.
49. Fang, W., Sheng, G.-P., Wang, L.-F., Ye, X.-D., & Yu, H.-Q. (2015). Quantitative evaluation of noncovalent interactions between polyphosphate and dissolved humic acids in aqueous conditions. *Environmental Pollution*, 207, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.001>

50. Forbes, V. E. (Valery E.), & Forbes, T. L. (Thomas L.). (1997). *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Paris : Institut national de la recherche agronomique.
51. Fu, J., Gao, B., Xu, H., Hao, S., Ren, J., Wu, J., & Sun, Y. (2023). Effects of biofilms on the retention and transport of PFOA in saturated porous media. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130392. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130392>
52. Geng, Q., Guo, M., Wu, H., Peng, J., Zheng, G., Liu, X., ... Tan, Z. (2021). Effects of single and combined exposure to BDE-47 and PFOA on distribution, bioaccumulation, and toxicity in blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 113014. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113014>
53. Geng, Q., Zou, L., Liu, H., Guo, M., Li, F., Liu, X., ... Tan, Z. (2024). Influence of humic acid on the bioaccumulation, elimination, and toxicity of PFOS and TBBPA co-exposure in *Mytilus unguiculatus* Valenciennes. *Science of The Total Environment*, 923, 171358. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171358>
54. Ghisaidoobe, A. B. T., & Chung, S. J. (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518-22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
55. Grandjean, P., Andersen, E. W., Budtz-Jørgensen, E., Nielsen, F., Mølbak, K., Weihe, P., & Heilmann, C. (2012). Serum Vaccine Antibody Concentrations in Children Exposed to Perfluorinated Compounds. *JAMA*, 307(4), 391-397. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.2034>
56. Gravesen, C. R., Lee, L. S., Choi, Y. J., Silveira, M. L., & Judy, J. D. (2023). PFAS release from wastewater residuals as a function of composition and production practices. *Environmental Pollution*, 322, 121167. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121167>
57. Greaves, A. K., Letcher, R. J., Sonne, C., Dietz, R., & Born, E. W. (2012). Tissue-Specific Concentrations and Patterns of Perfluoroalkyl Carboxylates and Sulfonates in East Greenland Polar Bears. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 11575-11583. <https://doi.org/10.1021/es303400f>
58. Grebelnyi, S. D. (1996). Influence of parthenogenetic reproduction on the genotypic constitution and evolutionary success of populations and species. *Hydrobiologia*, 320(1), 55-61. <https://doi.org/10.1007/BF00016804>

59. Han, H.-C., Tseng, C.-A., Du, C.-Y., Ganguly, A., Chong, C.-W., Wang, S.-B., ... Chen, L.-C. (2012). Enhancing efficiency with fluorinated interlayers in small molecule organic solar cells. *Journal of Materials Chemistry*, 22(43), 22899-22905. <https://doi.org/10.1039/C2JM34091G>
60. Han, X., Snow, T. A., Kemper, R. A., & Jepson, G. W. (2003). Binding of Perfluorooctanoic Acid to Rat and Human Plasma Proteins. *Chemical Research in Toxicology*, 16(6), 775-781. <https://doi.org/10.1021/tx034005w>
61. Hernandez, E. T., Koo, B., Sofen, L. E., Amin, R., Togashi, R. K., Lall, A. I., ... Francis, M. B. (2022). Proteins as adsorbents for PFAS removal from water. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 8(6), 1188-1194. <https://doi.org/10.1039/D1EW00501D>
62. Hobza, P., & Müller-Dethlefs, K. (2010). *Non-covalent interactions: Theory and Experiment*. Cambridge, U.K. : RSC Pub.
63. Horel, S. (2023, 23 février). Révélations sur la contamination massive de l'Europe par les PFAS, ces polluants éternels. *Le Monde.fr*. Repéré à https://www.lemonde.fr/les-decodeurs/article/2023/02/23/revelations-sur-la-contamination-massive-de-l-europe-par-les-pfas-ces-polluants-eternels_6162940_4355770.html
64. Houde, M., Martin, J. W., Letcher, R. J., Solomon, K. R., & Muir, D. C. G. (2006). Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environmental Science & Technology*, 40(11), 3463-3473. <https://doi.org/10.1021/es052580b>
65. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2017). *Some Chemicals Used as Solvents and in Polymer Manufacture*. Lyon (FR) : International Agency for Research on Cancer. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436263/>
66. Innes, D. J., & Singleton, D. R. (2000). Variation in allocation to sexual and asexual reproduction among clones of cyclically parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4), 771-787. <https://doi.org/10.1006/bjpl.2000.0474>
67. ISO. (2012, 31 octobre). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë. [Standard guide], Genève : International Organisation for Standardisation. Repéré à <https://www.iso.org/fr/standard/54614.html>
68. Ji, K., Kim, Y., Oh, S., Ahn, B., Jo, H., & Choi, K. (2008). Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid on freshwater macroinvertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) and fish (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(10), 2159-2168. <https://doi.org/10.1897/07-523.1>

69. Jiao, Y., Zou, M., Yang, X., Tsang, Y. F., & Chen, H. (2022). Perfluorooctanoic acid triggers oxidative stress in anaerobic digestion of sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127418. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127418>
70. Jin, Y. H., Liu, W., Sato, I., Nakayama, S. F., Sasaki, K., Saito, N., & Tsuda, S. (2009). PFOS and PFOA in environmental and tap water in China. *Chemosphere*, 77(5), 605-611. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.058>
71. Johansson, J. H., Salter, M. E., Navarro, J. C. A., Leck, C., Nilsson, E. D., & Cousins, I. T. (2019). Global transport of perfluoroalkyl acids via sea spray aerosol. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 21(4), 635-649. <https://doi.org/10.1039/C8EM00525G>
72. Karshikoff, A. (2006). *Non-covalent interactions in proteins*. London, Hackensack, NJ : Imperial College Press ; Distributed by World Scientific Pub. Co. Pte. Ltd.
73. Ke, X., Ng, V. W. L., Ono, R. J., Chan, J. M. W., Krishnamurthy, S., Wang, Y., ... Yang, Y. Y. (2014). Role of non-covalent and covalent interactions in cargo loading capacity and stability of polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*, 193, 9-26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.061>
74. Kern, M., Škulj, S., & Rožman, M. (2022). Adsorption of a wide variety of antibiotics on graphene-based nanomaterials: A modelling study. *Chemosphere*, 296, 134010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134010>
75. Kissa, E. (2001). *Fluorinated surfactants and repellents* (2nd ed., rev.expanded.). New York : Marcel Dekker. (Open Library ID: OL3944888M).
76. Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution*, 90(2), 263-267. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00029-Q](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00029-Q)
77. Koskela, A., Koponen, J., Lehenkari, P., Viluksela, M., Korkalainen, M., & Tuukkanen, J. (2017). Perfluoroalkyl substances in human bone: concentrations in bones and effects on bone cell differentiation. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07359-6>
78. Kravchenko, V. S., Abetz, V., & Potemkin, I. I. (2021). Self-assembly of gradient copolymers in a selective solvent. New structures and comparison with diblock and statistical copolymers. *Polymer*, 235, 124288. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124288>
79. Kudo, N., & Kawashima, Y. (2003). Toxicity and Toxicokinetics of Perfluorooctanoic Acid in Humans and Animals. *The Journal of Toxicological Sciences*, 28(2), 49-57. <https://doi.org/10.2131/jts.28.49>

80. Kudo, N., Sakai, A., Mitsumoto, A., Hibino, Y., Tsuda, T., & Kawashima, Y. (2007). Tissue distribution and hepatic subcellular distribution of perfluorooctanoic acid at low dose are different from those at high dose in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(8), 1535-1540. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1535>
81. Kunacheva, C., Fujii, S., Tanaka, S., Seneviratne, S. T. M. L. D., Lien, N. P. H., Nozoe, M., ... Harada, H. (2012). Worldwide surveys of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in water environment in recent years. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 66(12), 2764-2771. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.518>
82. Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed. 2006. Corr. 5th printing 2010 edition). New York : Springer.
83. Langenbach, B., & Wilson, M. (2021). Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS): Significance and Considerations within the Regulatory Framework of the USA. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), 11142. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111142>
84. Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., & Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 99(2), 366-394. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm128>
85. Lau, C., Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Narotsky, M. G., Rogers, J. M., Lindstrom, A. B., & Strynar, M. J. (2006). Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 90(2), 510-518. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj105>
86. Lecomte, V. (2024, 29 février). Évaluer les effets des polluants chimiques sur les êtres vivants et les écosystèmes : les grands principes. *Ecotoxicologie.fr*. Repéré à <https://ecotoxicologie.fr/evaluer-effets-polluants>
87. LEEQ. (2023a). *Acquisition, acclimatation et maintien de la culture de Daphnia magna* (Rapport No. LB-DAC-8). Canada : Environnement et Changement climatique Canada.
88. LEEQ. (2023b). *Préparation et exécution des essais de toxicité sur le microcrustacé d'eau douce* (Rapport No. LB-DAP-9). Canada : Environnement et Changement climatique Canada.
89. Lehmler, H.-J. (2005). Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants—a review. *Chemosphere*, 58(11), 1471-1496. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.078>

90. Lewis, A. J., Yun, X., Lewis, M. G., McKenzie, E. R., Spooner, D. E., Kurz, M. J., ... Sales, C. M. (2023). Impacts of divalent cations (Mg^{2+} and Ca^{2+}) on PFAS bioaccumulation in freshwater macroinvertebrates representing different foraging modes. *Environmental Pollution*, 331, 121938. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121938>
91. Lewis, A. J., Yun, X., Spooner, D. E., Kurz, M. J., McKenzie, E. R., & Sales, C. M. (2022). Exposure pathways and bioaccumulation of per- and polyfluoroalkyl substances in freshwater aquatic ecosystems: Key considerations. *Science of The Total Environment*, 822, 153561. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153561>
92. Lin, A. Y.-C., Panchangam, S. C., & Lo, C.-C. (2009). The impact of semiconductor, electronics and optoelectronic industries on downstream perfluorinated chemical contamination in Taiwanese rivers. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 157(4), 1365-1372. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.033>
93. Lindstrom, A. B., Strynar, M. J., & Libelo, E. L. (2011). Polyfluorinated compounds: past, present, and future. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 7954-7961. <https://doi.org/10.1021/es2011622>
94. Liu, F.-Y., Lo, S.-C., & Shu, C.-C. (2019). The Reaction of Dimerization by Itself Reduces the Noise Intensity of the Protein Monomer. *Scientific Reports*, 9, 3405. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39611-6>
95. Liu, X., Lu, J., Fang, X., Zhou, J., & Chen, Q. (2022). Complexation modelling and oxidation mechanism of organic pollutants in cotton pulp black liquor during iron salt precipitation and electrochemical treatment. *Chemosphere*, 308(Pt 2), 136374. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136374>
96. Long, X.-Y., Tang, R., Wang, T., Tao, G.-J., Wang, J.-Y., Zhou, H.-W., ... Yu, Y.-P. (2021). Characteristics of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process under the combined actions of intracellular and extracellular polyphosphate. *Chemosphere*, 279, 130912. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130912>
97. Lou, I., Wambaugh, J. F., Lau, C., Hanson, R. G., Lindstrom, A. B., Strynar, M. J., ... Barton, H. A. (2009). Modeling Single and Repeated Dose Pharmacokinetics of PFOA in Mice. *Toxicological Sciences*, 107(2), 331-341. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn234>
98. Manojkumar, Y., Pilli, S., Rao, P. V., & Tyagi, R. D. (2023). Sources, occurrence and toxic effects of emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Neurotoxicology and Teratology*, 97, 107174. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2023.107174>

99. McCarthy, J. F. (1988). Bioavailability and Toxicity of Metals and Hydrophobic Organic Contaminants. Dans *Aquatic Humic Substances* (Vol. 219, pp. 263-277). (S.l.) : American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ba-1988-0219.ch018>
100. Mittmann, B., Ungerer, P., Klann, M., Stollewerk, A., & Wolff, C. (2014). Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *EvoDevo*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-12>
101. Moe, S. J., Benestad, R. E., & Landis, W. G. (2022). Robust risk assessments require probabilistic approaches. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 18(5), 1133-1134. <https://doi.org/10.1002/ieam.4660>
102. Moriarty, F. (1988). Ecotoxicology. *Human Toxicology*, 7(5), 437-441. <https://doi.org/10.1177/096032718800700510>
103. Munoz, G., Liu, M., Vo Duy, S., Liu, J., & Sauvé, S. (2023). Target and nontarget screening of PFAS in drinking water for a large-scale survey of urban and rural communities in Québec, Canada. *Water Research*, 233, 119750. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119750>
104. Némethy, G., & Scheraga, H. A. (1962). THE STRUCTURE OF WATER AND HYDROPHOBIC BONDING IN PROTEINS. III. THE THERMODYNAMIC PROPERTIES OF HYDROPHOBIC BONDS IN PROTEINS^{1,2}. *The Journal of Physical Chemistry*, 66(10), 1773-1789. <https://doi.org/10.1021/j100816a004>
105. Nicole, W. (2013). PFOA and Cancer in a Highly Exposed Community: New Findings from the C8 Science Panel. *Environmental Health Perspectives*, 121(11-12), A340. <https://doi.org/10.1289/ehp.121-A340>
106. OCDE. (2007). *Report Of An OECD Workshop On Perfluorocarboxylic Acids (PFCAs) And Precursors* (Rapport No. ENV/JM/MONO(2007)11). Stockholm, Sweden : OCDE. Repéré à <https://theses.hal.science/tel-02299353/document>
107. OCDE. (2012). *Essai n° 211 : Daphnia magna, essai de reproduction*. Paris : Organisation for Economic Co-operation and Development. Repéré à https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-211-daphnia-magna-essai-de-reproduction_9789264185470-fr
108. OECD. (2012, 2 octobre). *Daphnia magna acute immobilisation test and reproduction test, guidelines for testing of chemicals*. [Standard guide], Paris, France : Organisation for Economic Cooperation and Development. Repéré à <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185203-en.pdf?expires=1695311022&id=id&accname=guest&checksum=2E5D131F67F5C13E5BE5FD27A2D6D765>

109. Olsen, G. W., Burris, J. M., Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Seacat, A. M., Butenhoff, J. L., & Zobel, L. R. (2007). Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environmental Health Perspectives*, 115(9), 1298-1305. <https://doi.org/10.1289/ehp.10009>
110. Palego, L., Betti, L., Rossi, A., & Giannaccini, G. (2016). Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *Journal of Amino Acids*, 2016, 8952520. <https://doi.org/10.1155/2016/8952520>
111. Pan, X., Liu, J., Zhang, D., Chen, X., Song, W., & Wu, F. (2010). Binding of dicamba to soluble and bound extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic activated sludge: A fluorescence quenching study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345(2), 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.02.011>
112. Parks, J. M., & Smith, J. C. (2016). Modeling Mercury in Proteins. *Methods in Enzymology*, 578, 103-122. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.041>
113. Paul, A. G., Jones, K. C., & Sweetman, A. J. (2009). A First Global Production, Emission, And Environmental Inventory For Perfluorooctane Sulfonate. *Environmental Science & Technology*, 43(2), 386-392. <https://doi.org/10.1021/es802216n>
114. Pelletier, É., Campbell, P. G. C., & Denizeau, F. (2004). *Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Québec, Canada : Presses de l'Université du Québec. Repéré à <https://www.puq.ca/catalogue/livres/ecotoxicologie-moleculaire-109.html>
115. Perera, N. L. D., Betancourt, J., Miksovska, J., & O'Shea, K. E. (2023). Detail study on the interaction between perfluorooctanoic acid (PFOA) with human hemoglobin (Hb). *Current Research in Toxicology*, 5, 100130. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2023.100130>
116. Pérez, F., Nadal, M., Navarro-Ortega, A., Fàbrega, F., Domingo, J. L., Barceló, D., & Farré, M. (2013). Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment International*, 59, 354-362. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.004>
117. Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K. C., Moreira-Santos, M., ... Han, T. (2009). Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (393), 01. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009012>

118. Place, B. J., & Field, J. A. (2012). Identification of Novel Fluorochemicals in Aqueous Film-Forming Foams Used by the US Military. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7120-7127. <https://doi.org/10.1021/es301465n>
119. Polubesova, T., Nir, S., Zadaka, D., Rabinovitz, O., Serban, C., Groisman, L., & Rubin, B. (2005). Water Purification of Organic Pollutants by Optimized Micelle–Clay Systems. *Environmental science & technology*, 39, 2343-8. <https://doi.org/10.1021/es049251o>
120. Post, G. B., Cohn, P. D., & Cooper, K. R. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: A critical review of recent literature. *Environmental Research*, 116, 93-117. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.03.007>
121. Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., & Korzeniowski, S. H. (2006). Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology*, 40(1), 32-44. <https://doi.org/10.1021/es0512475>
122. Quinnell, S., Hulsman, K., & Davie, P. J. F. (2004). Protein model for pollutant uptake and elimination by living organisms and its implications for ecotoxicology. *Marine Ecology Progress Series*, 274, 1-16. <https://doi.org/10.3354/meps274001>
123. Rattner, B. A. (2009). History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology (London, England)*, 18(7), 773-783. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0354-x>
124. Reilly, K., Ellis, L.-J. A., Davoudi, H. H., Supian, S., Maia, M. T., Silva, G. H., ... Lynch, I. (2023). Daphnia as a model organism to probe biological responses to nanomaterials—from individual to population effects via adverse outcome pathways. *Frontiers in Toxicology*, 5, 1178482. <https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1178482>
125. Roina, Y., Auber, F., Hocquet, D., & Herlem, G. (2022). ePTFE-based biomedical devices: An overview of surgical efficiency. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 110(2), 302-320. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34928>
126. Ross, P. D., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096-3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
127. Sajid, M., & Ilyas, M. (2017). PTFE-coated non-stick cookware and toxicity concerns: a perspective. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(30), 23436-23440. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0095-y>

128. Santé Canada. (2023, 7 février). Objectif proposé pour la qualité de l'eau potable au Canada pour les substances perfluoroalkylées et polyfluoroalkylées : Aperçu. [En ligne]. Repéré à <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/programmes/consultation-objectif-propose-qualite-eau-potable-canada-substances-perfluoroalkylees-polyfluoroalkylees/aperçu.html>
129. Savu, P. M. (2000). Fluorinated Higher Carboxylic Acids. Dans *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. (S.l.): John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0612211519012221.a01>
130. Sebastiano, M., Messina, S., Marasco, V., & Costantini, D. (2022). Hormesis in ecotoxicological studies: A critical evolutionary perspective. *Current Opinion in Toxicology*, 29, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2022.01.002>
131. Sharp, K. A. (2002). Electrostatic Interactions in Proteins. Dans G. Náray-Szabó & A. Warshel (Éds), *Computational Approaches to Biochemical Reactivity* (pp. 199-235). Dordrecht : Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/0-306-46934-0_5
132. Siegemund, G., Schwertfeger, W., Feiring, A., Smart, B., Behr, F., Vogel, H., & McKusick, B. (2000). Fluorine Compounds, Organic. Dans *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. (S.l.): John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a11_349
133. Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A. M., Gonçalves, F., & Ribeir, R. (2001). In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50(3), 174-179. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2088>
134. Stahl, T., Mattern, D., & Brunn, H. (2011). Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 1-52. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-38>
135. Steenland, K., Fletcher, T., & Savitz, D. A. (2010). Epidemiologic Evidence on the Health Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1100-1108. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901827>
136. Stern, O., & Volmer, M. (1919). Über die abklingungszeit der fluoreszenz, pp. 183-188.
137. Stickle, D. F., Presta, L. G., Dill, K. A., & Rose, G. D. (1992). Hydrogen bonding in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 226(4), 1143-1159. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91058-w](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91058-w)
138. Stockert, J. C., & Blazquez-Castro, A. (2017). *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. (S.l.) : Bentham Science Publishers. (Google-Books-ID: 4stFDwAAQBAJ).

139. Suja, F., Pramanik, B. K., & Zain, S. M. (2009). Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: a review paper. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 60(6), 1533-1544. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.504>
140. Sun, H., Li, F., Zhang, T., Zhang, X., He, N., Song, Q., ... Sun, T. (2011). Perfluorinated compounds in surface waters and WWTPs in Shenyang, China: Mass flows and source analysis. *Water Research*, 45(15), 4483-4490. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.036>
141. Tan, S., Ladewig, K., Fu, Q., Blencowe, A., & Qiao, G. G. (2014). Cyclodextrin-based supramolecular assemblies and hydrogels: recent advances and future perspectives. *Macromolecular Rapid Communications*, 35(13), 1166-1184. <https://doi.org/10.1002/marc.201400080>
142. Tang, L., Su, C., Fan, C., Li, R., Wang, Y., Gao, S., & Chen, M. (2022). Long-term effect of perfluorooctanoic acid on the anammox system based on metagenomics: Performance, sludge characteristic and microbial community dynamic. *Bioresource Technology*, 351, 127002. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127002>
143. Taves, D. R. (1968). Evidence that there are two forms of fluoride in human serum. *Nature*, 217(5133), 1050-1051. <https://doi.org/10.1038/2171050b0>
144. Taves, D. R., Guy, W. S., & Brey, W. S. JR. (1976). Organic Fluorocompounds in Human Plasma: Prevalence and Characterization. Dans *Biochemistry Involving Carbon-Fluorine Bonds* (Vol. 28, pp. 117-134). (S.l.) : AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. <https://doi.org/10.1021/bk-1976-0028.ch007>
145. Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2), 151-173. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1)
146. US Environmental Protection Agency. (2019). *EPA's per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) action plan* (Rapport No. 823R18004). Washington, DC : Environmental Protection Agency. Repéré à https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-02/documents/pfas_action_plan_021319_508compliant_1.pdf
147. Van Beijsterveldt, I. A. L. P., Van Zelst, B. D., De Fluiter, K. S., Van den Berg, S. A. A., Van der Steen, M., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2022). Poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) exposure through infant feeding in early life. *Environment International*, 164, 107274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107274>

148. Van Coillie, R., & Parent, L. (2011). *Écotoxicologie générale et appliquée*. Québec : Télé-université, Université de Québec à Montréal.
149. Van der Bruggen, B., Schaep, J., Wilms, D., & Vandecasteele, C. (1999). Influence of molecular size, polarity and charge on the retention of organic molecules by nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 156(1), 29-41. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00326-3](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00326-3)
150. Vanden Heuvel, J. P., Kuslikis, B. I., & Peterson, R. E. (1992). Covalent binding of perfluorinated fatty acids to proteins in the plasma, liver and testes of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 82(3), 317-328. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(92\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0009-2797(92)90003-4)
151. Vanni, M. J. (1988). Freshwater Zooplankton Community Structure: Introduction of Large Invertebrate Predators and Large Herbivores to a Small Species Community. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(10), 1758-1770. <https://doi.org/10.1139/f88-207>
152. Viganò, L. (1993). Reproductive strategy of *Daphnia magna* and toxicity of organic compounds. *Water Research*, 27(5), 903-909. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90156-C](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90156-C)
153. Vindimian, E., Robaut, C., & Fillion, G. (1983). A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry*, 5(4-5), 261-268.
154. Wang, Z., Cousins, I. T., Scheringer, M., Buck, R. C., & Hungerbühler, K. (2014). Global emission inventories for C4-C14 perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951 to 2030, Part I: production and emissions from quantifiable sources. *Environment International*, 70, 62-75. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.013>
155. Wei, D., Wang, B., Ngo, H. H., Guo, W., Han, F., Wang, X., ... Wei, Q. (2015). Role of extracellular polymeric substances in biosorption of dye wastewater using aerobic granular sludge. *Bioresource Technology*, 185, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.084>
156. Wei, Y., Wang, S., Shuang, S., & Dong, C. (2010). Chiral discrimination between d- and l-tryptophan based on the alteration of the fluorescence lifetimes by the chiral additives. *Talanta*, 81(4), 1800-1805. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.03.044>
157. Weiss, L. C., Tollrian, R., Herbert, Z., & Laforsch, C. (2012). Morphology of the *Daphnia* nervous system: a comparative study on *Daphnia pulex*, *Daphnia lumholtzi*, and *Daphnia longicephala*. *Journal of Morphology*, 273(12), 1392-1405. <https://doi.org/10.1002/jmor.20068>

158. Wen, B., Wu, Y., Zhang, H., Liu, Y., Hu, X., Huang, H., & Zhang, S. (2016). The roles of protein and lipid in the accumulation and distribution of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in plants grown in biosolids-amended soils. *Environmental Pollution*, 216, 682-688. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.032>
159. Xia, X., Rabearisoa, A. H., Jiang, X., & Dai, Z. (2013). Bioaccumulation of Perfluoroalkyl Substances by *Daphnia magna* in Water with Different Types and Concentrations of Protein. *Environmental Science & Technology*, 47(19), 10955-10963. <https://doi.org/10.1021/es401442y>
160. Xing, Y., Li, Q., Chen, X., Fu, X., Ji, L., Wang, J., ... Zhang, Q. (2021). Different transport behaviors and mechanisms of perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in saturated porous media. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123435>
161. Xu, C., Chen, H., & Jiang, F. (2015). Adsorption of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) on polyaniline nanotubes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 479, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.03.045>
162. Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., & Gamo, T. (2005). A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8), 658-668. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.026>
163. Yan, W., Qian, T., Zhang, L., Wang, L., & Zhou, Y. (2021). Interaction of perfluorooctanoic acid with extracellular polymeric substances - Role of protein. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123381. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123381>
164. Yang, H.-B., Zhao, Y.-Z., Tang, Y., Gong, H.-Q., Guo, F., Sun, W.-H., ... Chen, F. (2019). Antioxidant defence system is responsible for the toxicological interactions of mixtures: A case study on PFOS and PFOA in *Daphnia magna*. *The Science of the Total Environment*, 667, 435-443. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.418>
165. Yu, J., Hu, J., Tanaka, S., & Fujii, S. (2009). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in sewage treatment plants. *Water Research*, 43(9), 2399-2408. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.009>
166. Zhang, H., Jia, Y., Khanal, S. K., Lu, H., Fang, H., & Zhao, Q. (2018). Understanding the Role of Extracellular Polymeric Substances on Ciprofloxacin Adsorption in Aerobic Sludge, Anaerobic Sludge, and Sulfate-Reducing Bacteria Sludge Systems. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6476-6486. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00568>

167. Zhang, Lianying, Ren, X.-M., & Guo, L.-H. (2013). Structure-Based Investigation on the Interaction of Perfluorinated Compounds with Human Liver Fatty Acid Binding Protein. *Environmental Science & Technology*, 47(19), 11293-11301. <https://doi.org/10.1021/es4026722>
168. Zhang, Lili, Feng, X., Zhu, N., & Chen, J. (2007). Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), 551-557. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2007.05.001>
169. Zhang, S., Zhang, H., Feng, Y., Maddela, N. R., Li, S., & Zhang, L. (2023). Insights into the Responses of the Partial Denitrification Process to Elevated Perfluorooctanoic Acid Stress: Performance, EPS Characteristic and Microbial Community. *Water*, 15(16), 2977. <https://doi.org/10.3390/w15162977>
170. Zhao, L., Teng, M., Zhao, X., Li, Y., Sun, J., Zhao, W., ... Wu, F. (2023). Insight into the binding model of per- and polyfluoroalkyl substances to proteins and membranes. *Environment International*, 175, 107951. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107951>
171. Zhou, Q., Deng, S., Zhang, Q., Fan, Q., Huang, J., & Yu, G. (2010). Sorption of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on activated sludge. *Chemosphere*, 81(4), 453-458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.009>
172. Zhou, T., Li, X., Liu, H., Dong, S., Zhang, Z., Wang, Z., ... Wang, Q. (2024). Occurrence, fate, and remediation for per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in sewage sludge: A comprehensive review. *Journal of Hazardous Materials*, 466, 133637. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133637>
173. Zhu, H., & Kannan, K. (2020). A pilot study of per- and polyfluoroalkyl substances in automotive lubricant oils from the United States. *Environmental Technology & Innovation*, 19, 100943. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100943>