

# AVIS DE SOUTENANCE DE THÈSE

**Ghaya ALCHOUBASSI**

CANDIDAT(E) au DOCTORAT CHIMIE,  
à **L'UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR**  
SOUTIENDRA PUBLIQUEMENT sa THÈSE

le **13 décembre 2019 à 10h00**  
à **L'UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR**  
**Amphithéâtre de l'IPREM**

SUR LE SUJET SUIVANT :

**"Développement de nouvelles approches qualitatives et quantitatives de spéciation des métaux impliqués dans les complexes de faible poids moléculaires dans les plantes"**


JURY :

Katarzina BIERLA, Ingénieur de Recherche, UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR  
Eduardo BOLEA, Professeur, UNIVERSITÉ DE SARAGOSSE (ESPAGNE)  
Beata GODLEWSKA-ZYLKIEWICZ, Professeur, UNIVERSITÉ DE BIALYSTOK (POLOGNE)  
Ryszard LOBINSKI, Directeur de Recherche CNRS, IPREM - UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR  
Rochele SOGARI-PICOLOTO, Maître de Conférences, UNIVERSITÉ FÉDÉRALE DE SANTA MARIA (BRÉSIL)  
Joanna SZPUNAR, Ingénieur de Recherche CNRS - HDR, IPREM - UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Pau, le 27 novembre 2019

Le Président et,  
Par délégation, la Vice-Présidente de la Commission de la  
Recherche

 Isabelle BARAILLE

  
La Directrice de l'École Doctorale  
Sciences Exactes et leurs Applications (ED211)  
Mme Sophie MERCIER

Nom et Prénom du doctorant : AlChoubassi Ghaya  
Directeur de thèse : Szpunar Joanna  
Co-directeur de thèse : Bierla Katarzyna  
Laboratoire d'accueil : IPREM

## Développement de nouvelles approches qualitatives et quantitatives de spéciation des métaux impliqués dans les complexes de faibles poids moléculaires circulant dans les plantes

Des métaux tels que Fe, Mn, Ni, Zn et Cu sont essentiels dans le cycle de vie des plantes pour maintenir les fonctions cellulaires, l'activation enzymatique, l'expression des gènes et le métabolisme des acides aminés, des lipides et des glucides. Leur quantité doit être contrôlée, car des concentrations plus élevées peuvent les rendre toxiques. En conséquence, les usines ont mis au point des mécanismes leur permettant de contrôler et de réguler l'absorption, le transport et le stockage de métaux essentiels mais également non essentiels; et un rôle important dans ces processus est joué par des ligands spécifiques sécrétés par les plantes afin d'améliorer le transport du métal.

L'objectif principal de cette thèse était de développer et de valider des protocoles de méthodes de spectrométrie de masse, qui pourraient être appliqués à la détermination et à la quantification de composés métalliques de faible poids moléculaire dans des liquides végétaux. Malheureusement, la quantité de liquide végétal (par exemple, le xylème), qui peut généralement être échantillonnée après plusieurs semaines de culture fastidieuse, se situe dans la plage des microlitres (ou inférieure), ce qui rend difficile le développement de la méthode. Ainsi, comme compromis, l'eau de coco (*Cocos nucifera*) a été choisie comme modèle pour les études de développement de méthodes d'endospermes de plantes, car la quantité d'échantillon disponible pour les expériences est beaucoup plus importante.

La partie principale de la thèse concerne le développement de méthodes de caractérisation de l'échantillon du modèle en utilisant différentes colonnes chromatographiques : les conditions d'éluion ont été optimisées pour une utilisation ultérieure sur les échantillons réels. Les conditions MS ESI ont été ajustées (ionisation en mode positif ou négatif) en fonction des conditions chromatographiques utilisées. La préparation des échantillons avant la séparation HILIC a également été évaluée et les conditions de séparation optimisées sur les complexes modèles ont été testées.

La recherche d'une stratégie analytique générique pour la quantification sans standard de différents complexes métalliques de faible poids moléculaire par spectrométrie de masse moléculaire est poursuivie à l'aide de l'analyse de dilution isotopique (IDA) avec l'ajout d'un pic isotopique  $^{58}\text{Fe}$  sous forme ionique et HILIC-ICP-MS. Le protocole a été soigneusement étudié afin de conserver les complexes métalliques d'origine de manière non dégradée et d'obtenir la formation de complexes métalliques avec l'excès de ligands présents dans l'échantillon. Enfin, les procédures développées ont été appliquées à la caractérisation et à la quantification des composés du fer dans des échantillons de xylème de plusieurs plantes (*Pisum sativum*, *Paspalum urvillei* et *Setaria parviflora*)

Metals such as Fe, Mn, Ni, Zn and Cu are essential in the life cycle of plants to maintain cellular functions, enzymatic activation, gene expression and metabolism of amino acids, lipids and carbohydrates. Their quantity must be controlled because higher concentrations can make them toxic. As a result, the factories have developed mechanisms to control and regulate the absorption, transportation and storage of essential but non-essential metals; and an important role in these processes is played by specific ligands secreted by the plants in order to improve the transport of the metal.

The main objective of this thesis was to develop and validate protocols for mass spectrometry methods, which could be applied to the determination and quantification of low molecular weight metal compounds in plant fluids. Unfortunately, the amount of vegetable liquid (e.g., xylem), which can generally be sampled after several weeks of tedious cultivation, is in the microliter (or lower) range, which makes the development of the method difficult. Thus, as a compromise, coconut water (*Cocos nucifera*) was chosen as a model for endosperm plant development studies, as the amount of sample available for experiments is much larger.

The main part of the thesis concerns the development of model sample characterization methods using different chromatographic columns: the elution conditions were optimized for later use on real samples. MS ESI conditions were adjusted (positive or negative ionization) depending on the chromatographic conditions used. Sample preparation prior to HILIC separation was also evaluated and optimized separation conditions on the model complexes were tested.

The search for a generic analytical strategy for the non-standard quantification of different low molecular weight metal complexes by molecular mass spectrometry is pursued using isotopic dilution analysis (IDA) with the addition of a spike isotope  $^{58}\text{Fe}$  in ionic form and HILIC-ICP-MS. The protocol has been carefully studied in order to preserve the original metal complexes in a non-degraded manner and to obtain the formation of metal complexes with the excess of ligands present in the sample. Finally, the developed procedures were applied to the characterization and quantification of iron compounds in xylem samples from several plants (*Pisum sativum*, *Paspalum urvillei* and *Setaria parviflora*).