



Biological effects of manufactured nanoparticles : influence of their caractéristiques

Angélique Simon-Deckers

► To cite this version:

Angélique Simon-Deckers. Biological effects of manufactured nanoparticles: influence of their caractéristiques. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0081 . pastel-00004918

HAL Id: pastel-00004918

<https://pastel.hal.science/pastel-00004918>

Submitted on 19 Mar 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

$$N^\circ / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad /$$

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Toxicologie humaine et environnementale

présentée et soutenue publiquement
par

SIMON-DECKERS Angélique

le 5 décembre 2008

EFFETS BIOLOGIQUES DE NANOPARTICULES MANUFACTUREES : INFLUENCE DE LEURS CARACTERISTIQUES

Directeur de thèse : Cécile REYNAUD

Codirecteur de thèse : Marie CARRIERE

Travail réalisé : *CEA Saclay, UMR9956, Laboratoire Pierre Süe
F-91191 Gif-sur-Yvette*

Devant le jury :

Pr. Pascale BAUDA, Professeur, **Université de Metz**
Dr. Jorge BOCZKOWSKI, Directeur de recherche, **INSERM**
Dr. Marie CARRIERE, Docteur, **CEA Saclay**
Dr. Hélène DESQUEYROUX, Docteur, **ADEME**
Dr. Roselyne FERRARI, Maître de conférence, **Université Paris 7**
Dr. Cécile REYNAUD, Directeur de recherche, **CEA Saclay**
Pr. Daniel TOME, Professeur, **Agro Paris Tech**

Rapporteur
Rapporteur
Tuteur de thèse
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Président

*Par respect de l'environnement, la mise en page de ce document
est conçue pour une impression en recto-verso.
Merci d'imprimer uniquement si nécessaire, en respectant ce choix.*

Angélique

Cette thèse a été cofinancée par l'ADEME et le CEA
et entre dans le cadre des projets ANR Analyse multi-échelle des interactions entre
nanoparticules et bactéries (EC2CO) et Signanotox (SEST)
et du projet C'nano Ile-de-France THE_{nano}

Avant-propos

Ce mémoire marque l'aboutissement de trois années de travail intense et enrichissant, qui auraient été bien fades sans la participation de près ou de loin de nombreuses personnes que je remercie sincèrement et à qui je souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite.

Tout d'abord je souhaite remercier tous les membres de mon jury Pascale Bauda, Jorge Boczkowski, Hélène Desqueyroux, Roselyne Ferrari et Daniel Tomé, qui ont acceptés d'évaluer ces trois années de travail et qui ont permis, tout comme les membres de mon comité de thèse Stéphane Binet, Jean-Claude Meunier et Jérôme Rose, de faire avancer la réflexion sur les résultats obtenus.

Je tiens à remercier l'ADEME qui m'a dotée d'une bourse de thèse et C'Nano Ile-de-France et l'ANR qui ont financés une partie des ces travaux. Merci aussi à Stéphane Lequien et Pascal Berger qui m'ont accueillis au sein du Laboratoire Pierre Süe et ont mis à ma disposition les outils nécessaires à la réalisation de ce travail.

Cette histoire n'aurait pu naître ni se dérouler au mieux sans le noyau dur « de filles » de ce projet que je ne remercierai jamais assez pour son suivi, sa disponibilité et ses conseils : ma directrice de thèse Cécile Reynaud, mes encadrantes Marie Carrière et Barbara Gouget, et enfin Nathalie Herlin et Martine Mayne. Cette équipe de choc a permis de faire face à tous les problèmes !

J'ai une pensée encore plus particulière pour toi Marie, pour ta présence et ton soutien quotidien qui fut d'un grand réconfort tout au long de cette thèse. Tu es un encadrante vraiment exceptionnelle.

Je pense aussi à tous les membres et amis de la promo 2005-2008 des thésards du laboratoire : Judith Monnier, Maïté Hanot et mon colocataire de bureau Guillaume Untereiner qui a dû, en plus, me supporter au quotidien pendant ces trois années. Nous nous sommes serrés les coudes dans les moments difficiles et nous avons tous réussi dans les temps. J'espère sincèrement recroiser votre route, et qui sait à l'avenir nous retravaillerons peut-être ensemble dans le même laboratoire.

Ce travail ne serait pas aussi abouti sans les conseils et les protocoles miracles de Sabrina Barillet qui ont permis de débloquent de nombreuses embûches en fin de thèse. Merci à toi mais aussi à Mary-Line Jugan pour vos corrections au moment de la rédaction de ce mémoire.

Je pense aussi à tous les autres membres du groupe Toxicologie Humaine et Environnementale et plus particulièrement à Estelle Bakkaus, Céline Thiebault, Laure Avoscan et Sarah Milgram, mais aussi à Hélène Bureau et Charlotte Gonde. Je n'oublierai jamais tous les bons moments passés avec vous à la paillasse ou à la pause thé.

Un grand merci à mon stagiaire Sylvain Lôo que j'ai maltraité pendant plusieurs mois pour obtenir encore et encore plus de résultats. Ce fut une expérience très satisfaisante ou devrais-je plutôt dire enrichissante. Je ne doute pas de ta réussite pour la suite.

Je n'oublie pas non plus toutes les autres personnes du Laboratoire Pierre Süe que je connais plus ou moins bien, mais qui ont toujours été agréables avec moi, et plus particulièrement Eddy Foy notre expert en diffraction des rayons X mais aussi en séries TV.

Que serais-je devenue sans les physico-chimistes du Laboratoire Francis Perrin : Julien Glory, Michaël Helezen, Habert Aurélie, Hisham Maskrott, Bruno Pignon et Mathieu Pinault qui ont accueillis dans leur antre et aidés une « extraterrestre biologiste ». Grâce à vous j'ai pu comprendre et dompter les « nano ».

Tous mes remerciements à Danielle Jaillard et Jéril Degrouard du Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay qui m'ont formée, conseillée et permis d'avoir les magnifiques photos qui agrémentent ce mémoire. J'ai toujours eu du plaisir à venir travailler chez vous.

Un grand merci à Cécile Sicard et Emilie Brun du Laboratoire de Chimie Physique d'Orsay avec qui nous avons agréablement collaboré et écrit une publication scientifique. Emilie tu es en train de finir ta thèse bon courage pour cette période qui est la plus difficile mais qui reste la plus satisfaisante et enrichissante.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du projet ANR EC2CO pour leurs remarques judicieuses, et plus particulièrement à Nicolas Menguy de l'Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés de Paris pour sa disponibilité. Je pense aussi aux deux autres thésardes de ce projet Ophélie Zeyon à qui je souhaite beaucoup de réussite en Allemagne et Valérie Siron à qui je transmets tout mon courage pour sa fin de thèse.

Une pensée aussi à mes collègues de conférences et spécialistes en effets biologiques des nanotubes de carbone Dan Elgabri et Cyril Bussy avec qui j'ai passé de très bons moments à l'étranger.

Je ne peux oublier de remercier toutes les personnes qui sont à l'origine de ma passion progressive pour la biologie, les sciences et la recherche : les professeurs de la filière Sciences et Techniques de Laboratoire du Lycée Jules Renard de Nevers, les professeurs de la classe préparatoire Techniques Biologiques de l'ENCPB, les professeurs de l'ENSIA de Massy et enfin Emmanuelle Darbon-Rongère mon maître de stage de Master.

Je souhaite finir, mais peut-être aurais-je dû commencer par elles, par toutes les personnes qui comptent le plus pour moi et à qui je dédie ce mémoire. Tout d'abord à mes parents qui sont à l'origine de tout et qui m'ont toujours appuyée au cours de mes longues études. Un grand merci à mon père qui m'a convertie et aidée avec Latex et sans qui ce mémoire ne serait pas aussi abouti visuellement.

Enfin à mon mari Edouard, dont le soutien et l'amour quotidien me sont indispensables, et à la future petite famille que nous allons très bientôt former.

*On fait la science avec des faits, comme on fait
une maison avec des pierres :
mais une accumulation de faits n'est pas plus une
science qu'un tas de pierres n'est une maison.*

HENRI POINCARÉ

Introduction	1
1 Contexte de l'étude	3
1.1 Les nanoparticules manufacturées : un enjeu pour l'avenir?	5
1.1.1 Définition et intérêt	5
1.1.1.1 Des propriétés nouvelles	7
1.1.1.2 Les sources de nanoparticules	8
1.1.1.3 Les méthodes de synthèse des nanoparticules ma- nufacturées.	9
1.1.1.4 Les nanoparticules manufacturées : un marché pro- mettant de nombreuses applications	10
1.1.2 Les nanoparticules d'oxyde métallique	11
1.1.3 Les nanotubes de carbone	13
1.2 Les risques pour l'homme et l'environnement	15
1.2.1 Effets des nanoparticules sur l'environnement	15
1.2.1.1 Voies de contamination de l'environnement et dis- tribution dans les différents compartiments écolo- giques	15
1.2.1.2 Risques pour les écosystèmes et les organismes les constituant	18
1.2.2 Effets des nanoparticules sur l'Homme	19
1.2.2.1 Voies d'entrée dans l'organisme	19

1.2.2.2	Translocation et devenir dans l'organisme	22
1.2.2.3	Effets sur la santé humaine	23
1.3	Effets biologiques des nanoparticules à l'échelle cellulaire et moléculaire	25
1.3.1	Effets chez les Procaryotes	25
1.3.2	Effets chez les Eucaryotes	28
1.3.2.1	Les nanoparticules d'oxyde métallique	28
1.3.2.2	Les nanotubes de carbone	30
1.4	Synthèse du chapitre	32
Objectifs et démarche de l'étude		35
2 Matériels et méthodes		37
2.1	Nanoparticules étudiées et techniques de caractérisation	39
2.1.1	Sources des nanoparticules	39
2.1.2	Préparation des suspensions de nanoparticules	40
2.1.3	Etat d'agglomération par spectroscopie par corrélation de photon (SCP)	42
2.1.4	Mesure du potentiel zêta	44
2.1.5	Identification de la structure cristalline par DRX	47
2.1.6	Analyse des éléments traces dissouts par ICP-MS	49
2.1.7	Analyse élémentaire de la surface des nanoparticules par EDS	51
2.1.8	Surface spécifique et porosité par la méthode de BET	52
2.2	Techniques de microbiologie	54
2.2.1	Souches bactériennes	54
2.2.2	Conditions de culture et suivi de croissance	55
2.2.3	Evaluation de la viabilité cellulaire après exposition dans l'eau	57
2.2.3.1	Conditions d'exposition dans l'eau	57
2.2.3.2	Les dénombrements sur milieu solide	57
2.2.3.3	Le kit Live/Dead® BacLight TM	58

2.3	Techniques de culture cellulaire	60
2.3.1	Lignée cellulaire et culture	60
2.3.2	Evaluation de la viabilité cellulaire : les différents tests de cytotoxicité	61
2.3.2.1	Le test MTT	61
2.3.2.2	Le test XTT	62
2.3.2.3	Le test au rouge neutre	63
2.3.2.4	Le test à la résazurine	64
2.3.2.5	Le test LDH	64
2.3.2.6	Le test au bleu trypan	65
2.3.3	Dosage des espèces réactives de l'oxygène par la sonde H ₂ DCF- DA	66
2.3.4	Dosage des systèmes intervenant dans la régulation du stress oxydant	67
2.3.4.1	Extraction des protéines cellulaires	67
2.3.4.2	Dosage du glutathion total GSH	67
2.3.4.3	Dosage de la glutathion peroxydase GPx	68
2.3.4.4	Dosage de la glutathion réductase GRED	69
2.3.4.5	Dosage de la superoxyde dimustase SOD	70
2.3.4.6	Dosage de la catalase	71
2.3.5	Evaluation de la génotoxicité	72
2.3.5.1	le test des comètes en condition alcaline	72
2.3.5.2	l'immunomarquage des histones γ -H ₂ AX	73
2.3.5.3	le test des micronoyaux	74
2.4	Techniques communes	76
2.4.1	Dosage protéique par la méthode au BCA	76
2.4.2	Observations au microscope électronique en transmission.	76
2.4.2.1	La microscopie électronique en transmission (MET).	76
2.4.2.2	Préparation des échantillons	78
2.5	Analyses statistiques	79

3	Caractérisation des nanoparticules	81
3.1	Caractéristiques physico-chimiques	83
3.1.1	Nature, forme et taille	83
3.1.1.1	Les nanotubes de carbone (NtC)	83
3.1.1.2	Les nanoparticules d'oxyde métallique	87
3.1.2	Surface spécifique, évaluation de la taille, de la porosité et de l'aggrégation	90
3.1.3	Charge surfacique et point isoélectrique	92
3.1.4	Structure cristalline	93
3.1.5	Analyse chimique de la surface des nanoparticules	93
3.2	Préparation et stabilité des nanoparticules	94
3.2.1	La dispersion des nanoparticules par sonication	94
3.2.2	État de dispersion des nanoparticules	97
3.2.2.1	Dans les suspensions mères aqueuses	97
3.2.2.2	Évolution de l'état de dispersion dans les milieux biologiques	98
3.2.3	Dissolution en suspension aqueuse	100
3.3	Interférences des nanoparticules avec les mesures optiques	101
3.3.1	L'absorbance des nanoparticules	101
3.3.2	Interférences avec les signaux de fluorescence	101
3.4	Synthèse du chapitre	104
4	Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire	107
4.1	Effet cytotoxique des nanoparticules pour les bactéries	109
4.1.1	Effets sur la croissance bactérienne	109
4.1.2	Effets sur la viabilité bactérienne suite à une exposition aux nanoparticules dans l'eau	111
4.1.2.1	Les dénombrements sur boîte : une technique inadaptée à nos conditions	111
4.1.2.2	La technique du Live/Dead® BacLight TM	113
4.2	Effet cytotoxique des nanoparticules pour les pneumocytes A549	118

4.2.1	Choix des tests de viabilité	118
4.2.2	Effets des nanotubes de carbone sur la viabilité cellulaire .	120
4.2.3	Effets des nanoparticules d'oxyde métallique sur la viabilité cellulaire	123
4.3	Discussion	126
4.3.1	Un effet cytotoxique avéré mais dépendant de différents paramètres	126
4.3.1.1	Pour les bactéries	126
4.3.1.2	Pour les cellules pulmonaires	128
4.3.2	Des effets spécifiques aux nanoparticules	130
4.3.3	Une adsorption et/ou une accumulation des nanoparticules chez les cellules A549	131
4.4	Synthèse du chapitre	133
5	La localisation cellulaire des nanoparticules	135
5.1	Observations microscopiques des bactéries exposées aux nanoparticules	137
5.1.1	Interactions avec les nanotubes de carbone	137
5.1.2	Interaction avec les nanoparticules d'oxyde métallique . . .	139
5.2	Observations microscopiques des pneumocytes exposés aux nanoparticules	144
5.2.1	Interactions avec les nanotubes de carbone	144
5.2.2	Interactions avec les nanoparticules d'oxyde métallique . . .	145
5.3	Discussion	150
5.3.1	Une pénétration de la paroi chez les bactéries	150
5.3.2	Une accumulation cellulaire dans les pneumocytes, non dépendante du type de nanoparticule	154
5.4	Synthèse du chapitre	156
6	Mécanismes d'action des nanoparticules	159
6.1	Nanoparticules et stress oxydant	161
6.1.1	Le stress oxydant et les mécanismes de régulation de ce stress	161

6.1.2	Stress oxydant induit dans les pneumocytes	162
6.1.2.1	Dosage des espèces réactives de l'oxygène intracel- lulaires	162
6.1.2.2	Dosage des systèmes intervenant dans la régula- tion du stress oxydant	165
6.2	Nanoparticules et génotoxicité	166
6.2.1	Les effets génotoxiques : définition et nature	167
6.2.2	Le test des comètes	167
6.2.3	Le test de l'immunomarquage de l'histone γ -H ₂ AX	169
6.2.4	Le test des micronoyaux	170
6.3	Discussion	171
6.3.1	Une production d'ERO en présence de nanoparticules	171
6.3.2	Un mécanisme de cytotoxicité non résolu	176
6.3.3	Peu de cassures à l'ADN	178
6.4	Synthèse du chapitre	178
Conclusions et perspectives		181
Bibliographie		187
Abréviations		211
Glossaire		213
Liste des figures		222
Liste des tableaux		224
Annexes		225

Introduction

A l'aube du XXI^{ème} siècle, les nanosciences et nanotechnologies promettent des progrès remarquables que ce soit, entre autres, dans les domaines de la santé, de l'environnement ou encore de l'énergie. Ainsi ces dernières années nous avons assisté à un envol de l'intérêt des scientifiques, mais aussi du grand public, pour les nanotechnologies, ainsi que des moyens humains et financiers mis en oeuvre pour les développer. Cependant, peut être en conséquence des expériences du passé, elles soulèvent aussi de nombreuses inquiétudes en particulier au sujet de leurs effets sur la santé humaine et l'environnement. Les toxicologues, mais aussi les concepteurs, se sont donc penchés dès le début du développement des nanotechnologies sur la question afin d'anticiper leur impact et d'établir des règles d'utilisation. Cette tâche s'avère cependant très complexe, car il existe de nombreuses nanoparticules et qu'il a été de plus montré que chaque caractéristique physico-chimique pouvait influencer leurs effets. De plus, les tests biologiques classiquement utilisés et conçus pour évaluer la toxicité de substances chimiques se révèlent parfois non adaptés aux nanoparticules et trompeurs, ceci en raison d'interférences découlant de leur caractère physique non soluble et de leurs propriétés nouvelles. Plusieurs documents sont néanmoins parus sur le sujet, notamment un rapport d'experts de l'AFSSET sur le thème «nanomatériaux et sécurité au travail », un guide de recommandations édité par la commission européenne et un rapport du grenelle de l'environnement.

Cette étude, qui a débuté avec les premières études toxicologiques des nanoparticules en France, n'a pas pour prétention de faire le tour du sujet mais d'apporter des éléments de réponse afin de comprendre la nature et l'origine des effets biologiques des nanoparticules en les combinant à une caractérisation physico-chimique poussée des nanoparticules. Nous nous sommes concentrés sur deux classes de nanoparticules étant actuellement produites en grandes quantités en raison de leur intérêt technologique : les nanoparticules d'oxyde métallique, plus

particulièrement les nanoparticules d'oxyde de titane, et les nanotubes de carbone. Les effets biologiques d'un panel de ces nanoparticules possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes a été étudié *in vitro* sur deux modèles cellulaires : des cellules pulmonaires alvéolaires humaines permettant de se placer dans un contexte d'exposition de l'homme par voie respiratoire, et des bactéries permettant de se placer dans un contexte de contamination environnementale.

Dans le présent document, sera tout d'abord présenté un état de l'art donnant une définition des nanoparticules et décrivant leurs principaux effets biologiques connus. Après avoir présenté les objectifs et la démarche retenue pour l'étude, les matériels et méthodes utilisés seront décrits. Les résultats obtenus seront ensuite détaillés et discutés à travers quatre chapitres présentant : les caractérisations physico-chimiques des nanoparticules réalisées, les effets des nanoparticules sur la viabilité cellulaire, l'étude de leur localisation cellulaire et enfin la recherche de leurs mécanismes d'action. Pour finir, une conclusion générale et des propositions de perspectives d'étude seront présentés.

CHAPITRE 1

Contexte de l'étude

1.1 Les nanoparticules manufacturées : un enjeu pour l'avenir ?	5
1.2 Les risques pour l'homme et l'environnement	15
1.3 Effets biologiques des nanoparticules à l'échelle cellulaire et moléculaire	25
1.4 Synthèse du chapitre	32

Bien qu'existant depuis les années 1980, les nanosciences et nanotechnologies ont pris un réel envol depuis le début du XXI^{ème} siècle. Ces disciplines, véritables convergences entre la physique, la chimie et la biologie, étudient et mettent en pratique la conception et l'utilisation des nanoparticules. Elles promettent un éventail impressionnant d'applications qui pour certaines sont déjà commercialisées. Actuellement il n'y a aucune réglementation à leur utilisation, et leur impact à long terme sur l'environnement et l'Homme est encore mal connu. Cependant, la communauté scientifique s'est penchée très tôt sur le sujet et commence à apporter des éléments de réponse. Dans ce chapitre seront tout d'abord donnés une définition et un descriptif des principales nanoparticules et de leurs intérêts. Les risques pour l'Homme et l'environnement seront ensuite abordés. Enfin les effets biologiques connus à l'échelle cellulaire et moléculaire seront décrits.

1.1 Les nanoparticules manufacturées : un enjeu pour l'avenir ?

1.1.1 Définition et intérêt

Au sens strict une nanoparticule est un assemblage d'atome dont au moins une des dimensions est dans le domaine nanométrique ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). La limite admise est inférieure à 100 nm car c'est en général l'ordre de grandeur des longueurs caractéristiques des processus physico-chimiques. En dessous de ces valeurs, les propriétés changent à cause des effets de confinement ou parce que la surface joue un rôle prépondérant (Pitkethly, 2003). On distingue les nanopoudres correspondant à des nanoparticules plus ou moins sphériques et les nanotubes qui sont des fibres dont le rapport longueur sur diamètre est supérieur à 3.

Du point de vue de la taille, les nanoparticules se situent sur l'échelle du monde vivant entre l'hélice d'ADN (3,4 nm) et un virus (100 nm) (voir figure 1.1 page suivante).

On appelle nanomatériau, un matériau constitué d'un assemblage de nanoparticules. C'est un matériau nanostructuré qui peut être obtenu par une approche ascendante (bottom-up) qui correspond à un assemblage de nanoparticules, ou par une approche descendante (top-down) qui correspond à une nanostructuration d'un matériaux massif par attaque physique ou chimique.

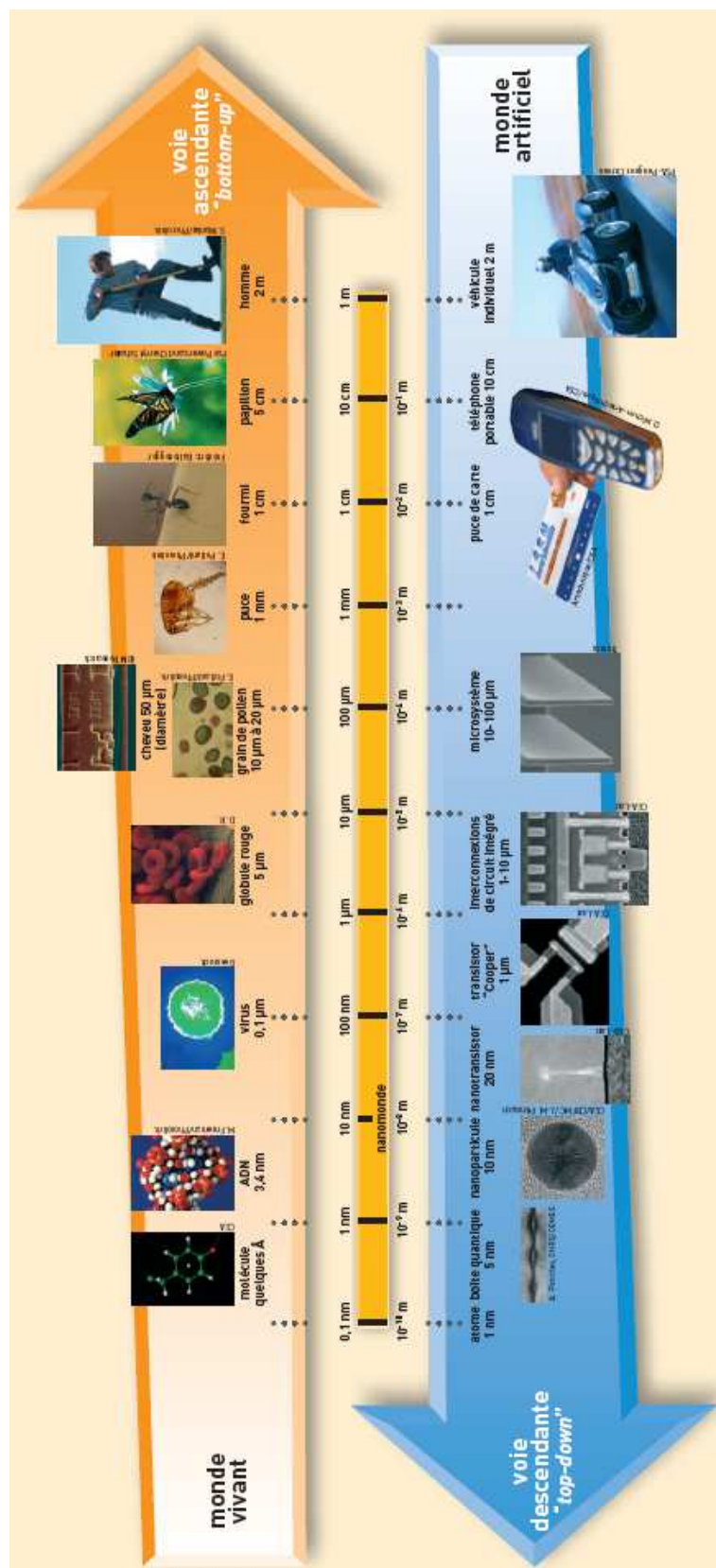


FIGURE 1.1 – Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Energie Atomique, 2005)

1.1.1.1 Des propriétés nouvelles

Lorsqu'une particule est non nanométrique, ses propriétés physiques et chimiques découlent du matériau qui la constitue : on appelle cela l'effet de volume. Mais lorsqu'elle atteint une taille nanométrique le rapport surface sur volume augmente (voir figure 1.2), les effets de surface ne sont donc plus négligeables vis-à-vis de ceux de volume. De plus l'augmentation importante de la proportion d'atomes en surface provoque une augmentation de l'activité surfacique. Ainsi la participation élevée de la surface aux propriétés, combinée à l'augmentation de l'activité surfacique confère de nouvelles propriétés aux nanoparticules.

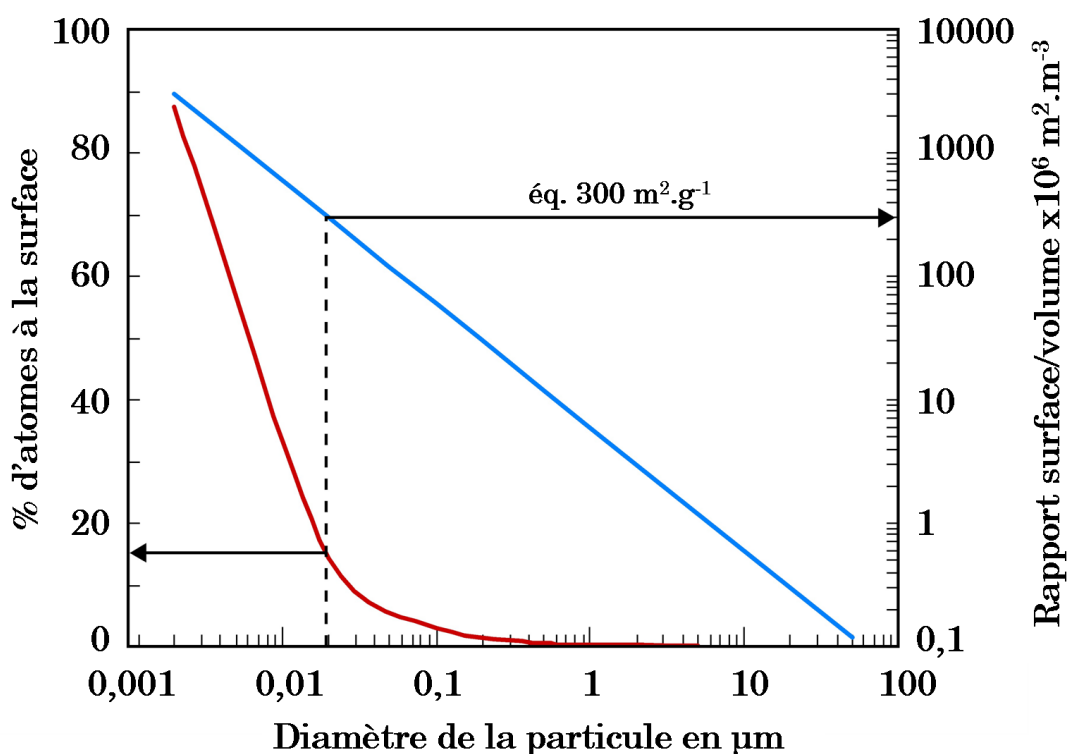


FIGURE 1.2 – Évolution du rapport surface volume (en bleu) et de la fraction d'atomes présents à la surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (d'après Witschger and Fabries, 2005a).

Les particules de taille nanométrique n'ont donc pas les mêmes propriétés que leurs homologues de taille plus importante, d'où leur intérêt technologique. Le tableau 1.1 présente des exemples d'évolution de propriétés à l'échelle nanométrique. Comme il est décrit dans la revue de Luther (2004), dans le domaine biologique, leur taille proche de celle des constituants cellulaires les rends capable d'interagir avec les cellules vivantes. Par exemple, les nanoparticules peuvent avoir une perméabilité accrue vis-à-vis des barrières biologiques. De plus la quantité de surface importante des nanoparticules est susceptible de favoriser les ré-

actions catalytiques entre les atomes localisés à la surface et les cibles biologiques (ADN, protéine,...).

Propriétés	Exemples
Catalytique	Efficacité catalytique élevée due au rapport surface/volume élevé
Electrique	Augmentation de la conductivité électrique des céramiques et des nanocomposites magnétiques Augmentation de la résistance électrique des métaux
Magnétique	Augmentation de la coersivité magnétique, comportement superparamagnétique
Mécanique	Augmentation de la dureté et de la solidité des métaux et des alliages, de la ductilité et de la superélasticité des céramiques
Optique	Changement spectral de l'absorption optique et des propriétés fluorescentes, augmentation de l'efficacité quantique des cristaux semi-conducteurs
Stérique	Augmentation de la sélectivité Sphères creuses pour un transport spécifique de médicaments et une distribution contrôlée
Biologique	Augmentation de la perméabilité vis-à-vis des barrières biologiques (membrane, barrière épithéliale,...), augmentation de la biocompatibilité

TABEAU 1.1 – Évolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique (d'après Luther, 2004).

1.1.1.2 Les sources de nanoparticules

On distingue trois types de nanoparticules en fonction de leur provenance (voir tableau 1.2) :

- les nanoparticules d'origine naturelle résultant essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère.
- les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs.
- les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle ou nanoparticules manufacturées.

Les Hommes sont exposés depuis toujours à des nanoparticules naturelles. Cependant, c'est seulement depuis la révolution industrielle que cette exposition est devenue élevée. Plus récemment, l'essor des nanotechnologies a entraîné la production de plus en plus importante de nanoparticules manufacturées auxquels

les travailleurs peuvent être exposés mais aussi les populations en cas de dissémination dans l'environnement.

Naturelles	Anthropogéniques	
	Non intentionnelles	Intentionnelles
Conversions gaz/particules	Combustion des moteurs	Nanomatériaux manufacturés
Feux de forêt	Centrales électriques	nanoparticules, nanotubes,
Lave de volcan	Incinérateurs	nanofilms
Virus	Avions	métaux, semi-conducteurs
Magnetites biogéniques :	Fumées de métaux	oxydes métalliques, carbone
bactéries, protozoaires,	(soudage, etc..)	
mollusques, arthropodes,	Fumées de polymères	
poissons, oiseaux,	Autres fumées	
cerveau humain	Surfaces chauffées	
Ferritine	Fritures, grillades	
	Moteur électrique	

TABLEAU 1.2 – Principales sources de nanoparticules (d'après Oberdörster et al., 2005b)

Par la suite, seuls les effets des nanoparticules d'origine anthropogénique, et plus particulièrement des nanoparticules manufacturées, seront décrits.

1.1.1.3 Les méthodes de synthèse des nanoparticules manufacturées.

Les nanoparticules peuvent être synthétisées selon différentes approches. On distingue l'approche ascendante (bottom-up) par laquelle les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule, de l'approche descendante (top-down) par laquelle une grande structure est graduellement sous-dimensionnée jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques. A l'heure actuelle, quatre grandes catégories de procédés sont utilisées pour produire des nanoparticules à l'échelle industrielle (Ostiguy et al., 2006) :

- les procédés par condensation en phase gazeuse (approche ascendante) qui sont basés sur une nucléation de vapeur sursaturée suivie d'une croissance de particules par condensation, coagulation et capture. Ils regroupent entre autres : la pyrolyse laser, la pyrolyse de flamme, l'évaporation à haute température et les synthèses dans un plasma (plasma de micro-ondes, plasma thermique).
- les synthèses par évaporation puis déposition de vapeurs (approche ascendante) regroupant les dépôts chimiques en phase vapeur (CVD) et les dépôts physiques en phase vapeur (PVD).

- la formation de colloïdes par réactions chimiques impliquant des phénomènes de précipitation contrôlée dans des solvants en phase liquide ou colloïdale (approche ascendante).
- les procédés mécaniques par attrition qui consistent en une réduction mécanique de la taille du matériau à l'aide de frottements et d'impacts à haute énergie (approche descendante).

1.1.1.4 Les nanoparticules manufacturées : un marché promettant de nombreuses applications

Les nanoparticules intéressent de plus en plus d'industriels de par leur marché grandissant et polyvalent (industrie automobile, industrie chimique, industrie électronique, industrie agro-alimentaire, etc. . .). D'autre part les applications potentielles en médecine, énergie et environnement sont très prometteuses pour la société. Ainsi, de plus en plus de budgets et de ressources humaines sont consacrés aux nanotechnologies. En 2006, près de 12,4 Md de \$ ont été investis dans le monde en R&D sur les nanotechnologies, et seulement une petite part a été consacrée à l'estimation des risques sanitaires et environnementaux. En Europe, 3,5 Md d'€ seront investis dans les nanosciences et nanotechnologies entre 2007 et 2013 dans le cadre du 7^{ème} PCRD (Programme-Cadre de Recherche et de Développement). Le rapport World Nanotechnology Market 2006 estime à 29 Md de \$ le marché des nanotechnologies en 2008 et selon l'optimisme des estimations il devrait atteindre entre 150 Md de \$ en 2010 (Mitsubishi Institute) et 2600 Md de \$ en 2014 soit 15 % du marché total (Lux Research) (Hullmann, 2006).

Les principales nanoparticules manufacturées ainsi que des exemples d'applications basées sur l'élaboration de nanocomposites¹ avec ces nanoparticules sont présentées dans le tableau 1.3 page ci-contre. Actuellement, de nombreux produits contenant des nanoparticules sont commercialisés et utilisés dans le monde. Une partie de ces produits, directement acquérables par les consommateurs, sont référencés sur le site internet concernant le Project on Emerging Nanotechnologies de Woodrow Wilson International Center for Scholars². Ils étaient au nombre de 609 en février 2008 et la base de données s'enrichit de 3 à 4 nouveaux par semaine. Les nanoparticules d'Ag s'avèrent être les plus citées avec 143 produits en contenant, soit environ 20 % de l'inventaire. Les produits contenant des nanoparticules à base de carbone (nanotubes de carbone et fullerènes) sont les deuxièmes plus référencés. Les autres nanoparticules retrouvées dans ces produits sont le

1. matériaux contenant des nanoparticules

2. site internet <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer> consulté le 4 juillet 2008

zinc (incluant l'oxyde de zinc ZnO), le titane (incluant les oxydes de titane TiO₂), la silice (SiO₂) et l'or.

Nanoparticules	Exemples d'applications
Métaux	
Fe	Enregistrement magnétique de données analogiques et digitales, décontamination des nappes phréatiques
Al	Agent antimicrobien, circuits électroniques, Cellules solaires,...
Ni	Capaciteur céramique
Ag	Biocide (USA), Encre conductrice transparente
Au	Applications catalytiques (production propylène, oxydation CO,...), applications électriques et optiques (détecteur, appareil optique)
Oxydes	
Al ₂ O ₃	Polissage des puces électroniques, Composant de céramique, agent retardant les flammes, enduit de papier d'impression,...
ZrO ₂	Céramique (capteur oxygène, composant pompe), Spray thermique, prothèses orthopédiques et dentaires, vecteur de médicaments
TiO ₂	Crème solaire, catalyseur, Carrelage et vitre autonettoyante
ZnO	Crème solaire, antifongique, nanolaser, céramique
SiO ₂	Polissage des puces semiconductrices
Carbones	
Fullerène	Cellules solaires, batterie lithium, Membrane proton conductrice, médicaments
SWCNT	Matériaux résistants aux radiations
MWCNT	Peinture automobile, batteries

TABLEAU 1.3 – Principaux nanoparticules manufacturées ayant un intérêt commercial (d'après Theodore and Kunz, 2005).

1.1.2 Les nanoparticules d'oxyde métallique

Il en existe de nombreuses natures, mais les plus courantes sont : les oxydes de titane (TiO₂), les oxydes de fer (Fe₂O₃), les oxydes de zinc (ZnO), les oxydes d'aluminium (Al₂O₃) et la silice (SiO₂). Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux nanoparticules TiO₂ qui sont les nanoparticules d'oxyde métallique les plus produites au monde (GeoYearbook, 2007).

Les oxydes de titane

Les oxydes de titane sont commercialisés sous forme non nanométrique depuis le début du XX^{ème} siècle et sont couramment utilisés comme pigments opacifiants dans de nombreux produits tels que les peintures, les plastiques, les papiers, etc...(Chen and Mao, 2007). Récemment, le développement des nanotechnologies a permis d'obtenir des nanoparticules de TiO_2 ayant une très grande surface spécifique et donc une très grande réactivité. Ainsi, de nombreuses applications mettant en pratique cette réactivité sont utilisées ou en développement, en particulier la dégradation de polluants et la production d'énergie solaire résultant respectivement de leurs propriétés photocatalytique¹ et photovoltaïque². Cela a pour conséquence une production de nanoparticules de TiO_2 de plus de 5000 T par an (GeoYearbook, 2007).

La réactivité des TiO_2 dépend de leur structure cristalline, c'est à dire de l'arrangement cristallographique de leurs atomes (Chen and Mao, 2007; Linsebigler et al., 1995). Pour les oxydes de titane purs, on distingue trois structures cristallines : les formes tétraogonales anatase et rutile (voir figure 1.3) et la forme orthorhombique brookite. Actuellement les nanoparticules de TiO_2 les plus produites sont des anatases, en raison des méthodes de synthèse favorisant cette forme à la taille nanoparticulaire (Naicker et al., 2005; Zhang and Banfield, 1998) mais aussi en raison de leur réactivité photocatalytique plus importante (Linsebigler et al., 1995). En 2006, les particules d'oxyde de titane ont été classées par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) dans le groupe des carcinogènes 2B, c'est à dire des carcinogènes possibles pour l'Homme (voir annexe 3 page 237). Cette classification repose sur des études montrant que de fortes concentrations de pigments en poudre composés de TiO_2 et les nanoparticules de TiO_2 , provoquent des cancers du tractus respiratoire chez le rat exposé par inhalation ou instillation intratrachéale³ (Baan, 2007). Des recoupements entre rongeurs et Homme, d'effets biologiques conduisant à des cancers ayant déjà été démontrés, l'IARC a considéré que ces études sont suffisamment inquiétantes pour les personnes travaillant dans des atmosphères confinées riches en TiO_2 . Cependant il faut noter qu'aucune étude menée jusqu'à présent sur l'Homme ne suggère une association entre une exposition au TiO_2 et une augmentation du risque de cancer (Ramanakumar et al., 2008).

1. capacité à augmenter la vitesse d'une réaction chimique par interaction de photons à la surface du catalyseur

2. capacité à générer une tension électrique suite à l'absorption de photons.

3. technique d'administration d'un composé : ce dernier est directement introduit dans les poumons via la trachée.

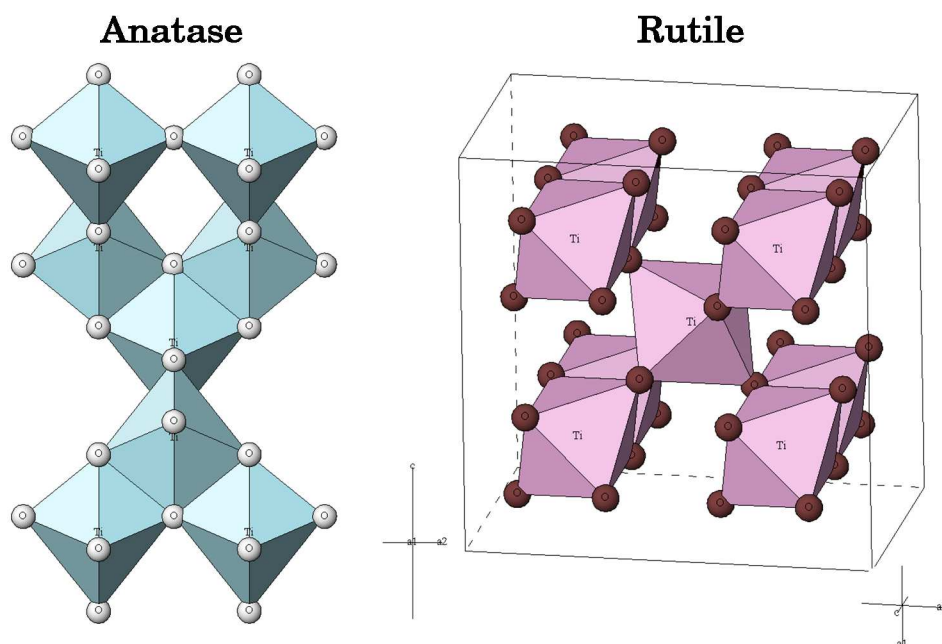


FIGURE 1.3 – Arrangement cristallographique des atomes de TiO₂ anatase et rutile (d'après Advanced Industrial Science and Technology Kansai¹).

1.1.3 Les nanotubes de carbone

Contrairement à la première idée reçue, les nanotubes de carbone (NtC) ne sont pas uniquement le fruit des technologies actuelles. En effet, des NtC naturels ont été observés dans de nombreuses émissions de combustion mais aussi dans des carottes de glace vieilles de plus de 10 000 ans (Murr et al., 2004). Cependant la découverte dans les années 90 de leurs exceptionnelles propriétés et de méthodes permettant leur synthèse (Iijima, 1991) a entraîné une production de plus en plus importante de NtC manufacturés. Ils ont représenté un chiffre d'affaire de 700 M de \$ en 2006-07, et celui-ci est estimé à 3,6 et 13 Md de \$ en 2008-10 et 2011-2014 (GeoYearbook, 2007).

Les NtC sont des fibres creuses de diamètre inférieur à 100 nm. Ils sont composés de feuillets de carbone repliés sur eux-même pour former un tube. On distingue les nanotubes de carbone ayant un seul feuillet (SWCNT : single-walled carbon nanotube) de ceux ayant plusieurs feuillets (MWCNT : multi-walled carbon nanotube) (voir figure 1.4 page suivante).

Les NtC possèdent des propriétés qui intéressent plusieurs domaines de la science. Tout d'abord, ils sont extrêmement résistants, plus de deux cent fois plus que

1. site internet <http://staff.aist.go.jp/nomura-k/english/itscgallery-e.htm> consulté en ligne le 28 juin 2008

l'acier. Ils ont une grande élasticité et peuvent donc être courbés très facilement sans rompre. Ainsi ils peuvent être tressés ou tissés pour former des matériaux aux propriétés mécaniques inégalées. Ensuite, leurs propriétés électriques sont particulièrement intéressantes : selon leur hélicité, les NtC peuvent être conducteurs ou semi-conducteurs. De plus, les NtC sont capables d'émettre des électrons lorsqu'on les soumet à un champ électrique, et cet effet est d'autant plus important que le NtC est long et fin. Enfin, les NtC sont aussi des objets intéressants pour les chimistes et biologistes, qui peuvent les remplir de molécules par capillarité, ou greffer des molécules à leur surface pour modifier leur propriétés (Jain et al., 2007).

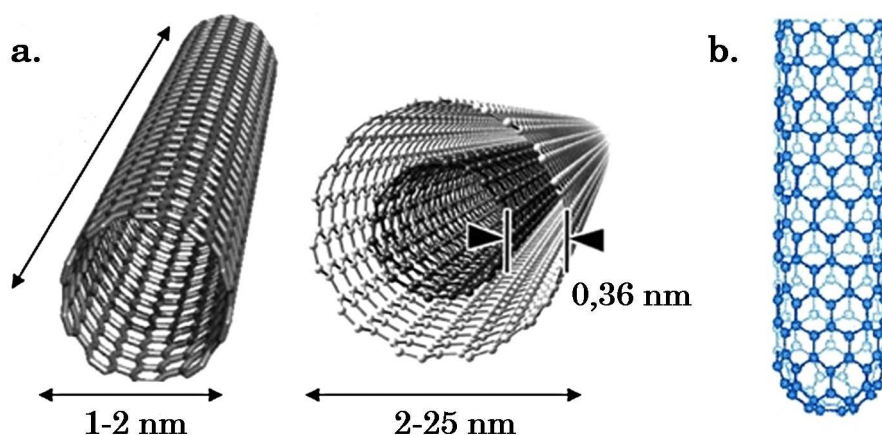


FIGURE 1.4 – Les nanotubes de carbone. a. Schéma de l'organisation des NtC avec leurs tailles types, à gauche un SWCNT et à droite un MWCNT à deux parois (Reilly, 2007), b. Schéma de l'extrémité d'un NtC (Harris, 1999).

Les NtC sont souvent comparés aux fibres d'amiante. En effet, tous deux sont des fibres ayant un faible diamètre pour une longueur élevée, et ayant une forte stabilité chimique dans les environnements physiologiques se traduisant par une longue biopersistence (Murr and Soto, 2004). Il est donc à craindre qu'ils aient les mêmes effets sur la santé, effets qui dépendent du rapport longueur sur diamètre (Lippmann, 1990). Ainsi, deux études récentes mettent en avant l'analogie des effets pathologiques provoqués par des NtC et par des fibres d'amiante injectés directement dans la cavité pleurale de rats ou de souris (Poland et al., 2008; Takagi et al., 2008). Cependant comme l'ont discuté Kane and Hurt (2008), aucune étude d'inhalation n'a été menée afin d'évaluer si les NtC peuvent effectivement se retrouver dans la cavité abdominale comme les fibres d'amiante.

1.2 Les risques pour l'homme et l'environnement

1.2.1 Effets des nanoparticules sur l'environnement

La présence de substances non naturelles dans l'environnement augmente proportionnellement à leur utilisation par l'Homme. Ainsi le développement des nanotechnologies et de leurs utilisations, aura très certainement pour conséquence une augmentation de la concentration en nanoparticules dans l'air, les eaux et les sols. Ils pourront donc atteindre les écosystèmes (voir figure 1.5).

Des études commencent à montrer l'impact que pourrait avoir les nanoparticules sur l'environnement, mais actuellement il est difficile de savoir si les nanoparticules vont poser un problème pour l'environnement à court ou à long terme. C'est pourquoi l'Union Européenne préconise le principe de précaution en ayant adopté un code de bonne conduite pour une recherche responsable en nanosciences et nanotechnologies (Union Européenne, 2008).

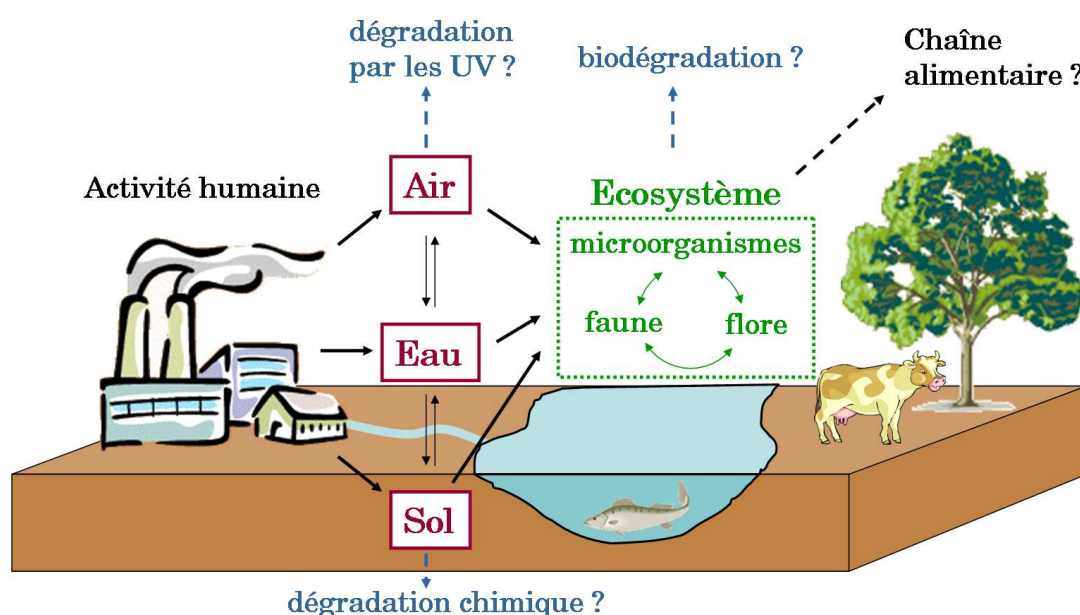


FIGURE 1.5 – Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement. En rouge sont indiquées les voies de contaminations primaires et en bleu les voies de dégradation hypothétiques.

1.2.1.1 Voies de contamination de l'environnement et distribution dans les différents compartiments écologiques

Peu d'étude ont été publiées sur la contamination, le devenir et la stabilité des nanoparticules manufacturées dans l'environnement. Récemment une modélisation du devenir des nanoparticules dans l'environnement a été réalisée, et plus

particulièrement des NtC et des nanoparticules de TiO_2 et d'Ag (Mueller and Nowack, 2008). Cette étude tient compte de leur production, de leur utilisation et des modalités actuelles de recyclage et d'élimination. Une estimation de leur libération dans l'environnement (air, eau et sol) a été établie (voir tableau 1.4).

	Air en $\mu\text{g.m}^{-3}$		Eau en $\mu\text{g.L}^{-1}$		Sol en $\mu\text{g.kg}^{-1}$	
	SR	SP	SR	SP	SR	SP
Ag	$1,7.10^{-3}$	$4,4.10^{-3}$	0,03	0,08	0,02	0,1
TiO_2	$1,5.10^{-2}$	$4,2.10^{-2}$	0,7	16	0,4	4,8
NtC	$1,5.10^{-3}$	$2,3.10^{-3}$	0,0005	0,0008	0,01	0,02

TABLEAU 1.4 – Prédiction des concentrations en nanoparticules de TiO_2 , d'Ag et NtC dans les différents compartiments environnementaux (Mueller and Nowack, 2008). Avec SR : scénario réaliste et SP : scénario pessimiste.

Les particules ultrafines dans l'air

L'aérosol atmosphérique contient des nanoparticules qui sont alors appelées particules ultrafines ou $\text{PM}_{0,1}$ ¹. Actuellement, ces particules ultrafines résultent essentiellement de la conversion gaz-particules. Elles constituent la fraction majoritaire en nombre et en surface des particules (voir figure 1.6). En règle générale, il y a variabilité de la concentration en particules ultrafines dans l'air, en fonction des sources de pollution et des conditions météorologiques. Cependant la concentration moyenne dans l'atmosphère est de l'ordre de 10^3 à 10^5 nanoparticules. cm^{-3} (Kulmala et al., 2004).

De nombreux travaux ont été menés sur le comportement des particules ultrafines dans l'air et donc indirectement sur le comportement probable des nanoparticules manufacturées. Contrairement aux particules de taille supérieure à 100 nm dont le mouvement est régi principalement par les principes de gravité² et convection thermique³, celui des nanoparticules se fait essentiellement par diffusion⁴. En particulier à l'échelle macroscopique, il s'agit de diffusion turbulente ce qui se traduit par une persistance dans l'air relativement longue et une pénétration ou sortie des locaux facilitée (Witschger and Fabries, 2005a).

Actuellement il est difficile de déterminer la part de nanoparticules manufacturées dans l'aérosol atmosphérique (Ostiguy et al., 2006). En effet les techniques

1. Particulate Matter 0,1 : particules dont le diamètre est inférieur à 0,1 μm
2. attraction terrestre ayant pour conséquence une sédimentation des grosses particules
3. déplacement de matière provoqué par une différence de température
4. migration d'une zone plus concentrée en particules vers une zone moins concentrée

actuelles permettent très difficilement de récolter la fraction PM 0,1 de l'aérosol atmosphérique en raison de la difficulté à les séparer du reste de l'aérosol (SCE-NIHR, 2006). De plus, les quantités récoltées sont très faibles et ne permettent donc pas une analyse très fine des constituants.

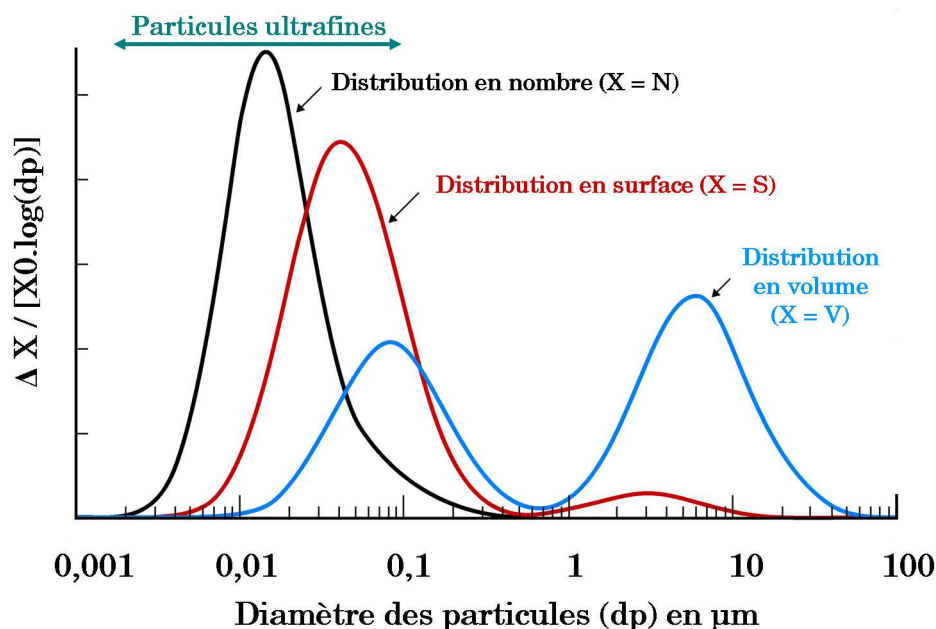


FIGURE 1.6 – Distributions granulométriques d'un aérosol atmosphérique en environnement urbain (d'après Witschger and Fabries, 2005b)

Les nanoparticules dans l'eau et le sol

Il est communément admis que c'est sous la forme dissoute (ou au moins modérément dissoute) dans l'eau que beaucoup de substances ont le maximum d'impact sur l'environnement. En effet c'est sous cette forme qu'elles sont le plus susceptibles d'être transportées, accumulées, dégradées et transformées. Les nanoparticules sont *a priori* peu ou pas solubles dans cet élément, cela semble donc limiter leur dispersion dans l'environnement. Cependant, il n'est pas exclu que de par leur petite taille, les nanoparticules puissent aussi très bien se disperser dans l'environnement et ainsi interagir avec celui-ci. Par exemple il a déjà été montré que certaines nanoparticules d'oxyde métallique ont une dispersion stable dans l'eau malgré le fait qu'elles soient partiellement agglomérées (Zhang et al., 2008) et que la dispersion des NtC est stabilisée par les matières organiques naturelles dans l'eau de rivière (Hyung et al., 2007). De même leur potentiel de migration et de dépôt dans les milieux poreux tel que les aquifères, ou le sol a été évalué par des études de mobilité dans un milieu poreux défini (Lecoanet and Wiesner, 2004). Cette étude montre que les fullerènes, et à moindre degré les nanoparti-

cules TiO_2 , se déposent sur le milieu poreux, ce qui prédit une sorption sur les sédiments et le sol.

Très peu d'études relatent la contamination des eaux et des sols par des nanoparticules manufacturées car en réalité il est difficile de les distinguer des nanoparticules naturelles et anthropogéniques non intentionnels. Ce n'est que très récemment que des nanoparticules de TiO_2 manufacturées ont été décelées dans un échantillon issu d'un cours d'eau suisse (Kaegi et al., 2008). Ces nanoparticules proviennent probablement de revêtements de facade dans lesquels elles sont incorporées comme catalyseur autonettoyant.

D'autre part, des nanoparticules manufacturées pourrait être rejetées dans les eaux et les sols de manière intentionnelle. En effet de nombreuses études décrivent l'utilisation de nanoparticules comme dépolluant (Liu and Zhao, 2007; Theron et al., 2008). Ils pourraient donc être injectés volontairement dans un but de rémediation des eaux et des sols. Cependant même si des essais *in situ* ont déjà été réalisés, la tendance semble être à la prudence puisque les effets indirects sur les écosystèmes ne sont pas connus (Tratnyek and Johnson, 2006).

1.2.1.2 Risques pour les écosystèmes et les organismes les constituant

A ce jour, peu d'études ont été menées afin d'évaluer les effets des nanoparticules sur les écosystèmes. La première étude, qui a été conduite sur le sujet, montre que l'exposition pendant 48 h du Black-bass à grande bouche¹ à seulement 0,5 ppm de fullerènes colloïdaux, a pour conséquence une augmentation de la peroxydation lipidique dans le cerveau et une diminution du glutathion, qui est un marqueur du stress oxydant dans les branchies (Oberdörster, 2004). D'autres études montrent que les nanoparticules peuvent avoir des effets néfastes sur la faune et la flore aquatique (Hund-Rinke and Simon, 2006; Lovern and Klaper, 2006; Smith et al., 2007). De même les nanoparticules peuvent aussi avoir des effets sur la croissance des végétaux terrestres. En effet, les nanoparticules d' Al_2O_3 (Yang and Watts, 2005) et de Zn ou ZnO (Lin and Xing, 2007) sont capables d'inhiber la croissance de différentes espèces de plantes, cette inhibition dépendant du surfactant utilisé (Yang and Watts, 2005). Il a aussi été démontré que certains nanoparticules peuvent avoir un effet bactéricide sur différentes souches bactériennes (voir chapitre 1.3.1 page 25). Il est donc tout à fait envisageable que ces mêmes nanoparticules puissent inhiber la croissance de souches naturelles et ainsi déséquilibrer les écosystèmes. Enfin, certains nanoparticules peuvent fixer

1. espèce de poisson très répandue dans les lacs et les étangs

d'autres polluants à leur surface, ce qui dans certains cas rend moins toxique le polluant et dans d'autres cas augmente l'effet toxique (Navarro et al., 2008).

Ainsi, ces quelques études montrent que les nanoparticules peuvent avoir un impact sur les écosystèmes. Cependant, pour la plupart d'entre elles, des effets sont observés à des concentrations élevées qui ne reflètent probablement pas les conditions environnementales. De plus il faudrait étudier une très grande diversité de modèles et de nanoparticules pour pouvoir prédire les conséquences sur l'environnement à court ou à long terme. Les connaissances dans le domaine ne demandent donc qu'à être enrichies et approfondies.

1.2.2 Effets des nanoparticules sur l'Homme

1.2.2.1 Voies d'entrée dans l'organisme

L'Homme peut entrer en contact avec les nanoparticules de trois façons : en les touchant (voie cutanée), en les ingérant (voie digestive) ou en les respirant (voie respiratoire). Cette dernière est probablement la plus conséquente et donc la plus étudiée.

L'appareil respiratoire

Le dépôt des nanoparticules dans l'appareil respiratoire se fait essentiellement par diffusion (Witschger and Fabries, 2005a). La localisation de ce dépôt dépend de la taille, de la forme et de l'état d'agglomération des particules. Ainsi dans le cas de particules sphériques non agglomérées, l'intensité du dépôt en fonction de leur taille a pu être modélisée dans les différentes régions du tractus respiratoire : la région extra-thoracique (incluant la bouche, le nez, le larynx et le pharynx), l'arbre trachéo-bronchique (qui s'étend de la trachée aux bronches) et la région alvéolaire (constituée des bronchioles terminales et des alvéoles). D'après ce modèle, les nanoparticules comprises entre 5 et 100 nm de diamètre se déposent essentiellement dans la région alvéolaire. Il est donc tout à fait justifié de travailler avec des nanoparticules supérieure à 5 nm de diamètre lors d'études *in vitro* sur des cellules alvéolaires.

Suite au dépôt dans les voies respiratoires, l'organisme peut mettre en oeuvre différents mécanismes d'élimination des nanoparticules en fonction de leur localisation mais aussi de leur taille et de leur nature (Buzea et al., 2007; Yang et al., 2008b). L'escalier mucociliaire est le principal mécanisme mis en jeu pour éliminer les particules des régions extra-thoracique et trachéo-bronchique : le mouvement des cils emmène le mucus contenant les particules piégées jusqu'au

pharynx où il sera éliminé dans le tractus intestinal. C'est une élimination rapide (la plus grande partie en 24h dans la région trachéo-bronchique) en particulier pour les particules ultrafines déposées (Kreyling and Scheuch, 2000).

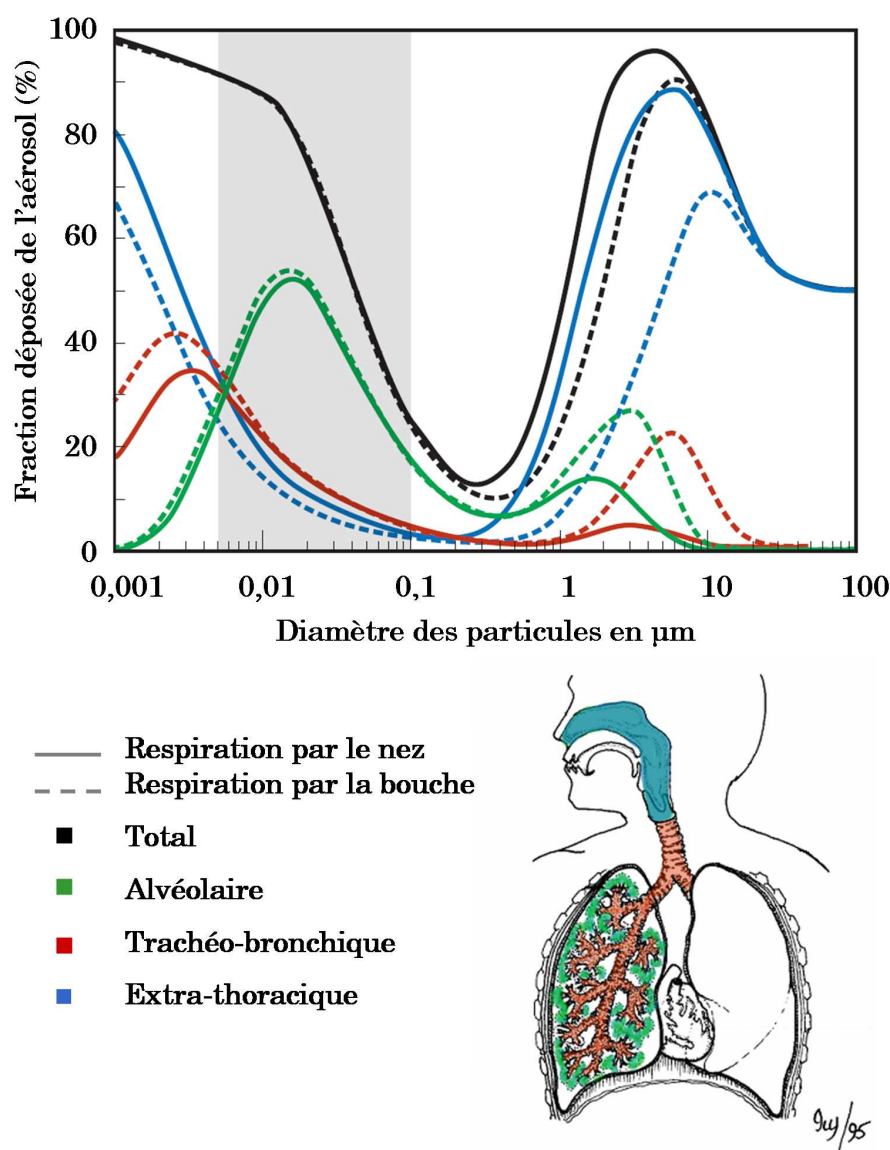


FIGURE 1.7 – Dépôt de particules dans les différentes régions des poumons (d'après Witschger and Fabries, 2005a). Ce dépôt a été prédit par un modèle mathématique publié par la Commission Internationale de la Protection Radiobiologique CIPR (1994) pouvant tenir compte des paramètres liés à l'aérosol mais aussi des paramètres physiologiques liés au sujet. Dans le cas présenté, il s'agit d'un sujet respirant majoritairement par le nez ou la bouche et effectuant un travail standard. De plus les particules sont considérées sphériques et non-agglomérées.

Les macrophages alvéolaires sont les acteurs principaux de l'élimination des particules dans la région alvéolaire. Il s'agit aussi de la première barrière empêchant les nanoparticules de transloquer à travers la barrière épithéliale. Cette élimina-

tion se fait par phagocytose des particules (Geiser et al., 2008), migration des macrophages jusqu'à l'escalier mucociliaire et passage dans le tractus digestif (environ 6-12h après phagocytose). L'étape de phagocytose peut être un phénomène très long, en effet la demi-vie d'une particule solide dans la région alvéolaire est de 70 jours chez le rat et de plus de 700 jours chez l'homme (Oberdörster et al., 2005b). L'efficacité de ce mécanisme dépend beaucoup de la capacité des macrophages à détecter les particules puis à se déplacer jusqu'à elles et enfin de les phagocyter. Ainsi les fibres $> 20 \mu\text{m}$ ne sont pas phagocytées ce qui entraîne une longue demi-vie dans la région alvéolaire.

Le tractus digestif

Le tractus digestif constitue une autre voie d'entrée des nanoparticules qui peuvent avoir deux origines : les premières qui peuvent être ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les médicaments, et les secondes qui sont éliminées de l'appareil respiratoire par l'escalier mucociliaire. Seulement quelques études ont été menées sur ce sujet et montrent que les nanoparticules sont éliminées rapidement avec peu de passage à travers la barrière intestinale (Jani et al., 1994; Yamago et al., 1995). Cependant, comme pour la translocation de la barrière alvéolaire, il existe très certainement des différences suivant la nature et la taille des nanoparticules. En effet il a été montré que l'internalisation des nanoparticules par les cellules intestinales dépend de ces deux paramètres (Hillyer and Albrecht, 2001; Win and Feng, 2005).

La voie cutanée

L'exposition par voie cutanée est probablement faible en raison du temps de dépôt long des nanoparticules sur les surfaces. Cependant elle ne peut pas être négligée dans le cas de manipulations directes des nanoparticules au poste de travail ou encore lors de l'utilisation de crèmes cutanées contenant des nanoparticules telles que les crèmes solaires.

Du fait de leur taille réduite, les nanoparticules pourraient avoir plus de facilité à passer la barrière cutanée pour atteindre le derme qui est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, en nerfs sensitifs et en cellules dendritiques. Cependant la plupart des études ne montrent pas (Cross et al., 2007; Lademann et al., 1999) ou ne montrent qu'une faible pénétration de nanoparticules dans l'épiderme mais sans qu'il y ait passage dans le derme lorsque celui-ci est intact (Alvarez-Román et al., 2004). Ainsi l'épiderme semble être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des nanoparticules mais à condition que celui-ci ne soit pas lésé. En effet quelques études mettent en évidence une pénétration dans le derme : celle-

ci serait imputée à des lésions cutanée ou à une ouverture des follicules pileux et non à une diffusion dans l'épiderme (Mavon et al., 2007; Tinkle et al., 2003). Le passage ou non des nanoparticules par la peau n'apparaît donc pas clair et est probablement dépendant de leurs caractéristiques. De plus, il reste aussi à déterminer, en cas de pénétration, si les nanoparticules restent localisées dans le derme ou si ils transloquent par le sang ou encore les nerfs sensitifs.

1.2.2.2 Translocation et devenir dans l'organisme

Quelque soit le mode d'exposition, il a été supposé que les nanoparticules sont capables de passer les barrières et ainsi d'être distribuées dans tout l'organisme (voir figure 1.8). Mais cela n'a été réellement montré que pour la barrière pulmonaire.

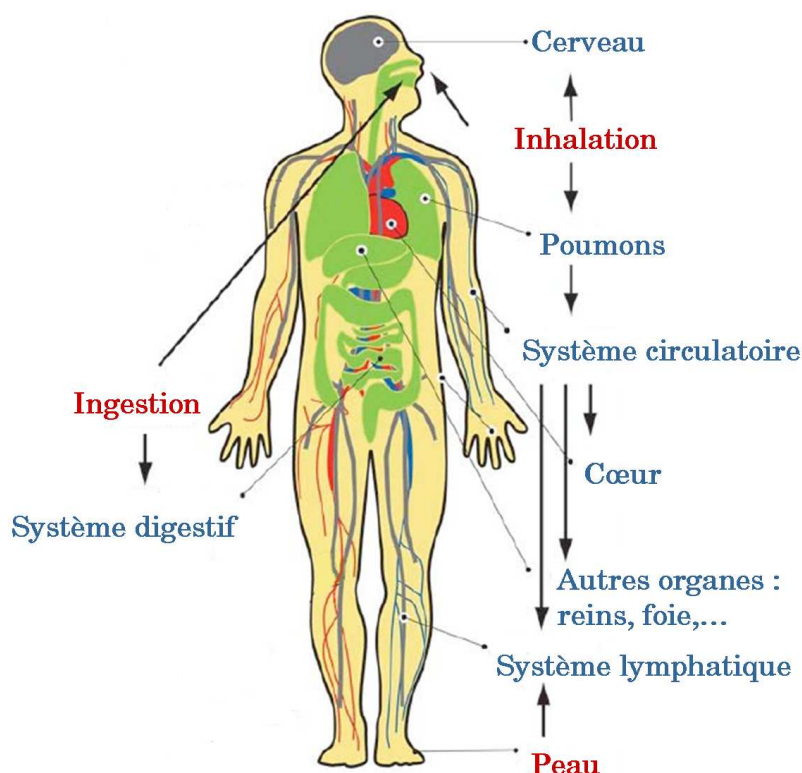


FIGURE 1.8 – Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules (en rouge) et devenir dans le corps humain (bleu) (d'après Buzea et al., 2007).

La translocation¹ après inhalation est à priori spécifique des nanoparticules. Elle serait due à leur taille réduite et aux propriétés surfaciques différentes qui accroissent leur perméabilité vis-à-vis des barrières biologiques. De plus, l'éventuelle inefficacité de l'élimination des nanoparticules dans la région alvéolaire

1. passage des barrières physiologiques

par les macrophages entraînerait une plus grande interaction entre les nanoparticules et les cellules épithéliales des poumons (pneumocytes I et II), et donc pourrait favoriser la translocation de ceux-ci à travers la barrière épithéliale. Plusieurs études montrent chez le rat que les nanoparticules peuvent atteindre, selon leur nature, les tissus interstitiels voire même les capillaires sanguins de l'épithélium alvéolaire (Möller et al., 2008; Mühlfeld et al., 2007; Takenaka et al., 2006; Yang et al., 2008b). Ainsi la translocation de particules ayant été montrée plus importante chez les primates ou les chiens que chez les rongeurs, cela suggère une forte translocation chez l'Homme (Kreyling and Scheuch, 2000).

Une translocation de nature différente et inhabituelle a aussi été démontrée : il s'agit du passage de nanoparticules inhalées, par les nerfs olfactifs jusqu'aux lobes olfactifs. Ainsi, une étude sur le rat montre une accumulation de nanoparticules de carbone de 35 nm de diamètre dans le bulbe olfactif qui est dépendante du temps (Oberdörster et al., 2004). Ce phénomène n'a pas été vérifié chez l'Homme, cependant une estimation a été réalisée, en utilisant un modèle de dépôt des particules et des données sur les paramètres olfactifs, qui permet de penser que la translocation de nanoparticules de 20 nm serait de 1,6 à 10 fois plus importante chez l'Homme que chez le rat (Oberdörster et al., 2005b).

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer dans quels organes sont accumulés les nanoparticules après pénétration. Pour cela des injections intraveineuses de nanoparticules ont été réalisées sur des rongeurs, puis la distribution et la durée de vie dans les différents organes ont été évaluées. Par exemple des nanoparticules de TiO_2 injectées à raison de 5 mg.kg^{-1} , n'ont pas d'effet sur la santé des rats et se retrouvent essentiellement par ordre décroissant de concentration et de persistance dans le foie, la rate, les poumons et les reins (Fabian et al., 2008). Dans la plupart des études, les principaux organes dans lesquels sont localisés les nanoparticules sont le foie, la rate et dans une moindre mesure les reins (Ballou et al., 2004; Yamago et al., 1995). De plus l'intensité d'accumulation et de persistance de ces nanoparticules dans ces différents organes dépendent beaucoup des caractéristiques de ces derniers, en particulier de leur nature, de leur taille (Jong et al., 2008) et de leur fonctionnalisation (Kattumuri et al., 2007). En ce qui concerne les NtC, une étude montre qu'ils se localisent essentiellement dans les reins et sont éliminés rapidement dans les urines (Singh et al., 2006).

1.2.2.3 Effets sur la santé humaine

Ne connaissant pas le degré d'exposition de l'homme aux nanoparticules, il est difficile de quantifier et de connaître la nature des effets sur la santé humaine.

Cependant des effets sont à prévoir si on se fie aux données complémentaires obtenues par les études *in vivo* déjà réalisées et les études épidémiologiques sur l'impact des particules ultrafines de l'air sur la santé humaine.

Les études épidémiologiques ont le désavantage de ne pas permettre d'établir la contribution réelle aux effets observés des particules ultrafines, et encore moins des nanoparticules manufacturées. Malgré tout des conclusions générales peuvent en être tirées puisque les effets observés avec des particules fines sont en partie dus aux particules ultrafines. Ainsi plusieurs études montrent que de fortes concentrations en particules fines (PM 2,5¹) ont un impact à court terme sur l'état de santé en particulier en ce qui concerne les problèmes respiratoires et cardiovasculaires (Peters et al., 1997). Des études à plus long terme montrent que l'exposition à de fortes concentrations en particules fines peut conduire à une réduction de l'espérance de vie (Brunekreef, 1997; Maynard and Maynard, 2002).

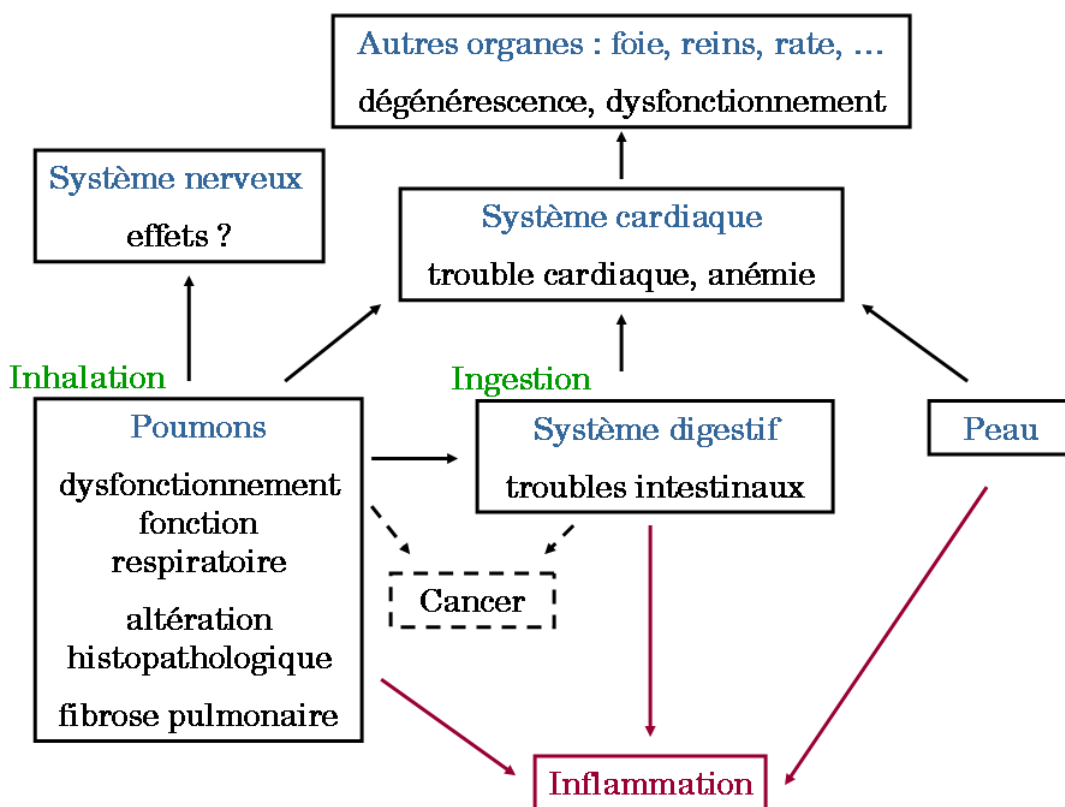


FIGURE 1.9 – Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine décrit dans la littérature (d'après Ostiguy et al., 2008). Il s'agit d'une description non exhaustive des effets de tous les nanoparticules confondus qui a été établie sur des études *in vivo* sur des rongeurs. La provocation de cancers n'a été établie *in vivo* que pour les nanoparticules de noir de carbone et est suspectée d'après des études épidémiologiques.

1. Particulate Matter 2,5 : particules dont la taille est inférieure à 2,5 µm

Les études *in vivo* permettent de déterminer les effets directs des nanoparticules manufacturées. Cependant elles restent des études sur des modèles et ne représentent pas forcément la réalité des effets sur l'homme. Elles montrent que les nanoparticules peuvent être responsables de pathologies, principalement au niveau des organes directement exposés mais aussi dans tous les autres organes (voir figure 1.9). Cependant, il faut noter que la nature et l'intensité des effets dépendent des caractéristiques des nanoparticules. De plus ces études sont la plupart du temps réalisées avec de fortes concentrations en nanoparticules (Ostiguy et al., 2008). Enfin à l'heure actuelle, il manque beaucoup d'informations pour pouvoir établir une liste exhaustive des effets des nanoparticules manufacturées sur la santé humaine en fonction de leurs nature et/ou de leurs caractéristiques.

1.3 Effets biologiques des nanoparticules à l'échelle cellulaire et moléculaire

L'étude des effets biologiques des nanoparticules promet d'être une discipline lourde et complexe, en raison du grand nombre de nanoparticules existantes, mais surtout du grand nombre de caractéristiques (taille, forme, état de surface, fonctionnalisation,...) pouvant influencer leurs effets biologiques. Ainsi les études *in vitro* semblent être une première étape indispensable car particulièrement adaptées aux tests d'un très grand nombre de conditions. Elles ne dispensent pas bien sûr de réaliser des études *in vivo* mais ont l'avantage de pouvoir établir une première sélection des nanoparticules pouvant avoir un effet sur l'homme et l'environnement. De plus ce type d'étude est idéal pour déterminer les mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire.

1.3.1 Effets chez les Procaryotes

Un grand nombre de nanoparticules a un effet antibactérien¹ sur différentes souches bactériennes (voir tableau 1.5 page 27). Cet effet est plus ou moins prononcé en fonction de la nature et des caractéristiques des nanoparticules. Ainsi les nanoparticules métalliques d'Ag et de Cu présentent une forte activité bactéricide dès de faibles concentrations (Kim et al., 2007; Yoon et al., 2007) tandis que dans la plupart des études, les effets apparaissent plus faibles ou à de plus fortes concentrations pour les oxydes métalliques (Adams et al., 2006; Makhluף et al., 2005; Reddy et al., 2007) et les fullérènes ou dérivés (Lyon et al., 2006; Tsao et al., 2002). Par exemple sur les mêmes modèles bactériens, une activité

1. effet bactéricide (mort bactérienne) ou bactériostatique (inhibition de croissance)

antibactérienne est constatée dès quelques $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les nanoparticules d'Ag et de Cu (Yoon et al., 2007) tandis qu'elle n'apparaît qu'à 1 mg.mL^{-1} pour les nanoparticules de TiO_2 ou SiO_2 (Adams et al., 2006).

Il a été montré que les effets antibactériens dépendent non seulement de la nature mais aussi des autres caractéristiques des nanoparticules comme la forme (Pal et al., 2007) et la taille ou l'état d'agglomération (Huang et al., 2005; Lyon et al., 2006; Makhluf et al., 2005). De plus, certaines études sur des nanoparticules a priori de même forme et taille, et sur les mêmes modèles apparaissent contradictoires, ce qui laisse penser que ce sont des variations d'autres caractéristiques qui sont à l'origine de ces différences d'effets. Ainsi la différence la plus flagrante est constatée pour les nanoparticules de ZnO de l'ordre de 10-20 nm de diamètre pour lesquels un effet a été observé dès 1,7 mM sur la souche *E. coli* dans l'étude de Brayner et al. (2006) alors qu'aucun effet antibactérien n'est observé jusqu'à 2 mM sur la même souche dans l'étude de Reddy et al. (2007).

L'activité antibactérienne apparaît généralement beaucoup plus prononcée pour des souches à Gram positif¹ que pour les souches à Gram négatif² et ceci quelle que soit la nanoparticule (Adams et al., 2006; Huang et al., 2005; Kim et al., 2007; Makhluf et al., 2005; Reddy et al., 2007; Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Tsao et al., 2002; Yoon et al., 2007). Ainsi les différences observées entre les deux types de bactéries et donc les deux types de paroi laissent penser que l'interaction avec la paroi joue un rôle dans la toxicité.

Dans les études évaluant les mécanismes d'action des nanoparticules, il apparaît que ce serait une perturbation de la membrane qui serait à l'origine de la toxicité. En effet, il a été montré que les nanoparticules d'Ag adhèrent à la paroi, ce qui provoquerait la formation de puits et perméabiliserait la membrane, entraînant ainsi une expulsion du cytosol de la bactérie (Sondi and Salopek-Sondi, 2004). De même, d'après les auteurs, les carboxyfullerènes et des dérivés cationiques de fullerènes s'intégreraient à la paroi ce qui provoquerait une destabilisation de la membrane (Tsao et al., 2002) et donc des fonctions cellulaires comme cela a été montré pour la chaîne respiratoire présente dans la membrane (Mashino et al., 1999, 2003). L'hypothèse a été vérifiée récemment dans une étude décrivant un changement de la composition lipidique de la membrane en présence de fullerènes, ce qui est la preuve d'une destabilisation et/ou d'une adaptation des bactéries (Fang et al., 2007). Dans le cas d'une destabilisation, cela pourraient être dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui entraîneraient par exemple une peroxydation des lipides de la membrane. Mais ce dernier point a

1. bactéries ayant une paroi constituée d'une couche épaisse de peptidoglycane

2. bactéries ayant une paroi constituée de l'intérieur vers l'extérieur : une fine couche de peptidoglycane, une membrane externe et une couche de lipopolysaccharides

1.3. Effets biologiques des nanoparticules à l'échelle cellulaire et moléculaire

été réfuté par des travaux récents ne montrant pas de peroxydation lipidique en présence de fullerènes (Lyon et al., 2008).

	Souche bactérienne Gram - Gram +	Effets observés	Références
Métaux			
Ag	<i>S. epidermidis</i> <i>et aureus</i>	Inhibition croissance C > 0,1 ou 1%	Alt <i>et al.</i> (2004)
	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	CMI > 3,3 nM CMI > 33 nm	Kim <i>et al.</i> (2007)
	<i>E. coli</i> et autres	Inhibition croissance sur boîte > 75 µg.mL ⁻¹	Morones <i>et al.</i> (2006)
	<i>E. coli</i>	Effet bactéricide Influence de la forme	Pal <i>et al.</i> (2007)
	<i>E. coli</i>	Inhibition croissance en milieu liquide et solide > 10 µg.mL ⁻¹ Pénétration de la paroi	Sondi <i>et al.</i> (2004)
	<i>E.coli</i> <i>B. subtilis</i>	CMB > 50 µg.mL ⁻¹ CMB > 25 µg.mL ⁻¹	Yoon <i>et al.</i> (2007)
	<i>E. coli, B. subtilis</i>	CMB > 10 µg.mL ⁻¹	Yoon <i>et al.</i> 2007
Oxydes métalliques et dérivés			
MgO	<i>E. coli, S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	Effet bactéricide. Influence taille et souche	Huang <i>et al.</i> (2005) Maklhuf <i>et al.</i> (2005)
ZnO	<i>E. coli</i>	CMB > 1,7 mM	Brayner <i>et al.</i> (2007)
	<i>E. coli</i>	Inhibition croissance Influence de la taille	Zhang L. <i>et al.</i> (2007)
	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	CMI > 3,4 mM CMI > 1mM	Reddy <i>et al.</i> (2007)
CeO ₂	<i>E. coli</i>	Effet bactéricide > 1 mg.L ⁻¹	Thill <i>et al.</i> (2006)
TiO ₂	<i>E. coli</i>	Effet bactéricide sous UV	Ireland <i>et al.</i> (1993) Benabbou <i>et al.</i> (2007)
TiO ₂ , ZnO et SiO ₂	<i>E. coli, B. subtilis</i>	Inhibition croissance. Influence nature de l'oxyde et souche	Adams <i>et al.</i> (2006)
Ag/Al ₂ O ₃	<i>E. coli</i>	Effet bactéricide dû à une production d'ERO	Chang <i>et al.</i> (2007)
TiO ₂ -2N ₂ ZrO ₂ -2N ₂	<i>E. coli</i>	Effet bactéricide Rôle des exopolysaccharides	Liu <i>et al.</i> (2007)
Pt/TiO ₂	<i>E. coli, S. aureus,</i> <i>E. faecalis</i>	Effet bactéricide sous UV Influence de la souche	Mitoraj <i>et al.</i> (2007)
Fullerènes et dérivés	<i>E. coli,</i> <i>B. subtilis</i>	Inhibition croissance. Influence taille et état de dispersion. Mécanisme ≠ ERO	Lyon <i>et al.</i> (2006) Lyon <i>et al.</i> (2008)
	<i>E. coli</i>	Inhibition croissance. Effet sur la respiration cellulaire	Mashino <i>et al.</i> (1999) Mashino <i>et al.</i> (2003)
	<i>E. coli</i> et autres <i>B.subtilis</i> et autres	Effet bactéricide sur les Gram + Pénétration de la paroi	Tsao <i>et al.</i> (2002)
NtC	<i>E. coli</i>	Effet bactéricide à 5 µg.mL ⁻¹	Kang <i>et al.</i> (2007)

TABLEAU 1.5 – Effets biologiques des nanoparticules sur les bactéries. Avec CMI : concentration minimale inhibitrice, CMB : concentration minimale bactéricide et ERO : espèces réactives de l'oxygène.

1.3.2 Effets chez les Eucaryotes

Les effets biologiques des nanoparticules dépendent de leurs caractéristiques (Ostiguy et al., 2008), mais il semblerait que ce soit avant tout de leur nature qui est à l'origine de leur réactivité et donc de leur interaction avec le vivant. Ainsi, de la même manière que pour les substances chimiques, il semble plus juste de traiter des effets biologiques des nanoparticules en fonction de leur nature. Nous nous concentrerons essentiellement ici sur les nanoparticules d'oxyde métallique et les nanotubes de carbone qui sont les principales nanoparticules étudiées à l'heure actuelle car les plus produites.

1.3.2.1 Les nanoparticules d'oxyde métallique

Les effets des nanoparticules d'oxyde métallique sur la viabilité cellulaire ont été décrits dans plusieurs études. Un effet cytotoxique est souvent constaté pour différentes nanoparticules testées sur différents modèles cellulaires (Auffan et al., 2006; Gojova et al., 2007; Hussain et al., 2005; Sayes et al., 2006b; Soto et al., 2005; Wang et al., 2007). L'intensité de ces effets dépend de plusieurs paramètres comme le modèle cellulaire (Barlow et al., 2005; Gurr et al., 2005), la nature des nanoparticules (Peters et al., 2004; Soto et al., 2005), leur taille (Barlow et al., 2005; Gurr et al., 2005; Sayes et al., 2006b) ou encore leur forme cristalline (Sayes et al., 2006b). Cependant à caractéristiques et modèles cellulaires égaux, certaines études sont contradictoires. C'est le cas des études de Soto et al. (2005) et Wagner et al. (2007) qui dans le premier cas montrent que les nanoparticules d' Al_2O_3 ont un effet cytotoxique prononcé ($\text{CI}_{50} = 5,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et dans le deuxième cas une perte de viabilité est seulement observée à partir de 3 jours et $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainsi d'autres caractéristiques différentielles non déterminées sont probablement à l'origine de cette discordance.

Un des principaux effets notés suite à une exposition aux nanoparticules d'oxyde métallique est l'activation de facteurs proinflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) (Gojova et al., 2007; Sayes et al., 2006b; Singh et al., 2007). Ce sont des facteurs qui favorisent l'inflammation c'est à dire la réponse immunitaire. Ainsi ces nanoparticules ne sont pas inertes pour l'organisme. Cependant, là aussi des différences selon les caractéristiques et des contradictions entre études sont constatées puisque certaines études ne montrent pas de réponse proinflammatoire (Barlow et al., 2005; Peters et al., 2004; Wagner et al., 2007).

Le tableau 1.6 page suivante résume les principaux résultats des études citées :

	Modèles cellulaires	Effets observés	Références
TiO ₂ anatase (10 nm) rutile (5 nm) mixte (3 nm)	Pneumocytes II Fibroblastes	Perte de viabilité et potentiel proinflammatoire > 100 µg.mL ⁻¹ Anatase 100 fois > rutile	Sayes <i>et al.</i> (2006b)
TiO ₂ (50 nm)	Pneumocytes II	Internalisation dans des vésicules	Stearns <i>et al.</i> (2001)
TiO ₂ (29 nm)	Pneumocytes II	Perte de viabilité > 250 µg.mL ⁻¹ Potentiel proinflammatoire nul	Barlow <i>et al.</i> (2005)
TiO ₂ (20-80 nm)	Pneumocytes II	Internalisation dans des vésicules Production d'ERO Potentiel proinflammatoire	Singh <i>et al.</i> (2007)
TiO ₂ (29 nm)	Macrophages alvéolaires	Pas d'effet cytotoxique à 8 h Diminution capacité à phagocyter	Renwick <i>et al.</i> (2001)
TiO ₂ (10 et 20 nm)	Cellules bronchiques	CI ₅₀ = 6,5 µg.mL ⁻¹ Peroxydation lipidique, Production d'ERO, Induction de micronoyaux, Dommages à l'ADN	Gurr <i>et al.</i> (2005)
TiO ₂ (40 nm)	Cellules microgliales	Internalisation dans des vésicules Production d'ERO rapide et prolongée	Long <i>et al.</i> (2006)
TiO ₂ (20-80 nm)	Lymphoblaste	Perte de viabilité > 26 µg.mL ⁻¹ Induction de micronoyaux Dommages à l'ADN	Wang <i>et al.</i> (2007)
MoO ₃ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ (40nm)	Hépatocytes	Perte de viabilité > 100 µg.mL ⁻¹	Hussain <i>et al.</i> (2005)
TiO ₂ (70 nm) SiO ₂ (14 nm)	Cellules endothéliales de peau	Internalisation dans des vésicules Potentiel proinflammatoire faible TiO ₂ < SiO ₂	Peters <i>et al.</i> (2004)
TiO ₂ , Al ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ , ZrO ₂	Macrophages alvéolaires	CI ₅₀ en µg.mL ⁻¹ : TiO ₂ 80%anatase = 10 TiO ₂ rutile non cytotoxique TiO ₂ anatase = 10 ; Al ₂ O ₃ = 5,5 Fe ₂ O ₃ = 5,3 ; ZrO ₂ = 4,9	Soto <i>et al.</i> (2005)
Al ₂ O ₃ (30-40 nm)	Macrophages alvéolaires	Perte de viabilité à 3 et 5 jours > 100 µg.mL ⁻¹ Aucun potentiel proinflammatoire	Wagner <i>et al.</i> (2007)
Fe ₂ O ₃	Fibroblaste	Internalisation dans des vésicules Effet cytotoxique Pas de cassures à l'ADN	Auffan <i>et al.</i> (2006)
Fe ₂ O ₃ ZnO, Y ₂ O ₃	Cellules endothéliales aortiques	Pas d'effet cytotoxique à 8 h Diminution capacité à phagocyter	Gojova <i>et al.</i> (2007)

TABLEAU 1.6 – Effets biologiques des nanoparticules d'oxyde métallique décrits dans des études *in vitro*. En gris, les mises en évidence de l'influence des caractéristiques des nanoparticules sur les effets observés.

Afin de connaître leur interaction avec les cellules et donc prévoir et comprendre leur mécanisme d'action, la localisation cellulaire des nanoparticules d'oxyde métallique a été étudiée. Quelle que soit la nature de l'oxyde, les nanoparticules sont uniquement localisées dans des vésicules qui sont probablement des vésicules d'endocytose (Auffan et al., 2006; Gojova et al., 2007; Long et al., 2006; Peters et al., 2004; Singh et al., 2006). Aucune nanoparticule d'oxyde métallique n'a été retrouvée libre dans le cytoplasme, dans les organites ou dans le noyau. Ainsi il semblerait qu'un mécanisme indirect soit à l'origine de leur toxicité.

En raison de leur activité catalytique reconnue, l'hypothèse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été la première mise en avant. Elle a été vérifiée pour les nanoparticules de TiO_2 (Long et al., 2006; Singh et al., 2007; Gurr et al., 2005). Cette production d'ERO a été corrélée à des dommages membranaires et à des dommages oxydatifs à l'ADN (Gurr et al., 2005) et donc pourrait expliquer l'origine des autres dommages à l'ADN constatés comme les micronoyaux (Rahman et al., 2002; Wang et al., 2007). Cependant, il faut noter qu'il n'y a pas toujours de dommages à l'ADN (Auffan et al., 2006). Les mécanismes d'action et les conséquences à l'échelle cellulaire et moléculaire d'une exposition à des nanoparticules d'oxyde métallique, semblent donc dépendre de beaucoup de paramètres et demandent à être éclaircis.

1.3.2.2 Les nanotubes de carbone

Les études concernant les nanotubes de carbone montrent parfois un fort effet cytotoxique dès quelques $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Cui et al., 2005; Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006; Manna et al., 2005; Murr and Soto, 2004; Sayes et al., 2006b; Wick et al., 2007) et d'autres fois un effet beaucoup plus faible voire nul (Monteiro-Riviere et al., 2005b; Pulskamp et al., 2007; Davoren et al., 2007; Dumortier et al., 2006). Il s'avère que le test de cytotoxicité utilisé dans les premières études est faussé par les NtC (Wörle-Knirsch et al., 2006; Casey et al., 2007a). En réalité la perte de viabilité cellulaire apparaît le plus souvent pour des concentrations supérieures à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et pour des temps d'exposition de un voir plusieurs jours.

Cette perte de viabilité cellulaire pourrait être en partie due à de l'apoptose. En effet une augmentation des cellules en apoptose a déjà été constatée en présence de NtC (Bottini et al., 2006; Cui et al., 2005; Ding et al., 2005) mais pas toujours (Shvedova et al., 2005). De plus, un ralentissement de la prolifération cellulaire a aussi été démontré (Cui et al., 2005; Raja et al., 2007).

Le tableau 1.7 page ci-contre résume les principaux résultats des études citées :

1.3. Effets biologiques des nanoparticules à l'échelle cellulaire et moléculaire

	Modèles cellulaires	Effets observés	Références
MWCNT	Keratinocytes	Perte de viabilité > 100 µg.mL ⁻¹ Potentiel proinflammatoire Influence du surfactant sur les effets	Monteiro-Riviere <i>et al.</i> (2005a)
	Fibroblastes	Augmentation du nombre de cellules en nécrose et en apoptose Potentiel proinflammatoire	Ding <i>et al.</i> (2005)
	Lymphocytes	Apoptose MWCNT oxydés plus toxiques	Bottini <i>et al.</i> (2006)
	Cellules pulmonaires	Diminution prolifération cellulaire et perte de viabilité dès 0,02 µg.mL ⁻¹ Changements morphologiques Plus ils sont fonctionnalisés plus ont d'effets	Magrez <i>et al.</i> (2006)
SWCNT	Keratinocytes	Perte de viabilité > 0,1 µg.mL ⁻¹ Production d'ERO > 1 µg.mL ⁻¹	Manna <i>et al.</i> (2005)
	Macrophages Lymphocytes	Pas de cytotoxicité à 10 et 50 µg.mL ⁻¹ Internalisation dans des vésicules Pas d'activation	Dumortier <i>et al.</i> (2006)
	Pneumocytes II	CI ₅₀ > 500 µg.mL ⁻¹	Davoren <i>et al.</i> (2007)
	Macrophages alvéolaire	Pas d'apoptose Pas de production d'ERO	Schvedova <i>et al.</i> (2005)
	Cellules musculaires	Inhibition prolifération cellulaire > 10 µg.mL ⁻¹	Raja <i>et al.</i> (2007)
	Fibroblastes	Perte de viabilité > 0,2 µg.mL ⁻¹ Plus ils sont fonctionnalisés moins ils ont d'effets	Sayes <i>et al.</i> (2006b)
	Cellules de reins	Diminution prolifération cellulaire et perte de viabilité dès 1 µg.mL ⁻¹ Apoptose, perte d'adhérence	Cui <i>et al.</i> (2005)
SWCNT MWCNT	Macrophages alvéolaires Pneumocytes II	Peu d'effet cytotoxique > 100 µg.mL ⁻¹ Internalisation dans des vésicules Potentiel proinflammatoire nul Production d'ERO dépendante du temps et de la concentration Diminution du potentiel mitochondrial Catalyseur Fe responsable des effets	Pulskamp <i>et al.</i> (2007)
	Macrophages alvéolaires	Pas de production d'ERO Diminution du glutathion intracellulaire	Kagan <i>et al.</i> (2006)
	Cellules mésothéliales	Perte de viabilité > 7,5 µg.mL ⁻¹ Perte d'adhérence Changements morphologiques	Wick <i>et al.</i> (2007)
	Macrophages alvéolaires	Perte de viabilité > 2,5 µg.mL ⁻¹ SWCNT > MWCNT	Murr <i>et al.</i> (2005)
	Macrophages alvéolaires	Perte de viabilité > 1 µg.mL ⁻¹ SWCNT = MWCNT Changements morphologiques Diminution capacité à phagocyter	Jia <i>et al.</i> (2005)

TABLEAU 1.7 – Effets biologiques des nanotubes de carbone décrits dans des études *in vitro*. En gris, les mises en évidence de l'influence des caractéristiques des NtC sur les effets observés.

En présence de NtC, les cellules subissent des changements morphologiques dont principalement l'apparition de nombreuses vésicules pouvant être très grosses, et qui contiennent la plupart du temps des NtC (Cherukuri et al., 2004; Dumortier et al., 2006; Jia et al., 2005; Pulskamp et al., 2007). Une condensation de la chromatine près de la membrane nucléaire (Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006) ainsi qu'une rétractation du cytoplasme conduisant à une perte de contact entre les cellules (Magrez et al., 2006) ont aussi été décrits. Enfin une perte d'adhérence a été constatée (Cui et al., 2005; Wick et al., 2007).

La capacité des NtC à générer des ERO et à provoquer un stress oxydant a été étudiée. Dans certaines études, il a été montré une production d'ERO (Manna et al., 2005; Pulskamp et al., 2007) alors que dans d'autres ce n'est pas le cas (Fenoglio et al., 2006; Kagan et al., 2006; Shvedova et al., 2005). Il se pourrait que ce soit la présence ou non du catalyseur métallique de synthèse qui soit à l'origine de cette différence (Pulskamp et al., 2007).

Enfin les NtC pourraient provoquer l'activation de la réponse inflammatoire (Ding et al., 2005; Monteiro-Riviere et al., 2005a) mais ceci n'est pas toujours vérifié (Dumortier et al., 2006; Pulskamp et al., 2007). Il est donc probable que cette activation soit dépendante des caractéristiques des NtC. La présence ou non de catalyseur de synthèse pourrait être responsable de la divergence des effets observés (Donaldson et al., 2006; Pulskamp et al., 2007), mais aussi leur fonctionnalisation qui parfois les rend plus (Bottini et al., 2006; Magrez et al., 2006) ou au contraire moins néfastes (Sayes et al., 2006a), ou encore leur état d'agglomération (Wick et al., 2007) et la nature du stabilisant utilisé (Monteiro-Riviere et al., 2005a).

1.4 Synthèse du chapitre

Chapitre 1

Contexte de l'étude

- Nous avons vu dans ce chapitre que les nanoparticules manufacturées présentent un grand intérêt scientifique et technologique, de par leurs nouvelles propriétés. De ce fait elles sont de plus en plus produites et utilisées, ce qui pourrait conduire à une contamination de l'environnement et donc une exposition des écosystèmes et de l'Homme. Par ailleurs cette exposition peut être encore plus conséquente dans le cas d'utilisation de produits contenant des nanoparticules ou de manipulation directe de nanoparticules sur les lieux de synthèse.
- L'impact sur les écosystèmes et la santé de l'Homme est encore mal connu. Et si parfois des études montrent des effets néfastes, ils ne sont d'une part pas toujours vérifiés selon les nanoparticules et leurs caractéristiques, et d'autre part rarement transposables à la réalité en raison du peu de données métrologiques sur la présence de nanoparticules dans l'environnement. Il reste donc beaucoup de travail à réaliser avant de pouvoir conclure quant à l'impact des nanoparticules sur l'Homme et l'environnement.
- A l'échelle cellulaire et moléculaire, les nanoparticules apparaissent réactives. En effet, des effets biologiques ont été constatés tels qu'une perte de viabilité cellulaire, une accumulation dans les cellules, des effets proinflammatoires, une production d'espèces réactives de l'oxygène ou encore des effets génotoxiques. Cependant il est difficile de faire des généralités car ces effets sont très variables d'une étude à une autre. En dehors de la nature des nanoparticules qui semble jouer un rôle important, il en ressort que chaque caractéristique peut changer les effets et les mécanismes d'action des nanoparticules. Les connaissances sur ce sujet restent néanmoins très incomplètes.

Objectifs et démarche de l'étude

Nous avons vu dans le chapitre 1 que les études actuelles montrent des effets biologiques des nanoparticules variant en fonction de leur nature mais aussi de leurs autres caractéristiques physico-chimiques. Actuellement, il existe très peu de connaissances sur ce sujet d'où la difficulté d'établir des règles et d'identifier les risques potentiellement associés aux nanoparticules pour l'Homme et l'environnement. La problématique de cette étude est donc la suivante : **quelles sont les relations entre les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules et les effets biologiques et mécanismes d'action constatés ?**

Pour cela nous nous sommes concentrés sur deux classes de nanoparticules étant actuellement produites en grandes quantités : les nanoparticules d'oxyde métallique, et plus particulièrement les nanoparticules d'oxyde de titane, et les nanotubes de carbone. Les effets biologiques d'un panel de ces nanoparticules possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes ont été étudiés *in vitro* sur deux grands modèles cellulaires : des cellules pulmonaires alvéolaires humaines (pneumocytes II A549) permettant de se placer dans un contexte d'exposition de l'homme par voie respiratoire, et des bactéries sauvages (*Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* MG1655) permettant de se placer dans un contexte de contamination environnementale. Un soin particulier a été apporté à la caractérisation des nanoparticules étudiées, mais aussi à la vérification et à la validation des techniques expérimentales utilisées.

La démarche de l'étude est présentée dans la figure 1.10 page suivante. Elle a pour point de départ la caractérisation physico-chimique des nanoparticules présentées dans le **chapitre 3**. Les caractéristiques suivantes ont été déterminées : la taille, la forme, la surface spécifique, la charge, la présence d'impuretés en surface, la structure cristalline ou encore l'état de dispersion et la stabilité chimique (dissolution). **Ces caractéristiques physico-chimiques ont été mises en relation avec les effets biologiques décrits dans les chapitres 4 à 6.**

Les relations entre les différents effets biologiques observés ont aussi été recherchées.

Le premier effet biologique, quantifié dans le **chapitre 4**, est la perte de viabilité cellulaire après exposition aux nanoparticules. Pour cela différentes méthodes d'estimation de la viabilité cellulaire ont été utilisées et discutées. La localisation cellulaire des nanoparticules a ensuite été observée dans le **chapitre 5**, grâce à des techniques de microscopie électronique en transmission. Enfin les capacités à provoquer un stress oxydant et à causer des dommages génotoxiques ont été déterminées dans le **chapitre 6** afin de vérifier les mécanismes d'action proposés dans la littérature. Pour cela un dosage des espèces réactives de l'oxygène intracellulaires et de différents systèmes de régulation du stress oxydant a été réalisé, ainsi qu'une détermination des dommages à l'ADN tels que les lésions primaires et les altérations chromosomiques.

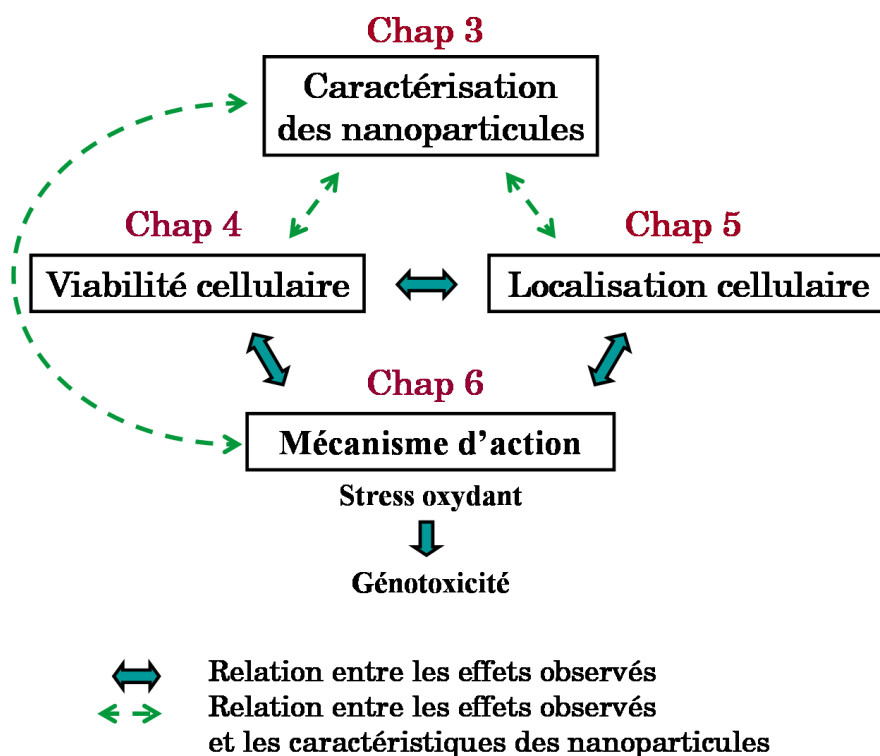


FIGURE 1.10 – Démarche de l'étude

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1 Nanoparticules étudiées et techniques de caractérisation	39
2.2 Techniques de microbiologie	54
2.3 Techniques de culture cellulaire	60
2.4 Techniques communes	76
2.5 Analyses statistiques	79

Dans ce chapitre seront décrites toutes les techniques utilisées dans le cadre de cette étude. Elles ont été divisées en quatre catégories : les techniques relatives à la caractérisation des nanoparticules, les techniques de microbiologie, les techniques de culture cellulaire et enfin les techniques communes à plusieurs des premières catégories. Par ailleurs, toutes les références des matériels et produits utilisés sont données dans l'annexe 1 page 227. Enfin toutes les lectures spectrophotométriques sont réalisées sur un Spectramax M2 (Molecular Device).

2.1 Nanoparticules étudiées et techniques de caractérisation

2.1.1 Sources des nanoparticules

Les nanotubes de carbone étudiés ont été synthétisés au Laboratoire Francis Perrin du CEA de Saclay, par dépôt chimique en phase vapeur à élément catalyseur assisté par aérosol (AACCVD : Aerosol Assisted Catalyst Chemical Vapour Deposition) (Pinault et al., 2005). Il s'agit d'une technique de croissance des NtC par précipitation d'atomes de carbone provenant de la dissociation d'un hydrocarbure gazeux en présence d'un catalyseur métallique (Zenga et al., 2006). Contrairement à d'autres techniques, elle permet d'obtenir des NtC parfaitement alignés et pratiquement purs avec seulement quelques % de catalyseur métallique et peu d'impuretés carbonées.

Les nanotubes étudiés sont des multifeuillets de 200 μm de longueur qui sont parfaitement alignés et forment des feuillets (voir figure 2.1 page suivante). Ils contiennent 4,3 % de catalyseur Fe enfermé dans le cœur des nanotubes et aucun sous-produit tel que du carbone amorphe. Afin d'étudier l'influence de la présence de Fe dans les nanotubes de carbone sur les effets biologiques, ces nanotubes ont été purifiés par chauffage à 2000°C pendant 2 h sous argon (Andrews et al., 2001) de façon à obtenir des nanotubes sans Fe (0,08 % massique, déterminé par activation neutronique au laboratoire Pierre Süe). Ainsi deux lots de nanotubes parfaitement identiques à l'exception de la concentration en Fe ont été obtenus.

Les nanoparticules d'oxyde métallique étudiées sont de deux natures : des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO_2) et des nanoparticules d'oxyde d'aluminium ou alumine (Al_2O_3 , Degussa Aeroxide® AluC). A taille équivalente elles nous permettront de comparer les effets en fonction de la composition. Les nanoparticules TiO_2 CEA ont été synthétisées par pyrolyse laser au Laboratoire Francis Perrin (Pignon et al., 2008) puis recuit sous air pendant 3 h à 400 °C afin de retirer les impuretés de carbone libres. Leurs effets seront comparés à ceux

de nanoparticules commerciales de tailles et formes cristallines différentes : TiO_2 P25 (Degussa, Aeroxide® P25), TiO_2 ana-NP (Sigma-Aldrich, ref. 637254), TiO_2 ana-P (Sigma-Aldrich, ref. T8141), TiO_2 rut-NP (Sigma-Aldrich, ref. 637262) et TiO_2 rut-P (Sigma-Aldrich, ref. 224227). Toutes ces nanoparticules se présentent sous forme de nanopoudres (voir figure 2.1 a.).

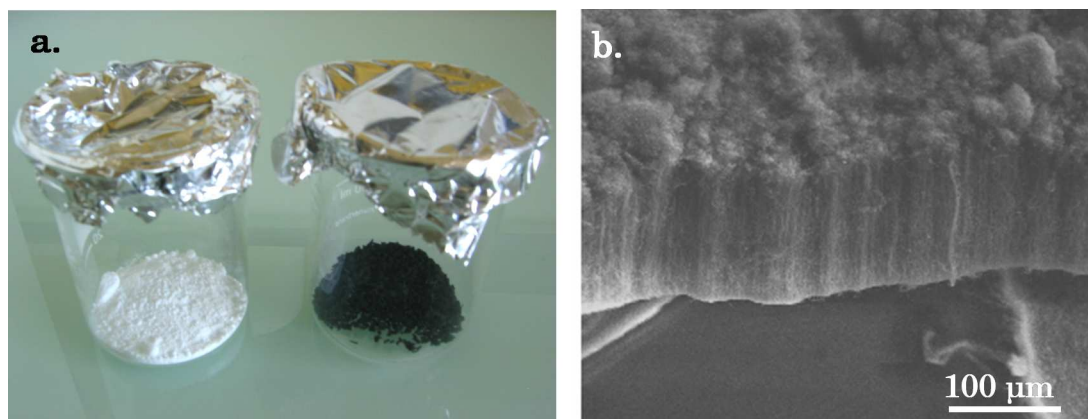


FIGURE 2.1 – Photographies des nanoparticules : a. Apparence macroscopique des nanoparticules avant dispersion : à gauche une nanopoudre de TiO_2 et à droite les feuillets de NtC, b. Apparence microscopique des feuillets de NtC.

2.1.2 Préparation des suspensions de nanoparticules

Les suspensions de nanoparticules ont été initialement préparées dans de l'eau ultrapure (pH = 5,5). Les concentrations sont de 10 g.L^{-1} pour les nanoparticules et 1 g.L^{-1} pour les NtC. La dispersion des nanoparticules a été réalisée par sonication qui est une technique mettant en oeuvre des ultrasons¹. Ces derniers permettent de casser les interactions intermoléculaires et donc d'obtenir des nanoparticules moins agglomérées voir moins agrégées² si la surface de liaison entre deux particules est faible (Kusters et al., 1994; Sauter et al., 2006; Mandzy et al., 2005). Ainsi plus le temps de sonication est long plus les interactions intermoléculaires sont cassées et meilleure est la dispersion (Gun'ko et al., 2001). Elle permet de plus de casser les NtC. Dès lors, plus le temps de sonication est élevé plus les NtC obtenus sont courts (Glory et al., 2007).

Dans le but d'obtenir les meilleurs dispersions possibles, divers stabilisants compatibles biologiquement ont été ajoutés avant la sonication. Dans le cas des NtC, la gomme arabique a été retenue avec une concentration de 0,25 %. Dans le cas des nanoparticules aucun stabilisant efficace n'a pu être identifié (voir chapitre 3.2.1 page 94).

1. onde mécanique dont la fréquence est supérieure à 20 kHz

2. La différence entre agglomération et agrégat est définie au chapitre 3.2.1 page 94

Matériel utilisé

Il s'agit d'un sonicateur Autotune 750 W de Fisher Scientific Bioblock muni d'un coupleur adapté et d'une microsonde conique en titane de 13 mm. Afin d'atténuer les nuisances sonores, le matériel est placé dans un caisson d'insonorisation. Un bain thermostaté (ou pour les temps courts un récipient rempli d'eau et de glaçons) a été utilisé pour maintenir une température inférieure à 4°C. Une photographie du montage est présentée à la figure 2.2.

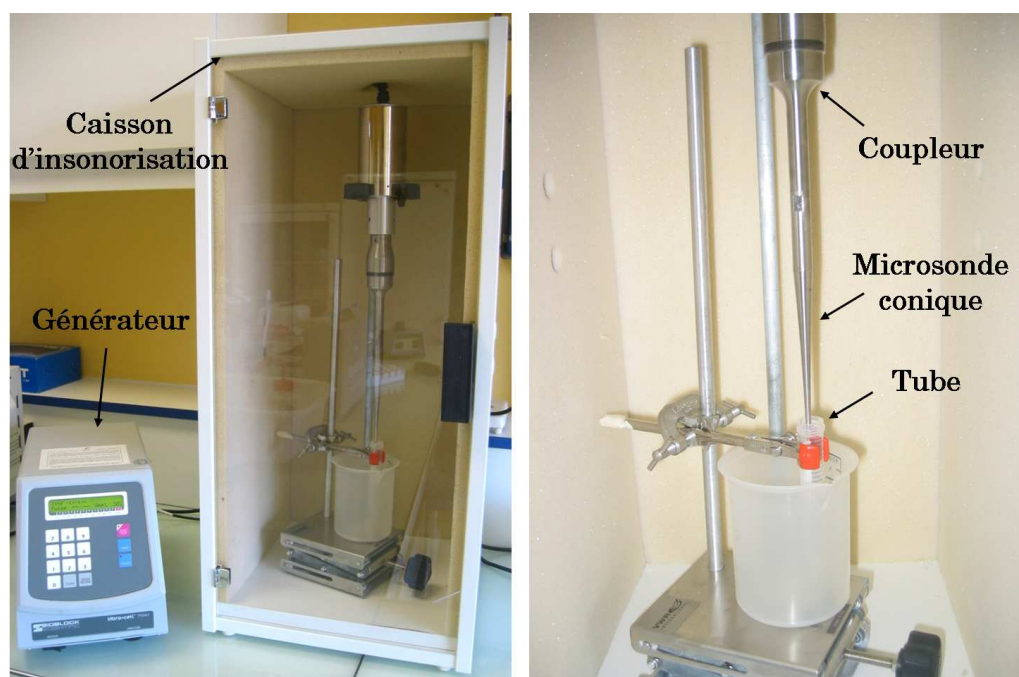


FIGURE 2.2 – Montage du sonicateur.

Conditions de sonication

La sonde est directement plongée dans un tube à centrifuger conique en plastique de 15 mL contenant 10 mL de suspension. Afin d'avoir les mêmes conditions de sonication, la sonde est toujours placée de façon à avoir le niveau de liquide à la graduation 12 mL.

Les nanoparticules sont soniquées à 30 % d'amplitude pendant un temps de sonication effectif de 30 min pour les NtC de taille longue et les nanoparticules, et de 8 h pour les NtC de taille courte. Le temps 30 min a été choisi car il permet d'avoir une très faible agglomération des nanoparticules de TiO_2 P25 qui retrouvent un diamètre proche de leur diamètre primaire soit environ 30-40 nm (voir figure 2.3 page suivante). Le mode pulsé a été utilisé dans le but d'éviter la surchauffe du matériel et de la suspension, avec 1 seconde de pulsation suivie d'1 seconde d'arrêt soit un temps total doublé (1 h et 16 h).

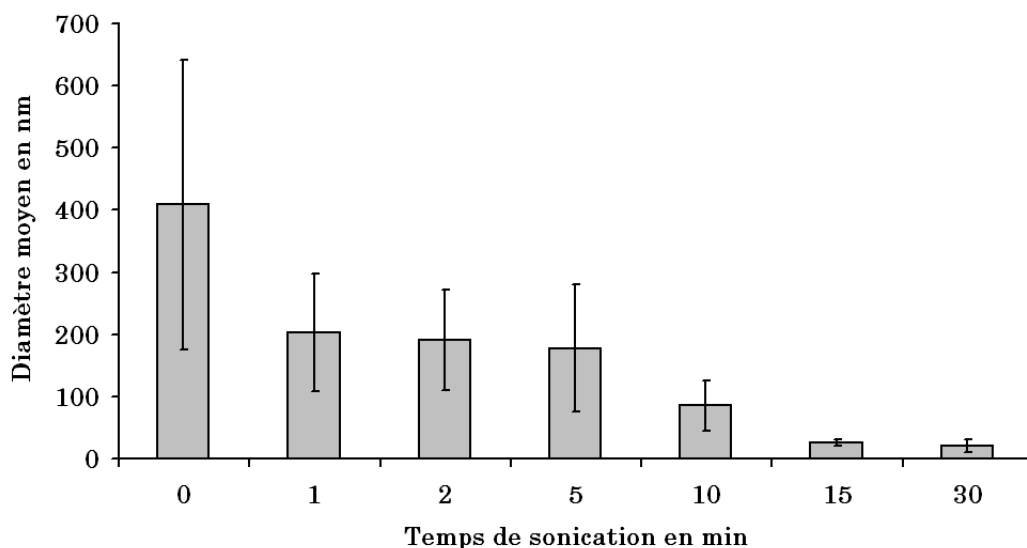


FIGURE 2.3 – Evolution du diamètre hydrodynamique moyen de TiO_2 P25 en fonction du temps de sonication. Les mesures ont été réalisées par SCP.

Après chaque échantillon, la sonde est nettoyée par sonication quelques secondes dans l'éthanol pur. Pour les NtC un premier nettoyage à l'eau est d'abord réalisé.

2.1.3 Etat d'agglomération par spectroscopie par corrélation de photon (SCP)

La spectroscopie par corrélation de photons appelée aussi diffusion dynamique de la lumière ou diffusion quasi élastique de la lumière, est la seule technique capable de mesurer les diamètres hydrodynamiques³ de particules en suspension comprises entre 3 nm et 3 μm Kaszuba (1999). Elle a l'avantage de nécessiter que très peu de préparation et d'avoir un temps de mesure très court, typiquement de quelques secondes ou quelques minutes. La préparation minimale assure que l'échantillon est mesuré tel qu'il est réellement avec ses agglomérats et agrégats. Ainsi cette technique, couplée à une mesure des particules primaires par MET, permet de connaître l'état d'agglomération de particules en suspension.

Principe

Lorsqu'une suspension colloïdale est traversée par un faisceau de lumière focalisé et monochromatique (laser), les particules dispersent une partie de ce faisceau dans toutes les directions. L'intensité du faisceau dispersé fluctue en fonction du temps en raison du mouvement brownien⁴ des particules qui a pour

3. qui prend en compte la couche de solvation au voisinage de la surface

4. mouvement aléatoire d'une plus grosse particule immergée dans un fluide et qui n'est soumise à aucune autre interaction que des chocs avec les petites molécules du fluide environnant.

conséquence une variation de la distance entre les particules. Grâce à un photomultiplicateur, l'appareil détecte les photons et analyse les fluctuations d'intensité pour donner les coefficients de diffusion des particules (voir figure 2.4). Ces coefficients sont finalement transformés en diamètre hydrodynamique à l'aide de la relation théorique du déplacement brownien de particules sphériques donnée par l'équation Stokes-Einstein.

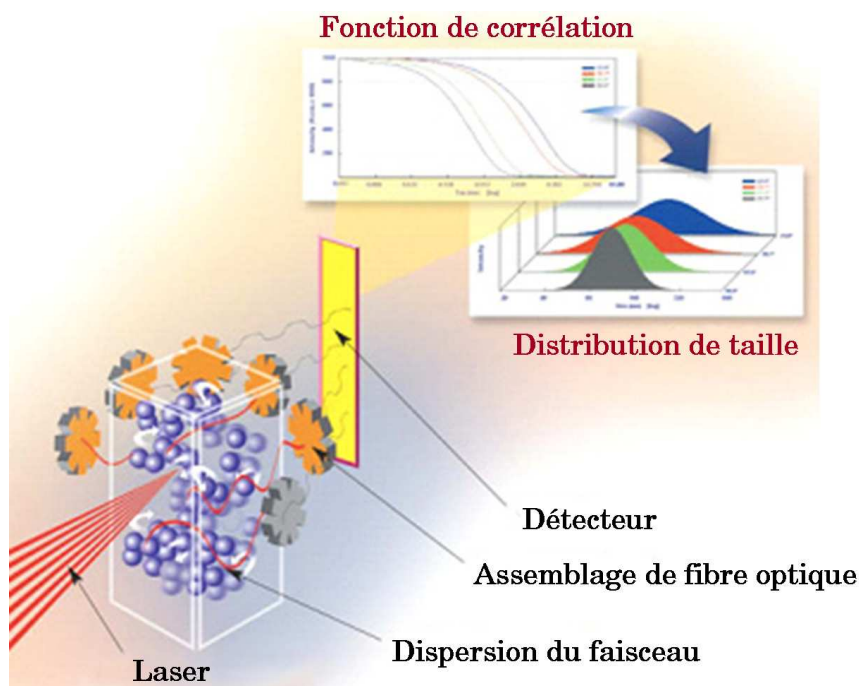


FIGURE 2.4 – La spectroscopie par corrélation de photons (d'après la Chemical Biology Division de l'Université de Jyväskylä ²).

Matériel et analyse des données

Le matériel utilisé est le ZetaSizer HS 3000 (Malvern) du Laboratoire Francis Perrin (CEA, Saclay). Le logiciel relié à l'appareil, donne directement le pourcentage de particules en intensité mesurée par classe de taille. En considérant que les particules sont sphériques, il calcule ensuite le pourcentage en volume et le pourcentage en nombre de particules. Ainsi, les grosses particules donnent une intensité élevée mais ne représentent qu'un faible volume et un encore plus faible nombre de particules en suspension, et inversement pour les petites particules (voir figure 2.5 page suivante).

2. site internet <http://ujkeb.com/facilities.html> consulté en ligne le 26 juillet 2008

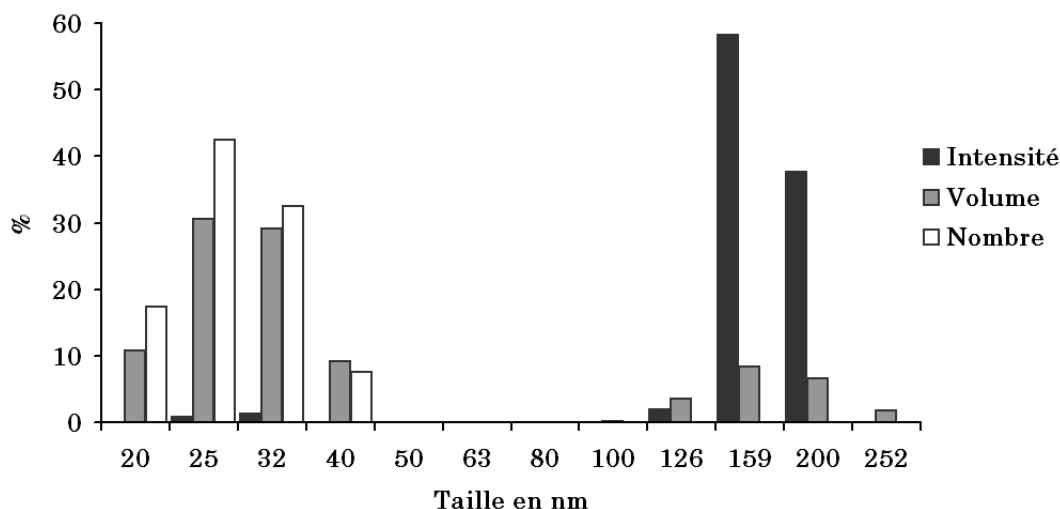


FIGURE 2.5 – Données obtenues par spectroscopie à corrélation de photon : exemple de TiO_2 P25.

Préparation des échantillons

Les suspensions de nanoparticules sont diluées directement dans une cuve, à raison de 40 μL dans 2 mL d'eau ultrapure. La suspension est homogénéisée 5 fois par pipetage et refoulement. La lecture est réalisée immédiatement.

Pour regarder l'état d'agglomération dans les milieux de culture, les nanoparticules sont diluées dans 2 mL de milieux de manière à obtenir une concentration de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La lecture est réalisée après 24 h à température ambiante, par simple transvasement dans une cuve à l'aide d'une pipette.

2.1.4 Mesure du potentiel zêta

La zétamétrie est une technique permettant de mesurer le potentiel zêta de particules en suspension et ainsi de caractériser la stabilité de ces suspensions en fonction de différents paramètres (pH, concentration en ions ou en surfactant).

Définition

Le potentiel zêta ζ représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. En général, une particule est chargée négativement et une couche fixe d'ions positifs l'entoure (voir figure 2.6 page ci-contre). En s'éloignant, dans une couche diffuse, le potentiel varie pour atteindre la neutralité dans la masse de la solution. Le potentiel zêta correspond au poten-

tiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de la particules en suspension c'est à dire au niveau du plan de cisaillement³.

En pratique, plus il est élevé en valeur absolue, plus la charge de la particule s'intensifie (négativement lorsque le potentiel zêta est négatif et inversement) ce qui offre aux particules leur stabilité en dégageant un effet répulsif lorsque deux particules s'approchent l'une de l'autre. A l'inverse, au fur et à mesure qu'il diminue en valeur absolue, les particules deviennent de moins en moins chargées et peuvent donc s'approcher les unes des autres plus étroitement. Cela accroît les probabilités de collision et donc a pour conséquence une perte de stabilité. Par conséquent, le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité colloïdale. Ainsi, on considère qu'une suspension est stable lorsque son $\zeta > |30|\text{mV}$.

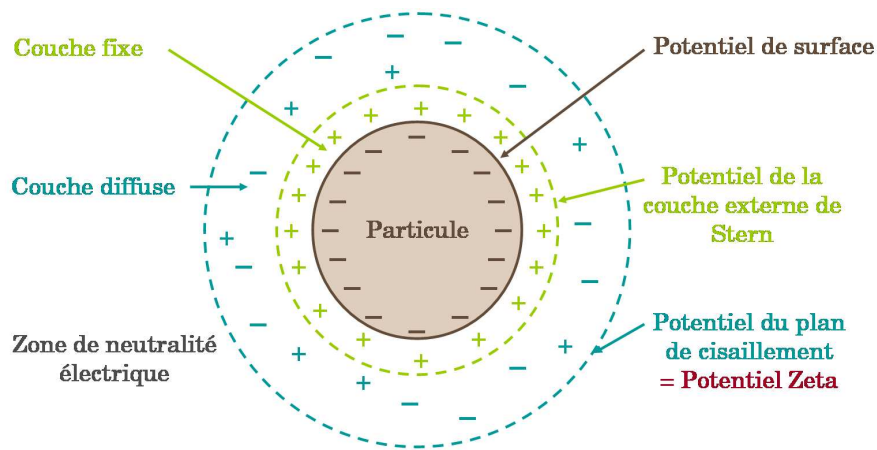


FIGURE 2.6 – Charge et potentiels électriques d'une particule.

Paramètres influençant le potentiel zêta

Le principal paramètre influençant le potentiel zêta est le pH. En effet lorsque celui-ci est acide les particules tendent à acquérir des charges positives et lorsque celui-ci est basique les particules tendent à acquérir des charges négatives (voir figure 2.7 page suivante). On définit alors un pH pour lequel la particule a un potentiel zêta nul : le point isoélectrique pI.

Par ailleurs, d'autres paramètres peuvent jouer sur la valeur du potentiel zêta. Par exemple l'épaisseur de la couche diffuse, qui est directement corrélée à l'intensité du potentiel zêta, est régie principalement par la concentration en électrolyte de la solution et par la valence des ions présents. Ainsi plus la force ionique est élevée plus la couche sera comprimée et moins le potentiel zêta sera élevé en valeur absolue.

3. limite entre la partie de la solution qui se déplace avec la particule et celle qui se déplace sans la particule

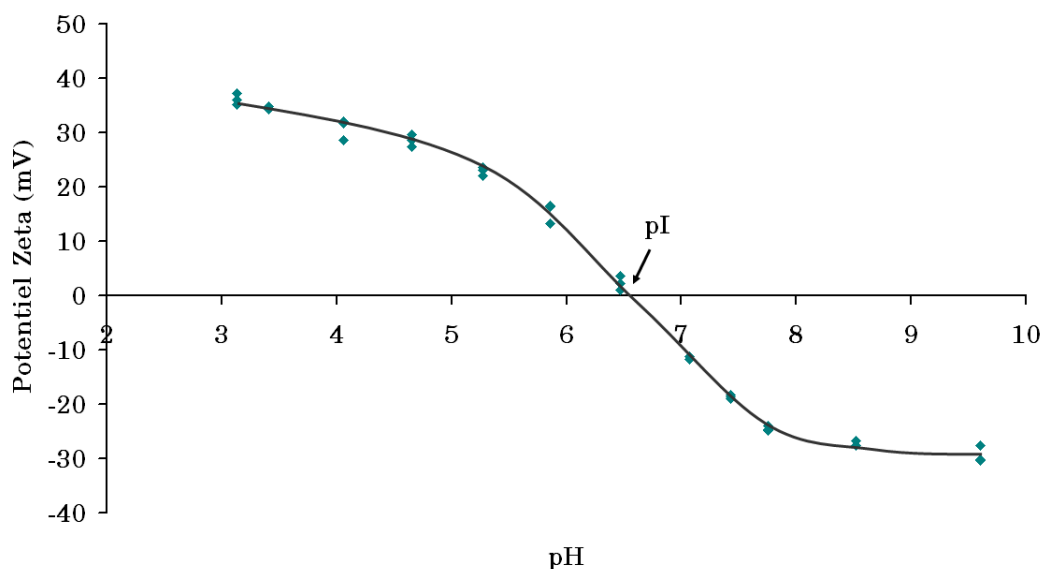


FIGURE 2.7 – Variation du potentiel zêta en fonction du pH de la solution de TiO_2 CEA.

Principe du zétamètre

La mesure du potentiel zêta met en oeuvre la technique de vélocimétrie laser Doppler qui est une technique optique reposant sur la mesure du décalage en fréquence de faisceaux laser éclairant des particules très fines entraînées par un fluide. Cette technique permet de mesurer la vitesse de particules dans un fluide. Afin d'entraîner les particules dans le fluide, l'appareil applique un champ électrique dans la suspension contenant les particules chargées. Or, les particules acquièrent leur mobilité en fonction de leur charge et de leur cortège ionique et donc de leur potentiel zêta. Ainsi la vitesse des particules est directement corrélée à leur potentiel zêta.

Matériel utilisé et protocole opératoire

Le matériel utilisé est le ZetaSizer HS 3000 (Malvern) du Laboratoire Francis Perrin (CEA) couplé à un titrateur MPT-1 pour la détermination du pI. Les lectures sont réalisées grâce au logiciel PCS Sizermode V1.61.

Pour les mesures ponctuelles du potentiel zêta, les nanoparticules diluées à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans les différents milieux étudiés (eau ou DMEM) sont directement injectée dans l'appareil en prenant soin de ne pas inclure de bulles.

Pour la détermination du point isoélectrique, 50 mL de suspension de nanoparticules à environ $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sont préparés dans un récipient adapté. Une calibration de la sonde pH est dans un premier temps réalisé. Sont ensuite rajoutés à la suspension 0,5 mL de NaCl à 10 mM pour s'assurer qu'il y ait suffisamment

de contre-ions. La titration est réalisée entre pH 3 et pH 10, avec 3 répétitions de mesure pour chaque point.

2.1.5 Identification de la structure cristalline par DRX

La diffraction des rayons X (DRX) est une méthode utilisée pour identifier la nature et la structure de produits cristallisés principalement, c'est-à-dire ayant un arrangement périodique et ordonné d'atomes constitutifs. Les particules de TiO_2 étudiée ayant une organisation cristalline, cette technique a pu être appliquée pour déterminer la nature de cette structure (anatase ou rutile) et quantifier cette organisation..

Principe de la technique

Les rayons X, comme toutes les ondes électromagnétiques, provoquent dans les atomes un déplacement du nuage électronique par rapport au noyau. Ces oscillations induites provoquent une réémission d'ondes électromagnétiques de même énergie et de même longueur d'onde appelée diffusion Rayleigh. Ainsi lorsque les rayons X frappent un morceau de matière, ils sont diffusés par chacun des atomes de la cible. Or ces rayons X diffusés interfèrent entre eux. Si les atomes sont ordonnés comme dans les cristaux, alors ces interférences vont être constructives dans certaines directions (les ondes s'additionnent), et destructrices dans d'autres (les ondes s'annulent). Ces interférences d'ondes diffusées forment le phénomène de diffraction (voir figure 2.8 a.).

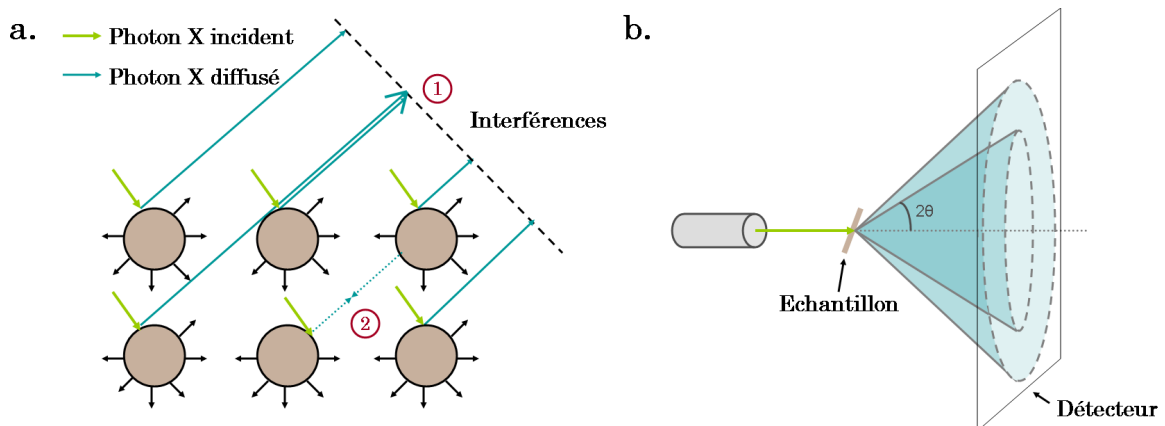


FIGURE 2.8 – Principe de la DRX. a. Interférences des rayons X diffusés : (1) interférences constructives (2) interférences destructrices. b. Détection des rayons diffusés.

Si le faisceau de rayons X qui éclaire l'échantillon polycristallin est ponctuel, il y a alors une symétrie de révolution autour de l'axe du faisceau. Les rayons diffractés

forment ainsi des cônes dont l'axe est le faisceau incident (voir figure 2.8 b.). Un détecteur à rayons X, détecte l'intensité des rayons diffusés en fonction de l'angle $2\theta^4$ dans un plan perpendiculaire au faisceau incident. Un diagramme de diffraction $I = f(2\theta)$ ou diffractogramme est ainsi obtenu (voir figure 2.9).

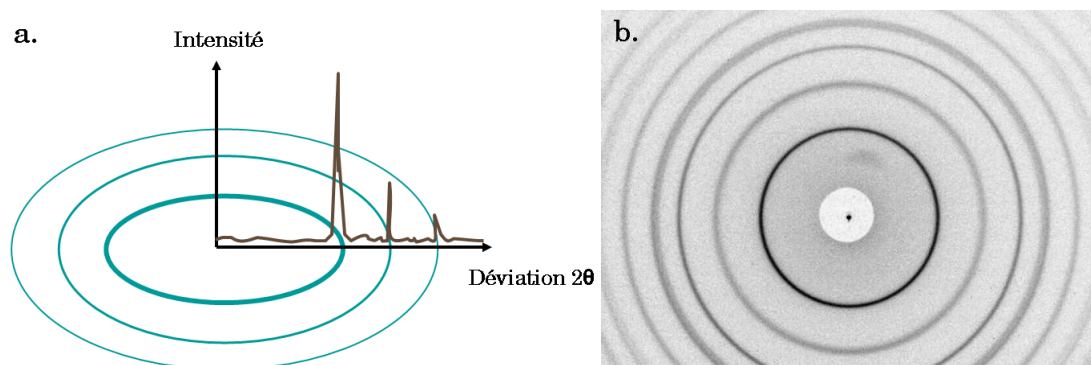


FIGURE 2.9 – Données obtenues par DRX. a. Diagramme de diffraction b. Photographie de DRX des nanoparticules de TiO_2 de structure cristalline anatase.

Or une poudre formée d'une structure cristalline donnée va toujours donner lieu à des pics de diffraction dans les mêmes directions, avec des hauteurs relatives à peu près constantes. Ainsi le diagramme de diffraction forme une véritable signature de la structure cristalline d'un composé.

Matériels et préparation des échantillons

Les échantillons ont été analysés à l'aide du dispositif microfaisceau monté autour du générateur de rayons X du Laboratoire Pierre Süe. Ils ont été préparés sous forme de pastilles de nanopoudre pure de 10 mm de diamètre et de 0,5 mm d'épaisseur.

Le générateur de rayons X est une anode tournante au Molybdène qui produit des photons dont l'énergie principale est d'environ 17,5 keV. Ces photons sont ensuite focalisés et guidés jusqu'à l'échantillon par un miroir multicouche permettant d'obtenir un faisceau micronique de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. Un détecteur photosensible aux rayons X a été placé à la perpendiculaire du faisceau pour mesurer le signal de diffraction (voir figure 2.10 page suivante).

4. θ est la moitié de la diffusion du faisceau incident

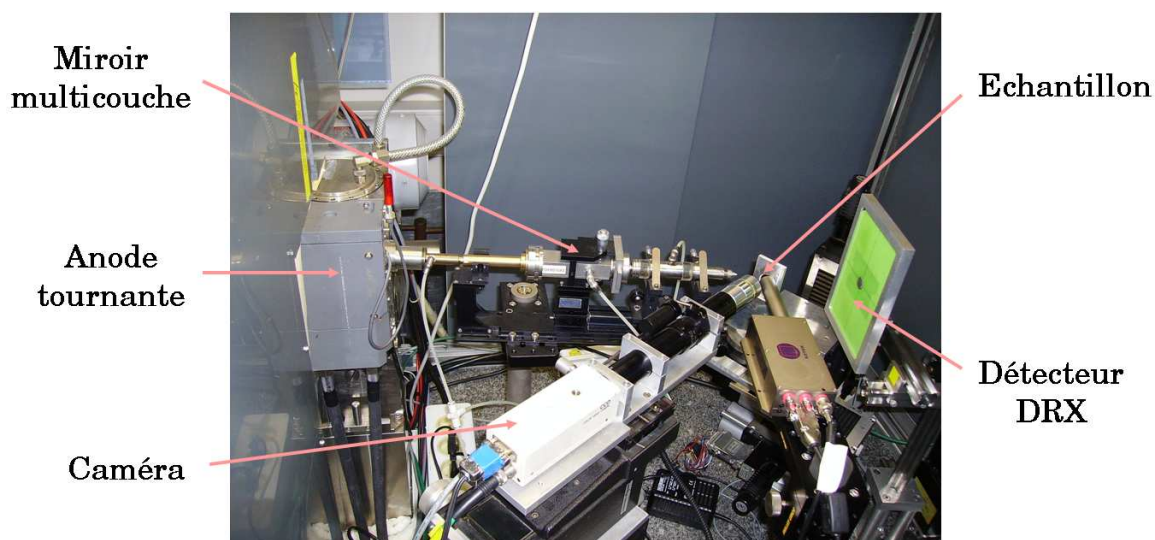


FIGURE 2.10 – Montage du dispositif microfaisceau permettant les mesures de DRX.

Identification des phases cristallines

Le diagramme mesuré sur les produits inconnus ont été comparés informatiquement à la base de données Powder diffraction file (PDF) de l'ICDD (International Centre for Diffraction Data) qui est la plus complète à l'heure actuelle. Cette base de donnée a été constituée par mesure de produits pur dans des conditions idéales ou par simulation numérique à partir de structures cristallographiques connues. Pour chaque produit, l'intensité I de chaque pic est exprimée en %, 100 % étant la hauteur du pic le plus intense.

Dans le cas de TiO_2 , les pics principaux des structures cristallines anatase et rutile se situent à un angle 2θ de respectivement $25,5^\circ$ et $27,5^\circ$. L'intensité de ces pics a été déterminé et la proportion d'anatase en % a été calculée par la formule suivante (Spurr and Myers, 1957) :

$$\%_{\text{anatase}} = \frac{1}{1 + 1,26 \cdot \frac{\text{IR}}{\text{IA}}} \cdot 100$$

avec **IR** l'intensité du pic principal rutile et **IA** l'intensité du pic principal anatase

2.1.6 Analyse des éléments traces dissouts par ICP-MS

Un dosage des éléments traces solubilisés dans les suspensions de nanoparticules a été réalisé à l'aide de l'ICP-MS Series X7 (Thermo Electron Corporation) du Laboratoire Pierre Süe. Cette technique permet une analyse multi-élémentaire rapide et précise avec des limites de détection très basses (de l'ordre de 0,01 à 0,1 ppb ou $\mu\text{g.L}^{-1}$) variant selon les éléments et les matrices. Dans notre cas

l'aluminium (isotope ^{28}Al), le titane (isotope ^{48}Ti) et le fer (isotope ^{57}Fe) ont été dosés.

Principe de la technique et analyse

Cette technique d'analyse repose sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments dissouts. Elle est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions (ICP) et d'un spectromètre de masse quadripolaire (MS) permettant de séparer ces ions en fonction de leur charge et de leur masse. Le principe de l'appareil est présenté dans la figure 2.11. L'échantillon est tout d'abord amené jusqu'à la torche à plasma par une pompe péristaltique. Au contact avec l'argon, l'échantillon est nébulisé, puis transporté jusqu'au centre du plasma où les températures atteignent 6000 à 8000 °C. L'échantillon va alors être atomisé puis ionisé dans sa totalité sous forme de cations monovalents. Une interface composée de deux cônes de nickel et d'une série de lentilles ioniques permet de stopper les photons et de focaliser les ions pour les amener au quadripôle pour la séparation en masse. Cette séparation est effectuée pour chaque ion en fonction du rapport masse atomique/charge. Le faisceau ionique obtenu est enfin amené sur un détecteur de type multiplicateur d'électrons et est analysé par un système informatique.

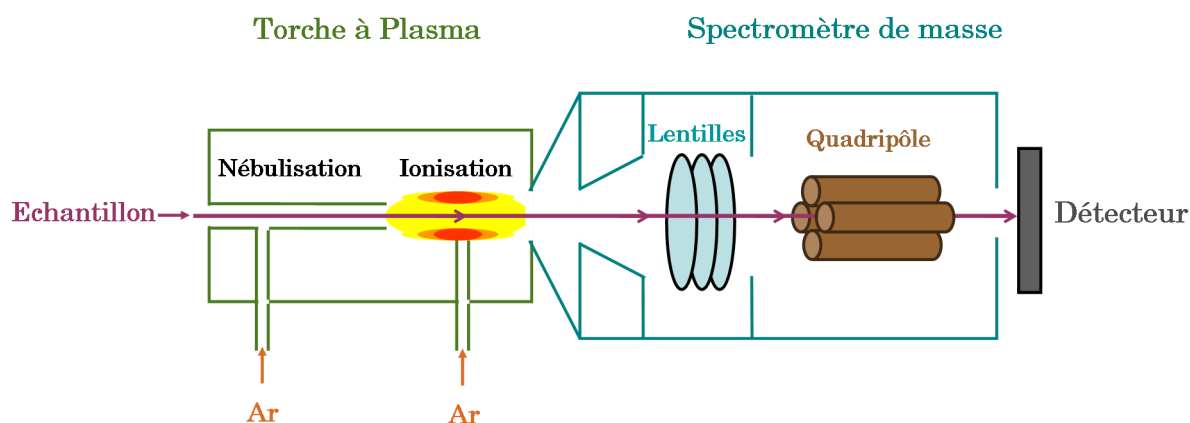


FIGURE 2.11 – Montage et principe de l'ICP-MS

Afin de réaliser le dosage, un étalonnage de l'appareil est nécessaire. Les courbes d'étalonnage sont obtenues par analyse d'une gamme étalon (0,1 à 50 ppb) de chaque élément que l'on souhaite doser. Elle est préparée à partir de solutions standards (SPEX certiPrep, Metuchen, NJ). Par ailleurs, un étalonnage interne est effectué en permanence pendant les analyses afin de s'affranchir d'une éventuelle dérive instrumentale. Pour cela, une solution d'une concentration connue (2 ppb d'isotopes rares : ^9Be , ^{103}Rh , ^{115}In et/ou ^{187}Re) est ajoutée à l'échantillon

en ligne avant l'introduction dans le nébuliseur. De plus, une solution certifiée (eau naturelle SRM 1640 ; NIST, USA) a été analysée à chaque début d'expérience afin de comparer les concentrations mesurées aux valeurs certifiées. Enfin, des blancs analytiques, composés d'eau ultrapure acidifiée, sont systématiquement passés au début de chaque procédure afin de soustraire le bruit de fond.

Préparation des échantillons

Afin de retirer toutes les nanoparticules qui ne pourraient être nébulisées et ne garder que les éléments dissouts, 2 mL de suspension de nanoparticules ont tout d'abord été centrifugés pendant 1 h à 14 000 rpm. Le surnageant obtenu a ensuite été filtré à l'aide d'un filtre ayant des pores de 0,022 μm . Le filtrat obtenu a finalement été dilué au minimum (soit maximum 5 fois) dans de l'eau acidifiée à 2 % d'acide nitrique 65% NORMATOM® qui permet de stabiliser la solution tout en favorisant l'ionisation de l'échantillon.

2.1.7 Analyse élémentaire de la surface des nanoparticules par EDS

Dans le but de déterminer la présence éventuelle d'impuretés, une analyse élémentaire de la surface des nanoparticules a été réalisée en microscopie électronique à transmission munie d'une analyse dispersive de l'énergie (EDS), à l'Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés (UMR 7590, CNRS).

Principe

Lorsque l'on bombarde de la matière avec des rayons X, celle-ci réémet de l'énergie sous la forme, entre autres, de rayons X. Ce phénomène est appelé fluorescence X ou émission secondaire de rayons X. Les énergies de réémission des rayons X sont spécifiques des éléments chimiques présents dans la matière. Ainsi le spectre des rayons X émis est caractéristique de la composition de l'échantillon. Dans cette méthode, les rayons X émis sont détectés puis analysés par analyse dispersive en énergie. C'est le détecteur lui-même qui trie les photons et détermine leur énergie. Ce type de détecteur a une bonne sensibilité pour les photons ayant une énergie entre 0.2 et 20 keV ce qui permet de détecter les éléments à partir du bore ou si on veut un meilleur rendement à partir du carbone.

La résolution de ce type d'analyse est de l'ordre de 60 eV sur le pic carbone, ce qui limite la détection de certains pics qui se retrouvent alors confondus avec d'autres comme par exemple celui de l'azote et de l'oxygène qui ne sont pas totalement séparés. Cependant elle a l'avantage d'être très rapide, puisque le signal

est collecté sur plusieurs canaux à la fois ce qui permet une analyse de toutes les énergies en même temps.

Mesure et identification des pics

Les nanoparticules dispersées dans l'eau ont été déposées à raison de 10 μL sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone. Après 10 min d'attente, l'excédent de liquide a été absorbé à l'aide d'un papier filtre sans cendres. Les grilles ont été observées au moyen d'un microscope JEOL 2100F équipé d'un spectromètre en dispersion d'énergie des rayons X. Les raies des spectres obtenues ont ensuite été identifiées au moyen d'une base de données. Les énergies des principaux pics utiles sont présentées dans le tableau 2.1.

Elément	Raie	Energie en Ev
C	K α_2	277
O	K α_2	525
Al	K α_1	1487
Si	K α_1	1740
Cl	K α_1	2620
Ti	K α_1	4506
	K β	4933

TABLEAU 2.1 – Principales énergies de rayons X réémis utilisées pour l'identification élémentaire par analyse EDS.

2.1.8 Surface spécifique et porosité par la méthode de BET

La surface spécifique représente la quantité de surface totale accessible par unité de masse de produit. Elle est constituée de toute la surface externe de chaque particule ainsi que de leurs pores ouverts. Ainsi plus les particules seront petites et poreuses, plus leur surface spécifique sera élevée.

Principe de la technique

Cette technique est basée sur la théorie de l'adsorption de l'azote à basse température développée par trois scientifiques Brunauer, Emmett et Teller (BET) (Brunauer et al., 1938). Cette théorie permet de calculer à partir du volume de gaz adsorbé et au moyen de l'équation BET, le volume d'azote adsorbé en monocouche sur la surface du solide. L'aire de cette monocouche correspondant à la surface du matériau est alors déduite sur la base de l'aire d'une molécule d'azote

par la formule suivante :

$$S = \frac{N_A \cdot V_{\text{monocouche}} \cdot A_{\text{azote}}}{V_M}$$

avec **S** la surface totale de l'échantillon en m², **N_A** le nombre d'Avogadro, **V_{monocouche}** le volume de la monocouche adsorbé en m³ déterminé à partir de l'isotherme d'adsorption de BET, **A_{azote}** l'aire d'encombrement de l'azote en m² et **V_M** le volume molaire en m³.

La surface calculée **S** en m² et la masse de l'échantillon **m** en g permettent ensuite de calculer la surface spécifique de l'échantillon en m².g⁻¹ par la formule suivante :

$$S_{\text{spé}} = \frac{S}{m}$$

En pratique (voir figure 2.12), l'échantillon est dans un premier temps dégazé sous vide à une température appropriée (en prenant soin de respecter les propriétés physiques de l'échantillon) dans le but d'évacuer les molécules d'eau ou de CO₂ qui se sont déposées dans la structure poreuse de l'échantillon. Dans un second temps il est refroidi dans l'azote liquide, puis de l'azote gazeux est injecté et se fixe à la surface de l'échantillon. Enfin l'échantillon est réchauffé pour libérer l'azote adsorbé qui est alors mesuré. L'appareil en déduit le volume adsorbé en monocouche selon la théorie de BET et ainsi la surface spécifique de l'échantillon.

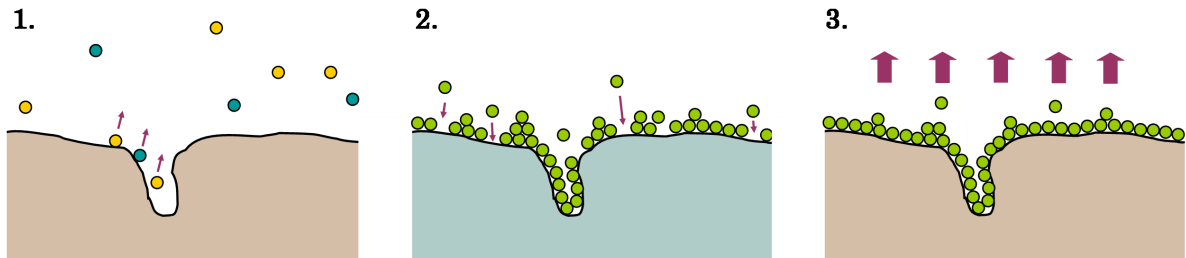


FIGURE 2.12 – Les différentes étapes de mesure de la surface spécifique par la méthode de BET. 1. Dégazage de l'échantillon, 2. Adsorption de l'azote gazeux sur l'échantillon refroidi, 3. Libération de l'azote par chauffage de l'échantillon et détection.

Matériel et préparation des échantillons

L'appareil utilisé est le Micromeritics Flowsorb 2300 (Norcross, USA). L'échantillon est tout d'abord pesé (entre 0,1 et 0,2 g) puis dégazé pendant 30 min à 200°C. La lecture est ensuite réalisée après stabilisation de l'échantillon.

2.2 Techniques de microbiologie

2.2.1 Souches bactériennes

Deux souches bactériennes ont été étudiées. Ce sont toutes deux des bacilles⁵ (voir figure 2.13), mobiles à Gram⁶ négatif c'est à dire que leur paroi est composée de l'intérieur à l'extérieur : d'une couche de peptidoglycane, d'une membrane externe délimitant l'espace periplasmique, et enfin d'une couche de lipopolysaccharides (voir figure 5.13 page 151).

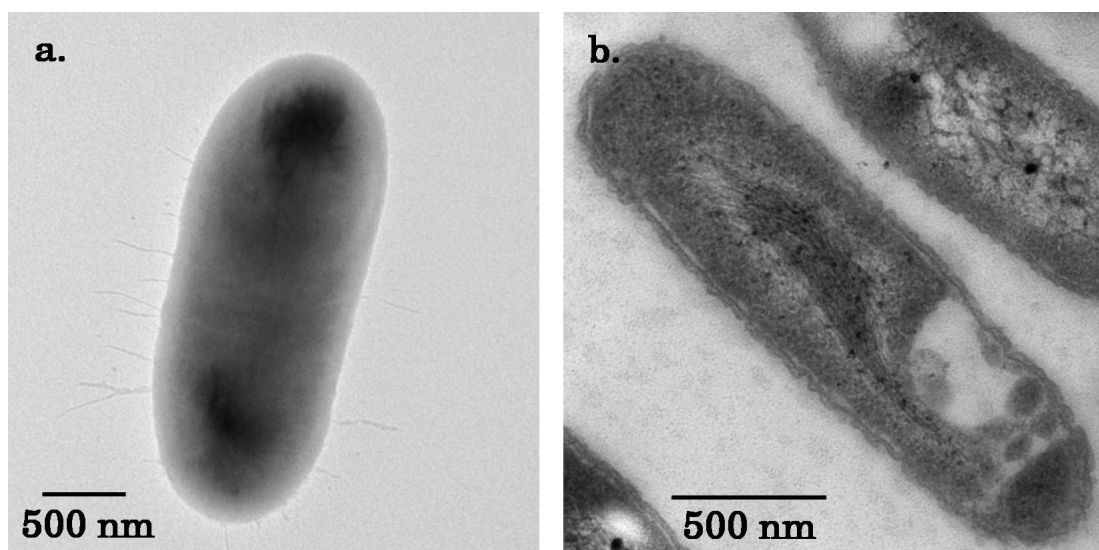


FIGURE 2.13 – Observations des bactéries étudiées au MET. a. Observation directe d'*Escherichia coli* MG1655, b. Coupe de *Cupriavidus metallidurans* CH34.

La bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 (anciennement appelée *Alcaligenes eutrophus* CH34 puis *Ralstonia metallidurans* CH34) a été fournie par le docteur Max Mergeay du Centre d'Energie Nucléaire de Mol, en Belgique. Il s'agit d'une bactérie tellurique sauvage qui a été isolée en 1976 dans des sédiments riches en zinc (Mergeay et al., 1978). Elle est aérobie-anaérobie facultative⁷. En condition hétérotrophe⁸ c'est à dire en absence de dihydrogène, elle peut utiliser l'acide gluconique, l'acide acétique, l'acide succinique ou d'azélate comme source de carbone. Sa température optimale de croissance est 30°C. Elle a la particularité d'être multi-résistante à de nombreux métaux lourds tels que Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , CrO_4^{2-} , Hg^{2+} et Pb^{2+} (Mergeay et al., 1978, 1985). Ainsi elle

5. en forme de bâtonnet

6. technique de coloration de la paroi bactérienne

7. la bactérie peut croître en présence ou non d'oxygène

8. condition pour laquelle la bactérie est incapable de produire ses substances organiques à partir de matière minérale et donc assure sa survie en assimilant des substances organiques.

aurait un rôle important dans la colonisation et la décontamination d'environnements pollués par les métaux à des concentrations souvent toxiques pour d'autres microorganismes (Reith et al., 2006). Cette dernière étude met aussi en évidence la capacité de *C. metallidurans* CH34 à former des biofilms. Enfin il est important de noter qu'il s'agit d'une bactérie mobile qui se déplace grâce à des flagelles péritriches⁹, et qui peut donc se disséminer dans tout l'environnement.

La bactérie ***Escherichia coli* MG1655** (CGSC 7740) est une souche dérivée de la souche K12 qui a été isolée en 1922 d'un patient atteint de diphtérie (Bachmann, 1996). Elle n'a subi que très peu de mutations génétiques et est donc très proche d'une souche sauvage d'*E. coli* (Blattner et al., 1997). La souche *E. coli* est une bactérie très étudiée en laboratoire, elle est d'ailleurs considérée comme la bactérie modèle à Gram négatif. Il s'agit d'une espèce essentiellement commensale¹⁰ mais il est possible de la retrouver dans l'environnement. Comme toutes les Enterobacteriaceae, elle est aérobie-anaérobie facultative et ne demande pas de milieu de culture particulier. Sa température optimale de croissance est 37 °C.

2.2.2 Conditions de culture et suivi de croissance

Les souches sont conservées à -195 °C dans de l'azote liquide. Elles sont tout d'abord cultivées une première fois en milieu liquide puis conservées sur boîte gélosée à 4°C, avant d'être repiquées dans du milieu neuf. C'est cette dernière culture qui est utilisée pour les différents tests. *C. metallidurans* CH34 est cultivée à 30°C dans du milieu TSM (Tris Salt Mineral, Mergeay et al. (1985)) contenant 1 % d'acide gluconique comme source de carbone, et *E. coli* MG1655 à 37°C dans du milieu Luria-Bertani (LB) (voir composition dans le tableau 2.2 page suivante). Afin d'assurer une bonne oxygénation du milieu, les erlenmeyers de culture sont remplis au 1/5^{ème} de leur volume et mis sous agitation à 250 rpm.

En raison de leur opacimétrie, certaines nanoparticules interfèrent avec le signal de mesure de densité optique (DO). La croissance bactérienne a donc été suivie par mesure de la concentration en protéines qui est directement corrélée à la quantité de biomasse bactérienne.

9. cils en périphérie de la cellule permettant à celle-ci de se déplacer

10. vivant sur l'homme

TSM		LB	
Tris (HCl)	50 mM	Tryptone	10 g.L ⁻¹
NaCl	80 mM	Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
KCl	20 mM	NaCl	5 g.L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	3 mM		
MgCl ₂	1 mM	Agar	15 g.L ⁻¹
CaCl ₂	200 µM	(milieu solide)	
Na ₂ HPO ₄	1,3 mM		
Acide gluconique	1 %		
Après autoclavage			
Fe(NH ₄) Citrate 1%	0,48 mL.L ⁻¹		
SL7	1 mL.L ⁻¹		
SL7 : ZnCl ₂ (500 µM), MnCl ₂ (500 µM), H ₃ BO ₃ (1 mM), CoCl ₂ (800 µM), CuCl ₂ (100 µM), NiCl ₂ (100 µM), Na ₂ MoO ₄ (150 µM), HCl (8,2 mM)			
pH = 7,2		pH = 7,3	

TABLEAU 2.2 – Composition des milieux de culture Tris Salt Medium (TSM) et Luria-Bertani (LB).

Protocole de suivi de croissance

Les souches sont repiquées à DO = 0,3 dans 20 mL de leur milieu respectif contenant 100 µg.mL⁻¹ de nanoparticules. Un témoin sans nanoparticules est réalisé à chaque fois. Un prélèvement de 0,5 ou 1 mL, selon le degré de croissance, est réalisé toutes les heures pour *E. coli* MG1655 et toutes les deux heures pour *C. metallidurans* CH34. Ce prélèvement est centrifugé 10 min à 6000 rpm. Le culot obtenu est ensuite repris dans 0,5 ou 1 mL de Cell LyticTM B puis incubé à température ambiante pendant 1 h. L'extrait protéique obtenu est finalement dosé par la technique au BCA (voir 2.4.1 page 76).

Interprétation des données

Les courbes de croissance concentrations en protéine en fonction du temps ont été tracées. Le taux spécifique de croissance maximal μ_{max} a été déterminé par régression exponentielle des points appartenant à la phase exponentielle de croissance. La regression donne une courbe d'équation :

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}$$

avec X_t la concentration en protéines au temps t , X_0 la concentration en protéines initiale, μ_{max} le taux spécifique de croissance maximal en h^{-1} et t le temps en h .

Le temps de génération G en h , qui est le temps de doublement de la population bactérienne, est calculé à partir du taux spécifique de croissance par la formule :

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{max}}$$

2.2.3 Evaluation de la viabilité cellulaire après exposition dans l'eau

2.2.3.1 Conditions d'exposition dans l'eau

Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont lavées deux fois par centrifugation pendant 10 min à 6000 rpm et reprise dans de l'eau ultrapure stérile. Le volume de la dernière reprise est calculé de telle sorte à obtenir un DO de 3. La suspension obtenue est ensuite diluée au $1/10^{ème}$ dans des tubes eppendorf stériles de façon à obtenir un volume final de 1 mL, une DO de 0,3 et des concentrations en nanoparticules de 10, 50, 100 et 500 $\mu g.mL^{-1}$. Les tubes sont ensuite mis sous agitation à 200 rpm, afin de ne pas favoriser la sédimentation des bactéries et des nanoparticules, pendant 24 h à température ambiante. Des témoins eau seule et eau avec gomme arabique (à des concentrations équivalentes à celles en présence de NtC) ont été réalisés afin de déterminer la viabilité cellulaire en pourcentage du témoin adéquat. Cette viabilité a été évaluée par les deux méthodes décrites par la suite.

2.2.3.2 Les dénombrements sur milieu solide

Les bactéries viables sont dénombrées en milieu LB-agar selon la méthode directe de dénombrement des colonies (Prescott et al., 2003). Cette technique repose sur le fait qu'une bactérie isolée viable va donner une colonie bactérienne après incubation sur milieu solide. Ainsi le nombre de colonies dénombrées correspond au nombre de bactéries présentes.

Pour que le nombre de colonies dénombrées corresponde exactement au nombre de bactéries étalées sur la gélose, et pour que la méthode soit suffisamment sensible, il faut que les bactéries soient diluées de manière à avoir entre 30 et 300 colonies sur une boîte. Ainsi, en partant d'une concentration de DO 0,3, il faut avoir une dilution finale entre 10^6 et 10^7 selon le taux de mortalité bactérienne. Pour cela des dilutions en cascade de dix en dix sont réalisées, en mettant 100 μL de la dilution précédente dans 900 μL d'eau stérile. Enfin, 100 μL des dernières

dilutions (10^5 et 10^6) sont étalés en triplicat sur des boîtes de pétri contenant le milieu solide. Les colonies sont dénombrées après une incubation de 48 heures à 29°C. Le pourcentage de viabilité est déterminé par rapport au témoin par la formule suivante :

$$\%_{\text{viabilité}} = \frac{N_x \cdot 100}{N_T}$$

avec N_x le nombre de colonies dénombrés pour la condition X et N_T le nombre de colonies dénombrées pour le témoin sans nanoparticules.

2.2.3.3 Le kit Live/Dead® BacLight™

Principe

Ce dosage est basé sur la différence de pénétration de deux fluorochromes se fixant sur l'ADN : le SYTO® 9 émettant dans le vert et le iodure de propidium émettant dans le rouge. Le SYTO® 9 entre à la fois dans les bactéries vivantes et dans les bactéries mortes, contrairement au iodure de propidium qui ne rentre que dans les cellules mortes c'est à dire qui ont une membrane endommagée (Boulos et al., 1999). Or, comme le montre la figure 2.14 a., il n'y a pas de fluorescence verte lorsque les cellules sont mortes malgré la pénétration du SYTO® 9. Ainsi, après excitation à 485 nm, les bactéries vivantes apparaissent vertes et les bactéries mortes rouges (figure 2.14 b.) .

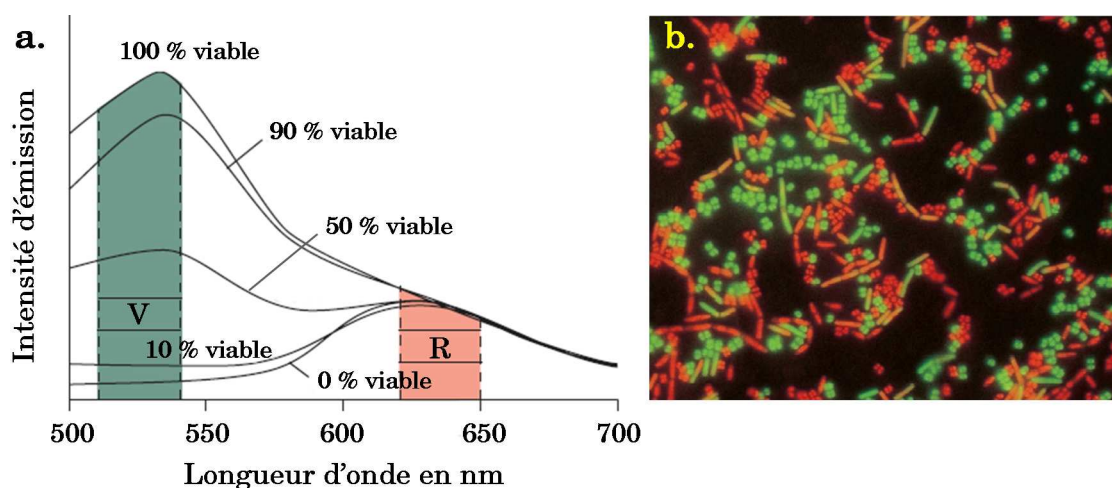


FIGURE 2.14 – Principe du kit Live/Dead® BacLight™. a. Spectres de fluorescence obtenus pour différentes conditions de viabilité, b. Photographies de *Micrococcus luteus* et *Bacillus cereus* incubés avec les colorants, en rouges les bactéries mortes et vert les bactéries vivantes (Invitrogen, 2008).

Il a été établi que le rapport fluorescence verte sur fluorescence rouge est directement proportionnel au % de viabilité (voir figure 2.15). Cela a été montré pour de nombreuses bactéries y compris *E. coli*. Pour *C. metallidurans* CH34, cette relation a été vérifiée en suivant le protocole donné par le fournisseur (voir figure 2.15).

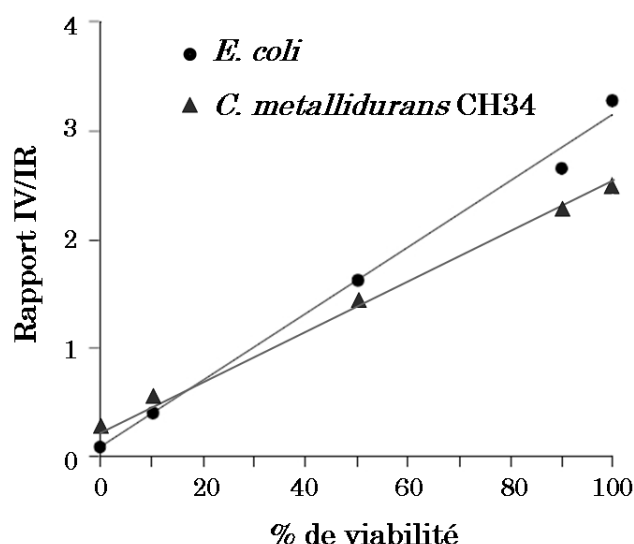


FIGURE 2.15 – Relation entre le rapport de fluorescence vert sur rouge et le pourcentage de viabilité cellulaire.

Le pourcentage de viabilité relatif a été calculé par rapport au témoin (eau seule ou eau avec gomme arabique) par la formule suivante :

$$\%_{\text{viabilité}} = \frac{\left(\frac{\text{IV}}{\text{IR}}\right)_{\text{éch}} \cdot 100}{\left(\frac{\text{IV}}{\text{IR}}\right)_{\text{témoin}}}$$

Protocole opératoire

Le protocole suivi est celui donné par le fournisseur : à 100 µL de bactéries sont rajouté 100 µL d'eau stérile contenant les deux fluorochromes à raison de 6 µL de chaque pour 2 mL d'eau. Les dépôts ont été réalisés en microplaque 96 puits opaques blanches. La microplaque est ensuite intubée dans le noir et à température ambiante, pendant 30 min exactement. La lecture est réalisée avec une excitation à 485 nm et une lecture à 530 nm pour le vert et 630 nm pour le rouge.

2.3 Techniques de culture cellulaire

2.3.1 Lignée cellulaire et culture

La lignée cellulaire étudiée est la lignée alvéolaire humaine A549 isolée d'un carcinome de poumons (Lieber et al., 1976) qui est classiquement utilisée pour les études en toxicologie pulmonaire. Elle a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC, CCL-185). Il s'agit de pneumocytes de type II qui sont les cellules de la paroi alvéolaire responsables de la sécrétion du surfactant alvéolaire (voir figure 2.16). Cette fonction de sécrétion est très importante puisque le rôle du surfactant alvéolaire est de réduire la tension superficielle entre l'air et les cellules et ainsi de prévenir l'affaissement des alvéoles. Les pneumocytes II représentent 60 % des cellules du revêtement alvéolaire mais occupent seulement 7 % de la surface alvéolaire.

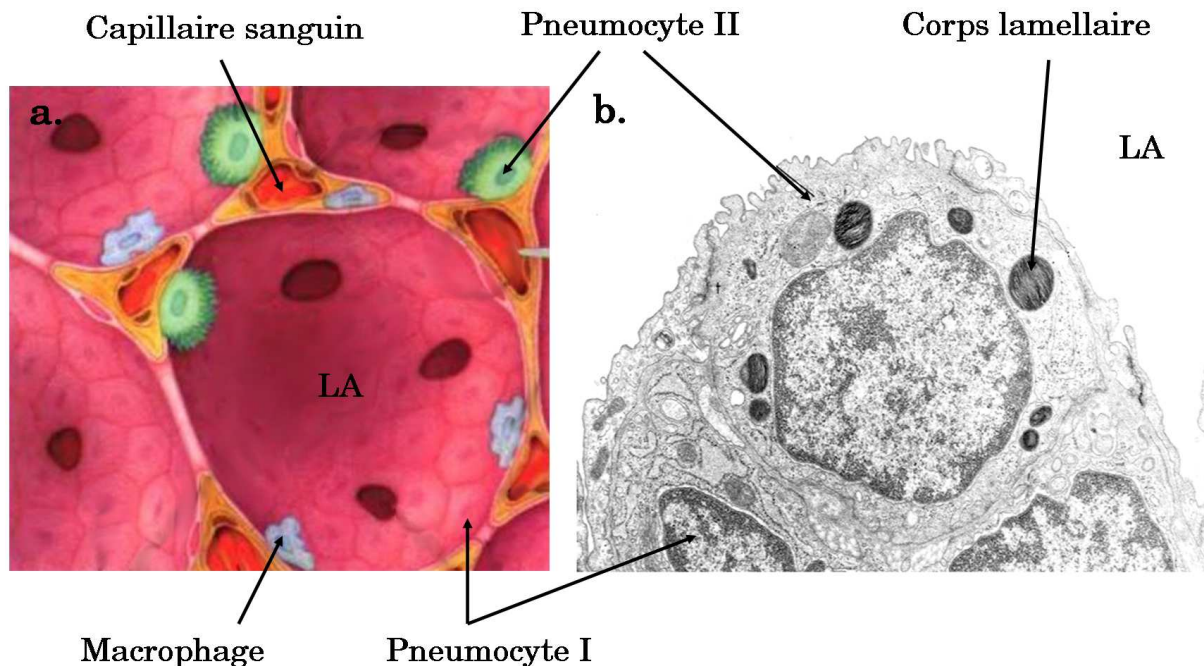


FIGURE 2.16 – Localisation et observation microscopique des pneumocytes II : a. Organisation cellulaire des alvéoles (Marieb, 2000) b. Coupe de la paroi alvéolaire². LA : Lumière alvéolaire.

Conditions de culture

Les cellules sont maintenues et cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco and Freeman, 1959) additionné de 10 % (Vol/Vol) de sérum de veau foetal, de 2 mM de

2. site internet <http://dspace.udel.edu:8080/dspace/handle/19716/1694> consulté en ligne le 29 juillet 2008

L-glutamine, de 50 UI.mL⁻¹ de pénicilline et 50 µg.mL⁻¹ de streptomycine. Elles sont incubées dans une étuve à 37 °C en atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO₂. Des repiquages sont réalisés à l'aide d'une solution de trypsine 0,05% EDTA, deux fois par semaine lorsqu'elles atteignent 80 % de confluence.

2.3.2 Evaluation de la viabilité cellulaire : les différents tests de cytotoxicité

Différents tests colorimétriques d'évaluation de la viabilité cellulaire ont été vérifiés et utilisés sur des cellules exposées pendant 24 à 72 h aux nanoparticules. Pour cela, les cellules ont été tout d'abord cultivées à 80 % de confluences dans des plaques 96 puits. Après élimination du milieu, les cellules ont été dans un second temps exposées à entre 0,01 à 100 µg.mL⁻¹ de nanoparticules diluées dans du milieu DMEM sans sérum de veau foetal ni L-glutamine (6 puits par condition).

L'effet cytotoxique d'une condition est évalué par le pourcentage de cellules vivantes pour la condition, par rapport aux cellules vivantes traitées avec le solvant seul. Ce pourcentage est donc rapporté aux cellules exposées à du milieu seul pour les nanoparticules, et à du milieu contenant de la gomme arabique traitée dans les mêmes conditions que les NtC, à raison de 250 µg.mL⁻¹ (qui correspond à la quantité de gomme arabique lors d'une exposition à 100 µg.mL⁻¹ de NtC). Ainsi on minimise l'influence du surfactant sur les effets cytotoxiques observés, comme cela a été montré dans l'étude de Monteiro-Riviere et al. (2005a).

Pour les tests où le signal colorimétrique augmente avec la viabilité cellulaire (MTT, XTT, resazurine et rouge neutre), le taux de mortalité est calculé de la manière suivante, en ayant pris soin de retirer à chaque absorbance l'absorbance du bruit de fond mesuré sur un puit constitué de solvant sans cellules :

$$\text{Taux de mortalité} = \frac{Abs_{\text{témoin}} - Abs_{\text{essai}}}{Abs_{\text{témoin}}} . 100$$

2.3.2.1 Le test MTT

Principe

Ce test permet de mesurer l'activité de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes par dosage colorimétrique (Slater et al., 1963). Cette enzyme coupe le cycle tétrazolium du MTT (ou bromure de 3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) de couleur jaune, en cristaux de formazan violets (voir figure 2.17 page suivante). Après dissolution de ces cristaux, une lecture

spectrophotométrique de l'absorbance est réalisée à 565 nm. Le clivage se produisant uniquement dans les cellules vivantes, l'intensité de coloration est directement proportionnelle aux nombres de cellules vivantes.

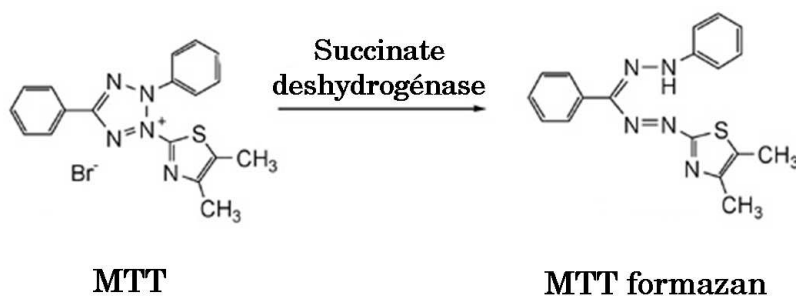


FIGURE 2.17 – Principe du test MTT.

Protocole opératoire

Le test MTT est réalisé selon la méthode décrite par Mosmann (1983). Au terme de l'exposition, 10 μL d'une solution de PBS à 5 g.L^{-1} de MTT sont déposés dans chaque puit. Les microplaques sont ensuite incubées 1 h à 37°C à l'abri de la lumière. Au terme de la période d'incubation, les surnageants sont éliminés, et les cristaux de formazan formés dans cellules sont solubilisés dans 100 μL de DMSO. Les solutions colorées sont ensuite homogénéisées par agitation et laissées reposer pendant un heure afin de permettre une sédimentation des nanoparticules au fond des puits. Enfin, 50 μL de chaque puit sont transférés dans une nouvelle plaque en prenant soin de ne pas prélever le fond du puit contenant les nanoparticules, puis complétés avec 50 μL de DMSO. Leur absorbance est lue à 565 nm.

2.3.2.2 Le test XTT

Principe

Le principe du test XTT consiste lui aussi à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme coupe le cycle tetrazolium du XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2Htetrazolium-5-carboxyanilide) de couleur jaune, et libère des cristaux de formazan oranges qui sont directement solubles dans l'eau (Scudiero et al., 1988). La lecture spectrophotométrique à 450 nm se fait donc directement et l'intensité de coloration orange dépend du nombre de cellules vivantes.

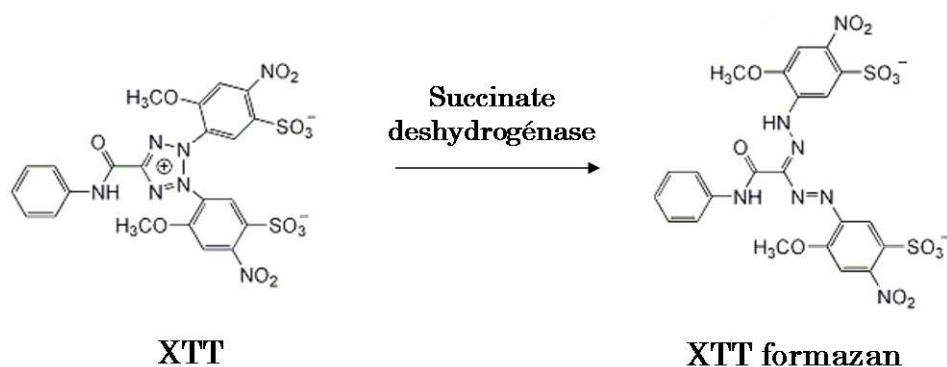


FIGURE 2.18 – Principe du test XTT.

Protocole opératoire

Le test a été réalisé en accord avec les méthodes décrites par Roehm et al. (1991). Le réactif XTT est préparé extemporanément en diluant au 1/100^{ème} une solution de Phenazine MethoSulfate (PMS) à 1 mg.mL⁻¹, conservable pendant 3 mois à 4°C, dans une solution de XTT à 1 mg.mL⁻¹ préparée extemporanément dans du milieu DMEM sans rouge de phénol. Le réactif est placé à 37°C afin d'assurer une bonne dissolution du XTT. Au terme de l'exposition cellulaire, le milieu d'exposition est retiré puis remplacé par 100 µL de réactif XTT. Les cellules sont ensuite incubées avec le réactif pendant 2 h, puis 50 µL de surnageant sont transférés dans une nouvelle plaque et complétés avec 50 µL d'eau. Une lecture spectrophotométrique est finalement réalisée à 450 nm.

2.3.2.3 Le test au rouge neutre

Principe

Le rouge neutre (3-Amino-7-diméthylamino-2-méthylphenazine hydrochloride) est un colorant vital. Lorsque les cellules sont viables, elles le puisent du milieu extérieur par transport actif et l'incorporent dans leurs lysosomes. La technique consiste à mettre les cellules en contact avec du rouge neutre, puis à mesurer par spectrophotométrie la quantité qu'elles ont incorporée, ceci après plusieurs lavages pour éliminer le colorant non incorporé et solubilisation du colorant incorporé. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de rouge neutre incorporée et donc à la viabilité cellulaire (Borenfreund and Puerner, 1985).

Protocole opératoire

Au terme de l'exposition, le milieu est retiré des puits et remplacé par 100 µL de milieu DMEM contenant 5 % de solution de rouge neutre à 0.33%. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 h à 37°C. Après élimination du réactif,

les cellules sont lavées 2 fois avec 200 μL de tampon PBS afin de retirer l'excédent de rouge neutre. Enfin 100 μL de solution de solubilisation sont ajoutés, et la plaque lue au spectrophotomètre à 540 nm.

2.3.2.4 Le test à la résazurine

Principe

Les cellules vivantes réduisent la résazurine de couleur bleue en résorufine fluorescente de couleur rouge (voir figure 2.19). L'intensité de fluorescence ou de coloration rouge obtenue est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (Liu, 1981).

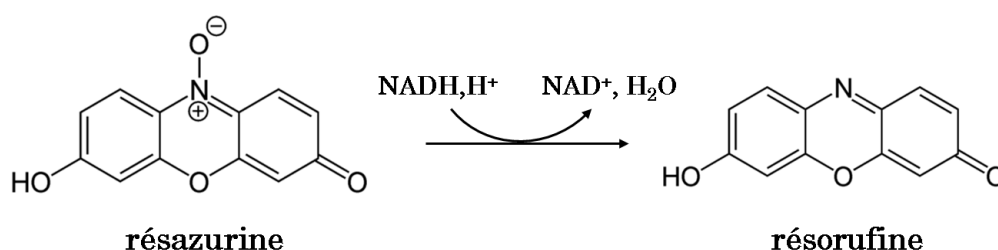


FIGURE 2.19 – Principe du test à la résazurine

Protocole opératoire

Après exposition, le milieu d'exposition est remplacé par 100 μL de milieu neuf contenant 10 % de résazurine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 h à 37°C. Au terme de l'incubation, la plaque est déposée sur un agitateur rotatif afin de répartir le colorant. Une lecture spectrophotométrique à 690 nm est finalement réalisée.

2.3.2.5 Le test LDH

Principe

Cette technique mesure l'intégrité membranaire : les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, et notamment l'enzyme lactate deshydrogénase (LDH). La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle à la mort cellulaire. La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture est effectuée par un dosage enzymatique colorimétrique (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Legrand et al., 1992). La LDH transforme le lactate en pyruvate, en réduisant le NAD en NADH (voir figure 2.20). En présence de NADH, le colorant jaune INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) est transformé en formazan de couleur rouge absorbant à 492 nm.

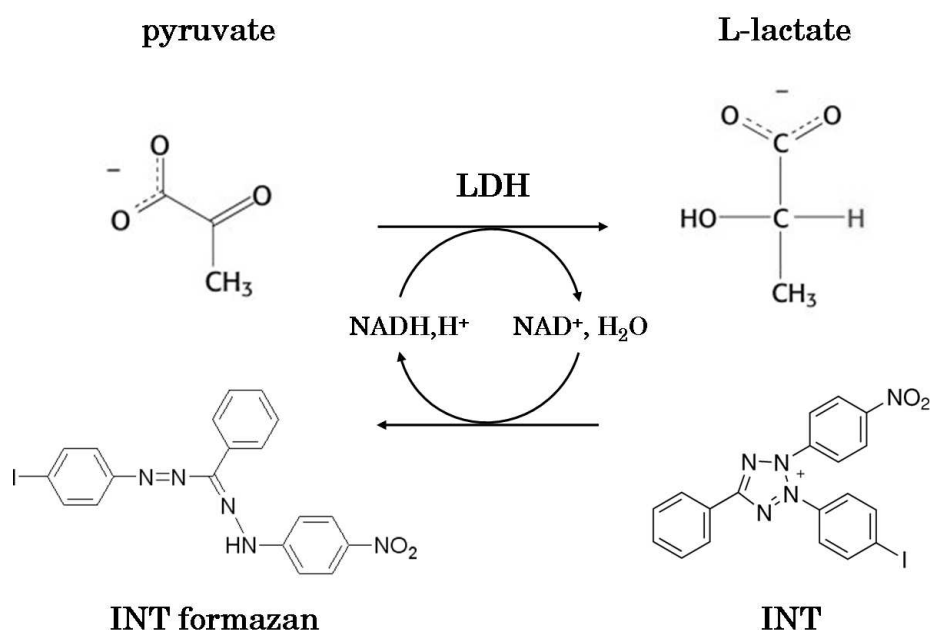


FIGURE 2.20 – Principe du test LDH

Pour ce test, le signal colorimétrique diminue avec la viabilité cellulaire (LDH), le pourcentage de cytotoxicité est calculé à l'aide d'un témoin à 100 % de mortalité cellulaire (CdCl_2 à 200 μM), à chaque absorbance est retiré l'absorbance du témoin négatif correspondant à 0 % de mortalité cellulaire :

$$\text{Taux de mortalité} = \frac{Abs_{\text{essai}} - Abs_{\text{témoin négatif}}}{Abs_{\text{CdCl}_2} - Abs_{\text{témoin négatif}}} \cdot 100$$

Protocole opératoire

Le réactif est préparé extemporanément, en mélangeant le substrat, l'enzyme et le colorant aux proportions 1 : 1 : 1. Au terme de l'exposition, 50 μL du surnageant cellulaire sont transférés dans une nouvelle plaque, et sont complétés de 50 μL de réactif. Après 30 min d'incubation à température ambiante 10 μL d'une solution d'HCl à 1 M sont ajoutés afin de stopper la réaction et faire virer le rouge de phénol du milieu à l'incolore. La plaque est finalement lue au spectrophotomètre à 490 nm.

2.3.2.6 Le test au bleu trypan

Principe

Le bleu de trypan est un colorant qui entre dans les cellules mais qui entraîne un mécanisme d'exclusion le rejetant dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le

mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera le colorant et restera incolore tandis qu'une cellule morte ne pourra le rejeter et restera bleue. Au microscope optique les cellules vivantes sont donc différenciées des cellules mortes (Tennant, 1964). Il est alors possible de déterminer le taux de mortalité cellulaire en utilisant un hémacytomètre, qui permet de compter les cellules dans un volume précis.

Protocole opératoire

Après avoir enlevé le milieu d'exposition, les cellules sont décollées sous l'action de 25 μL de trypsine pendant 5 min à 37 °C. La trypsine est ensuite neutralisée par 25 μL de milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont récupérées, additionnées de 5 μL de bleu trypan et homogénéisées avant d'être déposées dans une cellule de Malassez. Enfin, elles sont immédiatement dénombrées au microscope optique.

2.3.3 Dosage des espèces réactives de l'oxygène par la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$

Principe

La sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) pénètre dans les cellules où elle est alors hydrolysée en H_2DCF . Ce composé a la particularité de rester dans la cellule contrairement au composé parent. De plus, en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), il s'oxyde pour former le DCF qui est fluorescent (Cathcart et al., 1983; Keston and Brandt, 1965). Ainsi l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ERO présent dans la cellule.

Protocole opératoire

Les expériences ont été réalisées en prenant soin d'exposer le moins possible la sonde à la lumière. Les cellules sont cultivées à 80 % de confluence en plaques 12 puits. Avant l'exposition, une incubation est réalisée pendant 30 min dans du milieu complet contenant 80 μM de sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu sans sérum de veau foetal contenant 10, 50 ou 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules. Des contrôles positifs sont réalisés en exposant les cellules à l' H_2O_2 (500 μM) ou au *ter*-butyl hydroperoxide (100 à 500 μM). Après 4 ou 24 h d'incubation, le milieu d'exposition est retiré et les cellules lavées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) froid. Les cellules sont finalement grattées dans 200 μL de PBS froid. Après homogénéisation à l'aide d'une pipette, 40 μL de chaque puit sont conservés dans un tube pour réaliser un dosage protéique, et 150 μL sont déposés dans une plaque 96 puits noire qui est ensuite

lue au spectrophotomètre avec une excitation de 480 nm et une longueur d'onde d'émission à 530 nm (cut off à 515 nm). Pour le dosage protéique, 10 μ L de tampon de lyse 5X sont ajoutés puis les échantillons sont congelés avant d'être dosés par la méthode au BCA (voir chapitre 2.4.1).

2.3.4 Dosage des systèmes intervenant dans la régulation du stress oxydant

2.3.4.1 Extraction des protéines cellulaires

Afin de réaliser des dosages enzymatiques des systèmes intervenant dans la régulation du stress oxydant, une extraction des protéines cellulaires a été réalisée. Pour cela, les cellules ont été exposées pendant 4 ou 24 h aux nanoparticules dans des plaques 6 puits. Après exposition, elles ont été lavées deux fois à l'aide de tampon phosphate 100 mM à pH = 7,8 puis reprises et grattées dans 200 μ L du même tampon contenant 20 % de glycérol et 0,2 mM de phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). L'extraction des protéines a été achevée par choc thermique consistant en trois passages successifs dans l'azote liquide et dans un bain-marie à 37°C. Les extraits obtenus sont finalement centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm et à 4°C, puis aliquotés et conservés à -80°C.

2.3.4.2 Dosage du glutathion total GSH

Principe

Le dosage des différentes formes du glutathion suit le protocole décrit par Van deputte et al. (1994). Cette technique est basée sur la réduction par les groupements thiol (SH) du glutathion réduit du DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)) en TNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)) de couleur jaune (voir figure 2.21). L'enzyme GRED (glutathion réductase) est ajoutée avec son cofacteur NADPH, H⁺ pour accélérer le dosage en consommant le GSSG produit. De plus, afin de ne doser que les groupements thiol du GSH, une étape de précipitation des protéines est préalablement réalisée.

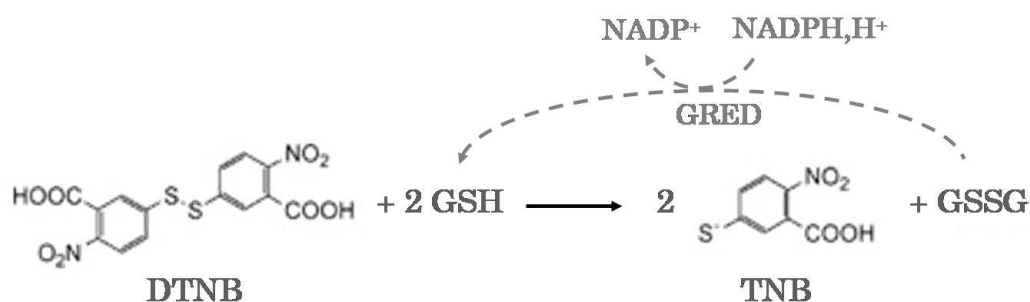


FIGURE 2.21 – Principe du dosage du glutathion total.

Protocole opératoire

Une gamme étalon de GSH allant de 0 à 150 μM est préalablement préparée dans du tampon phosphate 100 mM pH= 7,8 (TpP). Afin de précipiter les protéines, 10 μL d'acide trichloracétique (TCA) à 25 % sont ajoutés à 40 μL d'échantillon ou point de gamme pendant 10 min dans la glace. Une centrifugation des protéines est ensuite réalisée pendant 15 min à 10 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant est finalement dosé en plaque 96 puits par la méthode suivante : à 2,5 μL d'échantillon ou point de gamme sont ajoutés 7,5 μL de TpP contenant 10 mM d'EDTA (TpP-EDTA). Sont ensuite rajoutés 100 μL de réactif constitué de 2,55 mL d'une solution à 2 mM de NADPH, de 15 mL d'une solution à 10 mM de DTNB et de 10,95 mL de TpP-EDTA. Après incubation de quelques minutes dans le spectrophotomètre, 20 μL d'une solution de glutathion réductase à 8,5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du TpP-EDTA sont alors rapidement déposés. La cinétique d'apparition du TNB est suivie pendant 5 min à 405 nm. La concentration en glutathion des échantillons est déterminée grâce à la courbe étalon $V_{\text{max}} = f(C_{\text{GSH}})$, puis normalisée à la quantité de protéines.

2.3.4.3 Dosage de la glutathion peroxydase GPx

Principe

Ce dosage a été réalisé en accord avec la méthode décrite par Paglia and Valentine (1967). L'activité de la GPx est dosée grâce à un couplage avec une réaction produisant du GSH en présence de NADPH et de GRED. Le GSH produit est ensuite réoxydé par l'hydroperoxyde de cumène grâce à la Gpx (voir figure 2.22). La vitesse de disparition du NADPH est directement mesurable à 340 nm, et est proportionnelle à l'activité de la GPx. Ainsi en réalisant une gamme étalon en GPx, il est possible de déterminer l'activité de la GPx des échantillons.

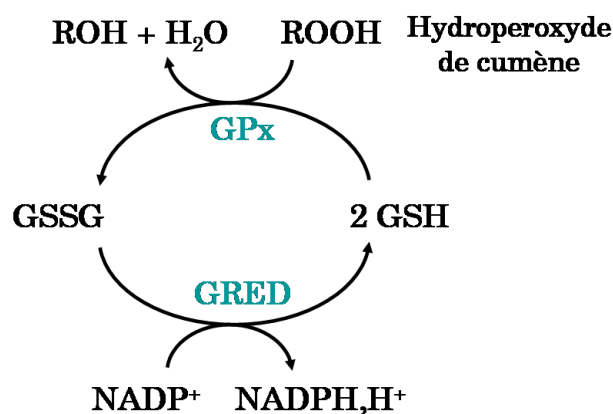


FIGURE 2.22 – Principe du dosage de la glutathion peroxydase.

Protocole opératoire

Une gamme étalon en GPx allant de 0 à 2 U.mL^{-1} est préparée dans du TpP additionné de 5 g.L^{-1} d'albumine de sérum bovin (BSA). Une normalisation de la concentration en protéine des échantillons à 0,6 g.L^{-1} est nécessaire et a été effectuée par dilution dans du TpP. Le réactif de dosage est préparé extemporanément par mélange de 500 μL d'une solution à 30 mM de GSH, 500 μL d'une solution à 3,6 mM de NADPH, 500 μL d'une solution à 30 U.mL^{-1} de GRED et 7 mL de TpP. Dans une plaque 96 puits sont tout d'abord déposés les échantillons et la gamme à raison de 15 μL , puis sont ajoutés 85 μL de réactif précédemment décrit. Enfin la réaction est déclenchée par addition de 50 μL d'une solution à 552 μM d'hydroperoxyde de cumène. Après une brève agitation de la plaque, l'absorbance est alors très rapidement lue à 340 nm pendant 5 min. L'activité de la GPx est déterminée grâce à la gamme étalon et est rapportée à la quantité de protéines.

2.3.4.4 Dosage de la glutathion réductase GRED

Principe

Le dosage de la GRED suit le protocole décrit par Smith et al. (1988) et suit le même principe que pour le dosage du glutathion total (voir figure 2.21 page précédente). En présence de NAPH la GRED réduit le glutathion oxydé (GSSG) en GSH qui réduira à son tour le DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)) en TNB (acide 5-thio(2-nitrobenzoïque)) de couleur jaune. La vitesse d'apparition de la couleur jaune est directement proportionnelle à l'activité de la GRED qui est alors déterminée grâce à une gamme étalon.

Protocole opératoire

Une gamme étalon de GRED allant de 0 à 0,6 U.mL⁻¹ est réalisée dans du TpP. Une solution à 0,05 mM de DTNB est tout d'abord préparée dans du TpP-EDTA. Dans une plaque 96 puits sont déposés 10 µL d'échantillon ou point de gamme et 150 µL de la solution précédemment décrite. 25 µL d'une solution à 2,5 mM de NADPH sont ensuite ajoutés, puis 25 µL de solution de glutathion oxydé (GSSG) qui déclenchent la réaction. L'absorbance est rapidement lue à 415 nm pendant 3 min. L'activité de la GRED dans les échantillons est déterminée grâce à la courbe étalon $V_{\max} = f(A_{GRED})$, puis normalisée à la quantité de protéines.

2.3.4.5 Dosage de la superoxyde dismutase SOD

Principe

Ce dosage est basé sur l'inhibition de l'oxydation du NADH par la superoxyde dismutase (Paoletti et al., 1986). En absence de SOD, β -mercaptoéthanol s'auto-oxyde en présence d'EDTA et MnCl₂ et génère des anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$). Ces anions vont provoquer l'oxydation du NADH, H⁺ en NAD⁺. Cette disparition de NADH, H⁺ est directement mesurable à 340 nm. En présence de SOD, il y a compétition entre les réactions de consommation des anions superoxyde par la SOD et l'oxydation du NADH, H⁺ (voir figure 2.23). Ainsi la diminution de la quantité d'anions superoxydes du milieu par la SOD a pour conséquence une inhibition de l'oxydation du NADH, H⁺ et donc une diminution moins importante de l'absorbance à 340 nm. Une unité enzymatique de la SOD correspond à 50 % d'inhibition du taux d'oxydation du NADH, H⁺.

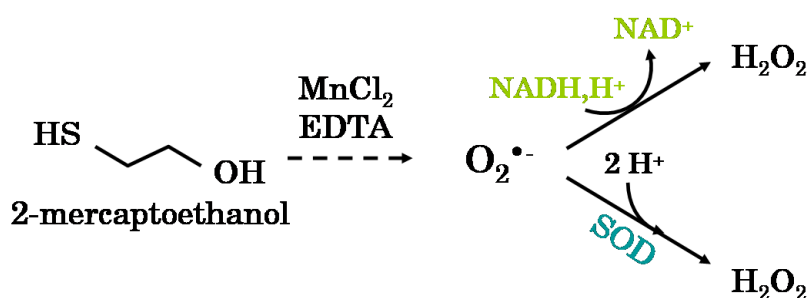


FIGURE 2.23 – Principe du dosage de la superoxyde dismutase

Protocole opératoire

Une gamme étalon de SOD allant de 0 à 2 U.mL⁻¹ est préparée dans du TpP. Les échantillons sont normalisés à 0,15 g.L⁻¹ de protéines dans du TpP. Le réactif est préparé extemporannément par mélange de : 800 µL d'une solution à 7,5 mM de β -NADH, 500 µL d'un mélange volume à volume d'une solution à 200 mM

d'EDTA et d'une solution à 100 mM de MnCl_2 et 16 mL de TpP. Dans un plaque 96 puits sont déposés 20 μL d'échantillon dilué ou de point de gamme, puis 173 μL de réactif précédemment décrit. Afin de déclencher la réaction, 20 μL d'une solution à 10 mM de β -mercaptoéthanol (10 mM) sont rapidement ajoutés dans chacun des puits. Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 340 nm pendant 5 min.

Afin d'obtenir l'activité des échantillons une recalibration de la gamme étalon $V_{\max} = f(\log(A_{\text{SOD}}))$ est nécessaire en considérant que le standard à 0 U.mL^{-1} correspond à 100% d'oxydation et que 50 % d'oxydation correspond à 1 U.mL^{-1} de SOD. L'activité des échantillons est ensuite déterminée à partir de la nouvelle droite d'étalonnage et rapportée à la quantité de protéines.

2.3.4.6 Dosage de la catalase

Principe

Le dosage de la catalase s'effectue selon la méthode décrite par Beers and Sizer (1952) adaptée en microplaque. Elle repose sur la mesure de la diminution d'absorbance à 240 nm du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est consommé par l'enzyme. Les résultats sont exprimés en μmol d' H_2O_2 consommé par minute, ce qui correspond à 1 U de catalase.

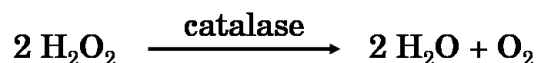


FIGURE 2.24 – Principe du dosage de la catalase

Protocole opératoire

Une gamme d'étalonnage de catalase allant de 0 à 0,1 U.mL^{-1} est réalisée dans du TpP. Les échantillons sont normalisés à 0,05 g.L^{-1} de protéines dans du TpP. Dans une plaque 96 puits transparente aux UV, 100 μL d'échantillon dilué ou de gamme sont déposés suivi de 100 μL d'une solution à 28 mM d' H_2O_2 dans du TpP. L'absorbance à 240 nm est alors immédiatement lue pendant 5 min. L'activité de la catalase des échantillons est finalement déterminée grâce à la droite étalon $V_{\max} = f(A_{\text{catalase}})$ et rapportée à la quantité de protéines.

2.3.5 Evaluation de la génotoxicité

2.3.5.1 le test des comètes en condition alcaline

Principe

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées (Singh et al., 1988). En conditions alcalines, cette technique permet de révéler les ruptures de chaîne simple et double brins ainsi que les sites alcali-labiles (attestant de la modification chimique de bases azotées). Pour cela, l'ADN des cellules est placé dans un champ électrique permettant la migration différentielle des fragments. Compte tenu du faible voltage et ampérage, les molécules d'ADN intactes et donc trop "lourdes" pour avoir été déplacées par le champ électrique vont décrire une sphère compacte (voir figure 2.25 a.). Un ADN endommagé va, quant à lui, voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère, formant ainsi un "halo" d'ADN comparables à des comètes (voir figure 2.25 b.). La longueur et l'intensité de la queue de la comète dépendent directement de la quantité de dommages à l'ADN. L'analyse d'image par un logiciel spécifique permet alors une quantification des effets observés.

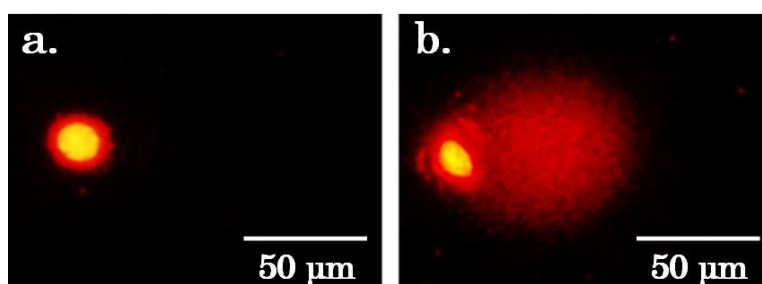


FIGURE 2.25 – Observations microscopiques des comètes : a. contrôle négatif ne présentant pas de dommages à l'ADN et b. contrôle positif présentant des dommages à l'ADN.

Protocole opératoire

Les cellules sont exposées en plaque 12 puits pendant 24 h aux nanoparticules diluées dans du milieu DMEM sans sérum de veau foetal. Après avoir retiré le milieu d'exposition et avoir rincé deux fois au tampon PBS, les cellules sont décollées sous l'action de 200 µL de trypsine pendant 5 min dans l'incubateur. Afin de neutraliser la trypsine, 200 µL de milieu DMEM additionné de 10 % (Vol/Vol) de sérum de veau foetal sont ajoutés, puis les cellules sont récupérées dans un tube et centrifugées pendant 10 min à 1500 rpm et à température ambiante.

Le culot cellulaire est ensuite repris dans 200 μL de tampon PBS puis mélangé à parts égales avec une solution à 1% d'agarose à bas point de fusion préparée dans du PBS. 80 μL du mélange sont ensuite déposés sur une lame microscopique pré-enduite d'une solution à 0,8 % d'agarose à point de fusion normal. Une lamelle est immédiatement posée sur la préparation afin de l'étaler le mélange sur la surface de la lame. Après polymérisation, la lamelle est retirée et une nouvelle couche d'agarose seul est déposée de la manière précédemment décrite. Les lames sont ensuite recouvertes pendant 1 h à l'obscurité d'une solution de lyse ajustée à pH 10 et constituée de 2,5 M de NaCl, 100 mM d'EDTA, 10 mM de Trizma base, 1 % Triton X100 et 10 % de DMSO.

Après la lyse, les lames sont transférées dans une cuve à électrophorèse et immergées durant 40 min dans un tampon de déroulement constitué de 0,3 M de NaOH et 1 mM d'EDTA. Les lames sont ensuite mises à migrer sous un champ électrophorétique à 20 V et 300 mA pendant 24 min, puis rincées 2 fois avec un tampon de neutralisation à 0,4 M de Trizma base ajusté à pH 7,5. Enfin les lames sont deshydratées 30 min à l'éthanol absolu et séchées à température ambiante.

Les lames sont regardées après dépôt de 50 μL d'une solution de bromure d'éthidium (BET) à 20 ng.mL^{-1} sous un microscope à épifluorescence muni d'un filtre TRITC ($\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} > 580 \text{ nm}$). Les photographies obtenues sont analysées par le logiciel d'acquisition Komet 4.0 (Kinetic Imaging Ltd).

2.3.5.2 l'immunomarquage des histones $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$

Lorsqu'il y a cassure double brin de l'ADN, les histones ³ H_2AX à proximité sont immédiatement phosphorylées en $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$, ce qui facilite le recrutement des complexes de réparation de la cassure. Ainsi les histones $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ sont un bon marqueur de la présence de cassures doubles brins (Rothkamm and Löbrich, 2003).

Principe

Les histones $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ sont mises en évidence par immunomarquage. Le principe consiste à mettre en contact l'histone avec un premier anticorps ⁴ qui se fixe spécifiquement à celle-ci. Puis l'anticorps primaire va être à son tour reconnu par un second anticorps spécifique portant un marqueur fluorescent (voir figure 2.26). Ainsi les histones $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ deviennent directement observables au microscope à épifluorescence. Il s'agit de foci qui peuvent être quantifiées.

3. protéines basiques s'associant à l'ADN pour former la structure de base de la chromatine

4. protéine complexe détectant et neutralisant les antigènes de manière spécifique.

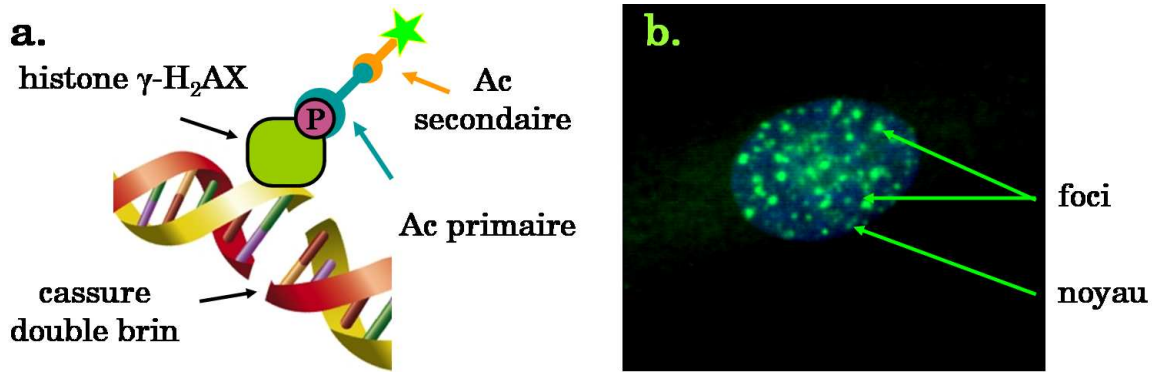


FIGURE 2.26 – L'immunomarcage des histones γ -H₂AX : a. Principe du marquage (Ac : anticorps) et b. Observation microscopique des foci γ -H₂AX.

Protocole opératoire

Les cellules sont cultivées sur des lamelles rondes de 12 mm de diamètre en plaque 24 puits, puis exposées aux nanoparticules dans du milieu DMEM sans sérum de veau foetal pendant 24 h. Après exposition, les cellules sont rincées trois fois au tampon PBS puis fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 3% pendant 15 min à température ambiante. Elles sont ensuite à nouveau rincées deux fois au PBS puis une fois au tampon PBS-lait à 3 % avant d'être perméabilisées pendant 15 min par une solution PBS-lait contenant 0,2 % de Triton X-100. Entre chaque étape est réalisé 3 rincages au PBS lait. Les lamelles sont déposées sur des gouttes d'anticorps anti- γ -H₂AX P62 dilué 500 fois dans du PBS-lait. Après 1h d'incubation à température ambiante les lamelles sont déposées sur des gouttes d'anticorps anti-Souris-FITC dilué 200 fois pendant une nuit à 4°C. Les noyaux des cellules sont finalement marqués par une solution de DAPI à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant 10 min, puis les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'une solution de mowiol à 2 % de dabco.

Les photographies sont réalisées au microscope à épifluorescence avec les filtres FITC pour l'immunomarcage ($\lambda_{\text{excitation}} = 490\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}} > 500 \text{ nm}$) et DAPI ($\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} > 400 \text{ nm}$), soit deux photos par champ qui seront ensuite superposées et analysées par le logiciel ImageJ.

2.3.5.3 le test des micronoyaux

Principe

Les micronoyaux sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal (voir figure 2.27), présentes au sein du cytoplasme, provenant de la perte de fragments chromosomiques, voire de chromosomes entiers au cours de l'anaphase. La

présence de micronoyaux est fiable à un événement génotoxique, clastogène⁵ ou aneugène⁶, non ou mal réparé par la cellule. Ils sont recherchés et quantifiés in vitro par la technique décrite par Fenech and Morley (1985). Pour cela, les cellules sont bloquées artificiellement grâce à la cytochalasine B⁷ en interphase. Les micronoyaux sont alors comptés dans les seules cellules binucléées correspondant aux cellules ayant subies une division cellulaire complète. Ainsi cette technique permet de ne comptabiliser que les lésions génotoxiques acquises, non réparables et transmissibles, correspondant aux micronoyaux dans les cellules binucléées, répondant seules à la définition stricte de la mutation.

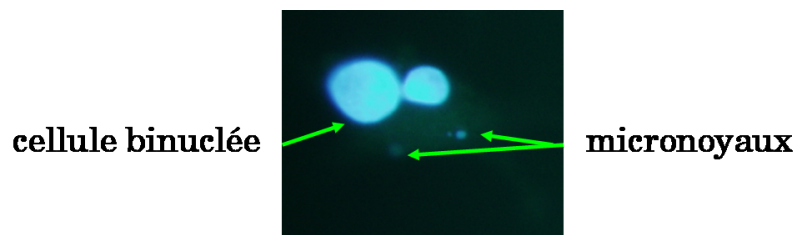


FIGURE 2.27 – Observation microscopique de micronoyaux.

Protocole opératoire

Les cellules sont cultivées sur des lamelles rondes de 12 mm de diamètre en plaque 24 puits, puis exposées aux nanoparticules dans du milieu DMEM sans sérum de veau foetal pendant 24 h. Le milieu d'exposition est ensuite remplacé par du milieu DMEM additionné de 10 % (Vol/Vol) de sérum de veau foetal, de 2 mM de L-glutamine et de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cytochalasine B et les cellules incubées à nouveau pendant 24 h. Après avoir retiré le milieu et rincé trois fois au PBS, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) à 3 % dans du PBS pendant 20 min, puis à nouveau rincées trois fois au PBS. Les acides nucléiques (ADN et ARN, soit la totalité de la cellule) sont ensuite marqués pendant 15 min à température ambiante avec une solution d'acridine orange à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les cellules sont rincées ensuite trois fois au PBS, avant de marquer les noyaux pendant 15 min avec une solution de DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Après trois nouveaux rinçages au PBS et un rinçage rapide à l'eau, les lamelles sont collées sur des lames à l'aide d'une solution de mowiol à 2 % de dabco.

Les photographies sont réalisées au microscope à épifluorescence avec les filtres FITC pour l'acridine orange ($\lambda_{\text{excitation}} = 490\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}} > 500\text{ nm}$) et DAPI ($\lambda_{\text{excitation}} =$

5. altération chromosomique

6. altération de l'appareil mitotique

7. substance qui bloque la division cytoplasmique par inhibition de l'assemblage des microfilaments d'actine

380 nm, $\lambda_{\text{émission}} > 400$ nm), soit deux photos par champ qui seront ensuite superposées.

2.4 Techniques communes

2.4.1 Dosage protéique par la méthode au BCA

Principe

Les protéines ont été dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith et al., 1985). Elle s'appuie sur la formation de complexe Cu^{2+} -protéine en condition alcaline, suivi par une réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ . Les ions Cu^+ sont ensuite chélatés par le BCA. Le complexe obtenu, de couleur pourpre, absorbe fortement à 562 nm et dans la gamme de longueurs d'onde de 540 à 590 nm. Cette absorbance est linéaire en fonction de la concentration en protéines dans une gamme de 200 à 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de protéines.

Protocole opératoire

Une gamme étalon de BSA de 200 à 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ est tout d'abord réalisée. Dans un plaque 96 puits, 10 μL de chaque échantillon ou point de gamme sont déposés dans les puits. Ensuite 200 μL de solution réactive BCA (préparée extemporanément) sont ajoutés à chaque puits. La microplaque est finalement incubée pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. L'absorbance du complexe obtenu est lue à 562 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée grâce à la courbe étalon $\text{Abs} = f(C_{\text{prot}})$.

2.4.2 Observations au microscope électronique en transmission.

2.4.2.1 La microscopie électronique en transmission (MET).

Principe

L'image observée en microscopie électronique à transmission est le résultat de l'interaction des électrons incidents avec des zones plus ou moins denses de l'échantillon. Les électrons traversant une région dense seront stoppés ou déviés laissant une zone sombre sur l'image, tandis que les électrons traversant une zone peu dense seront transmis et donneront une zone claire. L'image visible et agrandie de l'échantillon est formée par la focalisation du faisceau d'électrons ayant traversé l'échantillon au moyen des lentilles électromagnétiques.

Le faisceau d'électrons est généré par un filament de tungstène chauffé dans le canon à électrons au sommet de la colonne centrale du microscope. Il est accéléré par une différence de potentiel de 80 000 V, puis dirigé et focalisé par un double condenseur, constitué par des lentilles électromagnétiques, sur la préparation au niveau du porte-échantillon. L'ensemble de la colonne est maintenu sous un vide poussé ou ultra vide pour éviter une déviation des électrons par collision avec les molécules gazeuses. Le microscope électronique est équipé d'une caméra numérique permettant d'observer et de numériser les images obtenues à l'aide d'un programme de traitement d'images.

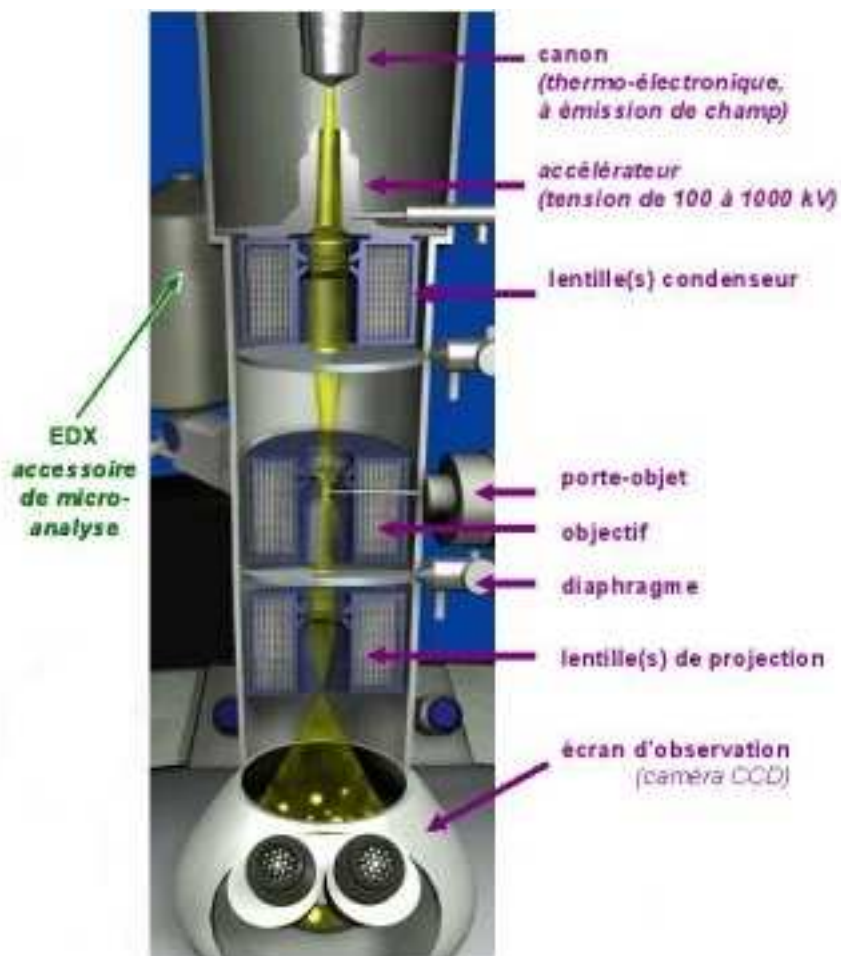


FIGURE 2.28 – Schéma simplifié d'un microscope électronique en transmission ⁸

Matériels

Les observations des coupes et des nanoparticules ont été réalisées avec la collaboration de Jéril Degrouard et Danielle Jaillard, à l'aide d'un microscope Philips EM 208 (Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR 8080, CNRS/université

8. site internet http://www.ircelyon.univ-lyon1.fr/les_services/microscopie_electronique/theorie consulté en ligne le 20 septembre 2008

Paris XI). Les observations ont été réalisées sous une tension d'accélération maximale de 80 kV, une résolution théorique de 0,1 nm et un grossissement maximal de 180 000. La numérisation des images a été réalisée grâce à une caméra numérique à bas niveau de lumière, modèle AMT Advantage HR3 (Capteur CCD 1,3 millions de pixels, 1024 x 1024) pilotée par le logiciel d'acquisition AMT Image Capture Engine.

Les observations en haute résolution des nanoparticules, les cartographies et les analyses EDS ont été réalisées avec la collaboration de Nicolas Menguy, à l'Institut de Mineralogie et Physique des Milieux Condensés (UMR 7590, CNRS). Le microscope utilisé est un JEOL 2100F équipé d'une pièce polaire haute résolution (0.19 nm), d'un dispositif de filtrage en énergie et de spectroscopie des électrons (GIF 2001), d'un spectromètre en dispersion d'énergie des rayons X (XEDS) et d'un dispositif de balayage (STEM) associé à un détecteur de champ noir annulaire à grand angle (HAADF). La plupart des images a été obtenue sur la caméra CCD Gatan UltraScan US 4000.

2.4.2.2 Préparation des échantillons

Les échantillons en observation directe

Les nanoparticules dispersées dans l'eau et les bactéries fraîches ont été déposées à raison de 10 μL sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone. Après 10 min d'attente, l'excédent de liquide a été absorbé à l'aide d'un papier filtre sans cendres et les grilles directement observées.

Les échantillons biologiques : l'inclusion en résine

La colonne sous vide et la transmission du faisceau du microscope électronique à transmission imposent une préparation particulière des échantillons car les électrons sont facilement absorbés et diffractés par la matière solide. Ainsi, seules de très fines coupes d'échantillons biologiques (entre 20 et 100 nm) permettent de bonnes observations du contenu cellulaire. C'est pourquoi un étape d'inclusion en résine et de coupe à l'ultramicrotome est nécessaire.

Les cellules A549 ont été cultivées en boîte de pétri et exposées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules dans du milieu DMEM sans sérum de veau foetal. Les bactéries ont été exposées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules dans l'eau à DO = 0,03. La préparation a été effectuée en plusieurs étapes comprenant une double fixation chimique au glutaraldéhyde et tétroxyde d'osmium, une déshydratation par immersions successives dans des bains d'alcool de concentration croissante, l'inclusion dans une résine (EPON) et la réalisation de coupes ultrafines (70 à 90 nm

d'épaisseur) par ultramicrotomie, utilisant un ultramicrotome LEICA EM FC6 équipé d'un couteau diamant Diatome. Les étapes précédant la réalisation des coupes ont été réalisées directement en boîte de Pétri pour les cellules A549. Pour les bactéries une étape d'enrobage du culot bactérien dans l'agarose et de découpe en petits blocs de 1 à 3 mm³ est nécessaire avant l'étape de deshydratation.

Les coupes de cellules ont finalement été contrastées dans un premier temps à l'acétate d'uranyle pendant 20 min, puis dans un second temps à l'aide de tampon Reynolds contenant du citrate de plomb pendant 10 min.

2.5 Analyses statistiques

Pour chaque test, ont été réalisés au moins 3 séries d'expérimentations indépendantes, constituées d'au moins 3 points par condition. Pour chaque condition la moyenne et les écarts-types sur la moyenne ont été calculés, toutes expérimentations confondues. La significativité des différences entre les moyennes des échantillons contaminés et des échantillons témoins non contaminés a été évaluée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)).

CHAPITRE 3

Caractérisation des nanoparticules

3.1	Caractéristiques physico-chimiques	83
3.2	Préparation et stabilité des nanoparticules	94
3.3	Interférences des nanoparticules avec les mesures optiques	101
3.4	Synthèse du chapitre	104

Il a été décrit dans le chapitre 1 que les travaux de recherche actuels mettent en évidence, pour un même type de nanoparticules, des effets biologiques très variés qui sont parfois même contradictoires. C'est pourquoi il a été suggéré (Maynard and Aitken, 2007; Oberdörster et al., 2005a) et parfois constaté (Brunner et al., 2006; Kennedy et al., 2008; Sayes et al., 2006a), qu'en dehors de la simple composition chimique, d'autres caractéristiques peuvent intervenir dans la nature et l'intensité des effets. Il peut s'agir de caractéristiques physico-chimiques tel que la forme, la taille, l'état de surface, etc... ou encore de l'état de dispersion des nanoparticules. Ainsi, un des objectifs de ce travail a tout d'abord été de caractériser le plus précisément possible les nanoparticules utilisées afin de comparer et d'être comparé au mieux à d'autres études, mais surtout, afin d'identifier les facteurs influençant les effets biologiques et ainsi proposer des mécanismes d'action en rapport avec ces facteurs. Dans ce chapitre sont donc décrites toutes les caractérisations qui ont été réalisées sur les nanoparticules étudiées.

3.1 Caractéristiques physico-chimiques

Deux grandes classes de nanoparticules ont été étudiées : des nanotubes de carbone et des nanoparticules d'oxyde métallique. Ces deux classes ont été choisies en raison de leur grand intérêt scientifique et industriel, débouchant sur un éventail très large d'applications potentielles ou avérées, et se traduisant par une production mondiale élevée et amenée à s'intensifier dans les années à venir. Du fait de cette forte production, ces nanoparticules pourraient être rejetées dans l'environnement et entrer en contact avec l'homme et les écosystèmes.

3.1.1 Nature, forme et taille

3.1.1.1 Les nanotubes de carbone (NtC)

Les NtC sont synthétisés sous la forme de feuillets d'environ 150-200 μm de d'épaisseur, formés de NtC disposés en brosse (voir figure 3.1 a. page suivante). Ils sont ensuite dispersés par sonication dans l'eau en présence de gomme arabique afin d'obtenir des NtC individualisés (voir 3.2.1 page 94). Une des conséquences de la sonication est de rompre les NtC, dont la longueur est alors diminuée. Ainsi plus le temps de sonication est long plus la taille des NtC diminue (Glory et al., 2007). En faisant varier le temps de sonication, des NtC de différentes longueurs ont donc été obtenus : des NtC que nous avons qualifié de long et des NtC que nous avons qualifié de courts (voir figure 3.1 b. et c. 84).

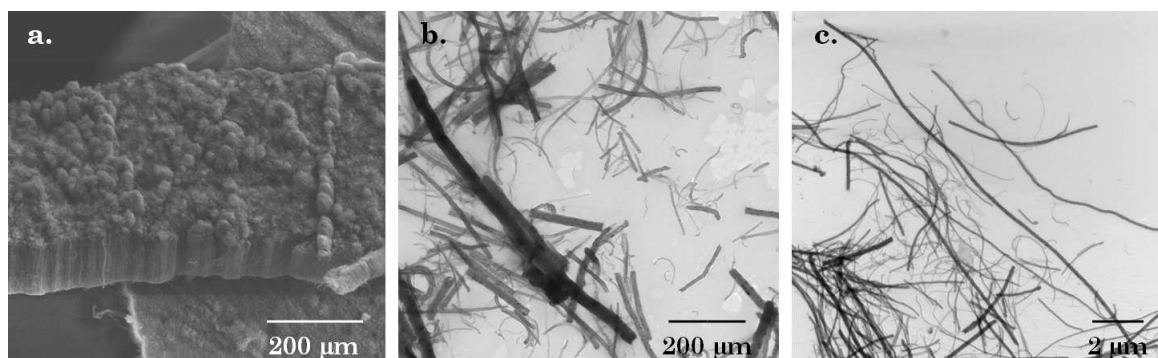


FIGURE 3.1 – Observations microscopiques des nanotubes de carbone : a. feuillet de NtC après synthèse observés au MEB, b. NtC courts observés au MET suite à une dispersion longue et c. NtC longs observés au MET suite à une dispersion courte.

Après dispersion, les répartitions de longueur et de diamètre des NtC ont été déterminées à partir des photographies obtenues au Microscope Électronique en Transmission (MET). Les résultats obtenus (voir figure 3.2) montrent que les NtC ont des dimensions très hétérogènes. En effet leur longueur est comprise entre 100 nm et jusqu'à 20 µm pour les NtC longs. Leur diamètre est quant à lui compris entre 10 et 160 nm avec plus de 90 % de NtC de diamètre inférieur à 100 nm, justifiant leur appellation de nanotubes.

La différence majeure entre les deux lots de NtC repose essentiellement sur leur longueur maximale : les NtC courts ont au maximum 5 µm de longueur contre 20 µm pour les NtC longs. Par conséquent les NtC courts ont une répartition de longueur plus serrée (d_{90}^1 de seulement 2 µm pour les NtC courts contre 3,9 µm pour les longs) et une longueur moyenne plus faible (voir tableau 3.1 page 86). Les autres paramètres de distribution de taille (longueur minimale, d_{10}^2 et d_{50}^3 ou médiane) restent proches, ce qui montre que les NtC ne peuvent être cassés par sonication en dessous de 100 nm et que la longueur des NtC semble se stabiliser autour de quelques centaines de nm voir quelques µm. Ainsi, une forte proportion de NtC de longueur inférieure à 1 µm a été observée pour les deux lots. Cette proportion est cependant un peu plus importante pour les NtC courts que pour les longs, avec respectivement 69 % et 57 % de NtC inférieur à 1 µm.

1. 90 % des NtC ont une taille inférieure à la valeur indiquée
2. 10 % des NtC ont une taille inférieure à la valeur indiquée
3. 50 % des NtC ont une taille inférieure à la valeur indiquée

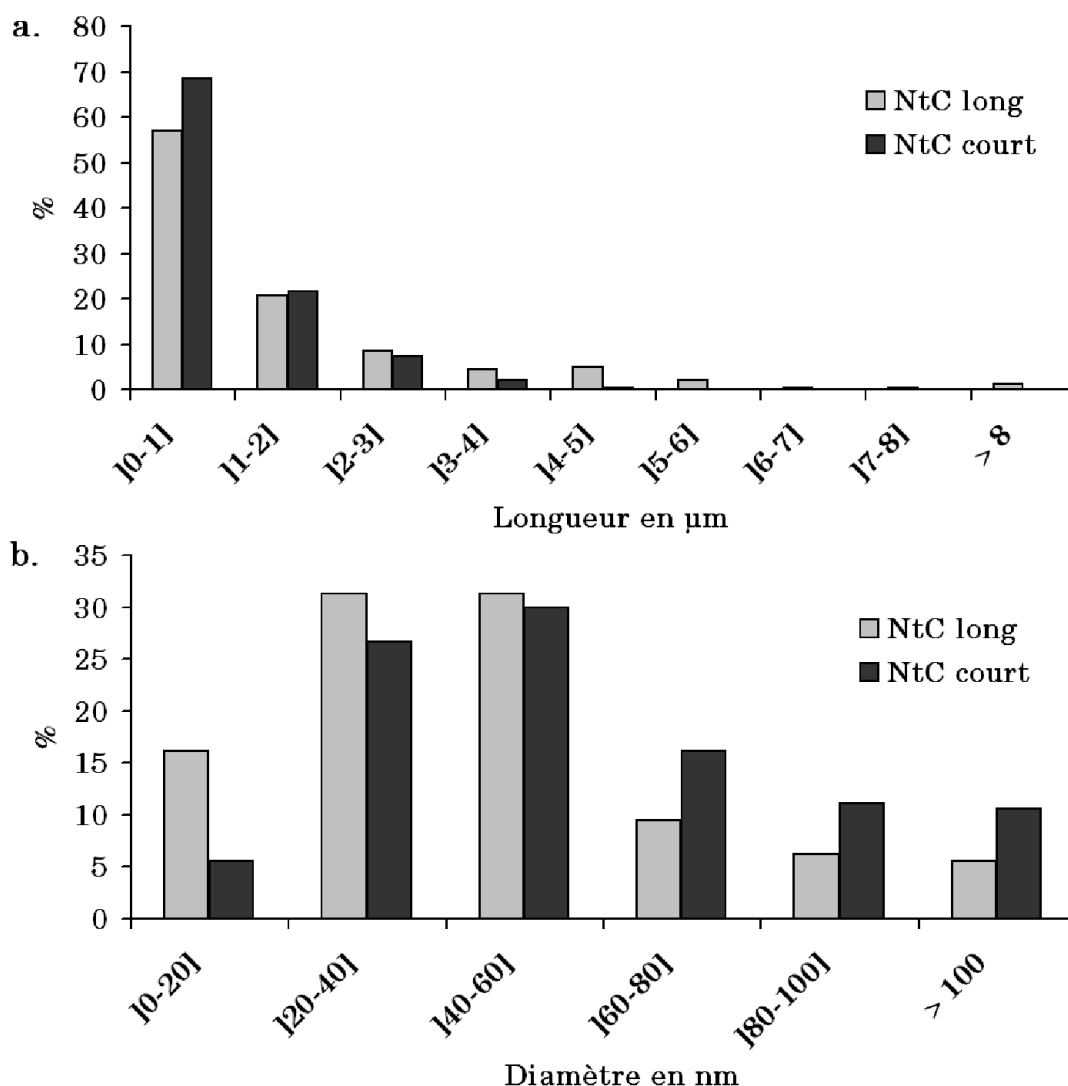


FIGURE 3.2 – Dimensions des NtC d'après les photographies au MET : a. longueurs, b. diamètres.

Bien que provenant du même lot de NtC, des différences de distribution de diamètre entre les NtC courts et NtC longs ont aussi été constatées (voir figure 3.2 et tableau 3.1 page suivante). Cela peut s'expliquer par la différence de rigidité des NtC en fonction de leur diamètre. En effet il est probable que plus le diamètre est élevé, plus le NtC est rigide et moins vite il se cassera sous l'action des ultrasons. Ainsi, pour les NtC longs soniqués pendant un temps court, les plus fins nanotubes se sont cassés plus vite en un nombre important de nanotubes contrairement au gros nanotubes, ce qui a pour conséquence une proportion plus grande de nanotubes fins. Tandis que pour les NtC courts soniqués pendant un temps long, les nanotubes fins ayant déjà, en grande partie, été cassés pendant le début de la sonication, ce sont majoritairement les gros nanotubes qui vont par la suite se casser ; ce qui a pour conséquence une ré-augmentation de la proportion en nombre des nanotubes à gros diamètre.

		NtC long	NtC court
Longueur en μm	min	0,1	0,1
	max	20,0	5,0
	moyenne	$1,5 \pm 1,2$	$1 \pm 0,6$
	d10	0,2	0,3
	médiane / d50	0,9	0,7
	d90	3,9	2,0
Diamètre en nm	min	8	7
	max	177	180
	moyenne	44 ± 22	54 ± 25
	d10	16	21
	médiane / d50	42	42
	d90	81	104

TABLEAU 3.1 – Paramètres de distribution des longueurs et des diamètres des NtC. min : taille minimale, max : taille maximale, d10 : 10 % des NtC sont inférieurs à cette taille, d90 : 90 % des NtC sont inférieurs à cette taille.

En regardant la relation entre la longueur et le diamètre des NtC (voir figure 3.3 a.), deux hypothèses ont été vérifiées. Premièrement, pour les NtC longs, les nanotubes les plus longs ont un diamètre supérieur à 50 nm, mais finissent par se casser au cours du temps puisqu'ils ne sont plus présents dans les NtC courts. Cela confirme que le diamètre des nanotubes joue dans la vitesse de cassage : plus le NtC a un diamètre élevé moins vite ils se casse sous l'action des ultrasons. Deuxièmement, nous remarquons que quelque soit le diamètre tous les NtC tendent à avoir un taille comprise entre 100 nm et 1 μm , ce qui nous montre, pour notre gamme de diamètre de NtC, que les ultrasons ne nous permettent pas de descendre en dessous de ces longueurs, et que le diamètre ne semble pas limiter la longueur des NtC.

Il a été montré, que plus le ratio entre longueur et diamètre est élevé, plus une fibre est toxique (Lippmann, 1990). C'est pourquoi, le rapport longueur sur diamètre a été déterminé pour les deux tailles de NtC (voir figure 3.3 b.). Dans les deux cas, plus de 95 % des NtC ont un rapport longueur sur diamètre supérieur à 5, ce qui fait bien d'eux des fibres. Une majorité de NtC ont un rapport compris entre 10 et 50, ce qui se traduit par un rapport médian de 16 pour les NtC courts et de 24 pour les NtC longs. En raison de l'absence de NtC supérieur à 5 μm , les NtC courts ne contiennent pas de nanotubes dont le rapport est supérieur à 85, contrairement aux NtC longs qui vont jusqu'à 190.

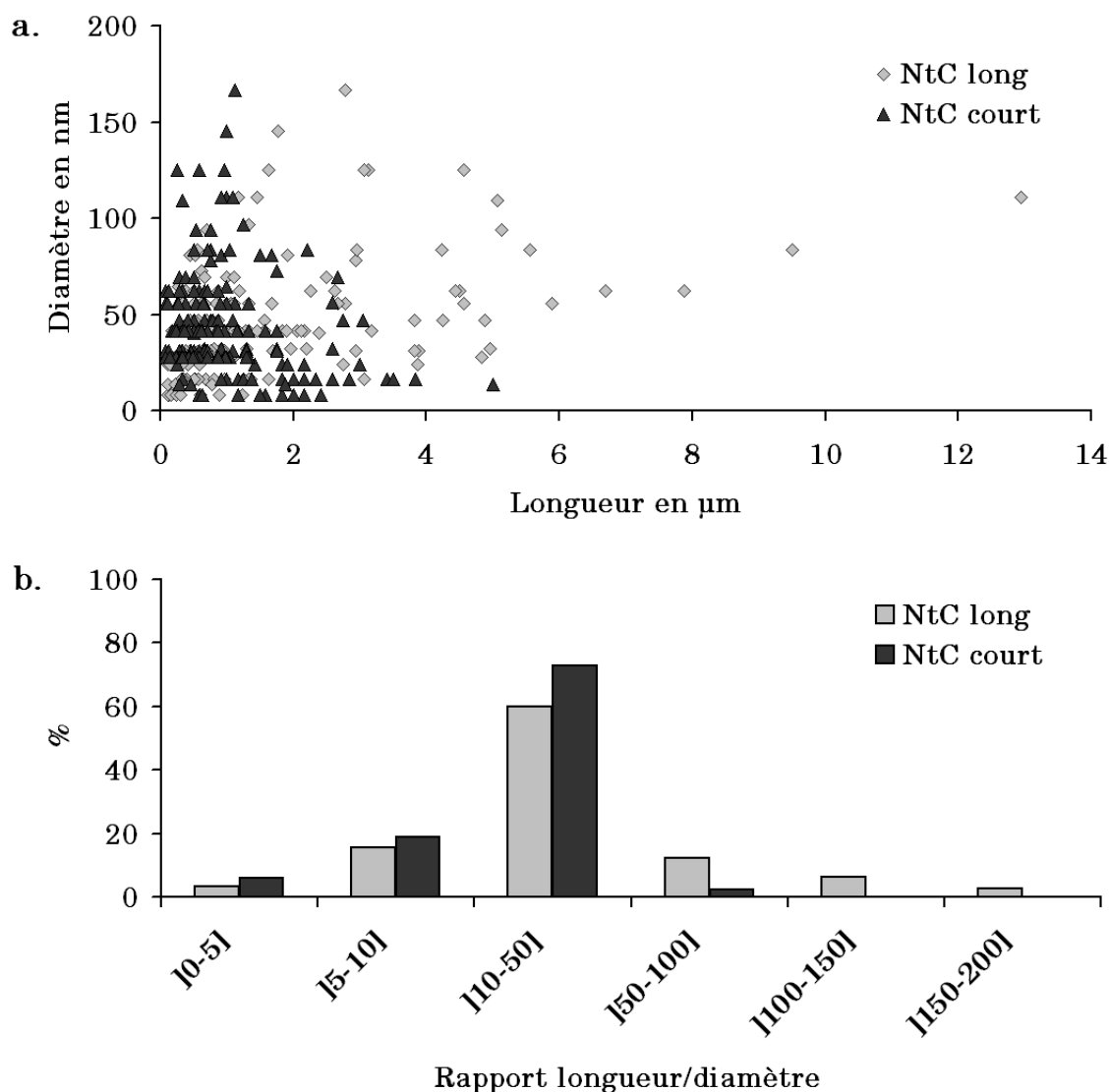


FIGURE 3.3 – Relation entre longueur et diamètre des NtC : a. diamètre en fonction de la longueur des NtC, b. rapport longueur sur diamètre.

3.1.1.2 Les nanoparticules d'oxyde métallique

Des particules d'oxyde métallique de deux différentes natures ont été étudiées : des particules d'oxyde de titane TiO_2 de différentes formes et tailles, et des nanoparticules d'oxyde d'aluminium ou alumine Al_2O_3 . La plupart de ces particules sont de forme plutôt sphérique (voir figure 3.4 page suivante), à l'exception des TiO_2 rut-NP qui sont allongées, formant des "épingles" (voir figure 3.4 page suivante g.). Sur les photographies, la taille des particules de TiO_2 apparaît différente selon l'échantillon.

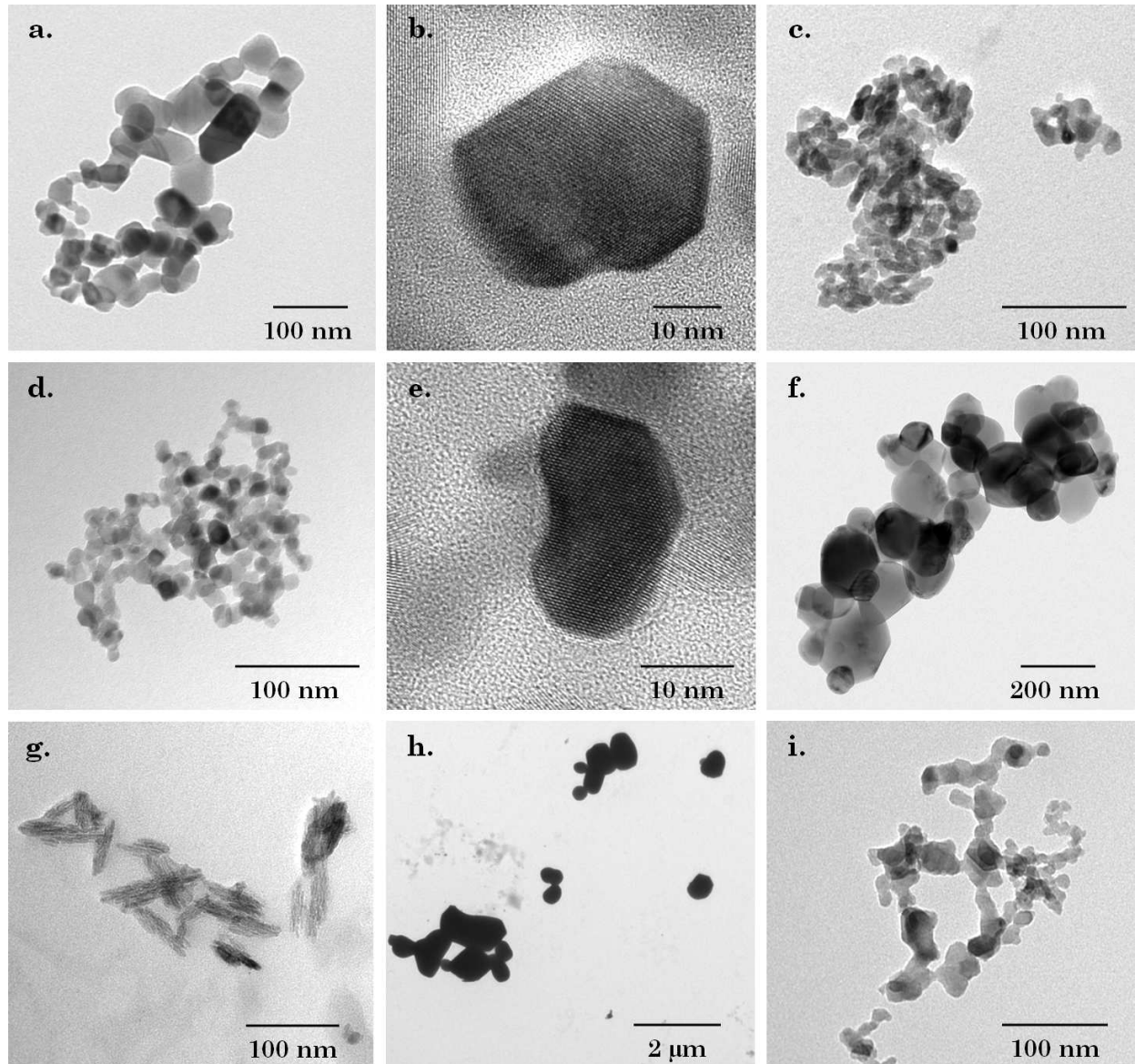


FIGURE 3.4 – Observations microscopiques au MET ou au HRMET des particules d'oxyde métallique : a. et b. TiO_2 P25, c. TiO_2 ana-NP, d. et e. TiO_2 CEA, f. TiO_2 ana-P, g. TiO_2 rut-NP, h. TiO_2 rut-P et i. Al_2O_3 .

La taille des particules primaires et leur distribution ont été déterminées à partir des photographies prises au MET (voir tableau 3.2). Deux classes de taille sont distinguées : les nanoparticules de diamètre moyen compris entre 11 et 24 nm (TiO_2 CEA, TiO_2 P25, TiO_2 ana-NP, TiO_2 rut-NP et Al_2O_3) et les particules de plus de 100 nm de diamètre (TiO_2 ana-P et TiO_2 rut-P). Ainsi, une comparaison des effets biologiques pourra être effectuée entre particules et nanoparticules, mais aussi en fonction du diamètre des nanoparticules de TiO_2 qui par exemple varie du simple au double entre TiO_2 CEA et TiO_2 P25. De même, les nanoparticules de TiO_2 CEA et Al_2O_3 ont un diamètre similaire ce qui permettra de comparer les effets en fonction de la composition chimique en oxyde métallique.

3.1. Caractéristiques physico-chimiques

	TiO ₂ CEA	TiO ₂ P25	TiO ₂ ana-NP	TiO ₂ ana-P	TiO ₂ rut-NP d l		TiO ₂ rut-P	Al ₂ O ₃
min	4	10	6	48	3	23	125	3
max	24	60	48	274	21	108	3000	29
moyenne	12 ± 3	24 ± 7	18 ± 6	142 ± 36	11 ± 3	68 ± 18	707 ± 336	11 ± 3
d10	8	16	10	81	6	37	250	5
médiane	11	21	16	129	10	63	583	10
d90	17	34	26	202	15	99	1458	16

TABLEAU 3.2 – Paramètres de distribution de taille des nanoparticules et particules étudiées en nm. Avec min : taille minimale, max : taille maximale, d : diamètre, l : longueur, d10 : 10 % des nanoparticules sont inférieures à cette taille, d90 : 90 % des nanoparticules sont inférieures à cette taille.

En confrontant les tailles obtenues aux caractéristiques des fournisseurs (voir annexe 2 page 231), nous obtenons des mesures conformes aux descriptifs, mais qui ont de plus l'avantage d'être beaucoup plus précises. En effet, en prenant l'exemple des TiO₂ ana-P qui sont seulement décrites comme particules de diamètre inférieur à 44 µm, il s'avère en réalité qu'elles sont très proches des nanoparticules avec un diamètre moyen de 142 ± 36 nm et près de 18 % en nombre de nanoparticules. En ce qui concerne les nanoparticules de TiO₂ rut-NP, les longueurs mesurées sont plus élevées (68 nm) que celles données par le fournisseur ($\simeq$ 40 nm), ce qui peut être expliqué par une imprécision de la mesure réalisée due à une mauvaise distinction des nanoparticules.

Pour chaque particule, est observée une distribution de diamètre très dispersée, la plus extrême étant pour les TiO₂ rut-P allant de 125 nm à 3 µm de diamètre (voir tableau 3.2). En regardant plus finement la distribution de diamètre des nanoparticules sphériques (voir figure 3.5 page suivante), nous remarquons que les nanoparticules TiO₂ CEA et Al₂O₃ ont effectivement des diamètres très similaires qui sont peu étalés, tandis que les nanoparticules de TiO₂ ana-NP et TiO₂ P25 ont des diamètres plus élevés et beaucoup plus dispersés.

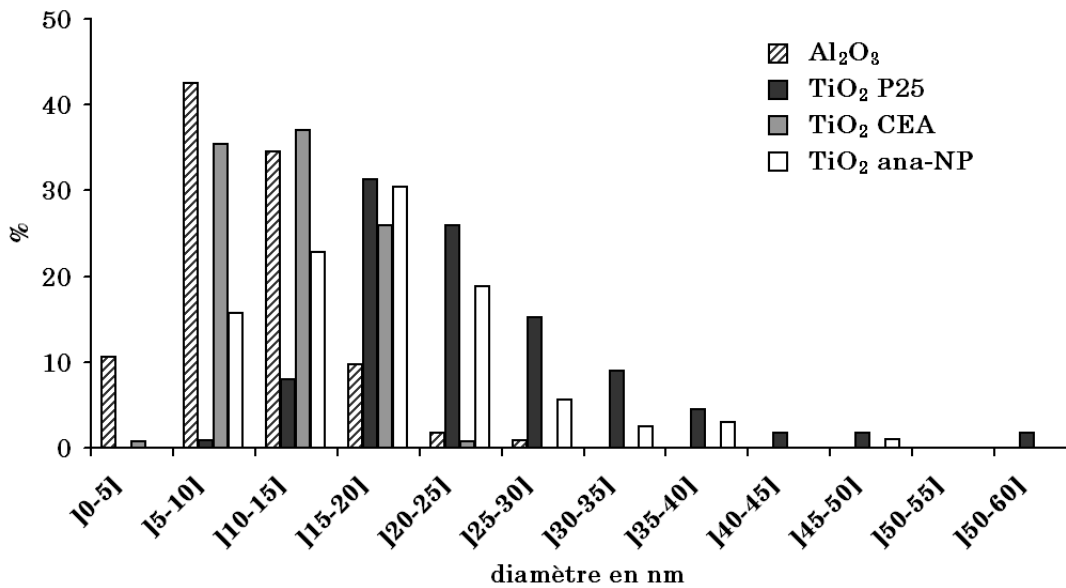


FIGURE 3.5 – Répartition de taille des nanoparticules sphériques.

3.1.2 Surface spécifique, évaluation de la taille, de la porosité et de l'aggrégation

La surface spécifique, c'est-à-dire la quantité de surface en m^2 par g de nanoparticules à été déterminée par la méthode classique de Brunauer Emmett et Teller (BET). Avec cette mesure, les concentrations en nanoparticules pourront être exprimées en concentrations surfaciques. Ces concentrations surfaciques permettront de déterminer si les effets observés sont des effets de surface, c'est-à-dire des effets seulement dus à la grande surface des nanoparticules, ou des effets « nano », c'est-à-dire des effets dus à une réactivité différente aux très faibles tailles.

Plus les particules sont petites, plus leur quantité de surface pour une même quantité de matière est grande. Ainsi les surfaces spécifiques obtenues (voir tableau 3.3 page ci-contre) varient bien de façon inverse à la taille des particules. Plus précisément, dans le cas de particules sphériques, le diamètre peut être directement corrélé à la surface spécifique par la relation suivante :

$$D = \frac{6}{\rho \cdot S_{\text{spé}}}$$

Avec **D** le diamètre en m, ρ la densité en $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ et **S_{spé}** la surface spécifique en $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

3.1. Caractéristiques physico-chimiques

	NtC	TiO ₂ P25	TiO ₂ CEA	TiO ₂ ana-NP	TiO ₂ ana-P	TiO ₂ rut- NP	TiO ₂ rut-P	Al ₂ O ₃
S _{spé} BET en m ² .g ⁻¹	42 ± 2	46 ± 1	92 ± 3	122 ± 1	10 ± 0	118 ± 2	2 ± 0	83 ± 1
D _{moyen} (S _{spé} BET) en nm	-	33	17	12	154	13	752	18
D _{moyen} (MET) en nm	-	24	12	18	142	-	707	11
S _{spé} théorique (MET) en m ² .g ⁻¹	-	64	128	85	11	-	2	137

TABLEAU 3.3 – Surfaces spécifiques et diamètres moyens des nanoparticules. Avec S_{spé} BET : surface spécifique mesurée par la méthode de BET, D_{moyen} (S_{spé} BET) : diamètre moyen calculé à partir de la surface spécifique mesurée par la méthode BET, D_{moyen} (MET) : diamètre moyen déterminé à partir des observations au MET et S_{spé} MET : surface spécifique calculée à partir du diamètre moyen déterminé au MET.

Dans le cas où les particules ont un diamètre variable, le diamètre calculé est un diamètre moyen. Ainsi nous avons pu déterminer à partir de la surface spécifique, le diamètre moyen théorique des particules sphériques ou D_{moyen}(S_{spé} BET). Les résultats obtenus pour les particules sphériques sont concordants avec les mesures réalisées au MET correspondant au D_{moyen}(MET) (voir tableau 3.3) . Nous notons cependant que pour TiO₂ P25, TiO₂ CEA, TiO₂ ana-P et Al₂O₃, les valeurs théoriques sont légèrement supérieures à celles mesurées au MET, ce qui peut être dû à une imprécision de mesure ou de calcul puisqu'elles ne sont pas réellement sphériques. Mais cela peut aussi être le signe d'une agrégation des particules, c'est à dire une fusion entre particules (voir figure 3.7 page 95), qui diminue ainsi la surface en particule. Dans le cas de TiO₂ ana-NP, le D_{moyen}(S_{spé} BET) est au contraire moindre que le D_{moyen}(MET). Une plus petite taille montre que la surface spécifique mesurée est plus grande que la surface spécifique théorique calculée d'après le D_{moyen}(MET), ce "trop de" surface peut s'expliquer par un état poreux des nanoparticules. Ainsi, pour TiO₂ ana-NP, la S_{spé} BET serait la somme des deux composantes suivantes : la surface extérieure des nanoparticules et la surface interne résultant des porosités.

Bien que non sphériques, les TiO₂ rut-NP ont un D_{moyen}(S_{spé} BET) bien plus faible que ce que présageaient les tailles mesurées au MET (voir tableau 3.2 page 89). En effet avec une longueur moyenne de 68 nm et un diamètre moyen de 11 nm, la surface S_{spé} BET aurait dû être plus faible. En dehors des mesures au MET qui

comme dit précédemment peuvent être légèrement faussées, il est possible que ces nanoparticules soient aussi très poreuses.

3.1.3 Charge surfacique et point isoélectrique

La charge surfacique que les nanoparticules acquièrent grâce aux ions qui les entourent ou potentiel zêta a été mesurée à différents pH. Le point isoélectrique, qui est le pH pour lequel la charge de la particule est nulle a été déterminé ainsi que les valeurs des potentiels zêta dans les conditions de dispersion et d'exposition des bactéries (eau) et dans les conditions d'exposition des cellules A549 (DMEM) (voir tableau 3.4).

Le pH de l'eau étant de 5,5, les particules ayant un pI supérieur à 5,5 sont chargées positivement et à l'inverse les particules ayant un pI inférieur à 5,5 sont chargées négativement. Ainsi dans les conditions de dispersion et d'exposition des bactéries, les nanoparticules TiO_2 P25, TiO_2 CEA, TiO_2 ana-NP et Al_2O_3 sont chargées positivement, TiO_2 ana-P et TiO_2 rut-NP sont chargées négativement et TiO_2 rut-P est non chargée.

Dans le milieu DMEM, le potentiel zêta est proche de la neutralité pour toutes les particules étudiées. Cela peut s'expliquer par le pH neutre du milieu proche du pI de certaines nanoparticules mais surtout par la force ionique élevée du milieu qui a pour conséquence l'inexistence de la couche diffuse d'ions et donc l'absence de potentiel zêta (voir chapitre 2.1.4 page 44).

	pI	ζ_{eau} en mV	ζ_{DMEM} en mV
TiO_2 P25	7	44	1
TiO_2 CEA	6,4	20	0
TiO_2 ana-NP	5,6	12	nd
TiO_2 ana-P	5,2	-33	0
TiO_2 rut-NP	-	-50	-1
TiO_2 rut-P	5,4	1	nd
Al_2O_3	8,4	120	-2

TABLEAU 3.4 – Point isoélectrique des nanoparticules et leur potentiel zêta dans les conditions d'exposition. Avac nd : non déterminé.

3.1.4 Structure cristalline

Nous avons voulu étudier différentes structures cristallines de TiO_2 afin de regarder si la différence de réactivité entre les formes anatase et rutile avait une incidence au niveau biologique. La structure cristalline des particules étudiées a donc été déterminée précisément par DRX (voir tableau 3.5). Deux grands groupes sont obtenus : les nanoparticules majoritairement anatases TiO_2 P25, TiO_2 CEA, TiO_2 ana-NP et TiO_2 ana-P et les nanoparticules majoritairement rutiles TiO_2 rut-NP et TiO_2 rut-P. Par ailleurs aucune impureté n'a été détectée par cette méthode.

	Forme cristalline
TiO_2 P25	86 % anatase
TiO_2 CEA	95 % anatase
TiO_2 ana-NP	100 % anatase
TiO_2 ana-P	100 % anatase
TiO_2 rut-NP	100 % rutile
TiO_2 rut-P	96 % rutile

TABLEAU 3.5 – Structure cristalline des oxydes de titane étudiés

3.1.5 Analyse chimique de la surface des nanoparticules

La présence éventuelle à la surface des nanoparticules d'impuretés issues de la synthèse a été vérifiée par MET couplée avec une analyse EDS (Energy Dispersive X-ray Spectrometry).

Seules les nanoparticules de TiO_2 rut-NP contiennent de manière significative (supérieur à 0,5 %)) des impuretés de silicium (voir figure 3.6 page suivante). Elles n'ont pas été quantifiées mais leur concentration massique est inférieure à 20 % puisquenon détectées en DRX. L'analyse EDS étant une analyse de surface, cela peut expliquer la proportion importante observée en comparaison avec le titane : le silicium est probablement localisé en majorité à la surface des nanoparticules de TiO_2 rut-NP sous forme de SiO_2 . Quelques traces de silicium ont aussi été détectées sur les nanoparticules Al_2O_3 , TiO_2 CEA et TiO_2 ana-NP.

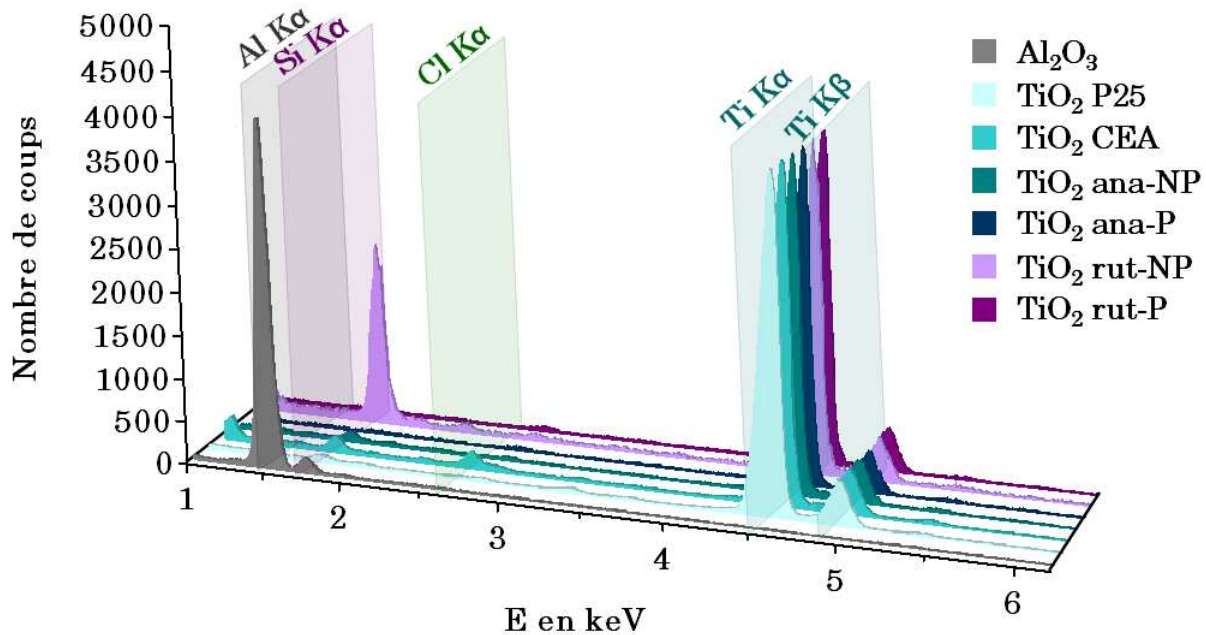


FIGURE 3.6 – Analyse chimique de la surface des nanoparticules par EDS.

3.2 Préparation et stabilité des nanoparticules

Dans un premier temps, les nanoparticules ont été préparées à concentration élevée dans l'eau (10 g.L^{-1} pour les nanoparticules d'oxyde métallique et 1 g.L^{-1} pour les NtC). Les suspensions obtenues sont appelées par la suite suspensions mères. Elles ont été diluées, dans un second temps, dans les milieux d'exposition cellulaire qui sont des milieux biologiques, c'est à dire permettant de maintenir en vie les cellules.

3.2.1 La dispersion des nanoparticules par sonication

Pour réaliser des expositions *in vitro*, les nanopoudres doivent être préparées en milieux liquides, milieux dans lesquels elles tendent à s'agglomérer (Buford et al., 2007; Schulze et al., 2008). Cette agglomération dépend entre autre de la chimie de surface des nanoparticules, de leur concentration qui influence directement la probabilité de contact entre particules, ou encore de la composition du milieu. Les forces régissant cette agglomération sont des interactions électriques de faible intensité entre atomes appelées force de van der Waals (Seipenbusch et al., 2007). De plus, il est possible qu'au cours de la synthèse des liaisons fortes se soient créées entre les nanoparticules qui sont alors fusionnées ou agrégées (Oskam, 2006). Ainsi par ordre décroissant de qualité de dispersion, on distingue les particules primaires individualisées, les particules primaires simplement ag-

glomérées (liaisons faibles), les particules agrégées (liaisons fortes) et dans le pire des cas les agrégats agglomérés (voir figure 3.7).

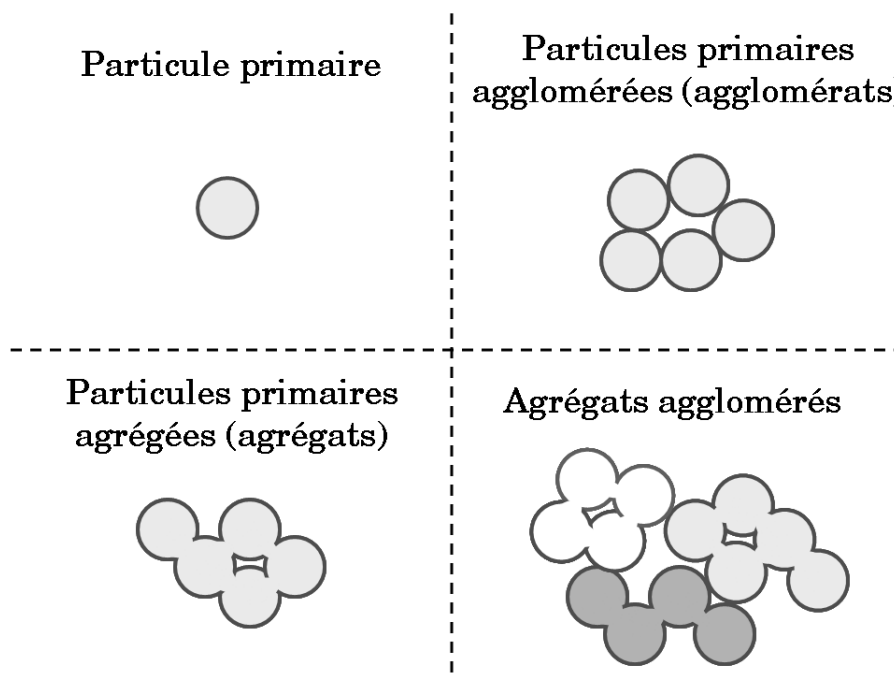


FIGURE 3.7 – Etats de dispersion des particules

Or, il a déjà été démontré que les effets biologiques peuvent être différents selon que les nanoparticules soient parfaitement individualisées ou non (Grassian et al., 2007; Limbach et al., 2005; Lyon et al., 2006; Wick et al., 2007). C'est pourquoi une partie de ce travail a consisté à essayer d'optimiser l'étape d'individualisation des nanoparticules en utilisant la technique de sonication. Cette technique a été appliquée uniquement pour la préparation des suspensions mères, ceci afin de ne pas détériorer les milieux biologiques par la sonication. En effet il a déjà été montré une modification de la qualité du milieu de culture cellulaire en présence de SWCNT, cette modification étant imputée à la présence de NtC puisque le milieu témoin sans NtC traité dans les mêmes conditions n'a pas subi de modifications (Casey et al., 2008). Or ces NtC ont été directement dispersés par sonication dans le milieu, ainsi il est difficile de distinguer la cause des modifications qui pourrait être due aux NtC, par exemple par fixation de différents facteurs du milieu sur les NtC, ou à la sonication en présence de nanotubes.

Des conditions de sonication ont été déterminées afin d'obtenir la meilleure dispersion possible pour les nanoparticules TiO_2 P25 (voir 2.1.2 page 40). Ces conditions ont ensuite été appliquées à toutes les nanoparticules étudiées pour ne pas introduire de facteurs de variation supplémentaires. Ainsi elles ne sont pas forcément optimales pour les autres nanoparticules.

Dans le cas particulier des NtC, l'étape de sonication permet non seulement d'obtenir des NtC non agglomérés mais a aussi pour but de casser les NtC afin d'en obtenir de plus courts (Glory et al., 2007). Cependant, la recherche d'un agent dispersant biocompatible a été nécessaire en raison du caractère hydrophobe des NtC les rendant très peu dispersibles dans l'eau seule. Différents types de molécules ont été testés : les meilleures dispersions ont été obtenues en présence de serum, d'albumine (principal constituant du sérum) ou de gomme arabique (voir figure 3.8). Des résultats similaires ont été observés avec des NtC (Elgrabli et al., 2007) et des nanoparticules de carbone (Buford et al., 2007) se dispersant très bien dans des milieux liquides contenant de l'albumine ou du serum contrairement aux milieux salins ou en présence de DMSO ou Tween 80.

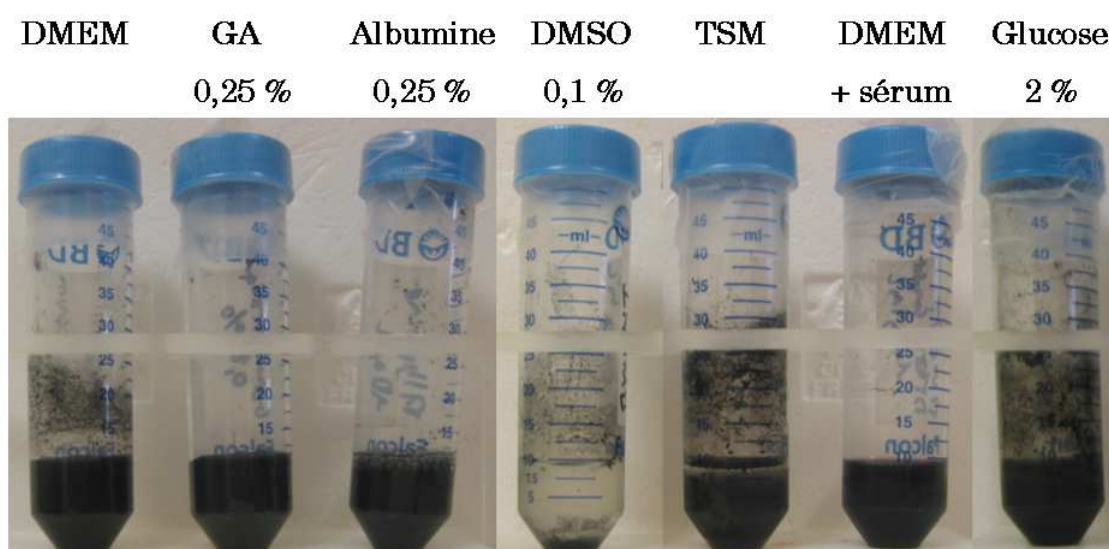


FIGURE 3.8 – Etats de dispersion des NtC suite à une sonication dans différentes solutions. DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GA : Gomme Arabique, DMSO : DiMethyl SulfOxide, TSM : Tris Salt Medium.

La gomme arabique a été choisie en raison de la dispersion homogène obtenue, contrairement au serum et à l'albumine dans lesquels quelques petits agglomérats de NtC mais dispersés ont été observés dans la mousse formée. Il s'agit d'un polymère anionique complexe formé de polysaccharides ramifiés et de protéines dont les trois espèces majoritaires sont l'arabinogalactane (88,4 %), l'arabinogalactane-protéine (10,4 %) et des glycoprotéines (1,2 %) (Verbeken et al., 2003). La gomme arabique étant une macromolécule amphiphile, elle agit comme un surfactant en formant un film autour des NtC les stabilisant dans l'eau (voir figure 3.9 page suivante).



FIGURE 3.9 – Stabilisation des NtC dans l'eau par la gomme arabique

3.2.2 État de dispersion des nanoparticules

Cet état a été déterminé par Spectroscopie à Corrélation de Photons (SCP) qui est une technique permettant de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules. Ainsi un agglomérat/agrégat de nanoparticules apparaîtra comme une grosse particule.

3.2.2.1 Dans les suspensions mères aqueuses

En comparant les résultats d'analyse par SCP (voir figure 3.10) avec les tailles primaires déterminées au MET (voir figure 3.5 page 90), on remarque que les répartitions de taille sont équivalentes pour les nanoparticules TiO_2 P25, TiO_2 rut-NP et Al_2O_3 , elles sont donc très bien dispersées dans l'eau.

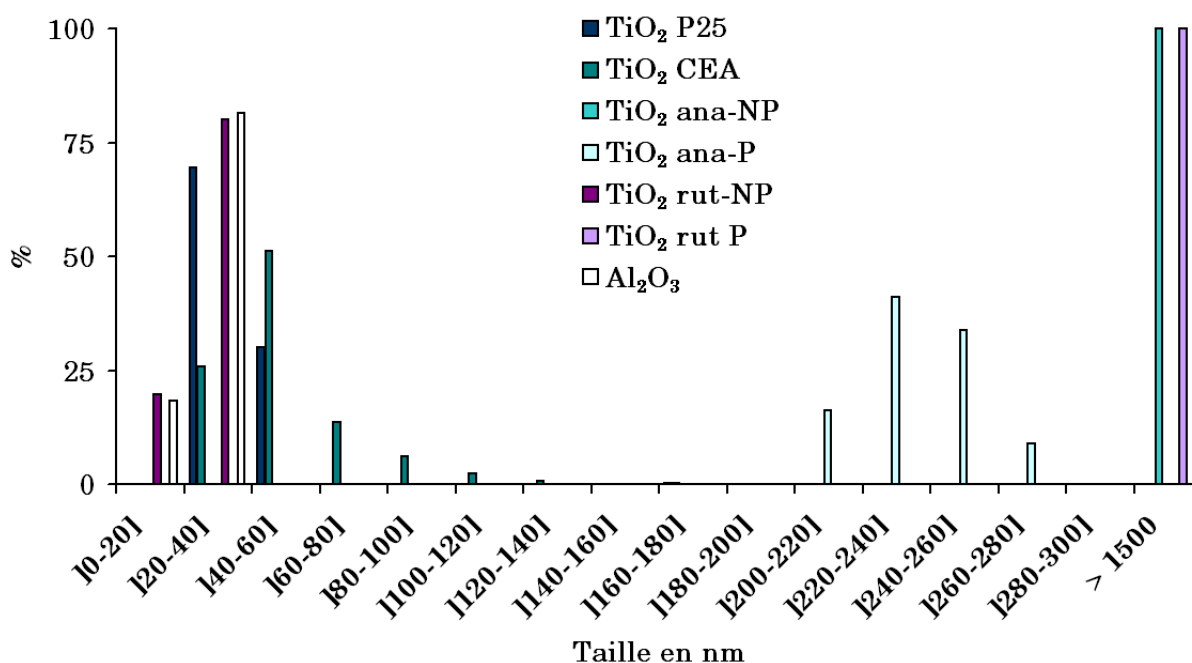


FIGURE 3.10 – Etat de dispersion des nanoparticules dans l'eau. Diamètre hydrodynamique mesuré par SCP.

A l'inverse, le diamètre hydrodynamique des autres nanoparticules est supérieur aux mesures de taille primaire. Cela montre qu'elles sont agglomérées mais plus

probablement qu'elles forment des agrégats puisque la mesure a été réalisée juste après 30 min de sonication qui devrait être suffisante pour disperser tous les agglomérats. Il n'est pas non plus exclu pour TiO_2 ana-NP, que ce soit le pH de la suspension proche de son pI qui soit à l'origine d'une forte agglomération. Pour TiO_2 CEA et TiO_2 ana-P des agglomérats sont formés de seulement quelques particules puisque l'on passe de 5 à 25 nm de diamètre primaire à de 20 à 120 nm de diamètre hydrodynamique pour TiO_2 CEA, et de 48 à 274 nm à 200 à 280 nm pour TiO_2 ana-P.

La stabilité de l'état de dispersion des suspensions de TiO_2 P25 a été suivie au cours du temps (voir figure 3.11). Les nanoparticules restent non agglomérées jusqu'à 46 jours. Ainsi les suspensions mères ont été renouvelées tous les 45 jours.

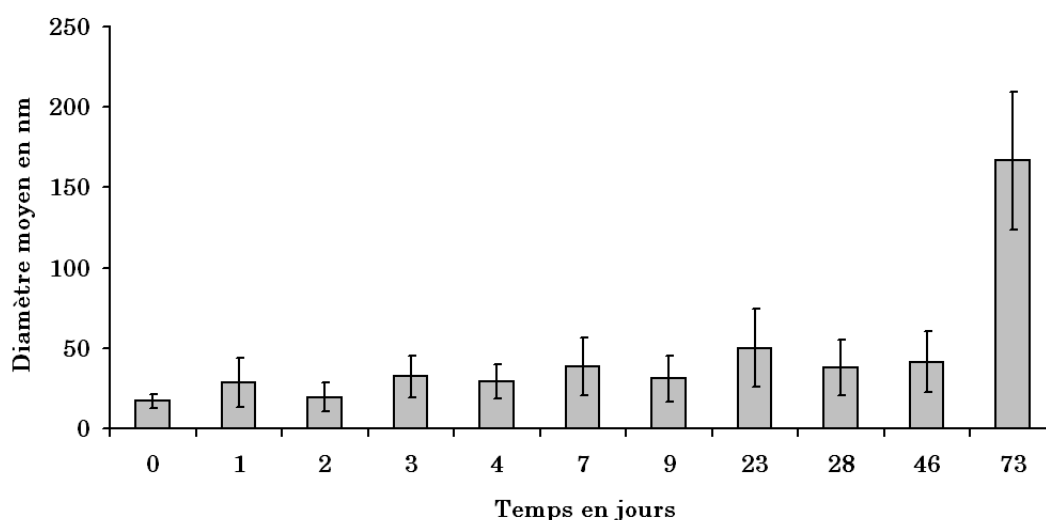


FIGURE 3.11 – Evolution au cours du temps du diamètre hydrodynamique des nanoparticules de TiO_2 P25 dispersées pendant 30 min dans l'eau. Le diamètre moyen représenté correspond au diamètre de plus de 99 % en nombre de nanoparticules. Les barres d'erreur sont les écarts type à la moyenne du diamètre mesuré par SCP.

3.2.2.2 Évolution de l'état de dispersion dans les milieux biologiques

Comme nous pouvions nous y attendre d'après certaines études (Buford et al., 2007; Long et al., 2006; Murdock et al., 2008; Schulze et al., 2008; Williams et al., 2006) et les pI déterminés (voir chapitre 3.1.3 page 92), une forte agglomération des nanoparticules est constatée, une fois diluées dans les deux milieux d'exposition cellulaire (voir tableau 3.6). Cette agglomération est probablement provoquée par la force ionique élevée des milieux de culture cellulaires ainsi que par leur pH neutre, proche des points isoélectriques des nanoparticules. Ainsi

l'utilisation de stabilisants se révèle souvent nécessaire pour avoir une bonne dispersion à long terme dans les milieux biologiques (Mandzy et al., 2005; Simakov and Tsur, 2007; Studart et al., 2007). Il a donc été recherché un stabilisant, biologiquement compatible, permettant de maintenir non agglomérées les nanoparticules dans les milieux de culture (voir tableau 3.6). Seuls le polyol à 10 %, le SDS à 0,1 % et le citrate à 0,2 % permettent d'obtenir un état de dispersion comparable à l'eau après dispersion. Mais tout comme l'eau seule, ils ne permettent pas de maintenir ce bon état de dispersion dans les milieux de culture.

	Après dispersion dans l'eau	Après dilution dans les milieux biologiques	
		DMEM	TSM
Eau	22	944	2833
Polyol 10%	23	2246	2032
GA 0.5%	204	2125	1658
SDS 0.1%	27	3375	813
Triton 0.1%	88	2206	1236
DMSO 10%	772	6816	1289
PBS 1X	712	1960	1369
Dextrose 0.2%	609	5071	2001
Albumine 0.1%	249	1619	986
Citrate 0.2%	29	2340	1963
HEPES	143	2003	1569

TABLEAU 3.6 – Diamètres moyens en nm des nanoparticules TiO₂ P25 après dispersion dans différentes solutions et après dilution des suspensions obtenues dans les milieux d'exposition bactérien (TSM) et cellulaire (DMEM) pendant 24 h.

Ainsi il a été décidé que les expositions seraient effectuées dans l'eau pour les bactéries. Ce type de protocole n'étant pas applicable pour les cellules eucaryotes, les expositions seront effectuées dans le milieu biologique en prenant soin de préciser l'état d'agglomération des nanoparticules (voir figure 3.12 page suivante). Ainsi dans le milieu DMEM, les nanoparticules forment des agglomérats compris entre 150 et 400 nm de diamètre. Cependant il n'est pas exclu que cet état de dispersion soit différent au contact des cellules.

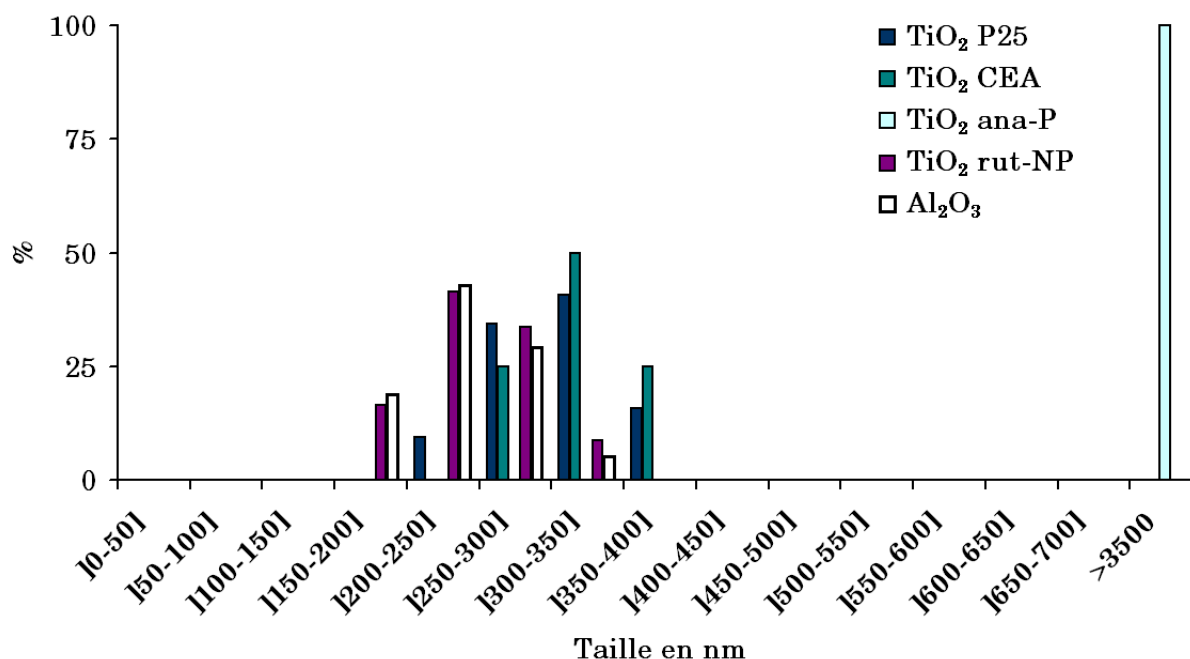


FIGURE 3.12 – Etat de dispersion des nanoparticules dans le milieu DMEM. Diamètre hydrodynamique mesuré par SCP.

3.2.3 Dissolution en suspension aqueuse

La stabilité chimique des suspensions de nanoparticules a été vérifiée par dosage des éléments solubilisés. Les concentrations obtenues sont très faibles et ne semblent pas être le signe d'une dissolution des nanoparticules dans l'eau (voir tableau 3.7), avec peut-être une exception pour Al₂O₃ mais cela ne représente que 0,3 % de l'aluminium total. De plus cette analyse nous a permis de vérifier que la sonde à ultrason en titane n'émet pas de titane soluble dans les suspensions.

	C en $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
	²⁸ Al	⁵⁷ Fe	⁴⁸ Ti
NtC Fe-long (6 j)		0,3	3,1
NtC Fe-court (6 j)		1,0	5,4
Al ₂ O ₃ (9 m)	14,2		3,9
TiO ₂ P25 (9 m)			4,1
TiO ₂ rut-NP (9 m)			2,1
TiO ₂ CEA (9 m)			2,6

TABLEAU 3.7 – Analyse par ICP-MS des éléments solubilisés dans les surnageants des suspensions de nanoparticules. Entre parenthèses sont indiqués les âges des suspensions en jours (j) ou en mois (m).

3.3 Interférences des nanoparticules avec les mesures optiques

3.3.1 L'absorbance des nanoparticules

Les suspensions de nanoparticules étant opaques, ceux-ci peuvent interférer avec les mesures spectrophotométriques d'absorbance. C'est pourquoi, par exemple, l'absorbance à la longueur d'onde de mesure de DO bactérienne a été vérifiée (voir figure 3.13). Une absorbance dépendante de la concentration en nanoparticules a été constatée. Elle est très importante pour les NtC dès $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et plus faible pour les nanoparticules. De plus des différences sont observées en fonction des nanoparticules, ainsi l'absorbance peut être classée de la façon suivante $\text{TiO}_2 \text{ ana-P} \simeq \text{TiO}_2 \text{ ana-NP} > \text{TiO}_2 \text{ P25} \simeq \text{TiO}_2 \text{ CEA} > \text{TiO}_2 \text{ rut-P} \simeq \text{TiO}_2 \text{ rut-NP} > \text{Al}_2\text{O}_3$. Cette absorbance n'est pas forcément corrélée à l'opacimétrie des suspensions puisque $\text{TiO}_2 \text{ rut-P}$ est très opaque, mais cela peut s'expliquer par une différence d'état d'agglomération. En effet les particules $\text{TiO}_2 \text{ rut-P}$ forment des agglomérats visibles à l'oeil nu, qui laissent place entre agglomérats à du milieu très peu opaque.

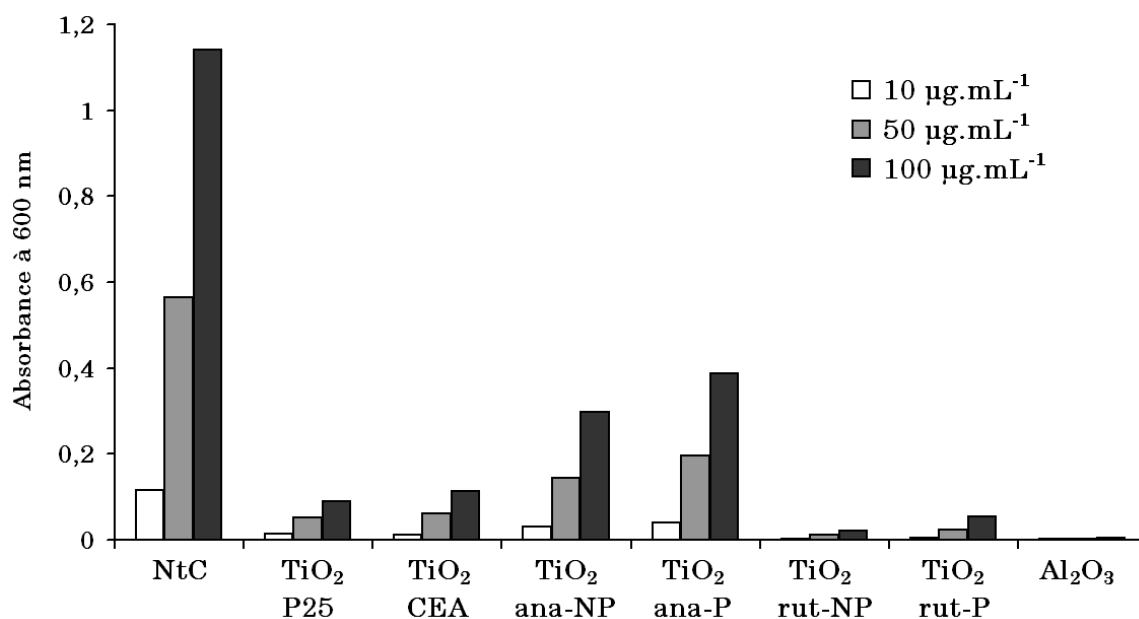


FIGURE 3.13 – Absorbance des nanoparticules à 600 nm.

3.3.2 Interférences avec les signaux de fluorescence

Des lectures fluorométriques étant utilisées pour certains tests, l'absence de fluorescence des nanoparticules étudiées a été vérifiée dans les conditions d'excitation et d'émission de ces tests. Aucune fluorescence n'a été constatée (voir figure

4.2). Cependant, dans le cas de l'utilisation de plaques multipuits blanches, une forte diminution de l'intensité de fluorescence a été constatée. Cette intensité étant due à la réflexion des photons d'excitation sur les fonds des puits blancs, il s'agit probablement d'une diminution de cette réflexion due à l'opacimétrie des nanoparticules.

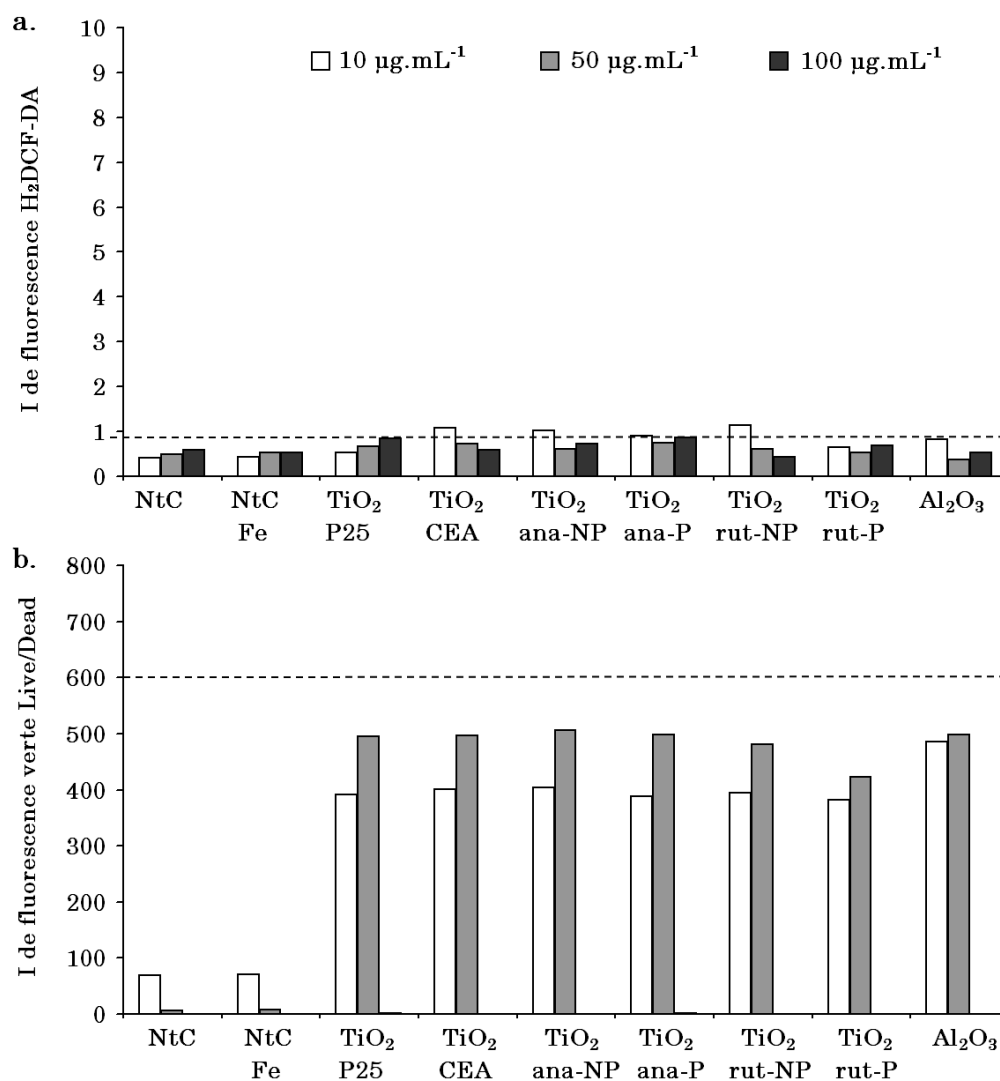


FIGURE 3.14 – Vérification de l'absence de fluorescence des nanoparticules dans les conditions : a. du test H₂DCF-DA (excitation 480 nm et émission 530 nm en plaque opaque noire) et a. du test Live/Dead® BacLightTM (excitation 485 nm et émission 530 nm en plaque opaque blanche, résultats similaires avec l'excitation à 485 nm et l'émission à 630 nm). La ligne en pointillés correspond au niveau basal dans l'eau seule.

En ce qui concerne les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission utilisées en microscopie à épifluorescence, seule l'utilisation du FITC (excitation à 490 nm et émission à partir de 500 nm) posent problème. En effet, une émission de fluorescence des nanoparticules semble être constatée (voir figure 3.15 a.), mais lorsque

l'on regarde le spectre d'émission des nanoparticules après excitation à 490 nm, on se rend compte qu'il ne s'agit pas d'un pic d'émission de fluorescence à proprement parler mais d'un élargissement du pic correspondant à la réflexion du signal d'excitation (voir figure 3.15 b.). Cela a aussi été constaté pour les longueurs d'ondes d'excitation dans le cas de l'utilisation des filtres DAPI (excitation à 380 nm et émission à partir de 400 nm) et TRITC (excitation à 540 nm et émission à partir de 580 nm) mais les longueurs d'ondes d'émissions étant plus éloignées des longueurs d'ondes d'excitation, cela ne donne pas d'impression d'émission de fluorescence.

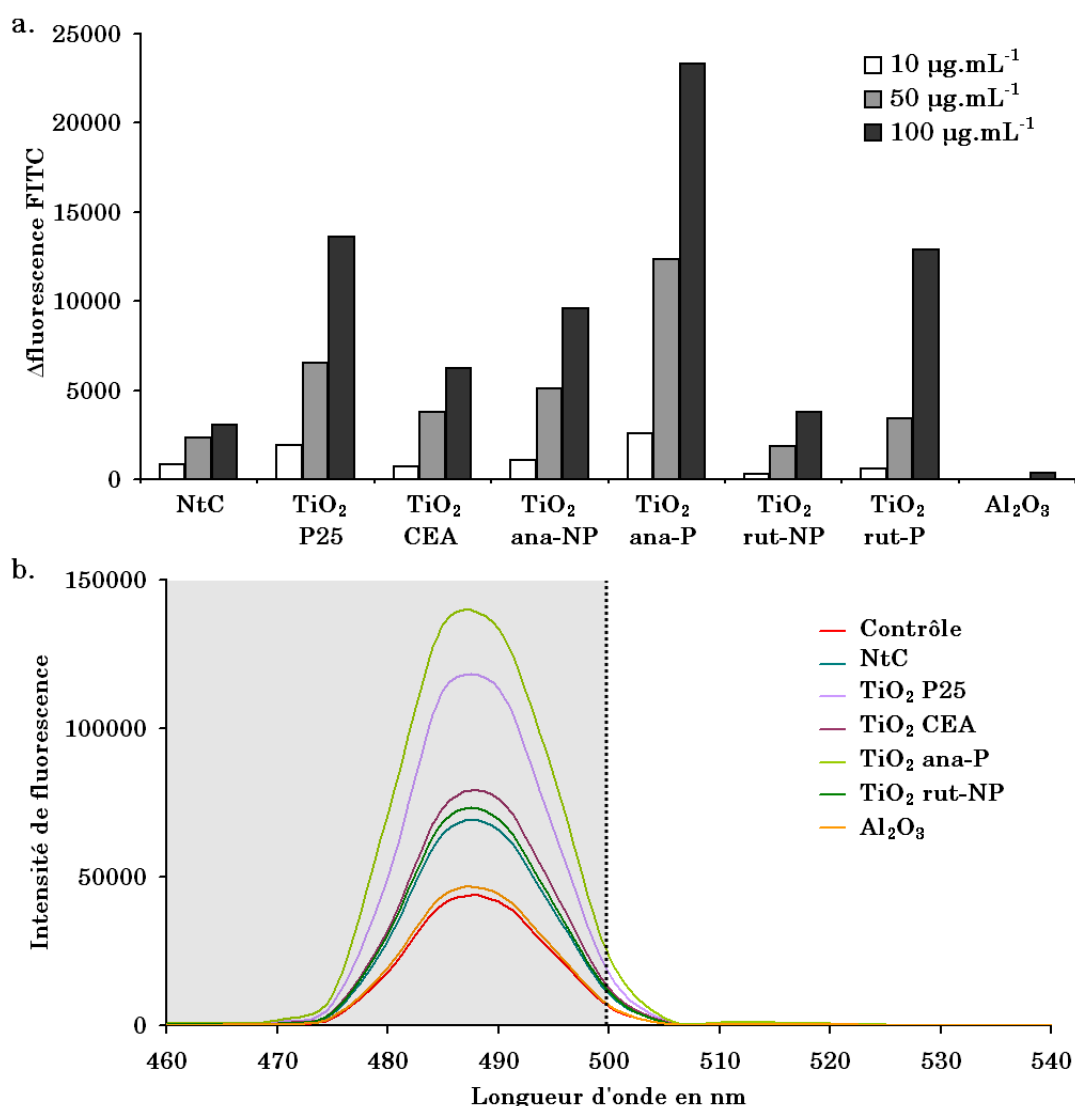


FIGURE 3.15 – Interférences des nanoparticules dans les conditions d'excitation et d'émission du filtre FITC utilisé en microscopie à épifluorescence : a. Différence d'intensité d'émission de fluorescence à 500 nm des nanoparticules excitées à 490 nm en comparaison avec le contrôle sans nanoparticules, b. Spectre d'émission des nanoparticules suite à une excitation à 490 nm.

3.4 Synthèse du chapitre

Chapitre 3

Caractérisation des nanoparticules

- Les principales caractéristiques des nanoparticules étudiées sont résumées dans le tableau suivant :

	Forme	Cristal -linité	Dimensions primaires	Charge		Impuretés
				Eau	DMEM	
NtC long	fibres	-	l. $1,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$	-	-	0,08 % Fe
NtC long Fe	fibres	-	$\varnothing 44 \pm 22 \text{ nm}$	-	-	4,8 % Fe
NtC court Fe	fibres	-	l. $1,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$ $\varnothing 54 \pm 25 \text{ nm}$	-	-	4,8 % Fe
TiO ₂ P25	sphér.	86 % ana	$24 \pm 7 \text{ nm}$	44	1	-
TiO ₂ CEA	sphér.	94 % ana	$12 \pm 3 \text{ nm}$	20	0	-
TiO ₂ ana-NP	sphér.	100 % ana	$18 \pm 6 \text{ nm}$	12	nd	-
TiO ₂ ana-P	sphér.	100 % ana	$142 \pm 36 \text{ nm}$	-33	0	-
TiO ₂ rut-NP	épingles	100 % rut	l. $68 \pm 18 \text{ nm}$ $\varnothing 11 \pm 3 \text{ nm}$	-50	-1	Si
TiO ₂ rut-P	sphér.	97 % rut	$707 \pm 336 \text{ nm}$	1	nd	-
Al ₂ O ₃	sphér.	-	$11 \pm 3 \text{ nm}$	120	-2	-

Les abréviations ont les significations suivantes : ana : anatase, l. : longueur, rut : rutile, sphér. : sphérique.

- Les états d'agglomération dans les milieux d'exposition sont les suivants :

	Taille agglomérats	
	Eau	DMEM
TiO ₂ P25	-	150-400 nm
TiO ₂ CEA	quelques particules	150-400 nm
TiO ₂ ana-NP	> 1,5 μm	> 1,5 μm
TiO ₂ ana-P	quelques particules	> 1,5 μm
TiO ₂ rut-NP	-	150-400 nm
TiO ₂ rut-P	> 1,5 μm	> 1,5 μm
Al ₂ O ₃	-	150-400 nm

- Aucune dissolution dans l'eau n'a été constatée.
- Les nanoparticules interfèrent avec les mesures d'absorbance en raison de leur opacimétrie et avec les mesures de fluorescence par modification de la réflexion du signal d'excitation.

CHAPITRE 4

Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire

4.1 Effet cytotoxique des nanoparticules pour les bactéries .	109
4.2 Effet cytotoxique des nanoparticules pour les pneumocytes	
A549	118
4.3 Discussion	126
4.4 Synthèse du chapitre	133

La première question que l'on se pose quand on veut étudier les effets biologiques d'une substance, est de savoir quels sont ses effets cytoxiques, c'est à dire, entre autres, ses effets sur la viabilité cellulaire. On entend par viabilité cellulaire la capacité d'une cellule à vivre *i.e* la capacité à se reproduire. Ainsi dans un premier temps, les effets cytotoxiques des nanotubes de carbone et des nanoparticules d'oxyde métallique ont été évalués au moyen de tests biologiques évaluant la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus sont présentés puis discutés dans ce chapitre.

4.1 Effet cytotoxique des nanoparticules pour les bactéries

4.1.1 Effets sur la croissance bactérienne

Les bactéries ont tout d'abord été cultivées dans leurs milieux respectifs en présence de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules. Un témoin sans nanoparticules a été réalisé dans les mêmes conditions. En raison de l'opacimétrie des nanoparticules interférant avec la mesure de la densité optique bactérienne (voir chapitre 3.3 page 101), la croissance bactérienne a été suivie au cours du temps par dosage des protéines totales, la concentration en protéines étant directement corrélée à la quantité de bactéries.

Comme le reflète la figure 4.1 montrant la croissance d'*E. coli* MG1655 en présence de certaines nanoparticules du panel étudié, les courbes de croissance obtenues en présence de nanoparticules sont parfaitement superposables à la courbe témoin. Aucun retard ou aucune inhibition de croissance n'ont été observés pour les deux modèles bactériens. Le même type de courbe a été obtenu avec *C. metallidurans* CH34.

Le temps de génération G , qui correspond au temps de doublement de la population bactérienne lors de la phase exponentielle de croissance, a été déterminé pour les deux souches bactériennes (voir tableau 4.1). Aucune variation significative du temps G n'a été observée.

Des effets bactéricides de la photoactivation par les UV des nanoparticules de TiO_2 ayant déjà été décrit (Ireland et al., 1993; Benabbou et al., 2007) l'influence de la présence de lumière visible a été vérifiée : aucune variation de croissance n'a été observée. Il est possible de conclure que la lumière utilisée n'est pas assez puissante et/ou n'émette pas dans les bonnes longueurs d'onde pour avoir un effet bactéricide (Chen and Mao, 2007). Ainsi la lumière visible artificielle n'active pas les nanoparticules de TiO_2 , travailler dans l'obscurité absolue n'est donc pas indispensable pour se protéger de la photoactivation.

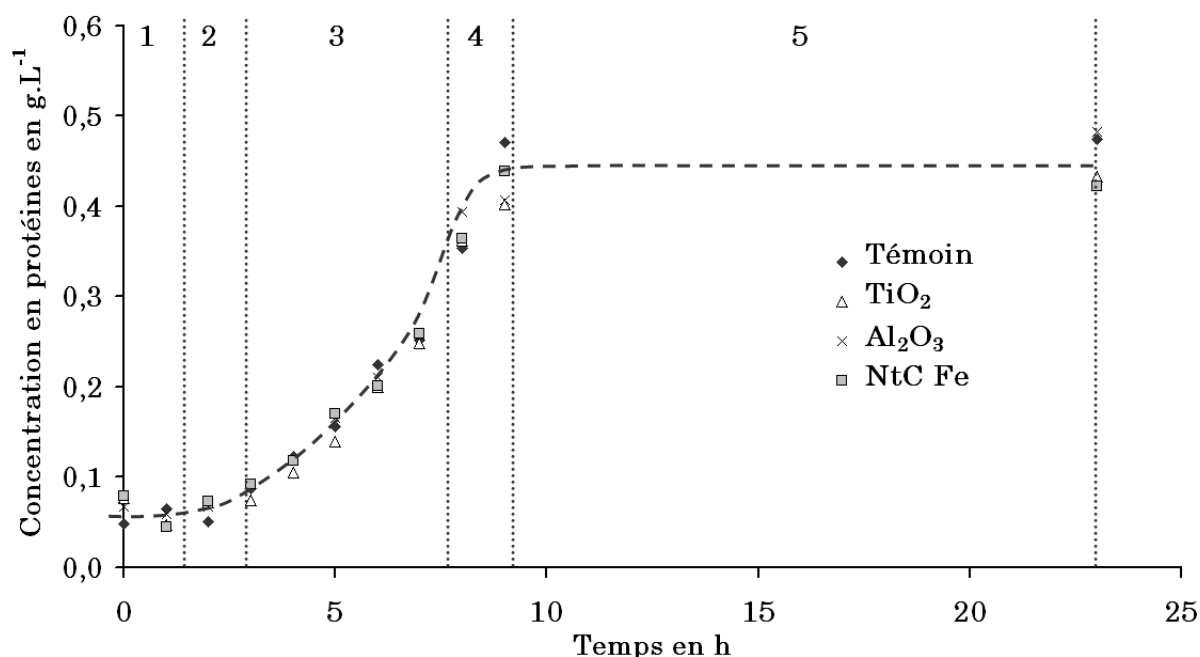


FIGURE 4.1 – Courbe de croissance d'*E. coli* MG1655 cultivée en présence de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules. Exemple des nanoparticules de TiO_2 P25, d' Al_2O_3 et des NtC Fe. La courbe témoin correspond à des bactéries non exposées. Les phases de croissance bactérienne ont été délimitées : 1 phase de latence, 2 phase d'accélération, 3 phase exponentielle, 4 phase de décélération et 5 phase stationnaire.

Les nanoparticules ne semblent donc pas avoir un effet cytotoxique pour les deux modèles bactériens. Cependant une forte agglomération des nanoparticules dans les milieux de culture a été observée et quantifiée (voir chapitre 3.2.2.2 page 98). Il se pourrait donc, comme le montre l'étude de Lyon et al. (2006) que la cytotoxicité des nanoparticules soit en réalité masquée par cette agglomération ne rendant plus disponibles les nanoparticules sous leur forme "nano" mais sous une forme équivalente à des particules de grande taille. C'est pourquoi dans un second temps, les bactéries ont été exposées aux nanoparticules dans l'eau, milieu dans lequel ces dernières sont bien dispersées (voir chapitre 3.2.2.1 page 97).

	<i>C. metallidurans</i> CH34		<i>E. coli</i> MG1655	
	G	±	G	±
Témoin négatif	3,0	0,1	2,5	0,2
NtC long	3,1	0,4	2,5	0,1
NtC long Fe	3,1	0,1	2,7	0,1
NtC court Fe	3,1	0,5	2,6	0,1
Al ₂ O ₃	2,9	0,3	2,6	0,1
TiO ₂ P25	3,1	0,3	2,4	0,2
TiO ₂ CEA	2,8	0,4	2,6	0,3
TiO ₂ ana-NP	3,0	0,1	2,5	0,6
TiO ₂ ana-P	3,2	0,4	2,4	0,3
TiO ₂ rut-NP	2,8	0,2	2,6	0,4
TiO ₂ rut-P	2,8	0,1	2,5	0,4

TABLEAU 4.1 – Temps de génération en h des bactéries *C. metallidurans* CH34 et *E. coli* MG1655 cultivées en présence de 100 µg.mL⁻¹ de nanoparticules.

4.1.2 Effets sur la viabilité bactérienne suite à une exposition aux nanoparticules dans l'eau

4.1.2.1 Les dénombrements sur boîte : une technique inadaptée à nos conditions

Dans un premier temps la technique de dénombrement des bactéries sur boîte de petri a été utilisée. Cette technique est basée sur la capacité d'une bactérie isolée à se développer sur milieu gélosé et à former une colonie ou UFC (Unité Formant Colonie). Ainsi après étalement d'une suspension bactérienne sur gélose et incubation, le nombre de colonies comptées correspond au nombre de bactéries initialement présentes dans le volume étalé. Le pourcentage de viabilité est calculé par rapport au nombre de bactéries dans le témoin.

Les deux souches bactériennes ont été exposées pendant 24 h aux nanoparticules dans l'eau. La figure 4.2 page suivante montre que le pourcentage de bactéries *C. metallidurans* CH34 viables par rapport au témoin non exposé diminue indépendamment de la dose. Quant aux NtC, ils semblent favoriser la croissance bactérienne dans l'eau. Cependant il est à noter que les écarts types sont très élevés. Ces écarts types reflètent la variabilité des résultats obtenus d'une expérience à une autre. Pour expliquer cette variabilité excessive, des observations directes après exposition ont été réalisées au MET. Les photographies montrent une forte agglomération entre *C. metallidurans* CH34 et les nanoparticules, et ceci quelles que soient les nanoparticules (voir figure 4.3 page suivante). Cette

agglomération peut être due à la formation de biofilms par la bactérie et/ou à une forte affinité entre bactéries et nanoparticules.

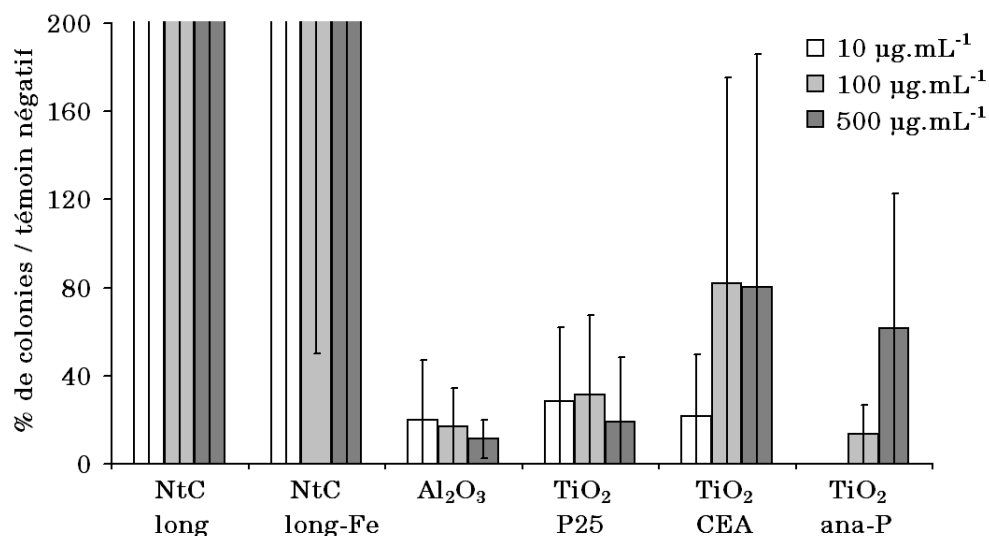


FIGURE 4.2 – Effets des nanoparticules sur la viabilité de *C. metallidurans* CH34 suite à une exposition de 24 h dans l'eau. Evaluation par la technique des dénombrements sur boîte.

Les bactéries étant agglomérées, une colonie dénombrée ne correspond donc plus forcément à une bactérie isolée mais plutôt à une ensemble de bactéries. Les dénombrements sur boîtes sont donc inappropriés pour déterminer la viabilité bactérienne suite à une exposition à des nanoparticules dans l'eau. Cette constatation implique d'avoir un regard nouveau sur les publications utilisant cette technique. Par la suite, une autre technique a donc été utilisée : la technique du Live/Dead® BacLightTM.

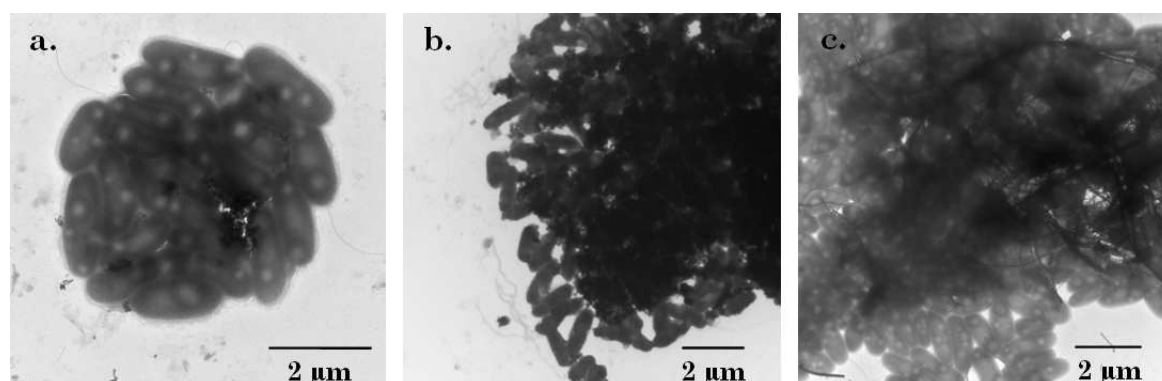


FIGURE 4.3 – Observations directes de *C. metallidurans* CH34 suite à une exposition de 24 h dans l'eau aux nanoparticules : a. TiO₂ CEA, b. TiO₂ P25, c. NtC Fe.

4.1.2.2 La technique du Live/Dead® Baclight™

Le pourcentage de viabilité suite à une exposition de 24 h aux nanoparticules a été déterminé par la technique du Live/Dead® Baclight™.

Vérification des interférences avec le test Live/Dead® Baclight™

Ce dosage est basé sur la différence de pénétration de deux fluorochromes se fixant sur l'ADN : le SYTO® 9 émettant dans le vert et le iodure de propidium émettant dans le rouge. Le rapport des intensités de fluorescence verte sur rouge (IV/IR) est directement proportionnel au pourcentage de viabilité bactérienne. Le pourcentage de viabilité relatif a été déterminé par rapport au témoin non exposé.

Les interférences des nanoparticules avec le test ont été vérifiées (voir figure 4.4). Quel que soit le pourcentage de viabilité bactérienne les nanoparticules à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ n'interfèrent pas avec le signal de mesure (voir figure 4.4 a.). Cependant, ce n'est plus le cas pour une concentration de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en NtC qui diminue fortement le rapport IV/IR, probablement en raison de la forte opacimétrie de ceux-ci (voir chapitre 3.3 page 101). Nous notons que malgré l'absorbance des nanoparticules, cela n'influence le rapport des deux fluorescences (voir figure 4.4 b.). Cette technique est donc appropriée pour des concentrations allant jusqu'à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les nanoparticules et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les NtC.

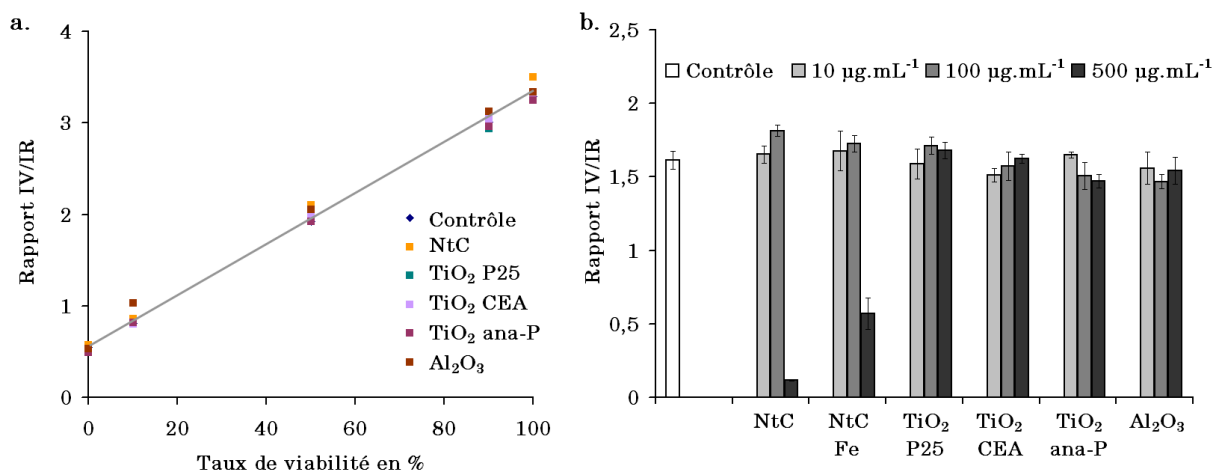


FIGURE 4.4 – Interférences des nanoparticules avec le test Live/Dead® Baclight™. Les nanoparticules ont été ajoutées au moment de la lecture fluorophotométrique : a. Relation entre le rapport IV/IR et le pourcentage de mortalité bactérienne de *C. metallidurans* CH34 en présence de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules, les différents % de viabilité ont été obtenus par mélange en différentes proportions de bactéries viables et de bactéries tuées à l'isopropanol, b. Variation du rapport IV/IR de *C. metallidurans* CH34 dans l'eau en présence de nanoparticules.

Effets des nanotubes de carbone

Les concentrations 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en NtC long, NtC Fe-long et NtC Fe-court ont été testées. La cytotoxicité du stabilisant utilisé pour disperser les NtC a été vérifiée pour les concentrations en gomme arabique équivalentes à celles correspondantes à 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en NtC long, soit 2,5 et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en gomme arabique. Cette gomme arabique a été soniquée dans les mêmes conditions que les NtC.

Quel que soit le type de NtC, aucun effet cytotoxique n'a été observé sur *C. metallidurans* CH34 (voir figure 4.5). La présence de NtC, en particulier des NtC Fe-court, à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ semble même favoriser une prolifération cellulaire dans l'eau en comparaison avec le témoin. Cet effet positif pourrait être dû à la présence de la gomme arabique qui est plus hydrolysée dans les NtC court en raison de la sonication plus longue (8 h au lieu de 30 min) et qui donc, sous forme très fortement hydrolysée, pourrait être une source de carbone pour la bactérie.

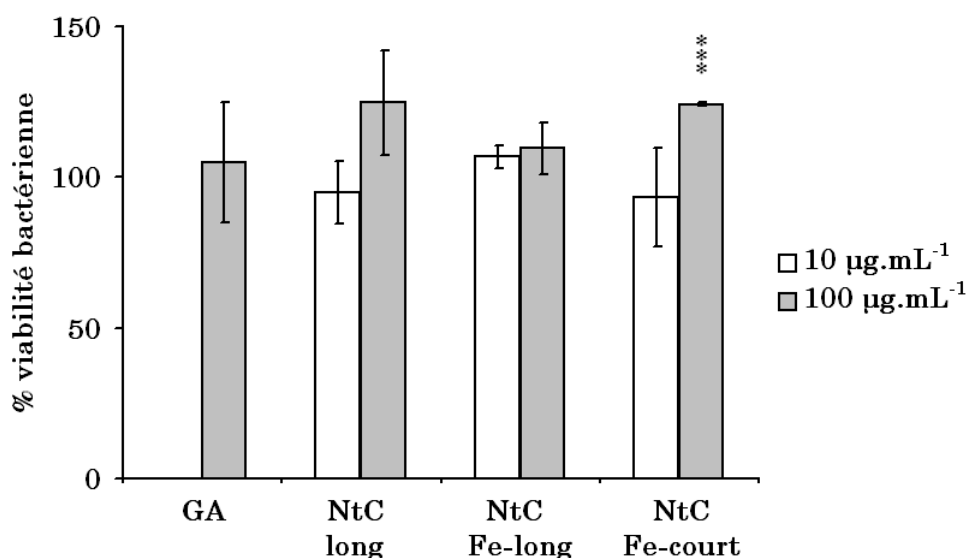


FIGURE 4.5 – Viabilité à 24 h d'exposition de *C. metallidurans* CH34 en présence de nanotubes de carbone. Le contrôle négatif GA a été soniqué dans les mêmes conditions que les NtC. Les concentrations en gomme arabique sont équivalentes à celles correspondantes à 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en NtC long, soit 2,5 et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en gomme arabique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé.

Les conséquences sur la viabilité cellulaire de *E. coli* MG1655 sont différentes. Un effet cytotoxique apparaît à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour tous les types de NtC (voir figure 4.6). Cependant il en va de même pour la gomme arabique seule qui a un effet toxique à forte concentration avec seulement 37 ± 10 % de viabilité cellulaire à 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ correspondant à une concentration en NtC de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

(résultats non montrés). La gomme arabique étant un polyside, il est difficile d'expliquer cette cytotoxicité d'autant plus qu'elle est présente en faible concentration. Il ne s'agit pas non plus d'un effet des déchets de la sonde puisque des conditions non toxiques ont été observées (voir figure 4.8 page 117). Il se pourrait donc que ce soit la sonication qui rende toxique la gomme arabique, quelques études montrent cependant que la sonication ne modifie que très peu la structure de polymère d'oses (Drimalova et al., 2005; Vodenicarova et al., 2006). L'effet cytotoxique de la gomme arabique seule étant plus faible que celle des NtC dispersés dans la gomme arabique, il est probable que les NtC aient eux-mêmes un effet cytotoxique.

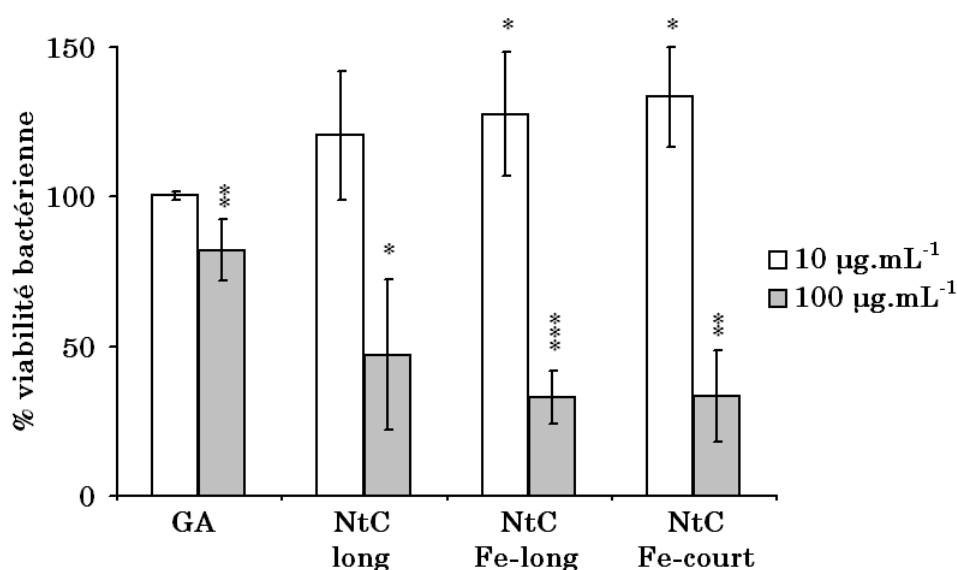


FIGURE 4.6 – Viabilité à 24 h d'exposition de *E. coli* MG1655 en présence de nanotubes de carbone. Le contrôle négatif GA a été soniqué dans les mêmes conditions que les NtC. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé. Les concentrations en gomme arabique sont équivalentes à celles correspondantes à 10 et 100 µg.mL⁻¹ en NtC long, soit 2,5 et 25 µg.mL⁻¹ en gomme arabique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé.

Effets des nanoparticules d'oxyde métallique

Les concentrations 10, 100 et 500 µg.mL⁻¹ ont été testées. Aucun effet cytotoxique significatif n'a été observé chez *C. metallidurans* CH34 (voir figure 4.7 page suivante). Un effet légèrement bénéfique a même été constaté pour les nanoparticules de TiO₂ rutile.

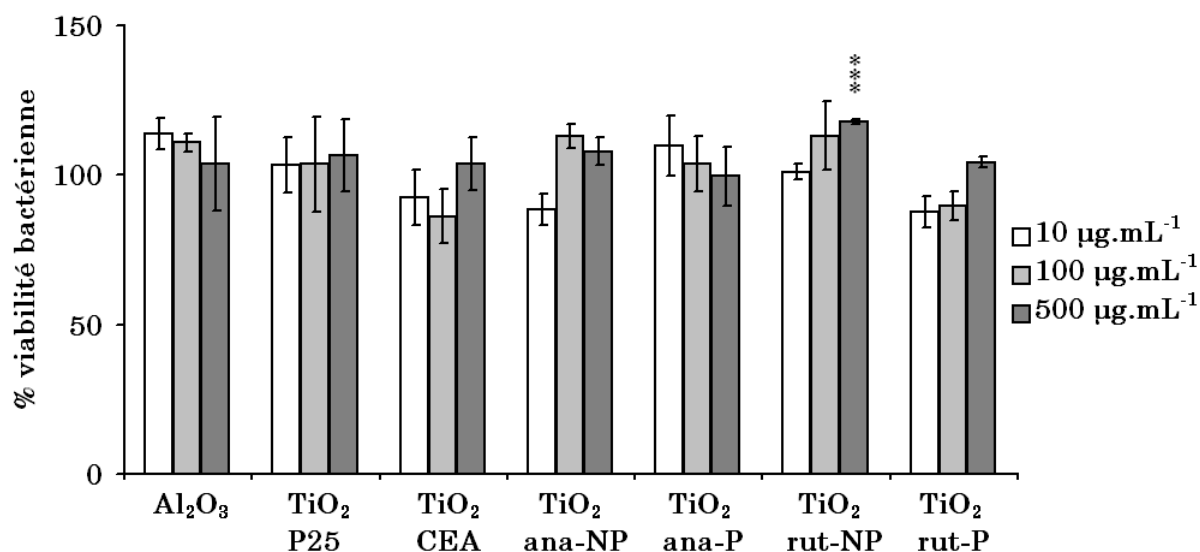


FIGURE 4.7 – Viabilité à 24 h de *C. metallidurans* CH34 en présence de nanoparticules d'oxyde métallique.

Comme pour les NtC les effets sont très différents pour *E. coli* MG1655 (voir figure 4.8). Les nanoparticules TiO₂ P25, ana-NP et CEA sont très cytotoxiques à partir de 100 µg.mL⁻¹ avec respectivement 64 ± 9 , 65 ± 10 et 21 ± 5 % de viabilité cellulaire. Ainsi les nanoparticules TiO₂ CEA apparaissent plus cytotoxiques que les autres nanoparticules de TiO₂. Les nanoparticules Al₂O₃ sont elles-aussi plus cytotoxiques avec une chute de la viabilité bactérienne à 66 ± 2 % dès 10 µg.mL⁻¹. Une influence de la taille est clairement observée puisque toutes les particules non nanoparticulaires (TiO₂ ana-P et rut-P) ne sont pas cytotoxiques. Les TiO₂ rut-NP ne sont pas non plus cytotoxiques, il semble donc y avoir aussi une influence de la cristallinité. Cependant ces nanoparticules n'étant pas sphériques et chargées négativement (contrairement aux nanoparticules anatases chargées positivement), il pourrait tout aussi bien s'agir d'un effet de la forme ou de la charge surfacique.

Lorsque la concentration en nanoparticules est ramenée en quantité de surface de nanoparticules par quantité de milieu de contact, l'influence de la taille est bien confirmée (voir figure 4.12) avec une droite regroupant les points de conditions non toxiques correspondant à TiO₂ ana-P et rut-P mais aussi rut-NP. Pour les conditions toxiques les points suivent deux tendances, une regroupant les points TiO₂ P25 et CEA ayant un effet cytotoxique et l'autre constituée des points TiO₂ ana-NP. Les nanoparticules de TiO₂ ana-NP étant plus petites, ces tendances vont à l'encontre d'un effet purement de taille.

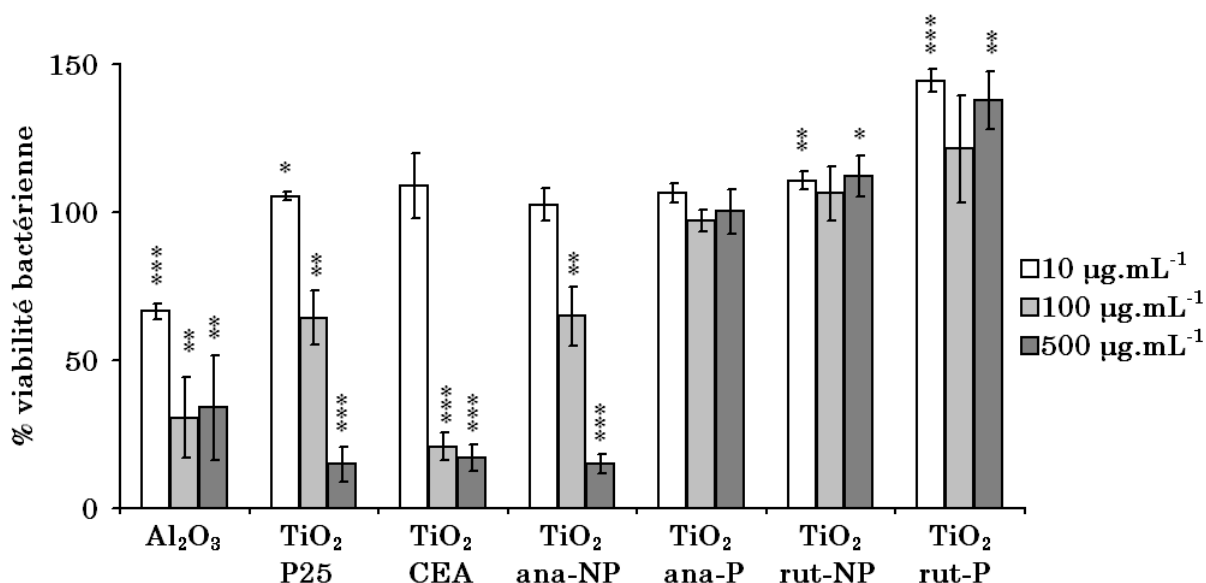


FIGURE 4.8 – Viabilité à 24 h d'exposition de *E.coli* MG1655 en présence de nanoparticules d'oxyde métallique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé.

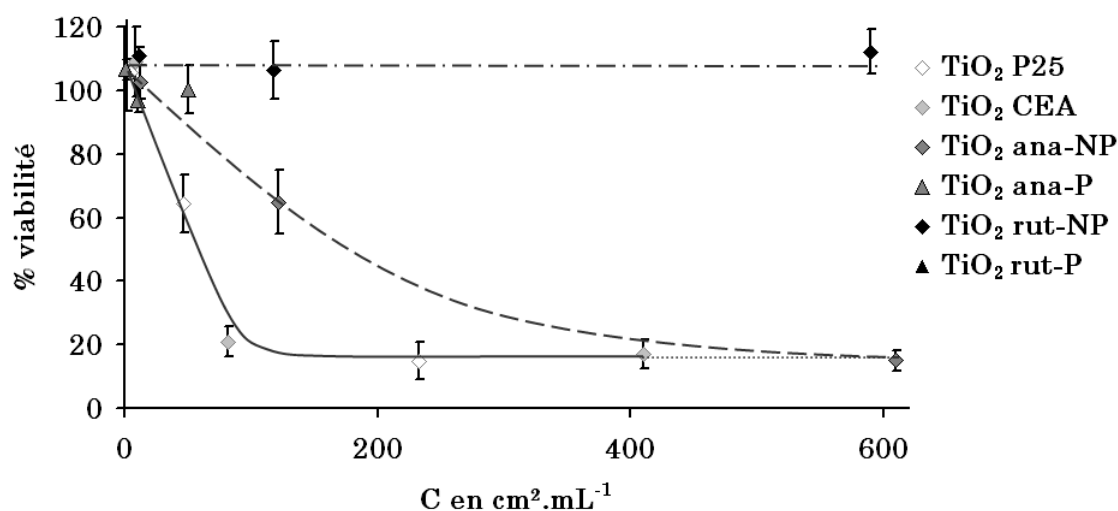


FIGURE 4.9 – Viabilité à 24 h d'exposition de *E. coli* MG1655 en présence de nanoparticules de TiO₂ en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules calculée à partir de la surface spécifique par la méthode de BET. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé.

Cependant, lorsque la concentration en nanoparticules est exprimée là aussi en quantité de surface par unité de volume de milieu mais cette fois-ci calculée à partir de la surface spécifique extérieure théorique (c'est à dire ne tenant pas compte de la quantité de surface due à la porosité des nanoparticules comme c'est le cas avec la surface spécifique mesurée par la méthode de BET, une seule

courbe de tendance est observée entre toutes les nanoparticules de TiO_2 anatase (voir figure 4.10). Cette droite montre qu'il y aurait un effet de quantité de surface mais que cet effet serait uniquement un effet de quantité de surface périphérique.

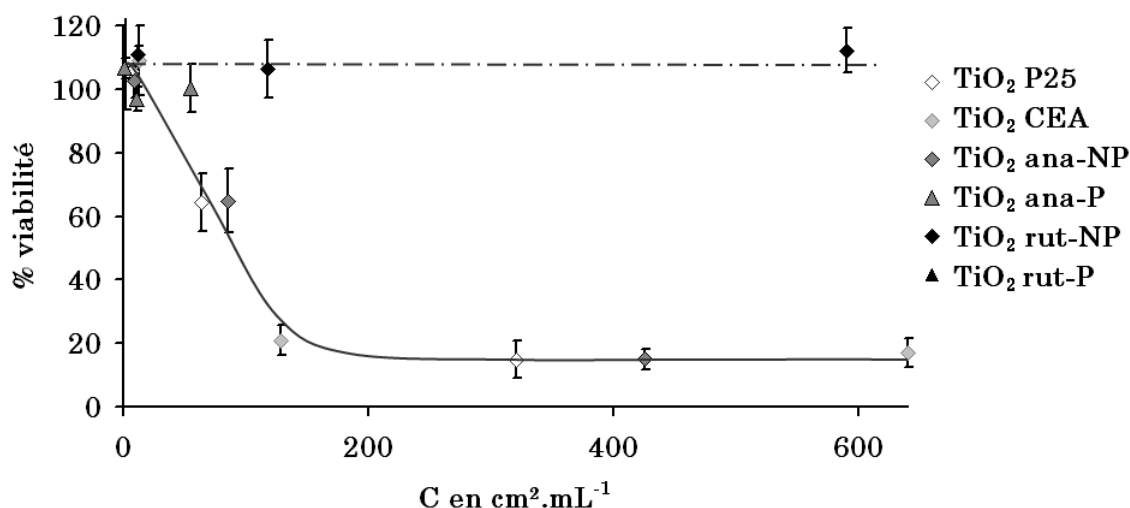


FIGURE 4.10 – Viabilité à 24 h d'exposition de *E. coli* MG1655 en présence de nanoparticules de TiO_2 en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules calculée à partir de la surface spécifique théorique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé.

4.2 Effet cytotoxique des nanoparticules pour les pneumocytes A549

4.2.1 Choix des tests de viabilité

En raison d'une interférence possible entre les nanoparticules et les tests de viabilité communément utilisés en biologie cellulaire, une attention particulière a été portée sur le choix des tests de viabilité cellulaire. Pour cela, les interférences des nanoparticules avec différents tests ont été vérifiées en ajoutant les nanoparticules au moment du test, d'une part en condition non toxique c'est à dire sur des cellules 100 % viables et d'autre part en condition toxique c'est à dire sur des cellules en partie mortes (traitement à 50 μM de chlorure de cadmium). Ainsi, dans le premier cas des faux positifs peuvent être mis en évidence (impression de toxicité alors qu'il n'y en a pas) et dans le deuxième cas des faux négatifs peuvent être mis en évidence (impression de non toxicité alors qu'il n'y en a). Les principes des différents tests sont expliqués dans la partie matériels et méthodes.

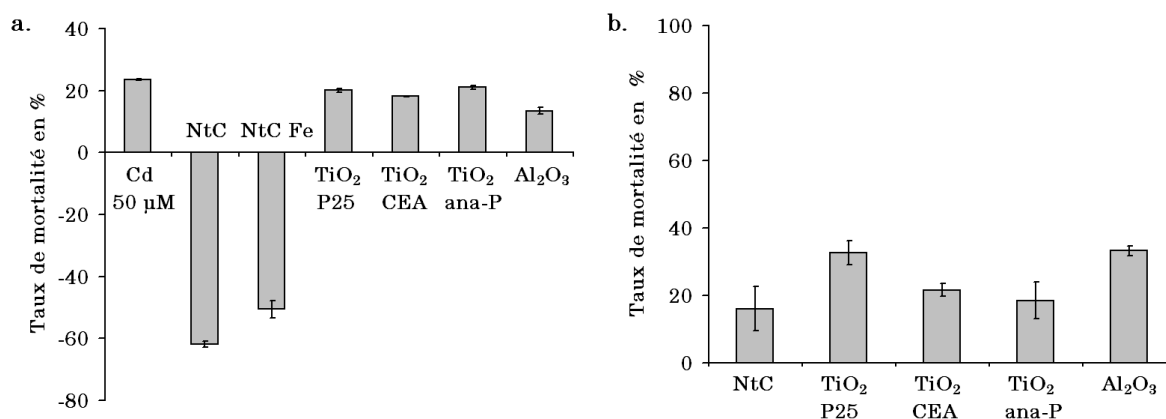


FIGURE 4.11 – Interférences des nanoparticules avec les tests à la résazurine et au rouge neutre. Les nanoparticules ont été rajoutées au moment de la lecture spectrophotométrique : a. en condition toxique à 50 µM de Cd pour le test à la résazurine (témoin Cd 50 µM), b. en condition non toxique pour le test au rouge neutre.

Seuls les tests à la résazurine et au rouge neutre ont montrés des interférences (voir figure 4.11). En effet, une absence de toxicité est constatée en présence de NtC pour le test à la résazurine alors que nous nous sommes placés en conditions où 20 % de cellules sont mortes. Les NtC semblent donc directement réduire le colorant. De même, une fausse toxicité est constatée avec le test au rouge neutre en présence de toutes les nanoparticules, cela peut être expliqué par un décollement plus prononcé du rouge neutre en présence de nanoparticules peut-être en raison d'une abrasion par les nanoparticules. A noter, que nous n'avons pas mis en évidence d'interférence des NtC avec le test MTT contrairement aux études de Casey et al. (2007b) et Wörle-Knirsch et al. (2006) publiées par la suite, c'est pourquoi ce test a été mis en oeuvre dans la suite de cette étude.

Un dénombrement des cellules vivantes et mortes a été réalisé par la technique au bleu trypan. Il s'avère que cette technique semble mal adaptée aux fortes concentrations en nanoparticules. En effet des agglomérats de cellules avec par exemple les NtC ont été observés rendant difficile le décompte des cellules (voir figure 4.12 page suivante.). Cela est probablement dû à une mauvaise trypsination¹ en présence de nanoparticules.

1. technique de décollement des cellules à l'aide de la trypsine, une enzyme hydrolysant entres les liaisons peptidiques responsables de l'adhérence cellulaire

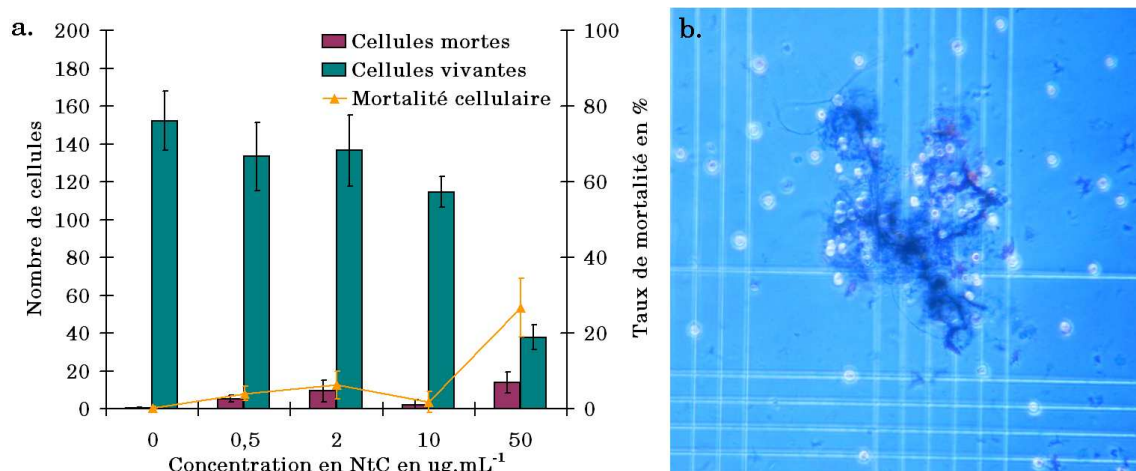


FIGURE 4.12 – Interférence des NtC avec le test au bleu trypan. a. Comptage du nombre de cellules vivantes et mortes et détermination du pourcentage de mortalité cellulaire après exposition aux NtC, b. Agglomérat de NtC et de cellules observés dans la cellule de Malassez au microscope optique.

4.2.2 Effets des nanotubes de carbone sur la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules A549 exposées aux NtC a dans un premier temps été évaluée par le test MTT. Suite à une exposition de 48 h, les résultats semblent montrer un fort effet cytotoxique dès $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec un plateau à 70-75% de mortalité à partir de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (voir figure 4.13). Des résultats identiques ont été obtenus à 24 h et 72 h d'exposition (résultats non montrés). Aucune différence de mortalité n'a été observée en fonction des différents types de nanotube de carbone. Dans nos conditions, la longueur et la présence de fer ne sont donc pas des paramètres influençant l'effet cytotoxique.

Une cinétique d'apparition de la mort cellulaire à des temps plus courts et à de plus faibles concentrations a été réalisée (voir figure 4.14). La mort cellulaire est constatée dès 1 h d'exposition. Elle augmente au cours du temps pour atteindre son maximum vers 9 h. A ce temps les NtC semble provoquer 20 % de mort dès $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ce qui est une très faible concentration. Les allures des courbes obtenues ont un profil logarithmique avant d'atteindre un plateau de mortalité qui dépend du temps exposition.

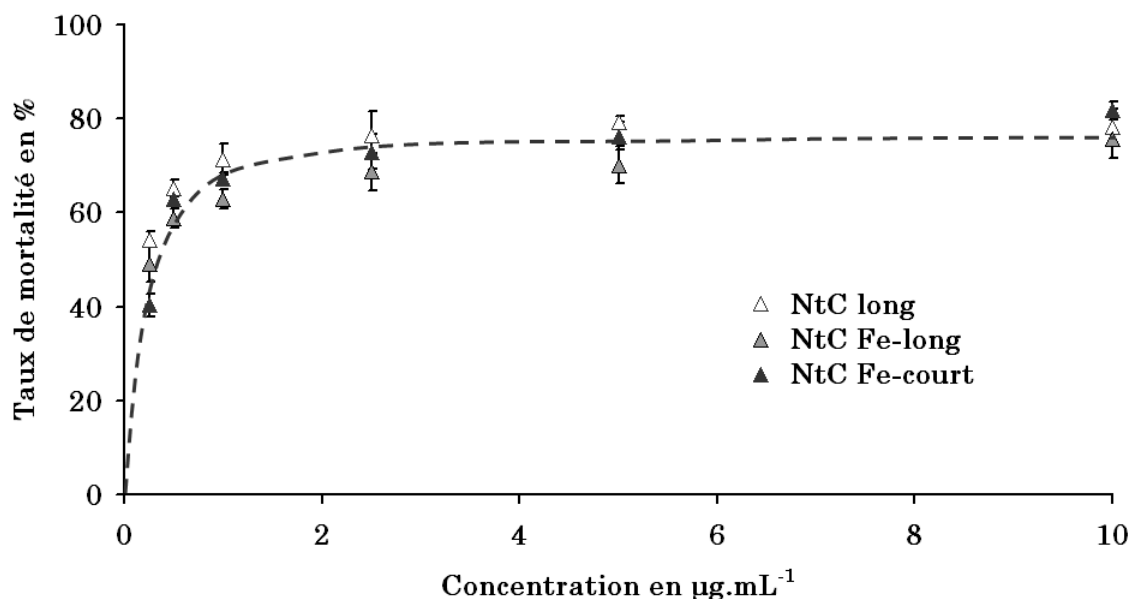


FIGURE 4.13 – Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanotubes de carbone. Evaluation par le test de viabilité cellulaire MTT.

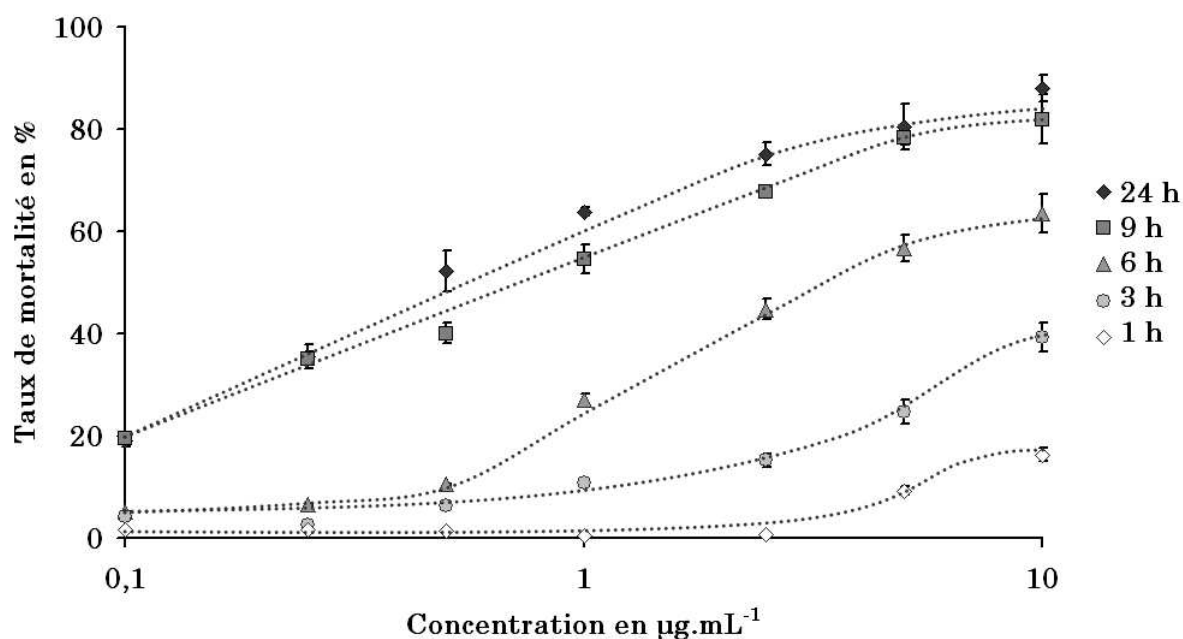


FIGURE 4.14 – Evolution au cours du temps de l'effet cytotoxique des nanotubes de carbone par le test MTT.

L'utilisation du test MTT pour évaluer la cytotoxicité des NtC étant controversée (Wörle-Knirsch et al., 2006; Davoren et al., 2007), les résultats ont été vérifiés dans un second temps par deux autres tests évaluant la viabilité cellulaire, avec lesquels les NtC n'interfèrent a priori pas : les tests XTT dosant lui aussi l'activité mitochondriale et le test LDH. Comme le laissait supposer l'étude de Wörle-

Knirsch et al. (2006), l'effet cytotoxique des NtC est beaucoup plus faible avec ces deux autres tests (voir figure 4.15) et n'apparaît qu'à partir de 48 h d'exposition. L'interaction des NtC avec le test MTT semblent donc bien confirmée : les résultats de cytotoxicité obtenus par ce test ne seront donc pas pris en compte. Bien que plus faible, l'effet cytotoxique des NtC est tout de même bien réel en particulier avec le test LDH qui montre 35 % de mortalité cellulaire à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Quant au test XTT, il ne met en évidence qu'un maximum de 10 % de mortalité à 25 et $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Aucune différence de mortalité n'a été observée en fonction des différents types de nanotube de carbone pour les deux tests.

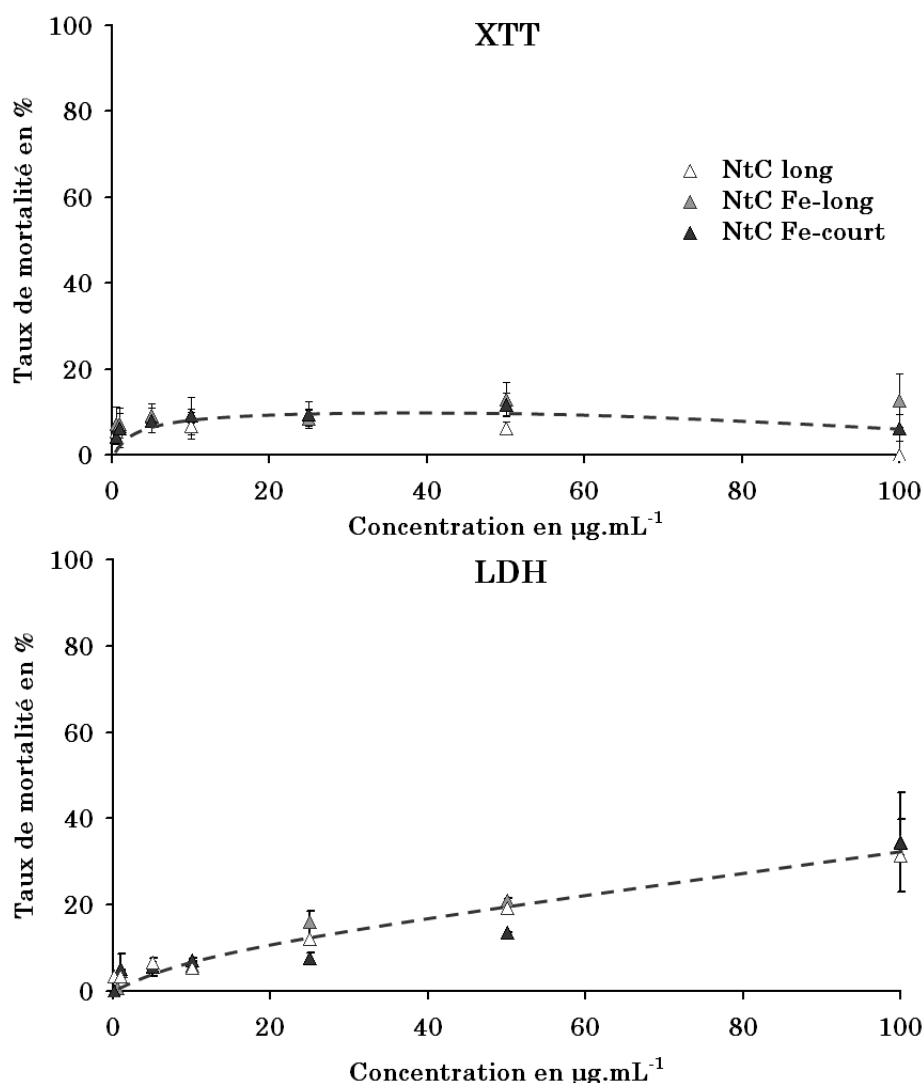


FIGURE 4.15 – Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanotubes de carbone. Evaluation par les tests de viabilité cellulaire XTT et LDH.

Nous remarquons une légère diminution de la mortalité cellulaire avec le test XTT à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en NtC. Cette diminution peut s'expliquer par la persistance de NtC au fond des puits de culture malgré l'élimination du surnageant et ceci

même à la suite de plusieurs rinçages. En effet pour de fortes concentrations d'exposition, la quantité de NtC adsorbée est non négligeable et visible à l'oeil nu. Or nous avons montré que les nanoparticules absorbent les photons (voir chapitre 3.3 page 101). Ainsi, lors de la lecture spectrophotométrique du test XTT (voir 2.3.2 page 61), les NtC interfèrent en partie avec le signal d'absorbance du formazan, en le surélevant. Le formazan étant formé lorsque les cellules sont en vie, cette surélévation du signal engendre une surévaluation de la viabilité cellulaire et donc une sous-évaluation du taux de mortalité pour de fortes concentrations en NtC.

4.2.3 Effets des nanoparticules d'oxyde métallique sur la viabilité cellulaire

Dans un premier temps, le potentiel cytotoxique des nanoparticules d'oxyde métallique pour les cellules A549 a été vérifié à de fortes concentrations pour différents temps d'exposition (voir figure 4.16 page suivante). Les nanoparticules TiO_2 apparaissent cytotoxiques à partir de 48 h d'exposition tandis que les nanoparticules Al_2O_3 ne le sont qu'à partir de 72 h d'exposition. Les expositions aux nanoparticules étant réalisées en milieu sans sérum, les résultats obtenus pour un temps d'exposition de 72 h pourraient être controversés, en raison d'une probable mauvaise condition des cellules en absence de sérum à ce temps. C'est pourquoi la suite des tests a été réalisée à 48 h d'exposition afin d'effectuer un comparatif des effets cytotoxiques des nanoparticules d'oxyde métallique.

La mortalité cellulaire des cellules A549 a donc été évaluée plus finement à 48 h d'exposition (voir figure 4.17 page suivante). A concentrations massiques égales, l'effet cytotoxique des nanoparticules est classé de la façon suivante : TiO_2 CEA > TiO_2 P25 > TiO_2 rut-NP > TiO_2 ana-P > Al_2O_3 . Un maximum de mortalité cellulaire de 25 % a été observé aux plus fortes concentrations testées pour les nanoparticules TiO_2 CEA et TiO_2 P25.

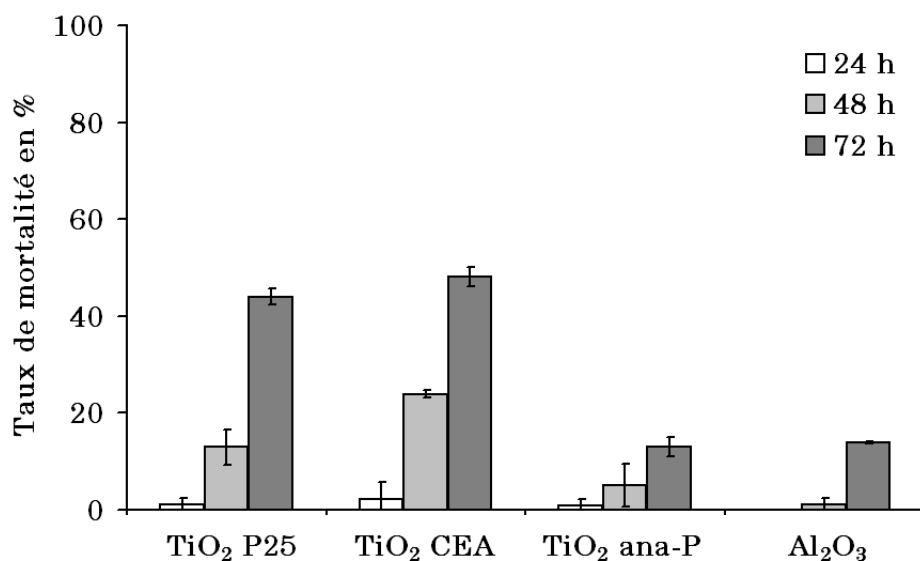


FIGURE 4.16 – Evolution au cours du temps de l’effet cytotoxique des nanoparticules d’oxyde métallique par le test MTT. Les concentrations sont de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour TiO₂ P25 et TiO₂ CEA et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour TiO₂ ana-P et Al₂O₃.

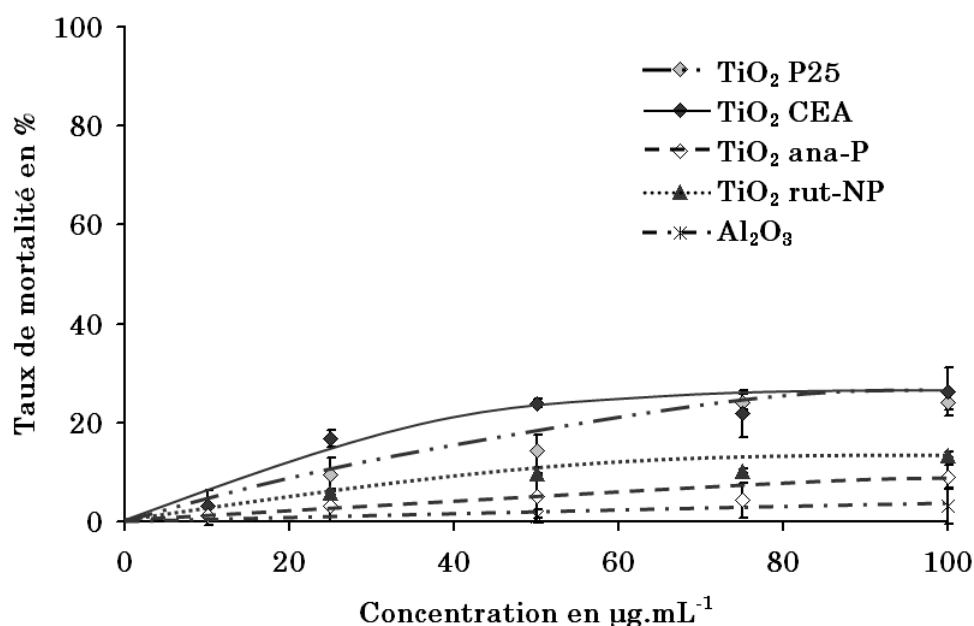


FIGURE 4.17 – Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanoparticules d’oxyde métallique. Evaluation par le test de viabilité cellulaire MTT.

Lorsque la concentration en nanoparticules est exprimée en quantité de surface de nanoparticules (cm^2) par surface de cellule (cm^2) (voir figure 4.18), trois tendances de courbe sont observées. Les nanoparticules TiO₂ CEA, TiO₂ P25 et TiO₂ ana-P, toutes trois de forme cristalline anatase, forment une courbe unique présentant un plateau à 25 % de mortalité cellulaire aux plus fortes concentrations.

La classification de l'effet cytotoxique des nanoparticules d'oxyde métallique peut donc être revue lorsqu'elle est établie à partir des concentrations surfaciques en nanoparticules : TiO_2 CEA = TiO_2 P25 = TiO_2 ana-P > TiO_2 rut-NP > Al_2O_3 .

Comme pour les nanotubes de carbone et bien que n'interférant à priori pas avec le test MTT, les résultats ont été vérifiés par les tests de viabilité cellulaire XTT et LDH à 48 h d'exposition (voir tableau 4.2.2 page 120). Les taux de mortalité obtenus sont plus faibles avec ces deux autres tests mais sont tout de même significatifs. La classification de l'effet cytotoxique des nanoparticules est la même pour les trois tests, excepté pour Al_2O_3 qui semble un peu plus toxique que TiO_2 rut-NP par le test XTT, ce qui est difficilement explicable puisque les tests XTT et MTT donnent tous deux une information sur la diminution d'activité mitochondriale.

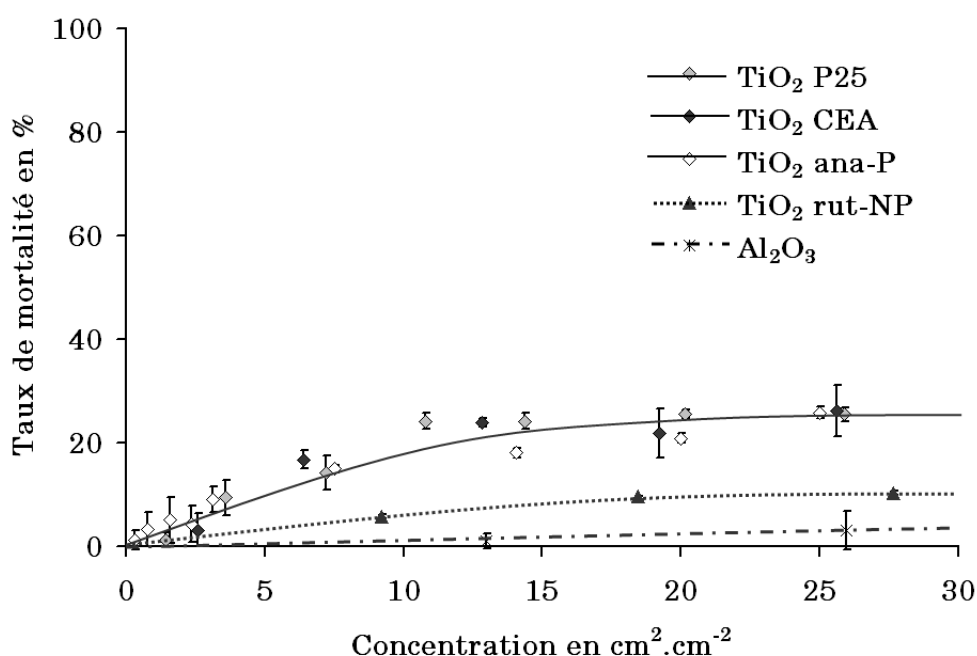


FIGURE 4.18 – Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanoparticules d'oxyde métallique en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules calculée à partir de la surface spécifique par la méthode de BET. Evaluation par le test de viabilité cellulaire MTT.

	C $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Taux de mortalité en %		
		MTT	XTT	LDH
TiO ₂ P25	25	9 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0
	100	24 $\pm$ 2	9 $\pm$ 0	11 $\pm$ 0
TiO ₂ CEA	25	17 $\pm$ 2	13 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0
	100	26 $\pm$ 5	15 $\pm$ 0	13 $\pm$ 1
TiO ₂ ana-P	25	3 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	100	9 $\pm$ 2	12 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0
TiO ₂ rut-NP	25	6 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	100	10 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0
Al ₂ O ₃	50	1 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	100	3 $\pm$ 4	8 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0

TABLEAU 4.2 – Comparaison de la mortalité cellulaire des cellules A549 obtenue par différents tests de viabilité cellulaire suite à une exposition de 48 h aux nanoparticules d'oxyde métallique.

4.3 Discussion

4.3.1 Un effet cytotoxique avéré mais dépendant de différents paramètres

4.3.1.1 Pour les bactéries

Nous avons montré que certaines nanoparticules de TiO₂ et les nanoparticules Al₂O₃ ont un effet cytotoxique sur *E. coli* M1655 dans l'eau et en absence de lumière. En effet, à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ le pourcentage de viabilité cellulaire diminue en 24 h à 30 $\pm$ 13 % pour Al₂O₃ et jusqu'à 20 $\pm$ 5 % selon le type de TiO₂. C'est la première fois que la cytotoxicité des nanoparticules d'Al₂O₃ pour les bactéries est relatée. Les nanoparticules de TiO₂ ont, quant à elles, déjà montré un effet bactéricide sur *E. coli* mais essentiellement suite à une photoactivation aux UV (Ireland et al., 1993; Benabbou et al., 2007). En absence de lumière, seule l'étude de Adams et al. (2006) montre un effet sur *E. coli* avec une inhibition de croissance de seulement 25 $\pm$ 4 % en présence de 1 mg.mL^{-1} en nanoparticules de TiO₂ de 66 nm de diamètre. Cet effet est bien plus faible que celui que nous avons constaté et peut s'expliquer par le diamètre plus élevé des nanoparticules utilisées dans cette étude, mais aussi par leur agglomération probable dans le milieu de culture (voir chapitre 3.2.2.2 page 98).

Les MWCNT semblent aussi avoir un effet cytotoxique sur *E. coli* MG1655 avec une diminution de la viabilité cellulaire à 40 % en 24 h dans l'eau. Il en est de même dans une étude récemment menée sur *E. coli* exposée pendant 1 h à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NtC dans l'eau, et montrant une viabilité cellulaire de seulement 20 ± 10 % en présence de SWCNT et 76 ± 4 % en présence de MWCNT après une exposition (Kang et al., 2008). Cependant le surfactant que nous avons utilisé étant toxique à forte concentration, on ne peut exclure un éventuel effet synergique² entre la gomme arabique et les NtC ayant pour conséquence une augmentation de l'effet toxique "réel" des NtC.

L'effet cytotoxique des nanoparticules étudiées pour *E. coli* MG1655 a pu être classé, lorsqu'il est regardé en fonction de la concentration massique, de la façon suivante : $\text{Al}_2\text{O}_3 > \text{TiO}_2 \text{ CEA} > \text{TiO}_2 \text{ ana-NP} = \text{TiO}_2 \text{ P25} > > \text{TiO}_2 \text{ ana-P} = \text{TiO}_2 \text{ rut-P} = \text{TiO}_2 \text{ rut-NP} = 0$ dans les conditions testées. Ainsi les nanoparticules Al_2O_3 ont un effet cytoxique plus prononcé pour cette bactérie que les nanoparticules TiO_2 , peut-être en raison d'un relargage d'ions Al^{3+} . De même les particules de plus de 140 nm de diamètre (TiO_2 ana-P, TiO_2 rut-P) n'ont pas d'effet cytotoxique, la taille joue donc un rôle dans la cytotoxicité des nanoparticules pour les bactéries. Enfin les nanoparticules TiO_2 rut-NP n'ont pas non plus d'effet cytotoxique dans les conditions testées, cela peut être dû à leur cristallinité, mais aussi à leur forme en épingle qui n'est donc pas sphérique, leur charge ou encore à leur taille puisqu'elles font 70 nm de longueur. Par conséquent, il a été mis en évidence que l'effet cytotoxique des nanoparticules d'oxyde métallique sur les bactéries est conditionné par : la composition chimique, la taille et éventuellement la cristallinité, charge et/ou la forme des nanoparticules. L'importance de la composition chimique de l'oxyde métallique avait déjà été décrit dans l'étude de Adams et al. (2006) qui montre pour deux modèles bactériens que l'inhibition de croissance est plus importante en présence de nanoparticules de ZnO (67 nm) que de TiO_2 (66 nm) et de SiO_2 (14 nm). De même les nanoparticules de CeO_2 de 7 nm semblent avoir un effet cytotoxique sur *E. coli* plus prononcé avec 50 % de mortalité cellulaire à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en nanoparticules (Thill et al., 2006).

Des deux modèles bactériens à Gram négatif étudiés, seule *E. coli* MG1655 est affectée par la présence de nanoparticules. La viabilité de *C. metallidurans* CH34 n'est en aucune mesure atténuée suite à une exposition aux nanoparticules dans les conditions testées, sûrement en raison des mécanismes de protection évolués qu'elle possède (Mergeay et al., 1978, 1985) contrairement à *E. coli*. Il n'est donc pas possible de tirer de conclusion générale au sujet de l'effet des nanoparticules

2. phénomène pour lequel plusieurs facteurs agissent ensemble et créent un effet plus grand que la somme des effets attendus s'ils avaient opérés indépendamment, ou créent un effet que chacun d'entre eux n'aurait pas créé isolément.

sur les bactéries à Gram négatifs. Nous pouvons seulement affirmer que les nanoparticules ont un effet cytotoxique pour certaines bactéries à Gram négatif comme *E. coli*. Des différences d'effets selon les modèles bactériens ont déjà été montrées mais uniquement entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En effet les bactéries à Gram positif se révèlent de manière générale plus sensibles aux nanoparticules (Adams et al., 2006; Kim et al., 2007; Reddy et al., 2007; Tsao et al., 2002). Ainsi, par exemple, la croissance de *Bacillus subtilis* est plus inhibée en présence de nanoparticules de ZnO, TiO₂ ou SiO₂ que celle d'*E. coli* (Adams et al., 2006) et la CMI³ en nanoparticules de ZnO est plus faible pour *Staphylococcus aureus* que pour *E. coli* (Reddy et al., 2007). Des variations d'effet cytotoxique, entre différentes bactéries à Gram positif ont déjà été constatées (Tsao et al., 2002) mais c'est la première fois que des variations entre différentes souches à Gram négatif ont été mises en évidence.

4.3.1.2 Pour les cellules pulmonaires

Tous les nanoparticules étudiées sont cytotoxiques pour les cellules A549. L'intensité des effets sur la viabilité cellulaire reste cependant faible avec un maximum de 20-25% de mortalité cellulaire aux plus fortes concentrations allant jusqu'à 100 µg.mL⁻¹, et ceci que ce soit pour les NtC ou les nanoparticules d'oxyde métallique. Les allures de courbe obtenues présentant des plateaux de mortalité cellulaire, aucune CI₅₀ n'a pu être déterminée.

Dans de nombreuses études, les NtC ont tout d'abord été décrits comme présentant un effet fortement cytotoxique (Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006; Tian et al., 2006; Soto et al., 2007). Mais ces études utilisent le test de viabilité cellulaire MTT qui a été montré interagissant avec les NtC et donnant de faux positifs (Wörle-Knirsch et al., 2006; Casey et al., 2007a). En réalité, des études plus récentes utilisant des tests de viabilités non controversés, montrent un faible effet cytotoxique des NtC. En effet pour les cellules alvéolaires A549 exposées à des SWCNT, un maximum de 10 % de mortalité cellulaire est obtenu par le test LDH et encore moins avec le test WST-1 (Wörle-Knirsch et al., 2006). De même, un plateau de seulement 20 % de mortalité cellulaire a été observé en absence de sérum, sur les mêmes cellules pour des concentrations allant de 12,5 à 200 µg.mL⁻¹ en SWCNT, avec les tests au Bleu de Comassie et au Bleu Alamar (Davoren et al., 2007). Nous obtenons donc des résultats similaires à ces deux dernières études avec des MWCNT, à l'exception que le plateau de mortalité semble être atteint à de plus fortes concentrations. Pour les cellules A549, il ne semble donc pas y avoir

3. Concentration Minimale Inhibitrice : concentration minimale pour laquelle une inhibition totale de la croissance bactérienne est observée

de variation importante d'effet cytotoxique entre SWCNT et MWCNT, et donc de variation en fonction du diamètre des NtC. Cette conclusion est renforcée par une étude sur des macrophages alvéolaires montrant aussi un maximum de mortalité cellulaire de 20 % et peu de différence entre SWCNT et MWCNT (Pulskamp et al., 2007).

Nous n'avons pas non plus constaté de différence en fonction de la longueur des NtC, contrairement à une étude menée sur des fibroblastes (Sato et al., 2005), ou en fonction de la présence ou non du catalyseur Fe. Il n'est cependant pas possible de conclure de manière radicale à une non influence de ces paramètres car : la différence de longueur entre les NtC longs et les NtC courts n'est peut être pas suffisante pour observer un effet, et le Fe se trouvant enfermé entre les couches de carbone des NtC que nous avons étudiés n'est pas réellement disponible, ce qui pourrait être le cas avec d'autres NtC.

Enfin, nous avons observé un taux de mortalité supérieur avec le test LDH en comparaison avec le test XTT, qui peut s'expliquer par une surévaluation du taux de mortalité pour le test LDH et une sous-évaluation pour le test XTT (voir chapitre 4.8 page 117). Cette légère divergence entre les deux tests peut aussi s'expliquer par la nature différente de ce qu'ils mettent en évidence, le test LDH montrant une perte d'intégrité membranaire qui dans notre cas serait plus précoce ou tout du moins plus importante que l'atteinte mitochondriale mise en évidence par le test XTT.

La cytotoxicité de nanoparticules d'oxyde métallique pour des cellules en culture a déjà été démontrée (Brunner et al., 2006; Hussain et al., 2005; Wang et al., 2007) et en particulier pour les pneumocytes II (Brunner et al., 2006; Soto et al., 2007). L'intensité des effets cytotoxiques observés peut être variable en fonction du type cellulaire et même de la lignée pour un même type cellulaire (Brunner et al., 2006; Patra et al., 2007). Ainsi les pneumocytes A549 sont plus sensibles aux nanoparticules que les macrophages alvéolaires THB-1, eux-même plus sensibles que les macrophages alvéolaires RAW 264.7 (Soto et al., 2007). Dans cette même étude, les nanoparticules TiO₂ anatase, de diamètre proche de celles que nous étudions, se révèlent avoir beaucoup plus d'effet cytotoxique sur les cellules A549, avec une CI₅₀ de 2 µg.mL⁻¹. Cette différence de résultats pour la même lignée cellulaire et avec des nanoparticules similaires, peut s'expliquer, soit par la présence éventuelle d'impuretés dans leurs nanoparticules, soit plus probablement par le fait qu'ils utilisent du DMSO pour disperser les nanoparticules. Dès lors, le DMSO étant capable de perméabiliser les membranes cellulaires (Gurtoenko and Anwar, 2007), il est possible qu'il favorise l'action des nanoparticules.

A l'exception de cette étude et en comparaison avec d'autres études sur d'autres modèles cellulaires (Brunner et al., 2006; Hussain et al., 2005; Karlsson et al., 2008; Wang et al., 2007) nous confirmons de manière plus générale que les nanoparticules TiO_2 et Al_2O_3 font parties des nanoparticules d'oxyde métallique qui ont peu d'effet sur la viabilité cellulaire. Nous pouvons aussi classer l'effet cytotoxique de ces nanoparticules de la manière suivante : TiO_2 anatase > TiO_2 rutile > Al_2O_3 . Ainsi, nous avons mis en évidence une influence de la composition de l'oxyde métallique, mais aussi de la cristallinité ou forme en absence de lumière sur l'effet cytotoxique des nanoparticules. Ce dernier point avait déjà été montré *in vivo* sur le rat (Warheit et al., 2007) et sur des cellules en culture (Sayes et al., 2006b; Soto et al., 2007).

4.3.2 Des effets spécifiques aux nanoparticules

En comparant les effets sur la viabilité cellulaire de nanoparticules à des particules de TiO_2 de plus gros diamètre, nous avons confirmé l'incidence de la taille sur l'intensité de ces effets (Chen et al., 2006; Brown et al., 2001; Meng et al., 2007; Oberdörster et al., 2000). Il s'agit plus exactement d'une influence de la surface spécifique qui est corrélée au diamètre des nanoparticules. En effet, nous avons montré, à la fois pour *E. coli* MG1655 et pour les cellules A549, que les taux de mortalité obtenus pour des particules de TiO_2 anatase de taille différente, suivent la même tendance une fois que les concentrations sont exprimées en quantité de surface de nanoparticule.

Nous notons cependant que pour les cellules, cette courbe de tendance unique est obtenue en considérant toutes les particules étudiées y compris celles de taille non nanoparticulaire. Ainsi, c'est bien un effet quantité de surface des nanoparticules de TiO_2 qui a été mis en évidence et non un effet "nano"⁴, puisque à quantité de surface équivalente les plus petites nanoparticules n'ont pas plus d'effet que celles de diamètre plus élevé. Cela suggère un mécanisme d'action impliquant l'activité de surface de ces nanoparticules, comme par exemple la génération d'espèces réactives de l'oxygène.

Tandis que pour les bactéries, nous obtenons une courbe de même tendance, uniquement avec les nanoparticules de diamètre inférieur à 50 nm. Cela suggère un mécanisme d'action reposant à la fois sur la taille des nanoparticules et sur leur surface spécifique, et donc une interaction à la fois mécanique et faisant intervenir l'activité de surface.

4. Effets dus à une réactivité différente aux très faibles tailles

4.3.3 Une adsorption et/ou une accumulation des nanoparticules chez les cellules A549

Une adhésion des nanotubes de carbone et des nanoparticules a été constatée au fond des puits de culture, même à la suite de plusieurs rinçage. Ceci n'a été observé qu'en présence de cellules, elle reflèterait donc l'accumulation et/ou l'adsorption des nanoparticules sur les cellules A549 sans pour autant qu'on puisse différencier les deux. Cependant, il est fort possible qu'il y ait adsorption et que celle-ci soit facilitée par le surfactant alvéolaire sécrété par les pneumocytes II A549 (Lieber et al., 1976; Balis et al., 1984). En effet il a déjà été démontré que la di-palmitoyl-phosphatidylcholine, le principal constituant du surfactant alvéolaire, s'adsorbe fortement sur des particules ultrafines (Kendall, 2007) et qu'un fluide de lavage bronchoalvéolaire contenant entre autre ce surfactant permet d'obtenir une très bonne dispersion de nanoparticules de noir de carbone et de TiO₂ P25 (Sager et al., 2007). De plus le même type d'étude a été mené au laboratoire sur d'autres types cellulaires ne sécrétant pas de surfactant alvéolaire et aucune adsorption n'a été observée à la surface des cellules.

Le test MTT : un test évaluant à la fois la cytotoxicité et l'accumulation/adsorption des nanotubes de carbone.

Le test MTT est un test couramment utilisé pour déterminer *in vitro* une perte de viabilité cellulaire. Ce test est basé sur la formation de cristaux de formazan violet insolubles dans les cellules viables (voir chapitre 2.3.2.1 page 61). Ainsi moins les cellules sont viables, moins de cristaux de formazan violet sont formés et moins l'intensité de coloration après dissolution est prononcée. Or il a été montré que les NtC sont capables de fixer les cristaux de formazan (Casey et al., 2007b), empêchant ainsi la libération de la coloration violette et donnant l'impression d'une perte de viabilité cellulaire. Cependant, les cristaux de formazan se forment à l'intérieur de la cellule, et les NtC libres dans le milieu sont éliminés avant l'étape de dissolution. Nous proposons donc l'hypothèse suivante : seuls les NtC accumulés ou adsorbés entrent en contact avec les cristaux de formazan au moment de la dissolution (voir figure 4.19 page suivante). Ainsi une perte apparente de coloration, non due à une perte de viabilité, mettrait en évidence une accumulation et/ou une adsorption des NtC. Dans les cas où il y a perte de viabilité cellulaire il est alors difficile de savoir quelle est la part d'interaction avec le test et la part d'effet cytotoxique. De même que si il n'y a pas d'accumulation et/ou d'adsorption, le test MTT mettra en évidence uniquement une perte de viabilité cellulaire.

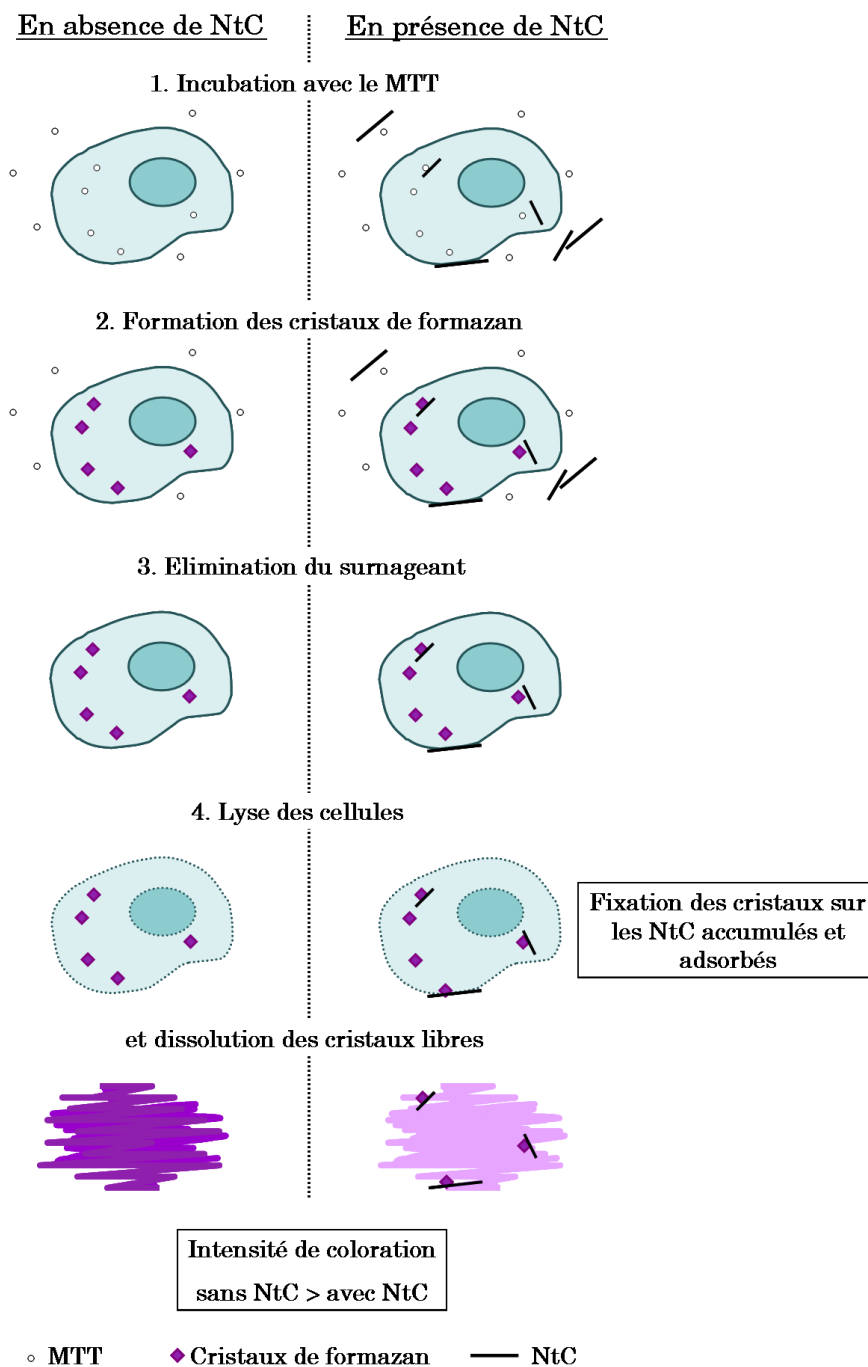


FIGURE 4.19 – Interaction des nanotubes de carbone avec le test MTT

Dans notre situation, la perte de viabilité cellulaire en présence de NtC se révèle faible avec d'autres tests de viabilité. La forte perte de coloration obtenue avec le test MTT ne peut donc pas s'expliquer entièrement par cette faible perte de viabilité (voir figure 4.13 page 121). Elle met donc en évidence une accumulation et/ou adsorption qui n'est cependant pas quantifiable. Malgré tout, les courbes de "mortalité" obtenues montrent que cette accumulation et/ou adsorption commence à de très faibles concentrations ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et qu'elle est très rapide avec

une diminution de coloration significative dès 3 h (alors que la mortalité n'apparaît qu'à 48 h avec les autres tests de viabilité). Elle semble de plus maximale dès 9 h d'exposition (voir figure 4.14 page 121). Cela explique la non interférence constatée lors de la vérification du test (voir chapitre 4.2.1 page 118), puisque les cellules n'ont été mise en contact avec les NtC qu'une seule heure.

Des résultats similaires ont déjà été obtenus sur les cellules A549 exposées pendant 24 h à des SWCNT (Davoren et al., 2007), la théorie de l'accumulation et/ou adsorption étant valable puisqu'il y a peu d'effets cytotoxiques avec d'autres tests de viabilité. Bien que non validé par d'autres tests ne montrant pas de cytotoxicité, une forte diminution de "viabilité" a aussi été montrée sur des cellules A549 exposée à des MWCNT avec une " IC_{50} " de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quelle que soit la surface spécifique des MWCNT (16 ou $239 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) (Soto et al., 2007). Cette accumulation/adsorption ne semble donc pas dépendre du type de NtC pour les cellules A549, contrairement aux macrophages pour qui les SWCNT ont un "effet cytotoxique" plus élevé que les MWCNT (Jia et al., 2005; Pulskamp et al., 2007). Des différences sont donc constatées selon le type cellulaire, comme le montrent aussi des études menées sur des fibroblastes pour qui les NtC ne sont pas cytotoxiques par le test MTT (Sayes et al., 2006b; Tian et al., 2006).

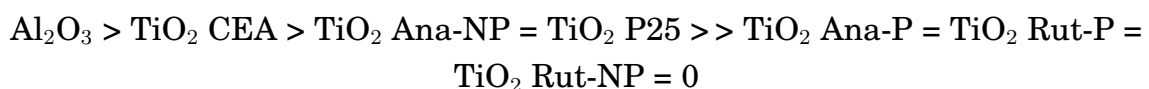
4.4 Synthèse du chapitre

Chapitre 4

Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire

- Dans ce chapitre nous avons vu des différences d'intensité d'effet sur la viabilité cellulaire en fonction des modèles cellulaires, de la nature et des caractéristiques des nanoparticules.

- Chez les deux modèles bactériens à Gram négatifs, les nanoparticules n'ont pas le même effet : elles ne sont pas cytotoxiques pour *C. metallidurans* CH34 mais le sont pour *E. coli* MG1655. Pour cette dernière souche, les effets cytotoxiques sont classés de la manière suivante en fonction de la concentration massique :



On observe donc **un effet de la taille** des particules, de **la composition chimique** en oxyde métallique, et aussi **de la forme, charge ou cristallinité** puisque TiO_2 rut-NP n'induit pas de mortalité cellulaire. Il s'avère qu'il n'y a plus de différence d'effets entre les nanoparticules TiO_2 anatase lorsque les concentrations sont exprimées en fonction de la surface de nanoparticules. Il y a donc **un effet de surface** à condition que les particules soient de taille nanométrique.

Enfin il semble y avoir un effet cytotoxique des NtC qui est cependant difficilement appréciable en raison d'un effet cytotoxique du surfactant seul.

- Chez les pneumocytes II A549, les effets cytotoxiques n'apparaissent qu'à partir de 48 h d'exposition pour atteindre un maximum de 25 % de taux de mortalité cellulaire pour toutes les nanoparticules. Ces effets sont classés de la manière suivante lorsqu'ils sont exprimés en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules :



Ainsi pour ce modèle ce n'est pas la taille nanométrique à proprement parler qui influence l'intensité des effets mais la **quantité de surface** en particules qui est bien sûr directement corrélée à la taille. Une influence de **la forme cristalline** et de **la nature** de l'oxyde métallique a aussi été constatée.

La localisation cellulaire des nanoparticules

5.1 Observations microscopiques des bactéries exposées aux nanoparticules	137
5.2 Observations microscopiques des pneumocytes exposés aux nanoparticules	144
5.3 Discussion	150
5.4 Synthèse du chapitre	156

Les nanoparticules étant des objets physiques (et non dissouts), regarder leur localisation dans les cellules vivantes est une étape essentielle afin de comprendre la nature des interactions nanoparticules/cellules et de prévoir leurs mécanismes d'action. De plus les observations microscopiques permettent aussi de déceler des anomalies morphologiques. Ainsi dans ce chapitre seront décrites les observations microscopiques réalisées sur les différents modèles cellulaires que nous avons exposés aux nanoparticules.

5.1 Observations microscopiques des bactéries exposées aux nanoparticules

Toutes les observations microscopiques présentées dans ce chapitre ont été réalisées suite à une exposition à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nanoparticules dans les mêmes conditions que le test de viabilité Live/Dead® BacLightTM, c'est à dire pendant 24 h dans de l'eau ultrapure.

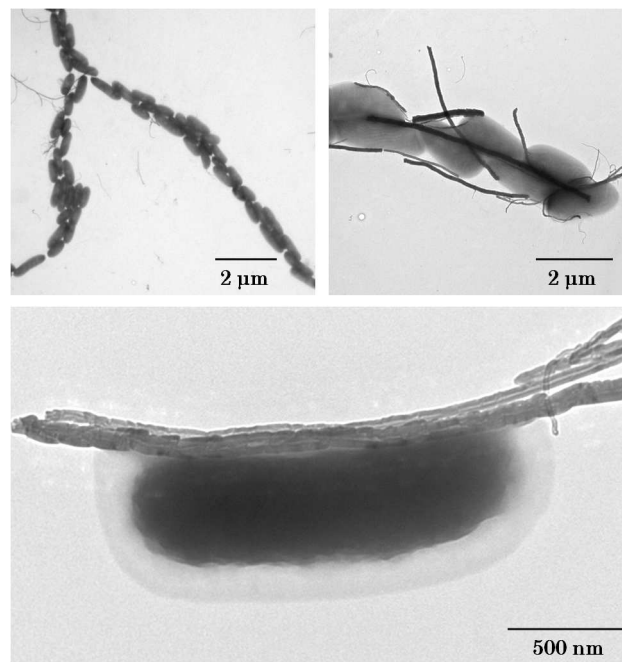
5.1.1 Interactions avec les nanotubes de carbone

Une adsorption entre bactéries et NtC a été observée et ceci pour les deux modèles bactériens (voir figure 5.1 page suivante). La même observation a été constatée que les NtC soient longs ou courts et qu'il y ait ou non présence de fer. Cela montre qu'il n'y a pas d'influence de la taille ou de la présence de fer. Cette adsorption n'est pas totale puisque des NtC et des bactéries isolés ont été observés. Il est probable qu'elle soit due à une affinité entre la gomme arabique entourant les NtC, qui est constituée principalement de polysaccharides (Verbeken et al., 2003), et la couche externe de la paroi bactérienne (voir figure 5.13 page 151).

Par ailleurs, de faibles modifications morphologiques ont été constatées chez *E. coli* MG1655 (voir figure 5.2 a. et b.). En effet, en présence de NtC, une faible proportion de bactéries ont une forme très allongée avec une longueur pouvant aller jusqu'à $5 \mu\text{m}$ contre $1,5 \mu\text{m}$ pour le contrôle sans nanoparticules. Ce type d'observation a déjà été constaté en cas de stress hyperosmotique (Hajmeer et al., 2006).

En raison de la dureté des NtC, les coupes de bactéries exposées n'ont pas pu être réalisées. Nous ne pourrions donc pas répondre à la question de l'accumulation des NtC dans les bactéries. Elle nous paraît cependant peu probable, d'après les observations que nous venons de décrire et en raison de la taille importante des NtC en comparaison avec la taille des bactéries.

Cupriavidus metallidurans CH34



Escherichia coli MG1655

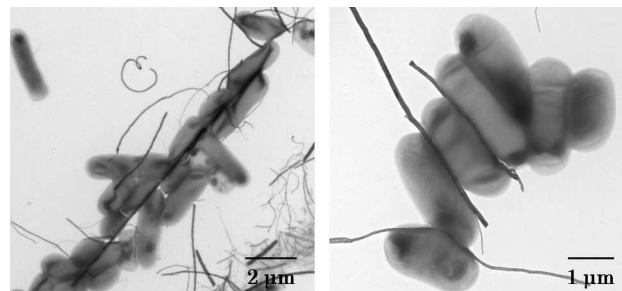


FIGURE 5.1 – Observations microscopiques directes des bactéries exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NtC pendant 24 h.

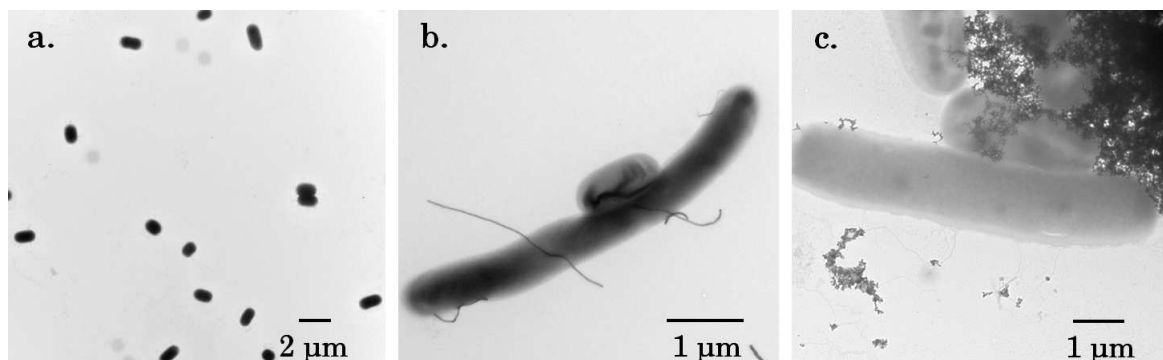


FIGURE 5.2 – Changements morphologiques d'*E. coli* MG1655 en présence de nanoparticules : a. sans nanoparticules, b. NtC et c. TiO_2 CEA.

5.1.2 Interaction avec les nanoparticules d'oxyde métallique

Nanoparticules TiO₂ anatase

Il ne semble pas y avoir d'adsorption spécifique entre les nanoparticules de TiO₂ anatase et les bactéries (voir figure 5.3). Cependant, étant donné que le rapport quantité de surface plane¹ de nanoparticules sur surface de bactéries est estimé inférieur à 1 (voir calculs ci-dessous), les bactéries ne pourraient être totalement recouvertes de nanoparticules même dans le cas d'une forte adsorption. De plus il n'est pas exclu que le traitement des échantillons ait pour conséquence une désorption partielle des nanoparticules à la surface. Il est donc difficile de conclure sur une éventuelle adsorption des nanoparticules sur la paroi bactérienne.

Estimation du nombre de nanoparticules par nombre de bactéries

$$N_{\text{part}} = \frac{C_{N \text{ part}}}{C_{\text{bact}}} \simeq \frac{\frac{C_{m \text{ part}}}{m_{\text{moy part}}}}{C_{\text{bact}}} \simeq \frac{C_{m \text{ part}}}{C_{\text{bact}} \cdot V_{\text{moy part}} \cdot \rho} \simeq \frac{C_{m \text{ part}}}{C_{\text{bact}} \cdot \frac{4\pi r_{\text{moy part}}^3}{3} \cdot \rho}$$

avec $C_{N \text{ part}}$ la concentration en nombre de particules en nombre.L⁻¹, C_{bact} la concentration en nombre de bactérie en nombre.L⁻¹, $C_{m \text{ part}}$ la concentration massique en particules en g.L⁻¹, $m_{\text{moy part}}$ la masse moyenne d'une particule en g, $V_{\text{moy part}}$ le volume moyen d'une particule considérant que c'est une sphère en m³, ρ la densité des particules en g.m⁻³ et $r_{\text{moy part}}$ le rayon moyen d'une particule en cm.

Ainsi pour les nanoparticules anatase : $N_{\text{TiO}_2 \text{ CEA}} \simeq 7085$ particules par bactérie , $N_{\text{TiO}_2 \text{ P25}} \simeq 895$ particules par bactérie et $N_{\text{TiO}_2 \text{ Ana-P}} \simeq 4$ particules par bactérie

Estimation du rapport quantité de surface plane de nanoparticules par surface de bactérie

$$R_S = \frac{S_{\text{part}}}{S_{\text{bact}}} \simeq \frac{N_{\text{part}} \cdot S_{\text{plane/part}}}{S_{\text{bact}}} \simeq \frac{N_{\text{part}} \cdot \pi r_{\text{moy part}}^2}{S_{\text{bact}}}$$

avec S_{part} la surface plane en particules pour une bactérie en µm², S_{bact} la surface d'une bactérie en µm², N_{part} le nombre de particules par bactérie, $S_{\text{plane/part}}$ la surface plane d'une particule en µm² et $r_{\text{moy part}}$ le rayon moyen d'une particule en µm.

Ainsi : $R_{S \text{ TiO}_2 \text{ CEA}} \simeq 0,34$, $R_{S \text{ TiO}_2 \text{ P25}} \simeq 0,17$ et $R_{S \text{ TiO}_2 \text{ Ana-P}} \simeq 0,03$

1. correspond à la quantité de surface que les nanoparticules peuvent couvrir lorsqu'elles sont mises sur un plan

Un rapport quantité de surface plane de nanoparticules par surface de bactérie inférieur à 1 montre qu'il n'y a pas suffisamment de particules pour couvrir entièrement les bactéries.

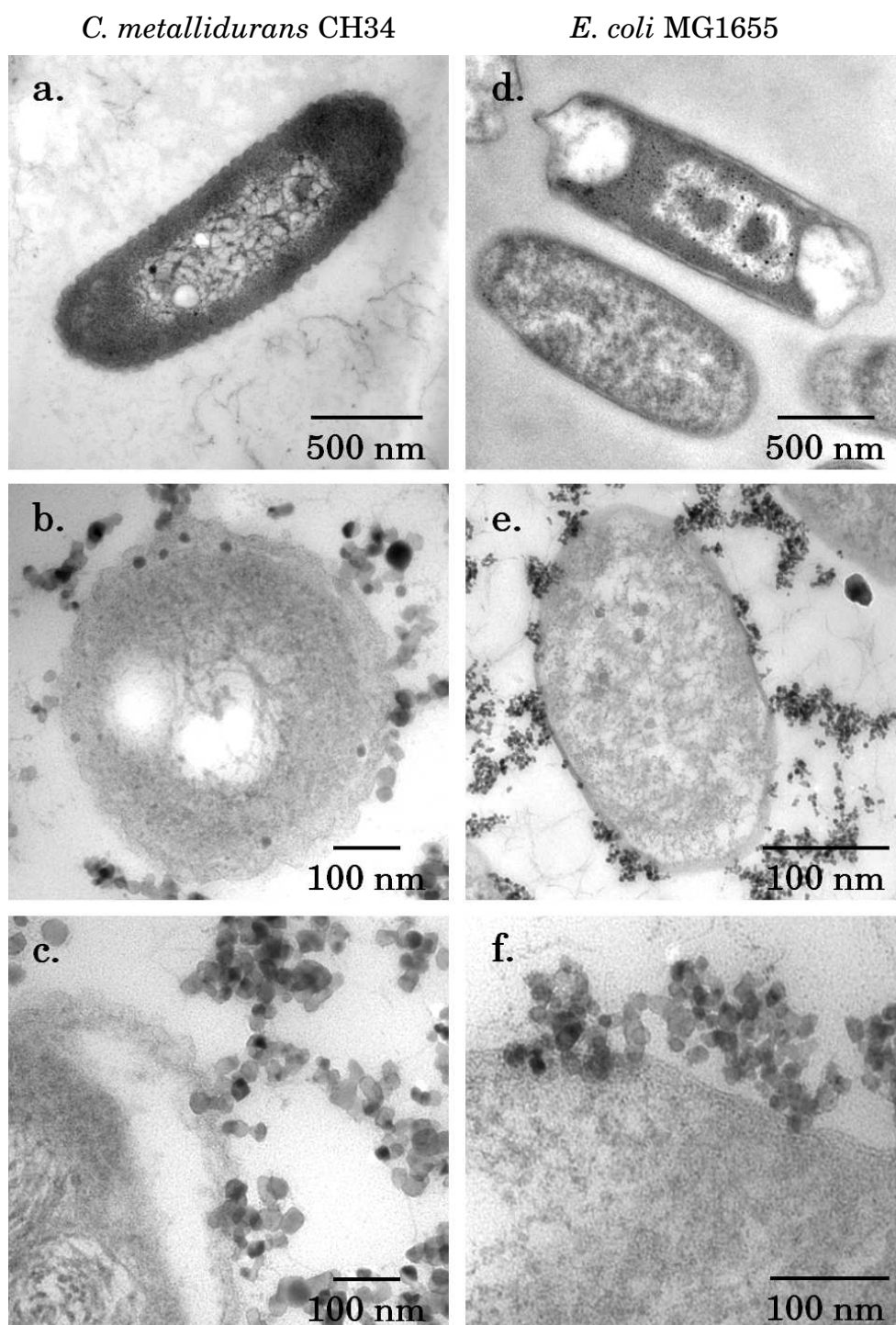


FIGURE 5.3 – Observations microscopiques des bactéries exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules anatases : bactéries non exposées (a. et d.), TiO₂ P25 (b. et c.) et TiO₂ CEA (e. et f.).

Par ailleurs, une pénétration de la paroi bactérienne a été constatée (voir figure 5.3). Les nanoparticules restent en périphérie des bactéries et aucune n'a été observée dans le cytoplasme des cellules. La pénétration a été vérifiée au METB couplé à un détecteur EDS (analyse dispersive en énergie) (voir figure 5.4) : des nanoparticules de TiO_2 ont été détectées en périphérie interne de la bactérie.

En comparaison avec les contrôles non exposés, peu de changements morphologiques ont été observés pour les deux modèles bactériens. Très peu de bactéries mortes ont été remarquées, ce qui n'est pas contradictoire avec les résultats de perte de viabilité obtenus, même pour *E. coli* MG1655 pour qui des effets cytotoxiques ont été constatés. En effet, à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (qui sont les conditions d'expositions pour les observations microscopiques) la viabilité de cette dernière est faible (voir figure 4.8 page 117). De plus, comme pour les NtC, une élévation d'*E.coli* MG1655 a été notée (voir figure 5.2 page 138).

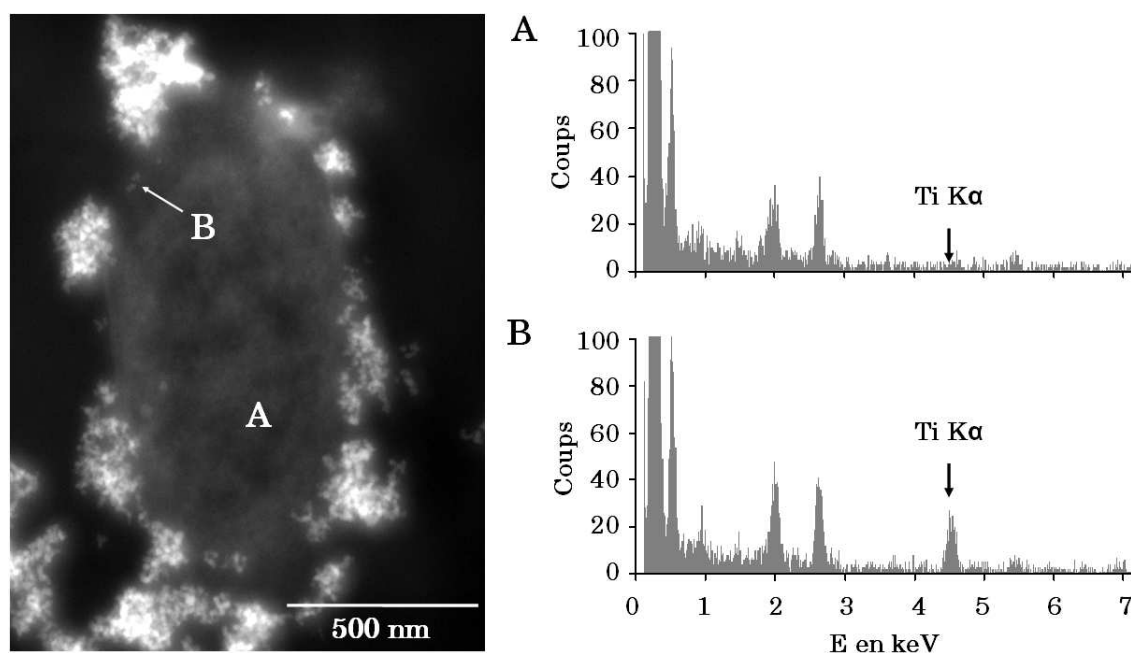


FIGURE 5.4 – Observations microscopiques au METB et analyse EDS d'une coupe d'*E. coli* MG1655 exposée à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules TiO_2 CEA : A. analyse EDS du cytoplasme de la bactérie, B. analyse EDS de particules à l'intérieur de la bactérie.

Particules TiO_2 anatase et nanoparticules TiO_2 rutilés

Contrairement aux nanoparticules de TiO_2 anatase, les particules de TiO_2 anatase et les nanoparticules TiO_2 rut-NP ne pénètrent pas la paroi bactérienne (voir figure 5.5 page suivante). De plus aucune adsorption sur la paroi bactérienne n'a été constatée.

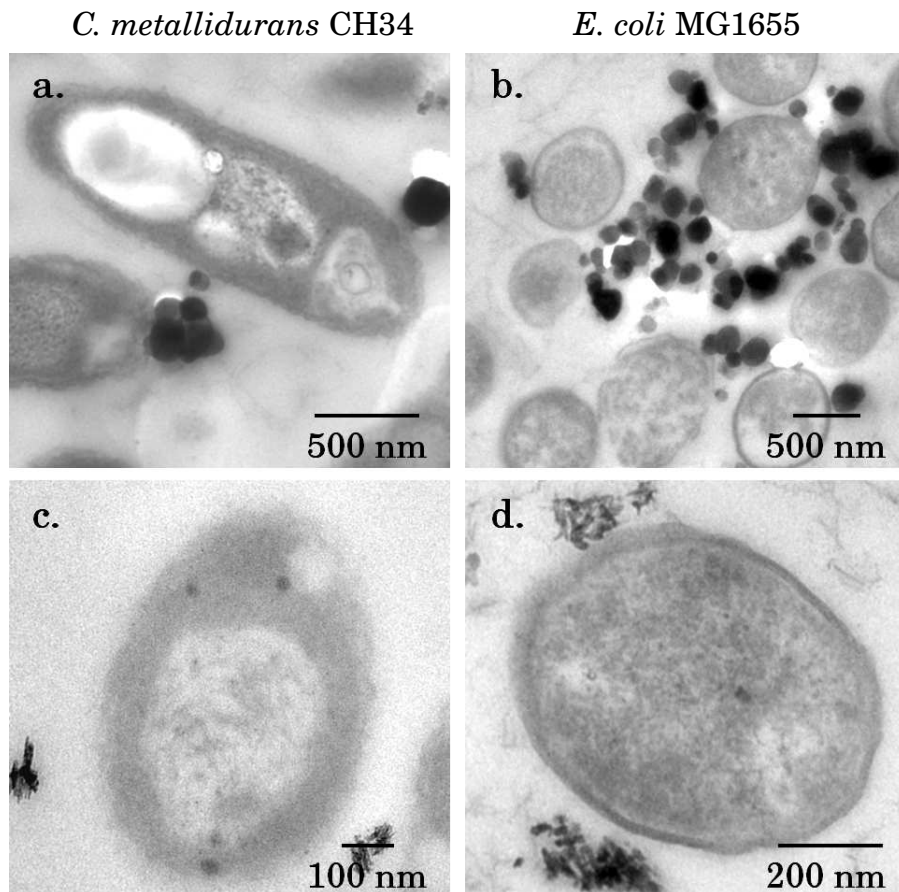


FIGURE 5.5 – Observations microscopiques des bactéries exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de particules anatases et nanoparticules rutilles : TiO_2 ana P (a. et b.) et TiO_2 rut NP (c. et d.)

Nanoparticules Al_2O_3

Les nanoparticules d' Al_2O_3 semblent s'adsorber plus fortement à la paroi bactérienne, ceci pour les deux modèles bactériens (voir figure 5.6 page ci-contre). Peu de modifications morphologiques sont aussi constatées malgré un plus fort effet cytotoxique à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (voir figure 4.8 page 117). Les bactéries mortes ont probablement éclaté et sont donc non visibles. Enfin, une pénétration de la paroi bactérienne sans accumulation dans le cytoplasme est aussi constatée mais elle est moins évidente que pour les nanoparticules de TiO_2 anatase.

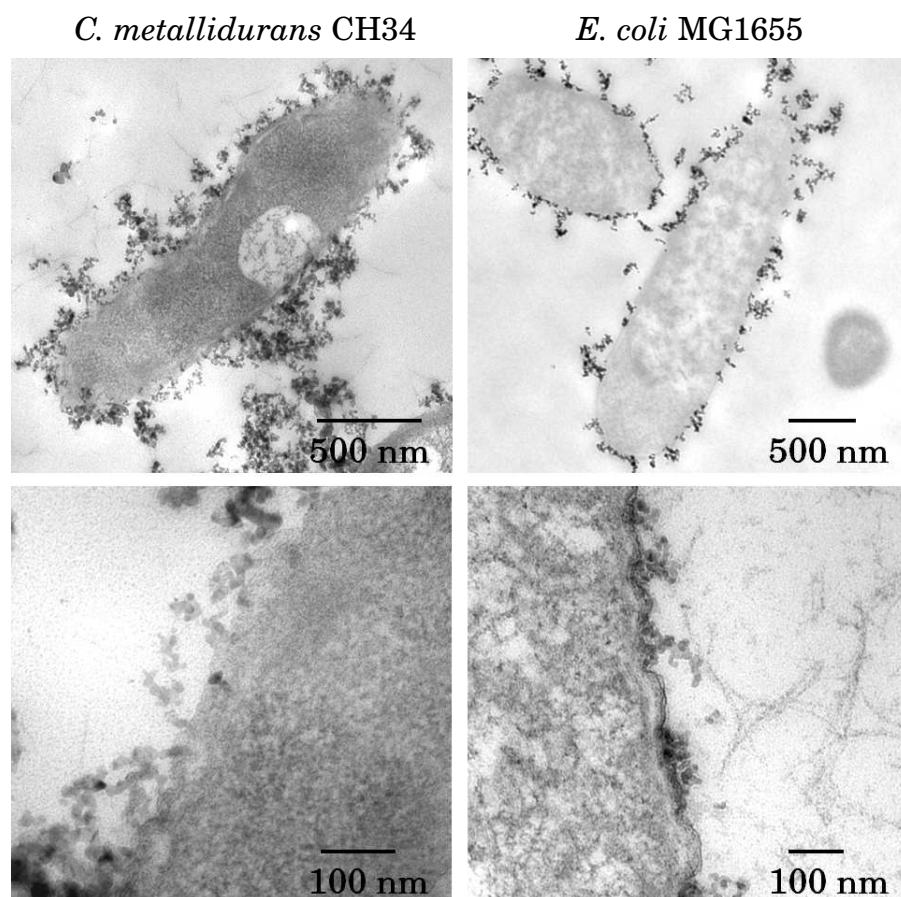


FIGURE 5.6 – Observations microscopiques des bactéries exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules d' Al_2O_3

La pénétration de la paroi a là aussi été vérifiée par cartographie EDS : des nanoparticules d' Al_2O_3 ont été détectées à l'intérieur des bactéries en périphérie (voir figure 5.7).

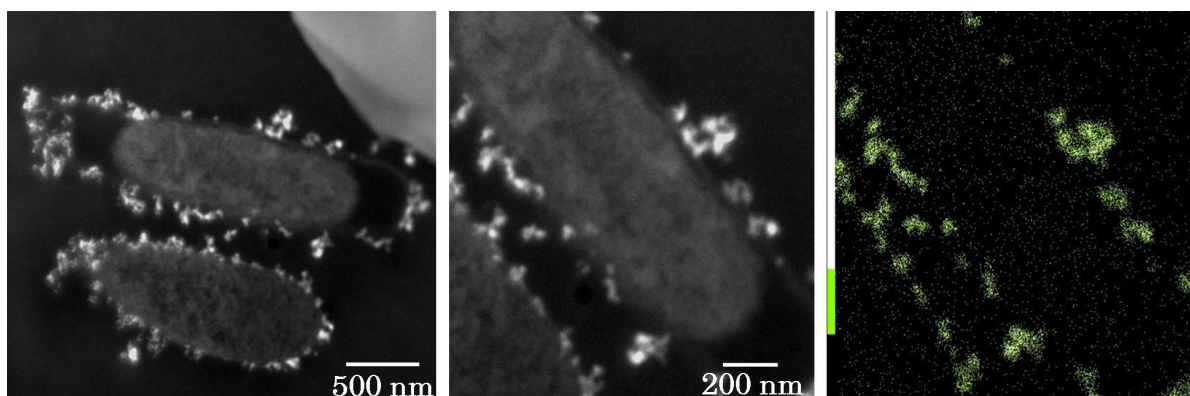


FIGURE 5.7 – Cartographie par EDS d'une coupe d'*E.coli* MG1655 exposée à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules Al_2O_3 . L'aluminium est visualisé en vert, avec pour échelle en noir l'absence d'Al et en blanc de fortes concentrations en Al.

5.2 Observations microscopiques des pneumocytes exposés aux nanoparticules

5.2.1 Interactions avec les nanotubes de carbone

Les cellules ont été exposées pendant 48 h à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NtC. Très peu de modifications morphologiques ont été observées suite à une exposition aux NtC. Les cellules exposées aux NtC contiennent peu de vésicules comme pour le contrôle (voir figures 5.8 a. et 5.9 a. page 146). Le seul changement morphologique observé semble être une altération des mitochondries. En effet, en comparant les coupes des cellules non exposées (voir figure 5.11 a. page 149), les mitochondries des cellules exposées aux NtC semblent avoir moins de crêtes qui sont de plus non parallèles (voir figure 5.8 a. et b.).

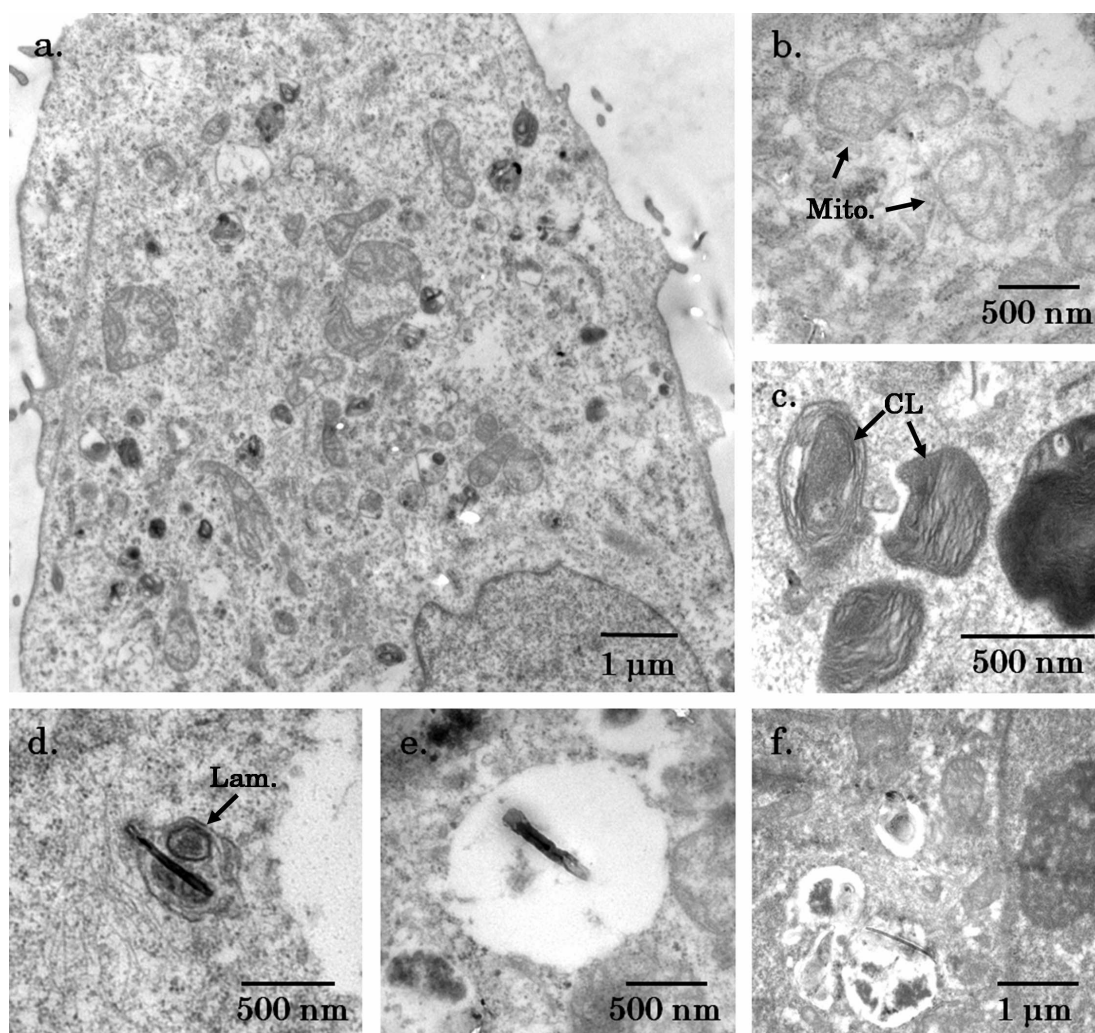


FIGURE 5.8 – Observations microscopiques des cellules A549 exposées à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NtC pendant 48 h. Avec Mito. : mitochondrie, Lam. : lamelles et CL : corps lamellaire.

Une faible quantité de petits NtC a été observée dans des vésicules à l'intérieur de la cellule (voir figure 5.8 d., e. et f.). Ces NtC ont une longueur inférieure à 1 μm . Les vésicules les contenant semblent parfois différentes des corps lamellaires contenant le surfactant (voir figure 5.8 c. et e.) mais dans d'autres cas il y a présence de lamelles (voir figure 5.8 d.).

5.2.2 Interactions avec les nanoparticules d'oxyde métallique

Les cellules ont été exposées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules d'oxyde métallique, puis observées après 6 ou 48 h d'exposition. Quel que soit le temps d'exposition et les caractéristiques des nanoparticules (composition, cristallinité ou taille), une quantité importante de nanoparticules a été observée à l'intérieur des cellules A549, dans des vésicules (voir figure 5.9). Cependant, le nombre de vésicules contenant des nanoparticules est généralement plus important après 48 h qu'après 6 h d'exposition.

La plupart du temps, peu de modifications morphologiques des cellules sont constatées, hormis une diminution du nombre de corps lamellaires² en comparaison avec les cellules non exposées (figure 5.9 a.). Cependant, quelques cellules présentant de fortes modifications morphologiques ont été observées, en particulier avec TiO_2 CEA (figure 5.9 c.). En effet des cellules possédant de grosses vésicules vides avec des nanoparticules en périphérie ont été constatées.

Quelques nanoparticules libres dans le cytoplasme ont aussi été observées (voir figure 5.10) et ceci principalement après 6 h d'exposition et plus rarement après 48 h. Ces nanoparticules sont individualisées ou en petits amas de quelques nanoparticules et apparaissent clairement libres dans le cytoplasme dans certains cas (voir figure 5.10 b.). Dans d'autres cas du matériel biologique plus dense est observé autour de ces nanoparticules (voir figure 5.10 a. et c.), ce qui pourrait correspondre à des extrémités de vésicules et donc à un artefact de coupe.

2. vésicules contenant le surfactant alvéolaire et apparaissant remplies de lamelles

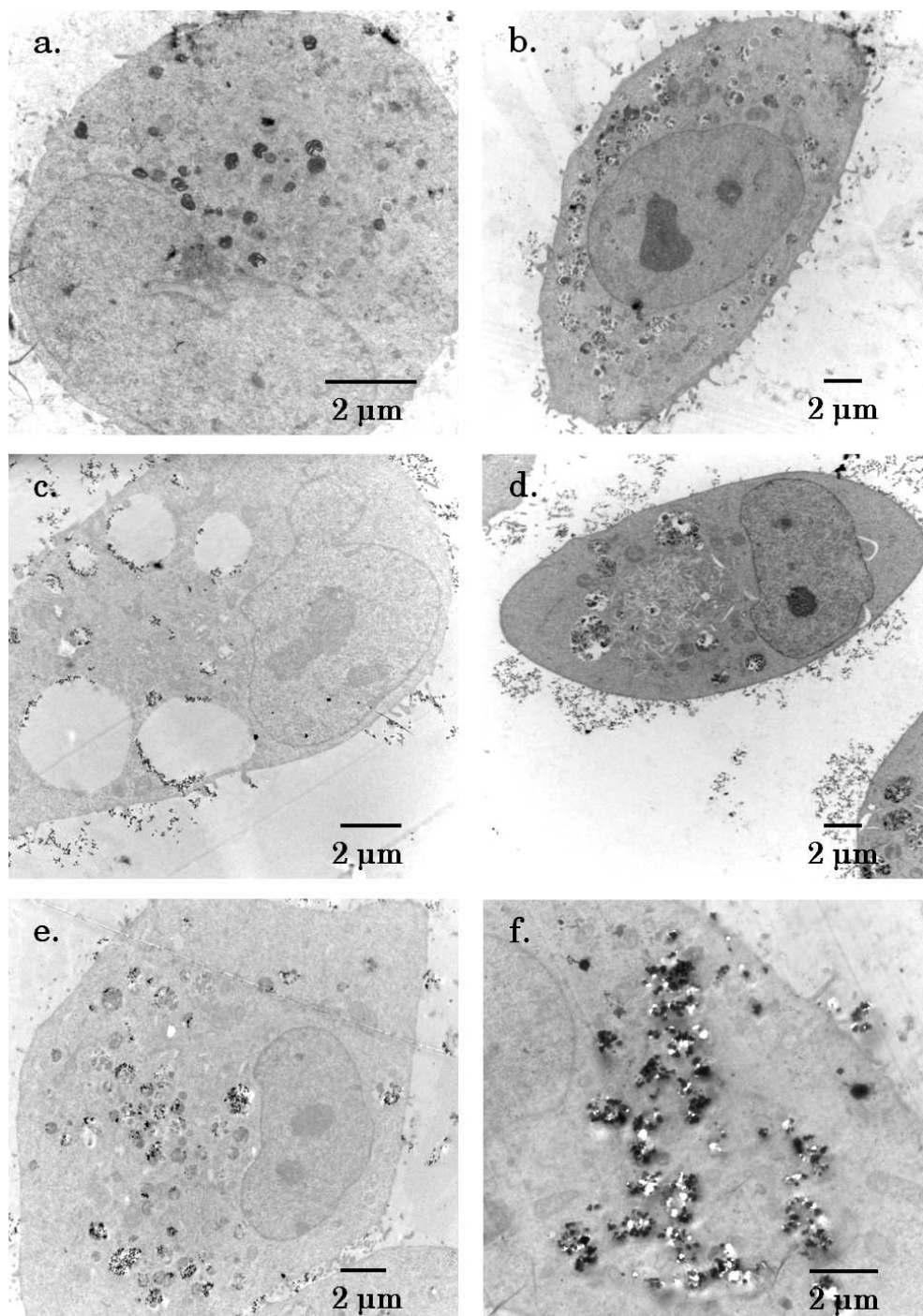


FIGURE 5.9 – Observations microscopiques des cellules A549 exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules d'oxyde métallique : contrôle non exposé (a.), Al_2O_3 à 48 h d'exposition (b.), TiO_2 CEA à 6h (c.) et 48 h (d.), TiO_2 P25 à 48 h (e.) et TiO_2 ana-P à 48 h (f.).

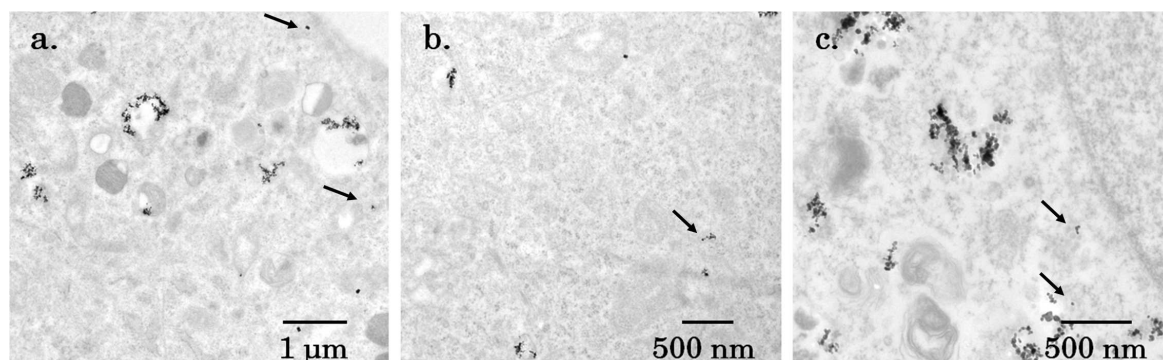


FIGURE 5.10 – Observations microscopiques de nanoparticules d’oxyde métallique libres dans le cytoplasme des cellules A549 (montrées par une flèche) : TiO_2 CEA à 6 h d’exposition (a.), Al_2O_3 à 6 h (b.) et TiO_2 P25 à 48 h (c.).

Les vésicules contenant les nanoparticules ont été observées plus en détails (voir figure 5.11 page 149). Elles ont toutes un diamètre supérieur à 500 nm. Une différence majeure a été constatée entre 6 h et 48 h d’exposition pour toutes les nanoparticules étudiées : les vésicules ont généralement un contenu clair à 6 h et un contenu beaucoup plus dense à 48 h. De ce fait, les vésicules apparaissent le plus souvent différentes des corps lamellaires à 6 h (voir figure 5.11 e.), alors qu’à 48 h des lamelles sont souvent observées dans les vésicules (voir figure 5.11 i. et l.).

L’interaction des nanoparticules avec la membrane plasmique a été observée de plus près afin de mettre en évidence l’endocytose des nanoparticules (voir figure 5.12). La photographie la plus révélatrice (figure 5.12 a.) montre la formation de deux bras de membrane plasmique autour des nanoparticules.

Par ailleurs, aucune adsorption spécifique ne semble constatée. En effet, étant donné que le rapport entre la quantité de surface plane³ de nanoparticules et la surface de cellule est supérieur à 2 (voir calculs page suivante), si il y avait adsorption, elle serait probablement visible sur toute la surface membranaire. Cependant ce n’est peut être plus le cas en raison de l’internalisation des nanoparticules ou ce n’est peut être pas visible puisqu’on se situe en profondeur de la cellule et non à la surface.

Estimation du rapport nombre de nanoparticules par nombre de cellule

On considère ici que toutes les nanoparticules entrent en contact avec les cellules. Cette hypothèse est fondée sur la sédimentation des nanoparticules en raison de leur agglomération dans le milieu de culture.

3. correspond à la quantité de surface que les nanoparticules peuvent couvrir lorsqu’elles sont mise sur un plan

$$R_N = \frac{N_{\text{part}}}{N_{\text{cell}}} = \frac{C_{N \text{ part}} \cdot V_{\text{exp}}}{C_{\text{cell}} \cdot S_{\text{exp}}} \simeq \frac{\frac{C_{m \text{ part}}}{m_{\text{moy part}}} \cdot V_{\text{exp}}}{C_{\text{cell}} \cdot S_{\text{exp}}} \simeq \frac{C_{m \text{ part}} \cdot V_{\text{exp}}}{C_{\text{cell}} \cdot S_{\text{exp}} \cdot V_{\text{moy part}} \cdot \rho} \simeq \frac{C_{m \text{ part}} \cdot V_{\text{exp}}}{C_{\text{cell}} \cdot S_{\text{exp}} \cdot \frac{4\pi r_{\text{moy part}}^3}{3} \cdot \rho}$$

avec N_{part} le nombre de particules, N_{cell} le nombre de cellules, $C_{N \text{ part}}$ la concentration en nombre de particules en nombre.L⁻¹, V_{exp} le volume d'exposition en L, C_{cell} la concentration surfacique en cellules en nombre.cm⁻², S_{exp} la surface de culture en cm², $C_{m \text{ part}}$ la concentration massique en particules en g.L⁻¹, $m_{\text{moy part}}$ la masse moyenne d'une particule en g, $V_{\text{moy part}}$ le volume moyen d'une particule considérant que c'est une sphère en m³, ρ la densité des particules en g.m⁻³ et $r_{\text{moy part}}$ le rayon moyen d'une particule en cm.

Ainsi pour quelques nanoparticules étudiées : $R_{N \text{ TiO}_2 \text{ CEA}} \simeq 3,7.10^7$ particules par cellule, $R_{N \text{ TiO}_2 \text{ P25}} \simeq 4,6.10^6$ particules par cellule et $R_{N \text{ TiO}_2 \text{ Ana-P}} \simeq 2,2.10^5$ particules par cellule

Estimation du rapport quantité de surface plane de nanoparticules par surface de bactérie

$$R_S = \frac{S_{\text{part}}}{S_{\text{cell}}} \simeq \frac{N_{\text{part}} \cdot S_{\text{plane/part}}}{S_{\text{cell}}} \simeq \frac{N_{\text{part}} \cdot \pi r_{\text{moy part}}^2}{S_{\text{cell}}}$$

avec S_{part} la surface plane en particules pour une cellule en µm², S_{cell} la surface d'une cellule⁴ en µm², N_{part} le nombre de particules par cellule, $S_{\text{plane/part}}$ la surface plane d'une particule en µm² et $r_{\text{moy part}}$ le rayon moyen d'une particule en µm.

Ainsi : $R_{S \text{ TiO}_2 \text{ CEA}} \simeq 4,19$, $R_{S \text{ TiO}_2 \text{ P25}} \simeq 2,1$ et $R_{S \text{ TiO}_2 \text{ Ana-P}} \simeq 3,33$

Un rapport quantité de surface plane de nanoparticules par surface de cellule supérieur à 1 montre qu'il y a suffisamment de particules pour couvrir entièrement la surface cellulaire.

4. estimée à 1000 µm²d'après la densité cellulaire qui est d'approximativement 100000 cellules.cm²

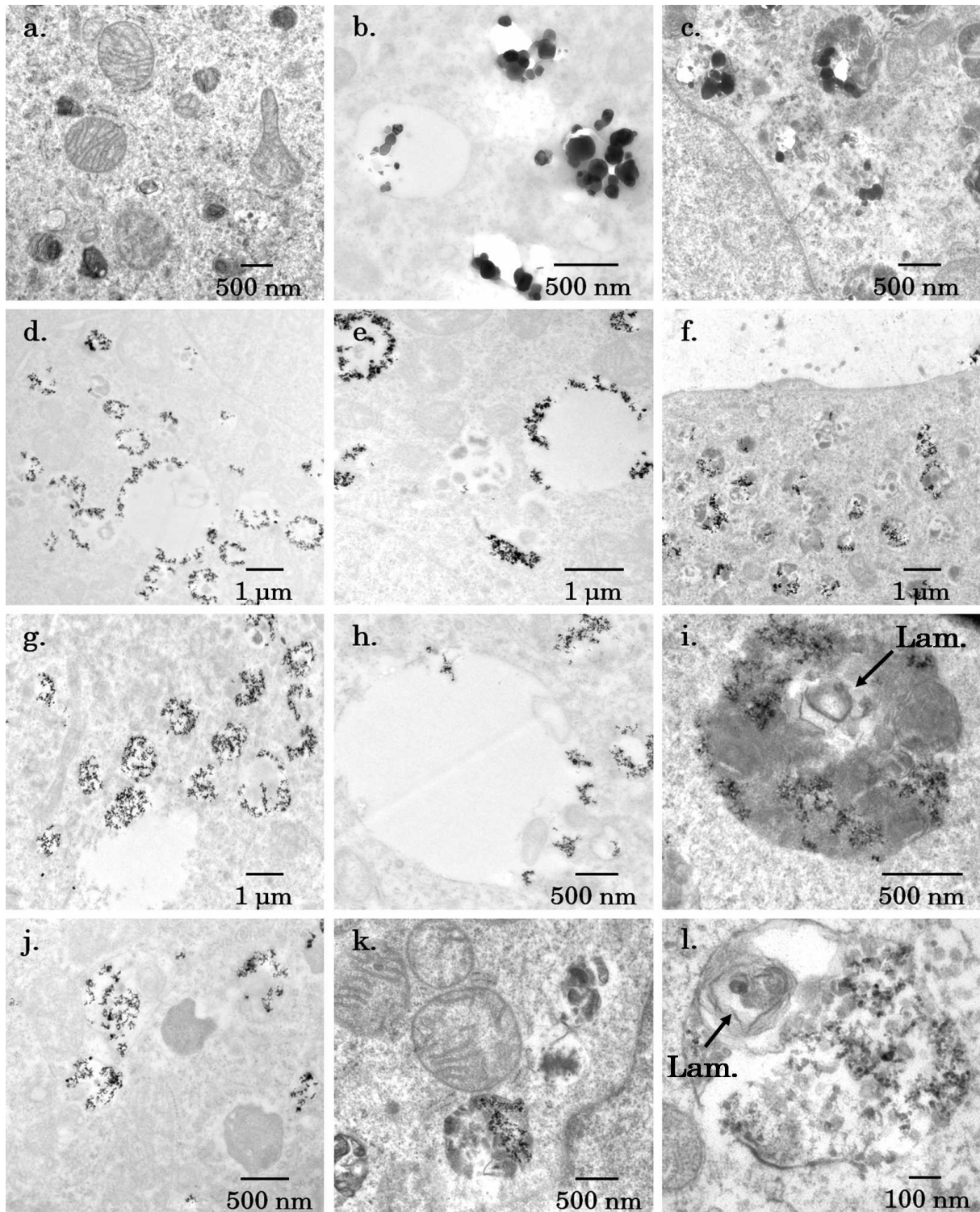


FIGURE 5.11 – Observations microscopiques des vésicules contenant les nanoparticules d'oxyde métallique : contrôle non exposé (a.), TiO_2 ana-P 6 h (b.) et 48 h (c.), TiO_2 P25 à 6 h (d. et e.) et 48 h (f.), TiO_2 CEA à 6 h (g. et h.) et 48 h (i.), Al_2O_3 à 6 h (j.) et 48 h (k. et l.). Avec Lam. : lamelles.

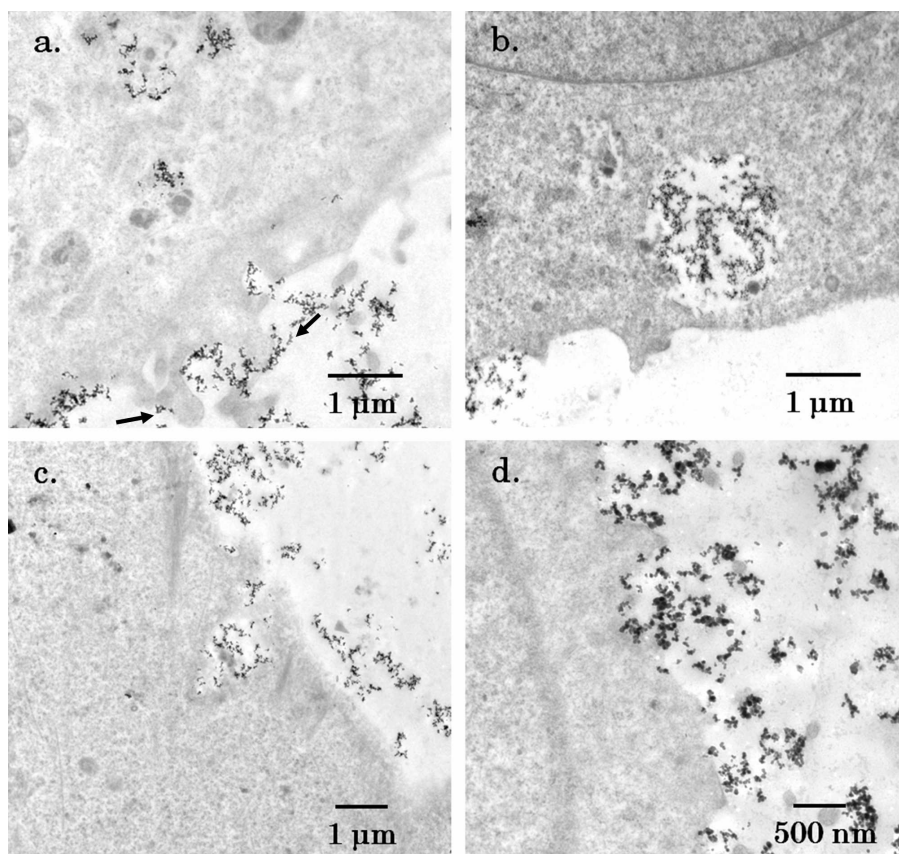


FIGURE 5.12 – Observations microscopiques de l'interaction entre nanoparticules d'oxyde métallique et membrane plasmique : TiO_2 CEA 6 h (a.) et 48 h (b.), TiO_2 P25 à 48 h (c. et d.). Les flèches montrent les bras de membrane.

Enfin, les nanoparticules à l'extérieur des cellules apparaissent en petits amas de maximum quelques centaines de nm de circonférence (voir figure c. et d.). Cela concorde avec les mesures réalisées en SCP dans le milieu DMEM (voir chapitre 3.2.2.2 page 98). Le surfactant alvéolaire ne semble donc pas favoriser une redispersion des nanoparticules au voisinage des cellules.

Nous remarquons aussi que les cellules ne sont pas jointives ce qui peut être le signe que des cellules se sont détachées probablement en raison des effets cytotoxiques que nous avons décrit dans le chapitre précédent.

5.3 Discussion

5.3.1 Une pénétration de la paroi chez les bactéries

Il a été mis en évidence une pénétration des nanoparticules d'oxyde métallique TiO_2 et Al_2O_3 dans la paroi bactérienne. Ce type d'observation avait déjà été constaté pour d'autres types de nanoparticules : les nanoparticules d'Ag (Sondi

and Salopek-Sondi, 2004) et les fullerènes (Tsao et al., 2002). Nous remarquons cependant des différences en fonction des caractéristiques des particules. En effet les particules TiO_2 ana-P, TiO_2 rut-P et TiO_2 rut NP ne pénètrent pas la paroi. Cela met en évidence une influence de la taille puisque les particules de grande taille (TiO_2 ana-P et TiO_2 rut-P) n'arrivent pas à pénétrer, ainsi que de la cristallinité ou forme ou charge étant donné que les TiO_2 rut NP, qui diffèrent aussi par leur forme en épingle et leur charge négative, ne pénètrent pas. Ainsi seules les particules de forme sphérique inférieures à une cinquantaine de nm de diamètre pénètrent.

Aucune nanoparticule n'a été observée dans la bactérie, ce qui laisse penser qu'elles ne passent pas la membrane plasmique pour atteindre le cytoplasme. Par ailleurs il est difficile de voir avec exactitude dans quel compartiment de la paroi les nanoparticules se sont logées : elles peuvent être coincées dans les membranes, ou arrêtées par le peptidoglycane dans l'espace périplasmique, ou encore se loger entre la couche de peptidoglycane et la membrane plasmique (voir figure 5.13). L'épaisseur d'une paroi de bactérie à gram négatif étant de l'ordre de 10 nm (Garrett et al., 2000), la figure 5.3 b. page 140 suggère une pénétration à plus de 10 nm et donc un logement entre la paroi et la membrane plasmique. Mais ceci est beaucoup moins évident sur les autres photographies et reste donc à confirmer.

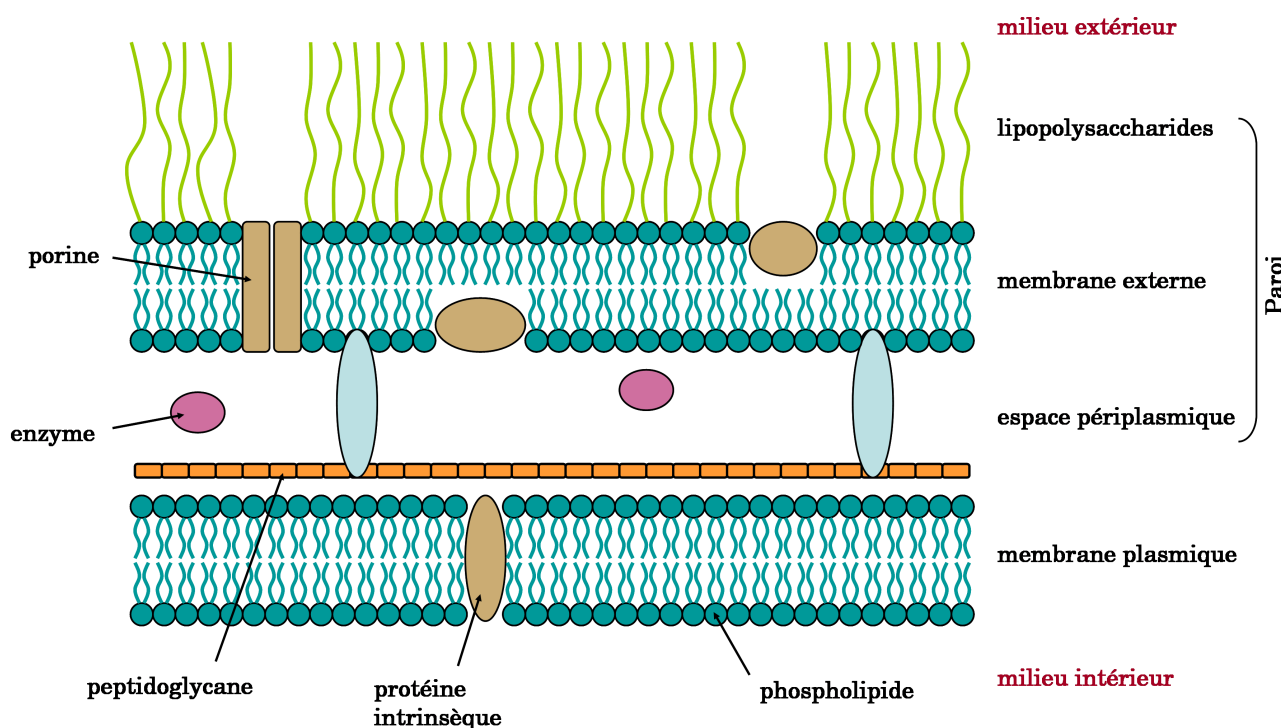


FIGURE 5.13 – Organisation de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif. La membrane plasmique ne fait pas partie de la paroi bactérienne.

Le mécanisme de pénétration des nanoparticules reste à élucider. En effet l'interaction de particules physiques avec la paroi bactérienne n'a été que très peu étudiée et donc leur pénétration dans la paroi bactérienne peu observée. De ce fait, aucune étude poussée n'a encore été menée pour essayer de comprendre comment des particules de plusieurs nm voir dizaines de nm arrivent à pénétrer une paroi rigide.

Plusieurs hypothèses peuvent cependant être formulées. La première serait un passage par des porines non spécifiques⁵ de la paroi, mais les plus grosses porines ayant un diamètre de 2 nm (Garrett et al., 2000), cette explication semble peu probable.

La deuxième hypothèse que nous proposons (voir figure 5.14 A) imagine que les particules sont capables d'exercer une pression mécanique sur la paroi, en raison d'une différence de concentration en osmolytes⁶ de part et d'autre de la membrane, et donc de traverser celle-ci en forçant un passage. Cependant, une mesure de l'osmolalité⁷ des suspensions de nanoparticules a été réalisée (voir annexe 4) et montre qu'elle est très faible. Ainsi les nanoparticules n'exercent aucune pression hyperosmotique et ne peuvent donc passer en force la membrane de cette manière.

La troisième hypothèse (voir figure 5.14 B) serait qu'une particule en contact avec la membrane pourrait produire des ERO et ainsi provoquer des dommages membranaires. Dans le pire des cas des trous dans la membrane seraient formés et permettraient la pénétration des nanoparticules dans le périplasme ou le cytoplasme (Neal, 2008). Les auteurs suggèrent l'importance de la charge de la particule pour qu'elle puisse s'approcher de la paroi et libérer les ERO à son voisinage.

Les bactéries étant chargées négativement (vérifié par mesure du potentiel zêta des bactéries dans l'eau à pH = 5,5 : -86 mV pour *E. coli* MG1655 et -12 mV pour *C. metallidurans* CH34), les particules chargées positivement ont donc une affinité pour la paroi bactérienne. Si on se fie aux mesures du potentiels zêta (voir chapitre 3.1.3 page 92), on se rend compte que ce sont les nanoparticules chargées positivement qui pénètrent la paroi bactérienne. Ainsi c'est peut-être la charge des particules, en complément ou en substitution de leur taille, qui conditionne la pénétration des nanoparticules. De plus cela conforte la troisième hypothèse de mécanisme de pénétration.

5. ne possédant pas de récepteur et permettant un simple tamisage moléculaire

6. particules qui peuvent être osmotiquement actives, c'est à dire qui sont l'origine de l'osmose

7. mesure du nombre de osmoles de soluté par kilogramme de solvant

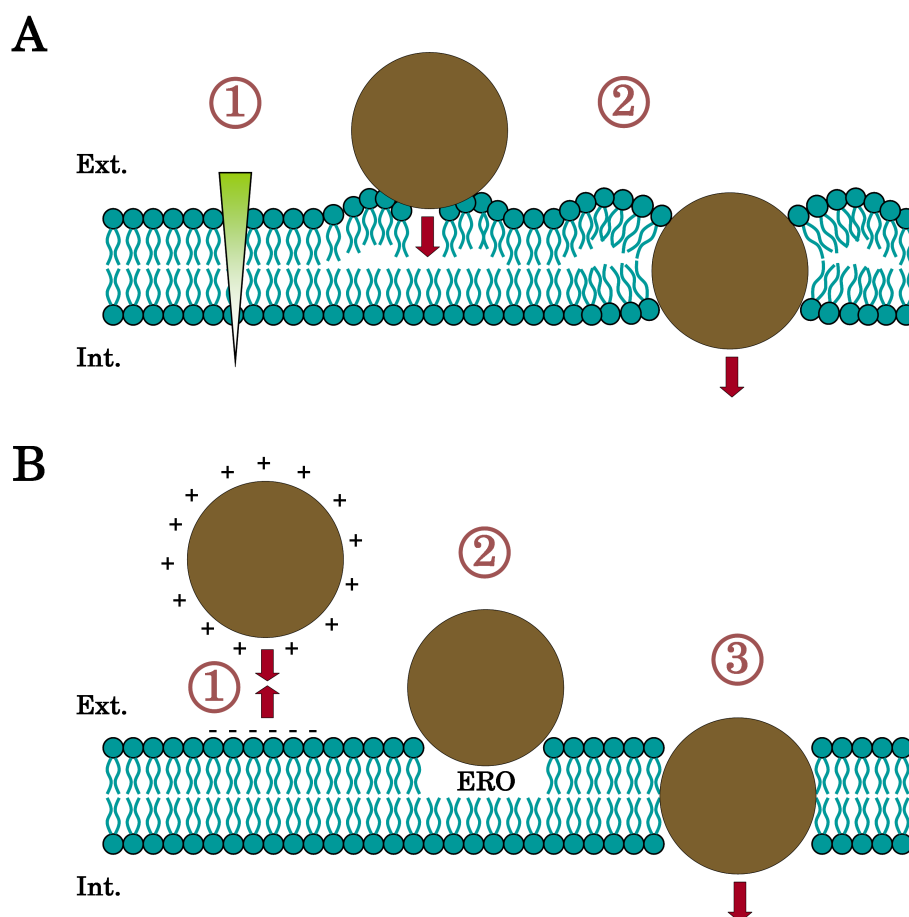


FIGURE 5.14 – Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries. Hypothèse du passage mécanique (A) : en imaginant une différence de concentration en nanoparticules exerçant une pression (1), les nanoparticules forcent le passage pour aller du compartiment le plus concentré au moins concentré. Hypothèse du passage par détérioration de la membrane externe (B) (d'après Neal, 2008) : une particule chargée positivement peut se coller sur la bactérie chargée négativement (1), en imaginant que ces particules sont capables de produire des ERO (2) l'une des conséquences possibles est une détérioration de la membrane externe et une formation de puits permettant le passage des nanoparticules.

Enfin, il a été mis en évidence que la capacité à pénétrer la paroi est en relation directe avec les effets cytotoxiques observés chez *E. coli* MG1655 (voir chapitre 4.1.2.2 page 115). Ainsi seules les nanoparticules pénétrant la paroi de la bactérie ont un effet cytotoxique. Il se pourrait donc que cet effet soit dû à une perturbation de la membrane plasmique qui aurait pour conséquence un dysfonctionnement de la bactérie. *C. metallidurans* CH34 serait donc alors moins sensible à ces perturbations puisqu'aucun effet cytotoxique n'a été observé malgré une pénétration.

5.3.2 Une accumulation cellulaire dans les pneumocytes, non dépendante du type de nanoparticule

Tous les nanoparticules étudiées sont accumulées dans les pneumocytes II A549, l'internalisation étant beaucoup plus massive pour les nanoparticules d'oxyde métallique que pour les NtC. Cela avait déjà été montré pour les nanoparticules TiO_2 sur ce modèle cellulaire (Singh et al., 2007; Stearns et al., 2001) ou pour d'autres modèles cellulaires (Long et al., 2006; Peters et al., 2004; Xia et al., 2006) mais pas pour les nanoparticules Al_2O_3 . Les NtC ont aussi été montrés internalisés mais uniquement dans des macrophages (Bussy et al., 2008; Pulskamp et al., 2007) ou des lymphocytes (Dumortier et al., 2006).

Puisqu'aucune différence n'a été observée entre les différentes particules, les caractéristiques telles que la taille, la nature de l'oxyde métallique ou la cristallinité n'influencent pas l'internalisation des nanoparticules d'oxyde métallique. Cette conclusion est enrichie par différentes études montrant une accumulation de nanoparticules de TiO_2 de différentes tailles (Stearns et al., 2001; Singh et al., 2006; Long et al., 2006; Peters et al., 2004), et une étude montrant l'internalisation de nanoparticules de Fe_2O_3 (Auffan et al., 2006). Au contraire, la taille des NtC semble avoir une influence sur leur accumulation, puisque seuls les NtC inférieurs à 1 μm de longueur ont été observés dans les cellules.

Les nanoparticules sont essentiellement localisées dans des vésicules qui sont probablement des vésicules d'endocytose. Cependant pour la première fois des nanoparticules isolées dans le cytoplasme ont aussi été observées, mais en faible proportion par rapport aux nanoparticules endocytées. Etant isolées, elles ne proviennent probablement pas de l'éclatement de vésicules mais plutôt d'une simple diffusion à travers la membrane ou de la formation de puits dans la membrane.

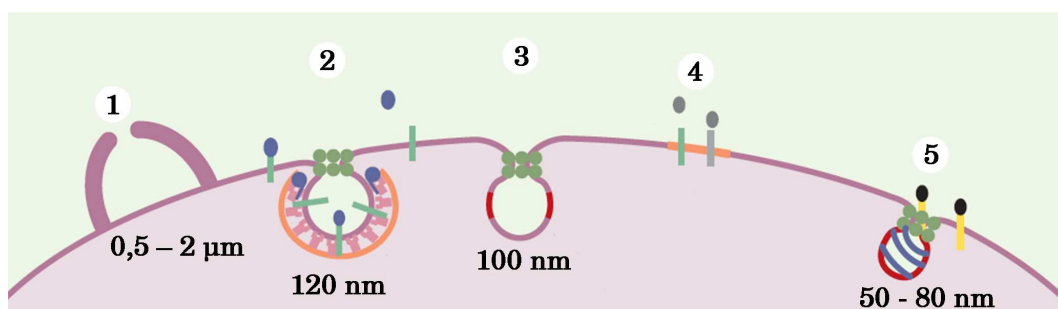


FIGURE 5.15 – Les différentes voies d'endocytose (Benmerah and Lamaze, 2002) : la macropinocytose (1), l'endocytose classique dépendante de la clathrine (2), l'endocytose non dépendante de la clathrine ou endocytose à vésicules lisses (3), les microdomaines (4) et les cavéoles (5).

Les vésicules contenant les nanoparticules ayant un diamètre supérieur à 120 nm, il ne s'agirait pas d'une endocytose classique dépendante de la clathrine mais plutôt d'une macropinocytose caractérisée par des vésicules de diamètre compris entre 0,5 et 2 μm de diamètre (voir figure 5.15). Il est connu que les pneumocytes II et en particulier les cellules A549 sont capables d'endocyter de grosses particules par cette voie (Couzinet et al., 2000; Wasylanka and Moore, 2002) qui n'est donc pas spécifique des macrophages. L'hypothèse de la macropinocytose est étayée par la figure 5.12 a. page 150 qui montre des bras de membrane à l'extérieur de la cellule entourant des nanoparticules. Ces bras sont spécifiques de la macropinocytose, à l'inverse de l'invagination de la membrane pour les autres voies.

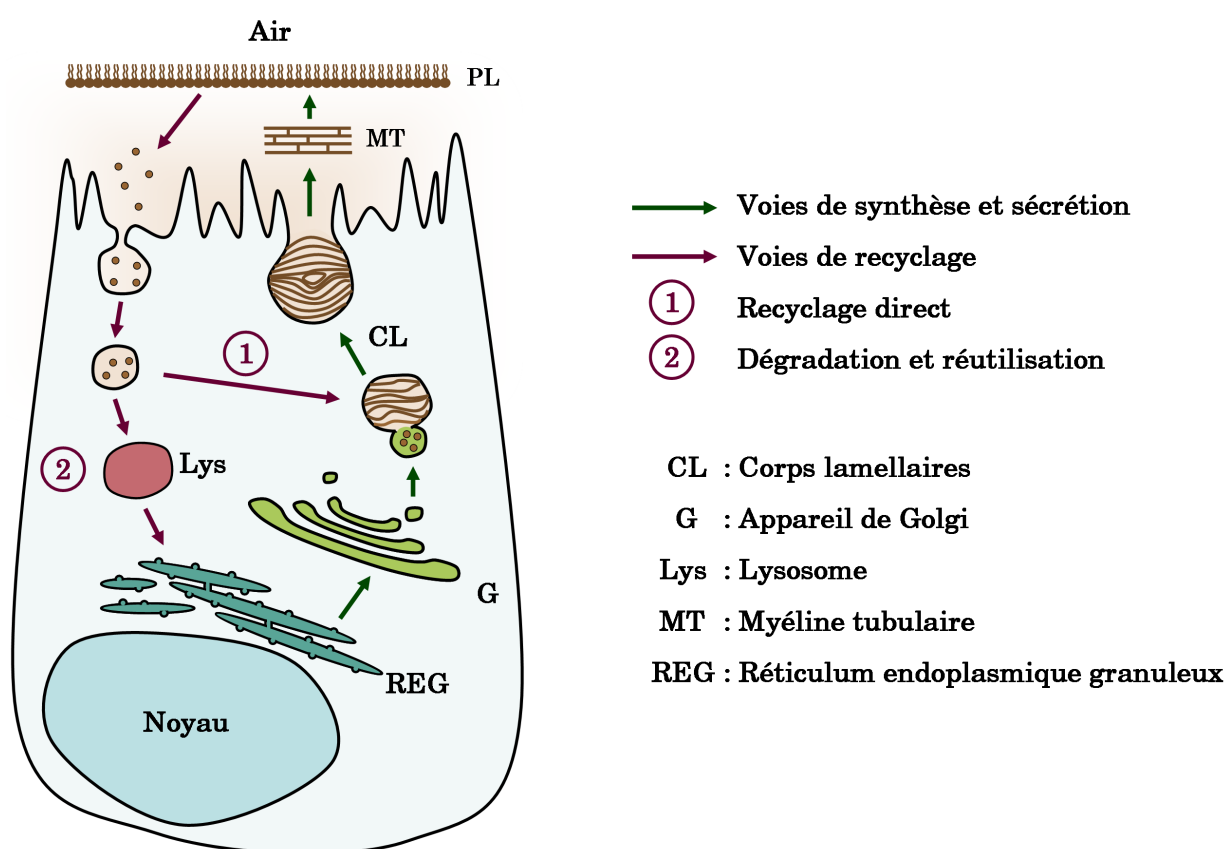


FIGURE 5.16 – Synthèse et recyclage du surfactant alvéolaire. Deux voies sont possibles : une voie de recyclage directe par réinjection dans les corps lamellaires (1) et une voie de recyclage indirecte passant par une digestion du surfactant et une réutilisation des substrats obtenus (2).

Le devenir des vésicules contenant les nanoparticules dans les cellules est incertain. Une évolution du contenu a été constaté entre 6 h et 48 h d'exposition, avec la présence d'un contenu dense au temps le plus long. Il s'agit probablement de lysosomes qui ont un contenu dense (Cross and Mercer, 1995) mais cela reste à vérifier. Par ailleurs il est impossible de dire si les vésicules sont par la suite exo-

cytées ou stockées dans la cellule. Cependant le contenu étant très dense et leur nombre étant plus important à 48 h, cela laisse penser qu'elles restent dans les cellules.

Des lamelles caractéristiques des corps lamellaires ayant été observées dans les vésicules contenant les nanoparticules, il est possible que les nanoparticules soient prises au moins partiellement dans le cycle de recyclage du surfactant. Nous avons élaboré le schéma 5.16 page précédente le représentant. N'ayant pas observé de nanoparticules dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de golgi, il est possible qu'elles empruntent la voie du recyclage directe ou s'arrêtent au stade du lysosome. Une perturbation du cycle du surfactant a par ailleurs été constatée puisque moins de vésicules contenant le surfactant ont été observées en présence de nanoparticules. Ce type de perturbation pourrait provoquer des pathologies alvéolaires.

5.4 Synthèse du chapitre

Chapitre 5

La localisation cellulaire des nanoparticules

• **Les nanoparticules pénètrent la paroi bactérienne** des deux modèles bactériens. Seules les particules sphériques de taille nanométrique sont capables de le faire : il y a donc un effet de la taille. Pour *E. coli* MG1655, la capacité à pénétrer la paroi est donc directement corrélée à l'observation d'effets cytotoxiques. L'hypothèse avancée la plus probable pour expliquer cette pénétration est un passage de la paroi par attraction des nanoparticules chargées positivement sur la paroi chargée négativement, puis endommagement de cette dernière par formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Les nanoparticules n'étant pas observées dans le cytoplasme, il est possible que ce soit une perturbation de la membrane qui soit à l'origine des effets cytotoxiques observés. La différence entre les deux bactéries pouvant s'expliquer par une meilleure résistance de *C. metallidurans* CH34 à ce genre de stress.

Par ailleurs, une adsorption des bactéries sur les NtC a été constatée.

• **Chez les cellules A549, toutes les nanoparticules d'oxyde métallique et les NtC sont accumulés essentiellement dans des vésicules.** Cette accumulation a lieu dès 4 h d'exposition et est beaucoup plus prononcée pour les nanoparticules, quelle que soit leur taille, que pour les NtC où seuls les NtC les plus courts (< 1 µm de longueur) ont été observés dans les cellules. Ainsi **une influence de la taille des NtC** sur leur accumulation est constatée.

La nature de ces vésicules a été discutée : il s'agit probablement de vésicules de macropinocytose en raison de leur taille. Par ailleurs il est possible qu'une partie de ces vésicules soit prise dans le cycle de recyclage du surfactant et qu'une partie soit maturée en lysosomes. Enfin le devenir de ces vésicules apparaît incertain mais aucun signe d'exocytose n'a été observé, et au vu du nombre de vésicules présentes dans les cellules après 48 h d'exposition, les nanoparticules semblent plutôt être stockées dans les cellules.

Occasionnellement quelques nanoparticules isolées dans le cytoplasme ont été observées en particulier à 4 h d'exposition, pouvant soit provenir d'une internalisation cellulaire par diffusion simple à travers la membrane ou par pinocytose, soit d'un relargage depuis les vésicules de macropinocytose décrites précédemment.

Mécanismes d'action des nanoparticules

6.1 Nanoparticules et stress oxydant	161
6.2 Nanoparticules et génotoxicité	166
6.3 Discussion	171
6.4 Synthèse du chapitre	178

En raison de leur réactivité de surface, les nanoparticules sont suspectées et ont parfois été démontrées comme étant capable d'induire la production d'espèce réactives de l'oxygène (ERO) et de provoquer un stress oxydant pour la cellule (Foucaud et al., 2007; Garza et al., 2008; Long et al., 2006). Il s'agit donc actuellement d'une des principales hypothèses pour expliquer leur mode d'action dans la cellule. Par ailleurs, si il y a stress oxydant, il est possible que ce stress soit à l'origine d'une génotoxicité. Dans ce chapitre sera donc tout d'abord regardé la capacité des nanoparticules à induire un stress oxydant chez les cellules A549 et dans un second temps seront décrits leurs effets génotoxiques.

6.1 Nanoparticules et stress oxydant

6.1.1 Le stress oxydant et les mécanismes de régulation de ce stress

Une conséquence de la vie en aérobie et de la respiration cellulaire est la formation spontanée et aléatoire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Il s'agit d'intermédiaires réduits de l'oxygène tels que les espèces radicalaires $O_2^{\bullet -}$ (anion superoxide) et $HO^{\bullet}$ (radical hydroxyle) ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces ERO peuvent être nocifs pour la cellule, en particulier le radical hydroxyle qui est très réactifs contrairement aux autres ERO citées. C'est pourquoi les cellules mettent en oeuvre différentes stratégies afin de contrôler leur niveau d'ERO intracellulaires. La première met en oeuvre des composés antioxydants tels que les vitamines E et C ou le coenzyme Q qui piègent les radicaux et en captent leurs électrons célibataires, les transformant en molécules ou ions stables. La seconde stratégie utilisée fait intervenir des systèmes enzymatiques qui visent la destruction des radicaux superoxydes et peroxydes (voir figure 6.1).

Dans des conditions nocives pour la cellule, comme par exemple en présence de substances chimiques, il peut y avoir une surproduction d'ERO intracellulaires. Les systèmes de régulation sont donc dépassés et une partie des radicaux libres sont alors non consommés : la cellule subit alors un stress oxydant. Lors de ce stress, les radicaux libres non consommés provoquent des lésions directes sur les molécules biologiques (protéines, lipides, ADN), mais aussi des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. A terme cela peut provoquer la mort cellulaire.

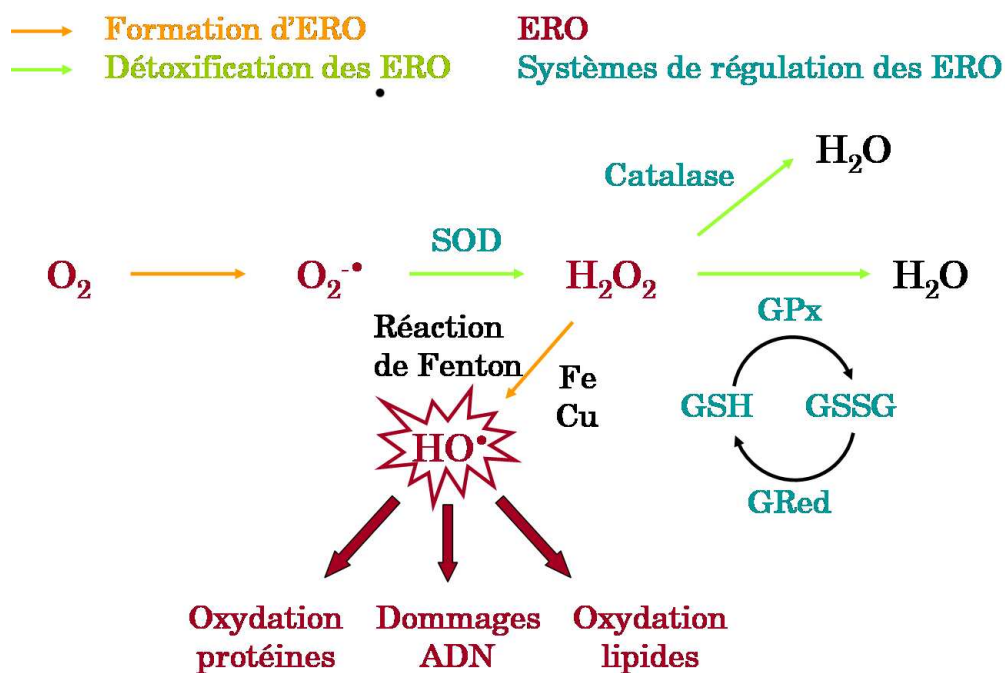


FIGURE 6.1 – Les principales voies de formation et de détoxification des ERO chez les cellules eucaryotes. Avec $O_2^{\bullet -}$: anion superoxyde, $HO^{\bullet}$: radical hydroxyle, SOD : superoxide dismutase, GPx : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé et GRed : glutathion reductase.

En pratique, le stress oxydant peut être visible par une activation des systèmes de régulation afin de contrer la surproduction d'ERO ce qui se traduit par une augmentation des activités enzymatiques ou de la concentration en glutathion total, ou au contraire par une désactivation des systèmes qui peut être l'origine ou une conséquence indirecte du stress oxydant.

6.1.2 Stress oxydant induit dans les pneumocytes

6.1.2.1 Dosage des espèces réactives de l'oxygène intracellulaires

Ce dosage a été réalisé par la technique utilisant la sonde $H_2DCF-DA$ qui entre passivement dans la cellule où elle est clivée avant de réagir avec les ERO pour devenir fluorescente. A 4 h d'exposition (voir figure 6.2 a.), la plupart des nanoparticules étudiées induisent la formation d'ERO intracellulaires. Seuls les NtC long sans fer n'ont pas d'effet alors qu'en présence de NtC contenant du fer, une production d'ERO est constatée. Par ailleurs cette production d'ERO n'est pas significativement dépendante de la concentration (résultats non montrés), excepté pour les NtC Fe long (entre 50 et $100 \mu g.mL^{-1}$), TiO_2 P25 (entre toutes les concentrations) et TiO_2 rut-NP (entre 10 et $50 \mu g.mL^{-1}$). De même, elle n'est pas signi-

ficativement différente entre les différentes nanoparticules d'oxyde métallique, mis à part pour TiO_2 P25 à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et TiO_2 rut-NP à 50 et $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

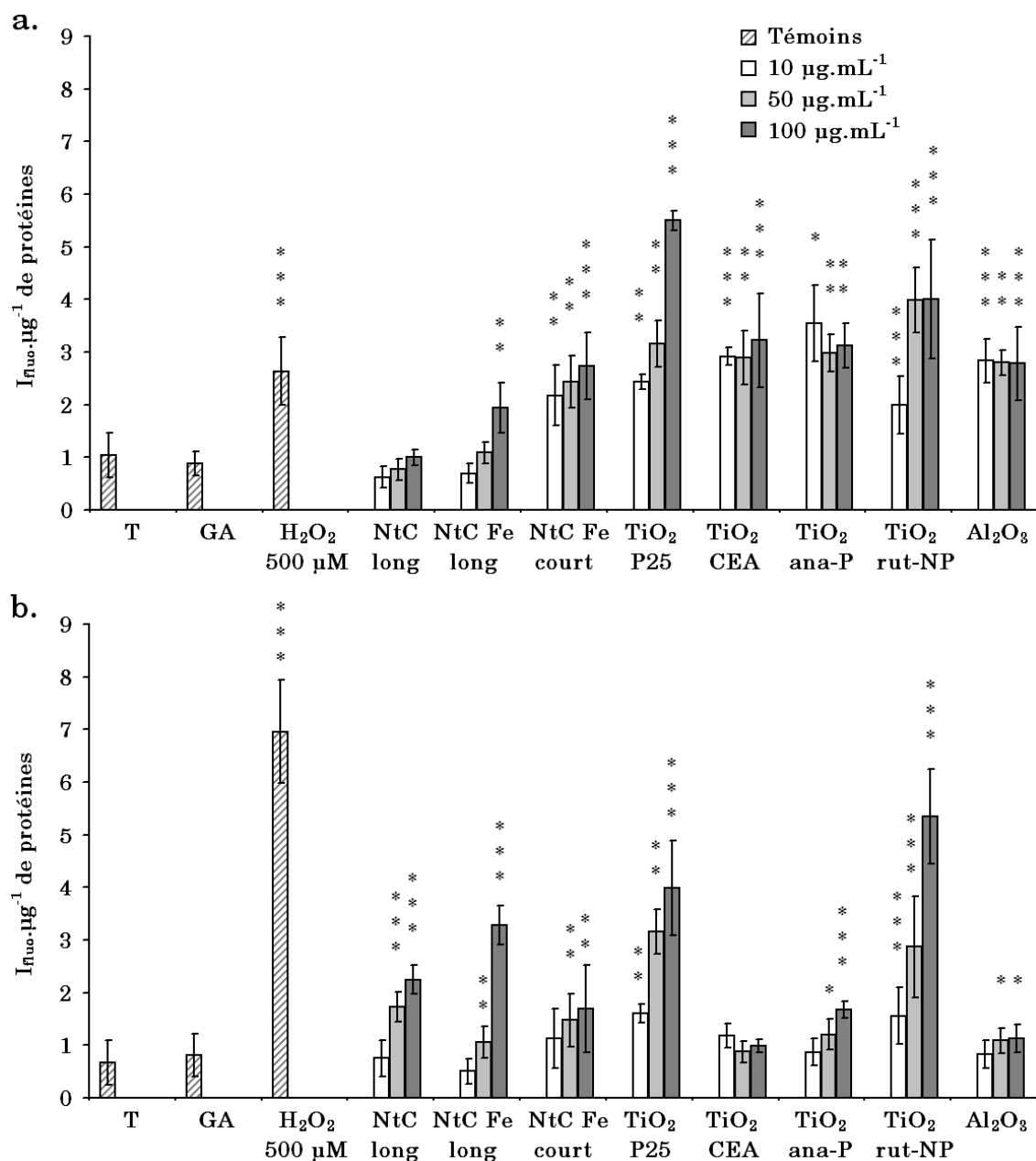


FIGURE 6.2 – Dosage des ERO intracellulaires par la sonde H₂DCF-DA suite à une exposition des cellules A549 aux nanoparticules pendant 4 h (a.) et 24 h (b.). Expression en fonction de la concentration massique en nanoparticules. La significativité des différences entre les moyennes des échantillons exposés et le contrôle non exposé a été évaluée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)

A 24 h d'exposition (voir figure 6.2 b.), tous les NtC induisent une production d'ERO en quantité similaire, tandis que des différences sont constatées entre les nanoparticules d'oxyde métallique. En effet, seules les cellules exposées aux na-

nanoparticules de TiO_2 P25, TiO_2 rut-NP et dans une moindre mesure TiO_2 ana-P, contiennent des ERO. Enfin, la production d'ERO est significativement dépendante de la dose pour les nanoparticules ayant un effet.

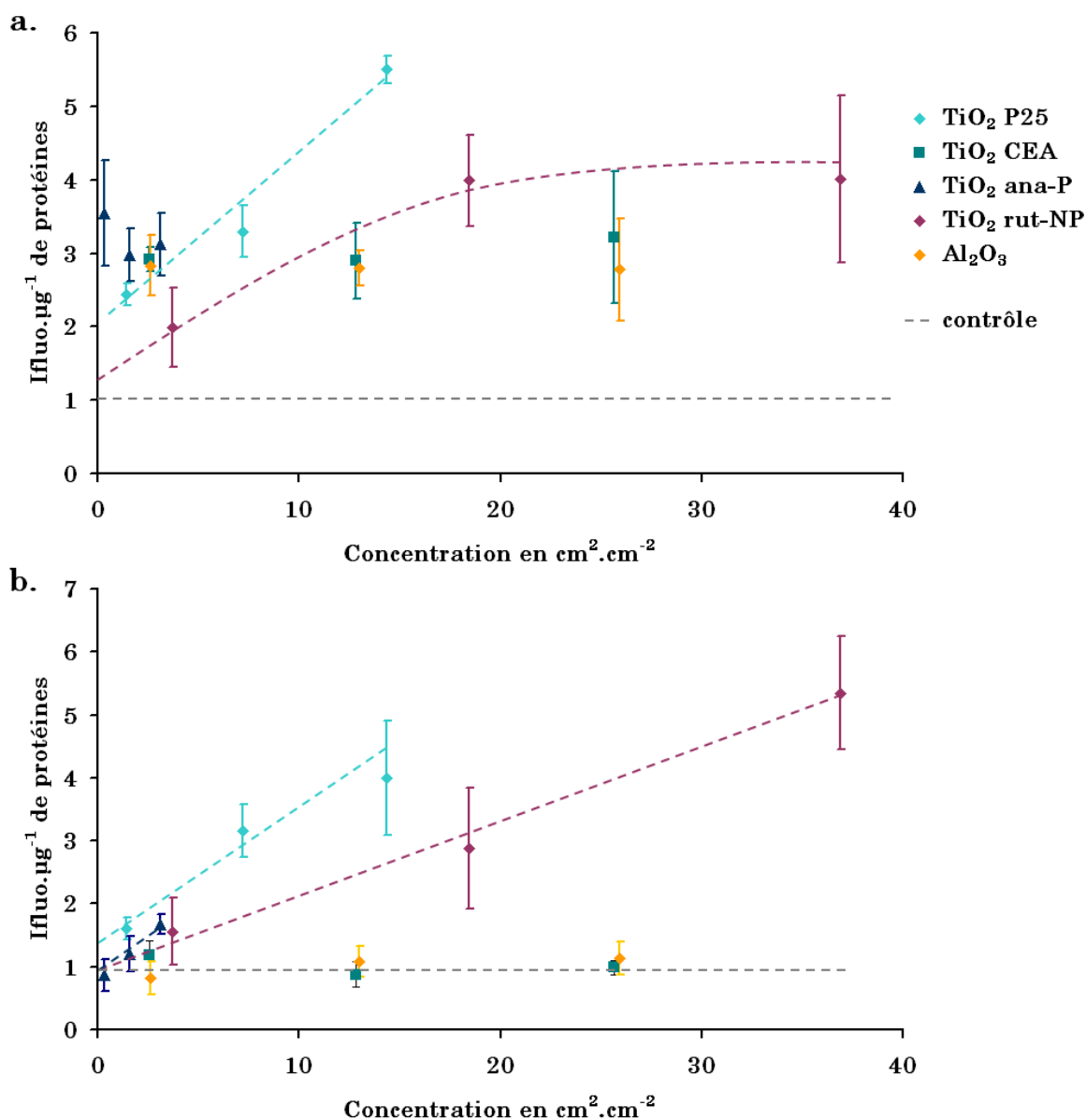


FIGURE 6.3 – Dosage des ERO intracellulaires par la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ suite à une exposition des cellules A549 aux nanoparticules d'oxyde métallique pendant 4 h (a.) et 24 h (b.). Expression en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules.

Lorsque les concentrations en nanoparticules sont exprimées en quantité de surface de nanoparticules par surface de cellules (voir figure 6.3), on remarque que la quantité d'ERO est directement proportionnelle à la quantité de surface en nanoparticules pour TiO_2 P25 à 4 et 24 h, TiO_2 ana-P et TiO_2 rut-NP uniquement à 24 h. A 24 h d'exposition, pour une même concentration surfacique en nano-

particules, la capacité à provoquer une production d'ERO peut être classée de la manière suivante : TiO_2 P25 > TiO_2 ana-P > TiO_2 rut-NP >> TiO_2 CEA = Al_2O_3 = 0.

6.1.2.2 Dosage des systèmes intervenant dans la régulation du stress oxydant

La réponse des cellules au stress oxydant induit par les nanoparticules a été regardée par dosage de différents systèmes intervenant dans sa régulation : les enzymes catalase, SOD, GRed et GPx, ainsi que le glutathion intracellulaire total (GSH). Dans nos conditions de dosage aucune activité de la catalase ou de la GPx n'a été détectée que ce soit pour nos contrôles négatifs et positifs ou nos conditions d'expositions aux nanoparticules. Celles-ci sont estimées inférieures à 2 U.mg^{-1} de protéines pour la catalase et $0,02 \text{ U.mg}^{-1}$ de protéines pour la GPx.

En ce qui concerne les autres systèmes de régulation, ceux-ci ont été dosés après 4 h et 24 h d'exposition aux nanoparticules (voir figure 6.4). Peu de variations significatives ont été notées, mais la validité de ce mode d'estimation de réponse est remise en cause dans ces conditions, étant donné la difficulté à obtenir des témoins positifs. Cependant on peut noter une diminution significative de l'activité de la SOD suite à une exposition pendant 24 h aux nanoparticules Al_2O_3 et une augmentation du glutathion intracellulaire total suite à une exposition de 24 h aux NtC contenant du fer (que ceux-ci soient longs ou courts).

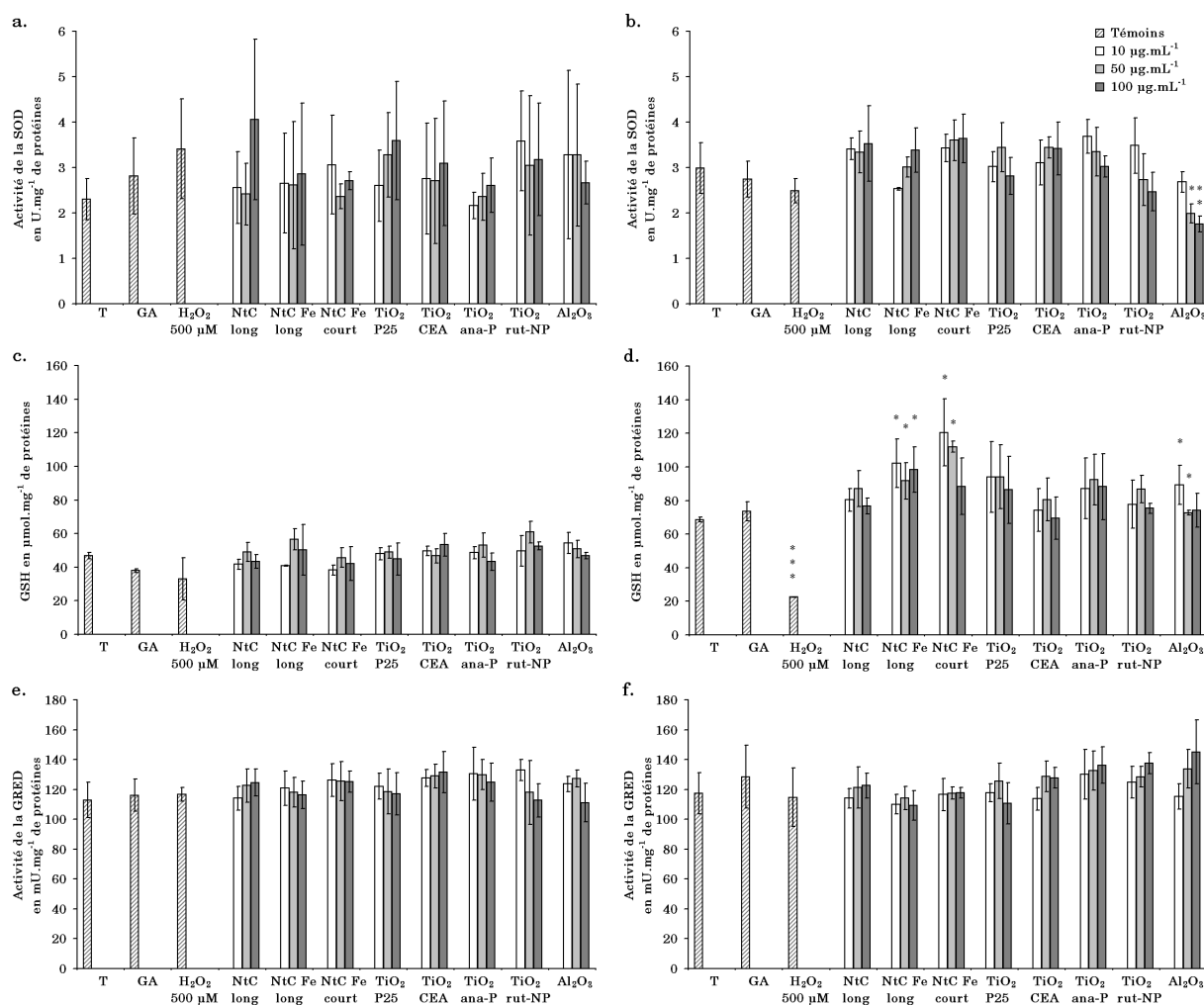


FIGURE 6.4 – Dosage des systèmes intervenant dans la régulation du stress oxydant dans les cellules A549 exposées aux nanoparticules : activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) à 4 h (a.) et 24 h (b.), concentration intracellulaire en glutathion total à 4 h (c.) et 24 h (d.) et activité enzymatique de la glutathion réductase (GRED) à 4 h (e.) et 24 h (f.). La significativité des différences entre les moyennes des échantillons exposés et le contrôle non exposé a été évaluée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)

6.2 Nanoparticules et génotoxicité

Il est peu probable que les nanoparticules aient un effet génotoxique par contact direct avec l'ADN puisque nous n'avons pas observé de nanoparticules dans le noyau. Cependant, nous avons vu que les nanoparticules induisent la production d'ERO intracellulaires qui sont à l'origine d'un stress oxydant dans les cellules. Or ce stress oxydant peut induire des modifications de l'ADN si il n'est pas géré à temps par la cellule et donc être à l'origine d'un effet génotoxique.

6.2.1 Les effets génotoxiques : définition et nature

On qualifie un agent de génotoxique lorsque celui-ci est capable, directement ou indirectement, d'altérer l'ADN. Classiquement, on distingue différents degrés d'altération de l'ADN : les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques et les altérations chromosomiques. Les lésions primaires constituent la première étape des effets génotoxiques : elles consistent en des cassures simple ou double brin, à la formation d'adduits¹, à l'alkylation des bases ou encore à la formation de pontages ADN-ADN ou ADN-protéine. Ces modifications de l'ADN sont en temps normal réparées, mais dans le cas d'une non ou d'une mauvaise réparation, elles peuvent conduire à des dommages plus graves transmissibles de cellules mères en cellules filles : les mutations géniques qui concernent quelques paires de bases ou les mutations chromosomiques qui concernent plusieurs milliers de bases.

Dans le cas d'un stress oxydant, les dommages à l'ADN connus comme pouvant être causés par les radicaux libres sont présentés dans la figure 6.5. Il s'agit de lésions primaires qui peuvent, en cas de dépassement des systèmes de réparations, être à l'origine de dommages beaucoup plus graves. Ainsi différents tests ont été menés afin de recouvrir différents types de lésions et degrés de dommage.

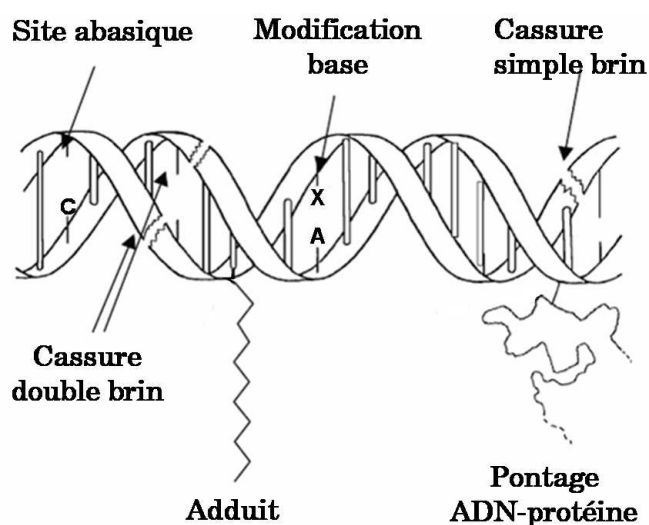


FIGURE 6.5 – Les lésions de l'ADN causées par les radicaux libres (Favier, 2003).

6.2.2 Le test des comètes

Ce test met en évidence les cassures à l'ADN simples et doubles brins confondues ainsi que la formation de sites alkali-labile. En effet, la longueur et l'intensité de la queue de la comète dépendent directement de la quantité de dommage à

1. greffage par liaison covalente d'une chaîne carbonée sur le désoxyribose

l'ADN. Ainsi, suite à une exposition de 24 h à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules, la taille et la quantité de comètes observés sont faibles en comparaison avec un contrôle positif à l'étoposide (voir figure 6.6). Plus précisément, la longueur des queues des comètes ont été quantifiées (voir figure 6.7). Un effet génotoxique a été constaté en présence de NtC Fe-long, de TiO_2 P25 et TiO_2 ana-P, mais cela reste très faible en comparaison avec le contrôle positif.

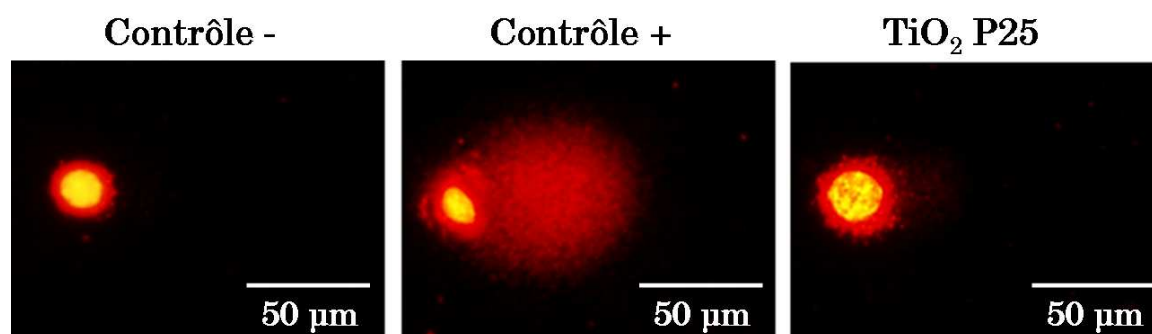


FIGURE 6.6 – Exemple de photographies de comètes : le contrôle positif a été obtenu en exposant les cellules à $100 \mu\text{M}$ d'étoposide pendant 24 h et TiO_2 P25 suite à une exposition à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant 24 h.

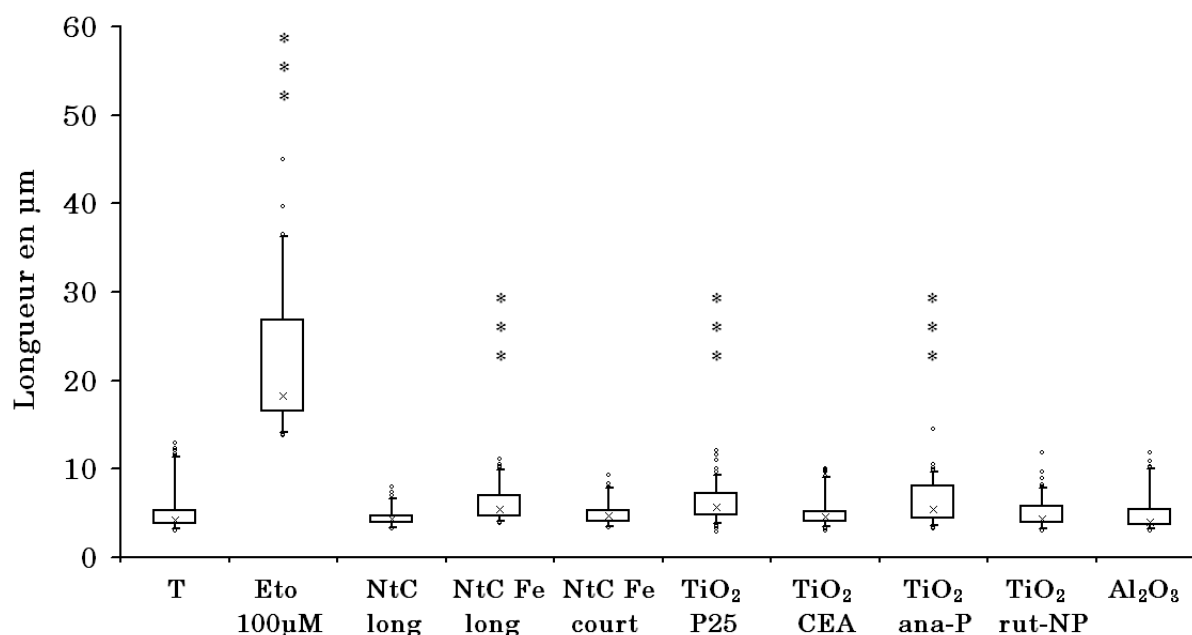


FIGURE 6.7 – Longueur de la queue des comètes mesurée après une exposition à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules pendant 24 h. Les tailles des comètes ont été évaluées à l'aide du logiciel COMET IV.

6.2.3 Le test de l'immunomarquage de l'histone γ -H₂AX

Ce test met en évidence les cassures doubles brins sur lesquelles se sont fixés les systèmes de réparation de ces cassures. Ainsi grâce à l'immunomarquage, un spot lumineux dans le noyau correspond à une cassure double brin (voir figure 6.7). Ayant observé que peu de dommages à l'ADN (cassures doubles brins comprises) par le test des comètes, il était prévisible de ne pas observer d'augmentation significative des cassures double brins en présence de nanoparticules par rapport au témoin non exposé (voir figure 6.8 a. et b.).

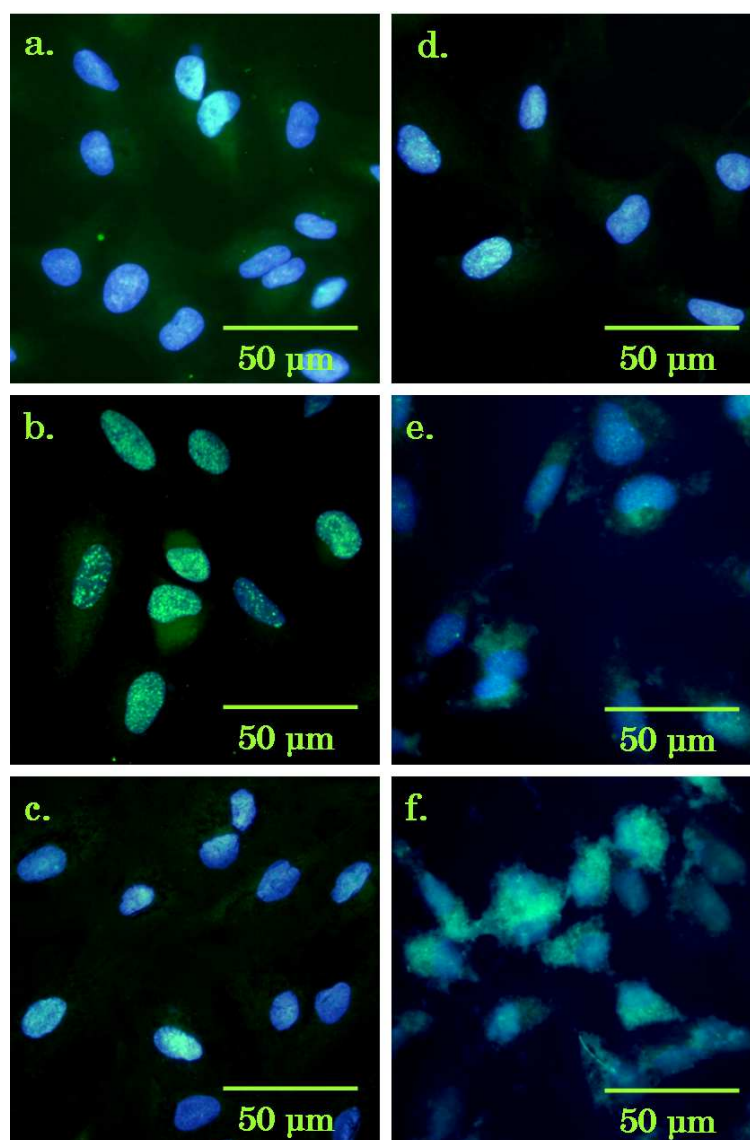


FIGURE 6.8 – Observations microscopiques des cassures doubles brins suite à une exposition aux nanoparticules : a. contrôle négatif, b. contrôle positif à l'étoposide 50 μ M, c. NtC 50 μ g.mL⁻¹, d. TiO₂ P25 10 μ g.mL⁻¹, e. TiO₂ P25 50 μ g.mL⁻¹ et f. TiO₂ P25 100 μ g.mL⁻¹.

Cependant, il apparaît que dans certaines conditions ce test n'est pas adapté aux nanoparticules, puisqu'une interférence dans le signal de fluorescence a été observé (voir figure 6.8 c. d. e. et f.). En effet, en présence de forte quantité de nanoparticules, celles-ci recouvrent les cellules ce qui pourrait empêcher la fixation des anticorps ou empêcher la distinction des spots lumineux. Cette interférence ne peut avoir lieu que si les nanoparticules sont adsorbées en forte quantité sur les cellules, ce qui est le cas pour les cellules A549 mais pas forcément pour d'autres modèles cellulaires.

6.2.4 Le test des micronoyaux

Ce test met en évidence les altérations chromosomiques c'est à dire les pertes de fragments de chromosome, ce qui correspond à un effet génotoxique beaucoup plus grave pour la cellule. Cela se traduit par l'apparition de micronoyaux de quelques μm de diamètre à proximité des noyaux des cellules binucléées (voir figure 6.9 a. et b. de la présente page). En présence de nanoparticules, la quantité de micronoyaux observés est comparable au contrôle négatif, ce qui montre que les nanoparticules ne provoquent pas d'altérations chromosomiques.

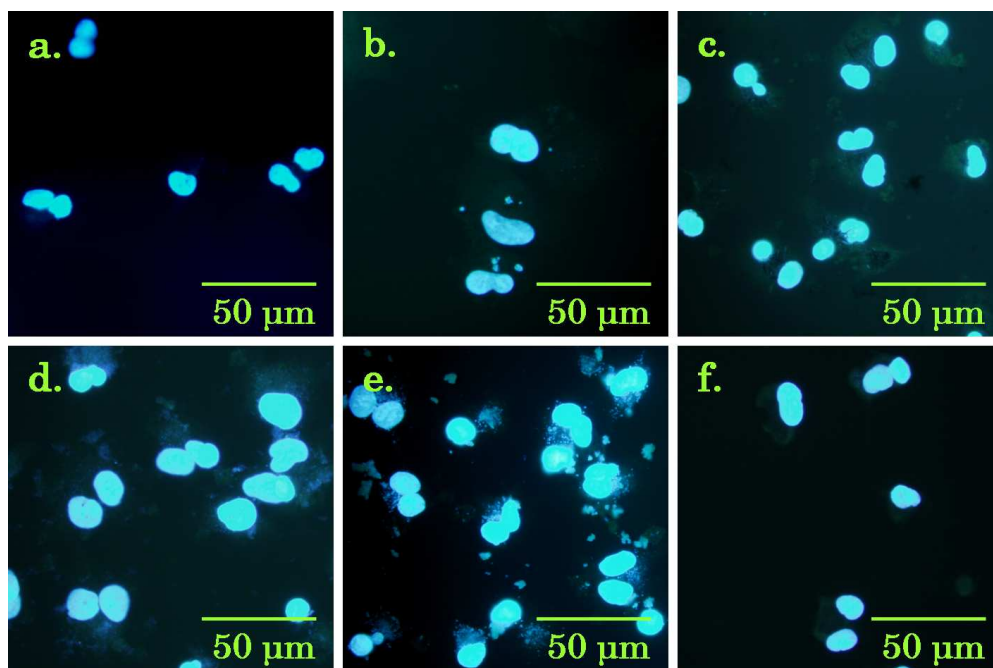


FIGURE 6.9 – Observations microscopiques des micronoyaux suite à une exposition aux nanoparticules : a. contrôle négatif, b. contrôle positif à l'étoposide 10 μM , c. NtC 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, d. TiO_2 P25 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e. TiO_2 ana-P 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et f. Al_2O_3 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Nous notons, tout comme le test $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$, que la présence de nanoparticules en grande quantité peut rendre difficile l'interprétation des photographies. En ef-

fet dans la figure 6.9 e, des amas de nanoparticules réfléchissent la lumière et pourraient être confondus avec des micronoyaux.

6.3 Discussion

6.3.1 Une production d'ERO en présence de nanoparticules

Tous les nanoparticules étudiées ont montré une capacité à engendrer la production d'ERO intracellulaires dans les cellules A549. Cela avait déjà été montré pour le même modèle cellulaire exposé à des NtC (Garza et al., 2008) ou à différentes nanoparticules d'oxyde métallique (Karlsson et al., 2008; Limbach et al., 2007) et en particulier les nanoparticules de TiO_2 dont TiO_2 P25 (Garza et al., 2008; Singh et al., 2007). Cette production d'ERO intracellulaires a aussi été constatée avec d'autres modèles cellulaires en présence de NtC (Kagan et al., 2006; Jacobsen et al., 2008; Pacurari et al., 2008; Sharma et al., 2007; Shvedova et al., 2003; Pulskamp et al., 2007) ou de nanoparticules d'oxyde métallique (Gurr et al., 2005; Long et al., 2006; Yang et al., 2008a).

Cependant, la production d'ERO se révèle plus ou moins importante, voire nulle, selon le temps d'exposition et les nanoparticules. En effet, nous constatons que les nanoparticules de TiO_2 n'ont pas toutes le même effet puisqu'à 24 h d'exposition seules les nanoparticules TiO_2 P25 et TiO_2 rut-NP entraînent une production d'ERO intracellulaire. De même les NtC sans fer ne provoquent la formation d'ERO qu'à 24 h d'exposition contrairement aux NtC contenant du fer ayant un effet à 4 et 24 h. Ainsi des nanoparticules de même nature n'induisent pas obligatoirement la même production d'ERO, ce qui montre que d'autres caractéristiques interviennent dans ce mécanisme. Cela permet d'expliquer les incohérences constatées dans la littérature, puisque parfois les NtC et les nanoparticules de TiO_2 ont été démontrés comme induisant une production d'ERO intracellulaires (Garza et al., 2008), tandis que parfois non (Karlsson et al., 2008; Xia et al., 2006).

De nombreuses caractéristiques influençant la production d'ERO, en dehors de la nature chimique (Yang et al., 2008a; Karlsson et al., 2008), ont déjà été mises en cause telles que la taille ou plus probablement la surface spécifique (Gurr et al., 2005), la chimie de surface (Singh et al., 2007) ou la présence d'impuretés (Limbach et al., 2007). Il est cependant probable que d'autres caractéristiques interviennent dans ce mécanisme puisque nous avons montré que des nanoparticules de caractéristiques très proches comme TiO_2 P25 et TiO_2 CEA n'ont pas le même effet sur la production d'ERO : les nanoparticules de TiO_2 P25 induisent une plus

grande quantité d'ERO en particulier à 24 h. En effet, en dehors de la taille qui est deux fois plus élevée pour TiO₂ P25 et qui donc devrait logiquement influencer la production d'ERO en sens inverse (si on considère que la production d'ERO est directement corrélée à la quantité de surface), la différence ne peut s'expliquer par une différence de cristallinité, puisque toutes deux 80-90 % anatase, ou par la présence d'impuretés favorisant la production d'ERO, puisque seul TiO₂ CEA en possède en faible quantité (voir chapitre 3.1.5 page 93). Il reste cependant à déterminer quelle caractéristique majeure pouvant influencer la production d'ERO différencie les deux nanoparticules. Il en va de même pour les nanoparticules de TiO₂ rut-NP qui montrent une très forte capacité à engendrer des ERO intracellulaires à 24 h. Cela peut s'expliquer par la présence de Si à leur surface, qui par exemple sous la forme SiO₂ peut être à l'origine de d'ERO (Cho et al., 1999; Lin et al., 2006). Il semblerait même que la production d'ERO soit plus importante lorsque les nanoparticules d'une certaine nature sont dopées en un autre composé que lorsque le composé est pur, peut être en raison d'une moins bonne stabilité chimique (Limbach et al., 2007).

Une influence de la présence de Fe dans les NtC sur la production d'ERO intracellulaires a aussi été constatée. En effet, cette production s'avère plus importante en présence de NtC contenant du fer, et encore plus en présence de NtC courts pour lesquels le Fe est probablement plus disponible. Ce type d'observation a déjà été montré pour des SWCNT (Pulskamp et al., 2007) et des MWCNT dopés ou non en Ni (Garza et al., 2008). Cela est vraisemblablement dû à la capacité du Fe, ou autres métaux de transition, à induire directement des ERO par une réaction du type Fenton (Gardès-Albert et al., 2003). De plus, il est intéressant de constater que la différence de production d'ERO n'est réelle qu'à 4 h d'exposition. Un scénario pouvant expliquer cette constatation, imagine deux origines de production d'ERO n'intervenant pas aux mêmes temps d'exposition. La première, intervenant immédiatement, tient compte de la capacité des NtC à produire des ERO extracellulaires comme cela a été montré dans les études de Jacobsen et al. (2008) et Kagan et al. (2006), ce qui peut conduire indirectement à la formation d'ERO intracellulaires par perturbation de la membrane plasmique. Or il a été montré que cette production extracellulaire d'ERO ne peut avoir lieu qu'en présence de métaux comme le Fe dans les NtC (Fenoglio et al., 2006; Kagan et al., 2006), ce qui permet d'expliquer qu'à 4 h seuls les NtC extracellulaires contenant du Fe provoquent une génération d'ERO. La deuxième origine d'ERO n'interviendrait que bien plus tard et ne ferait pas intervenir la réactivité catalytique des NtC, puisqu'*a priori* nulle pour les NtC sans Fe. Elle pourrait avoir pour origine un stress physique qui serait provoqué par les NtC adsorbés en grande quantité sur la membrane. En imaginant que la cellule consomme beaucoup d'énergie pour

éliminer ces NtC adsorbés en essayant de les endocyter (mais sans succès pour la plupart puisque seuls les plus petits réussissent à être endocytés) ce stress serait à l'origine d'une forte activité mitochondriale qui conduit inévitablement à une formation d'ERO plus importante (Boveris et al., 1972; Boveris, 1977; Favier, 2003).

La même hypothèse peut être avancée pour expliquer la production d'ERO intracellulaire à 4 h d'exposition aux nanoparticules d'oxyde métallique. En effet nous avons constaté, à ce temps d'exposition, que toutes les nanoparticules d'oxyde métallique engendrent une production d'ERO qui est non dépendante de la concentration, excepté pour les nanoparticules TiO_2 P25 et TiO_2 rut NP qui sont les seules à avoir un effet à 24 h. Cette production d'ERO ne semble donc pas dépendante d'une activité catalytique. Elle pourrait, comme pour les NtC à 24 h, avoir pour origine une forte activité mitochondriale dans le but d'endocyter les nanoparticules. La disparition de la production d'ERO en présence des nanoparticules d'oxyde métallique à 24 h, peut alors s'expliquer soit par une adaptation de la cellule soit par une consommation d'énergie moindre puisque beaucoup de nanoparticules ont déjà été endocytées et ne gênent donc plus la cellule.

La différence de temps d'apparition du stress physique entre les NtC et les nanoparticules, peut s'expliquer par une différence de temps de sédimentation des nanoparticules au fond des puits et donc d'adsorption sur la membrane. En effet, nous avons vu que les nanoparticules de TiO_2 et Al_2O_3 s'agglomèrent dans le milieu de culture (voir chapitre 3.2.2.2 page 98), n'étant plus sous forme isolée mais de gros agglomérats de quelques μm de diamètre, les nanoparticules sédimentent plus vite au fond des puits (Ostiguy et al., 2006). Pour les NtC, la sédimentation est certainement plus longue, en raison de leur bonne dispersion dans le milieu, mais aussi de leur forme offrant une plus forte résistance à la pénétration dans le milieu liquide. Cette hypothèse est enrichie par les résultats que nous avons obtenus avec le test MTT qui mettent en évidence une adsorption des NtC (voir chapitre 4.3.3 page 131) qui n'est que partielle à 3 h d'exposition (voir figure 4.14 page 121).

La stabilité chimique des nanoparticules peut aussi jouer un rôle dans les effets sur la cellule et en particulier dans la production d'ERO intracellulaires. En effet si les nanoparticules se dissolvent et libèrent des ions, ces derniers peuvent conduire directement ou indirectement à la formation d'ERO. Cependant, comme le montre l'étude de Limbach et al. (2007), certains ions sont plus susceptibles que d'autres de former directement des ERO. De plus cette étude met en avant un mécanisme du type cheval de troie, en montrant que les nanoparticules d'oxyde de cobalt et de manganèse induisent une production d'ERO équivalente aux ions

correspondant, probablement par dissolution, mais que seules les nanoparticules ont un effet sur la cellule puisqu'elles arrivent à pénétrer dans la cellule contrairement aux ions seuls (Limbach et al., 2007). Dans notre cas nous ne savons pas si des ions sont libérés. Cependant nous avons constaté pour les nanoparticules Al_2O_3 , une inhibition de la SOD, qui est une inhibition connue des ions Al^{3+} (Shainkin-Kestenbaum et al., 1989) par formation d'un complexe Al-SOD (Di et al., 2006). Cela laisse donc penser que les nanoparticules d' Al_2O_3 libèrent des ions Al^{3+} dans la cellule mais cela reste à vérifier.

Différents mécanismes de formation d'ERO intracellulaires possibles

Au vu des différentes hypothèses décrites précédemment et des observations microscopiques montrant des nanoparticules uniquement à l'extérieur de la cellule, dans des vésicules intracellulaires et rarement libres dans le cytoplasme, nous proposons différents mécanismes conduisant à la production d'ERO intracellulaires (voir figure 6.10). Ces mécanismes peuvent être distingués en 2 grands groupes : les mécanismes qualifiés de directs et les mécanismes indirects.

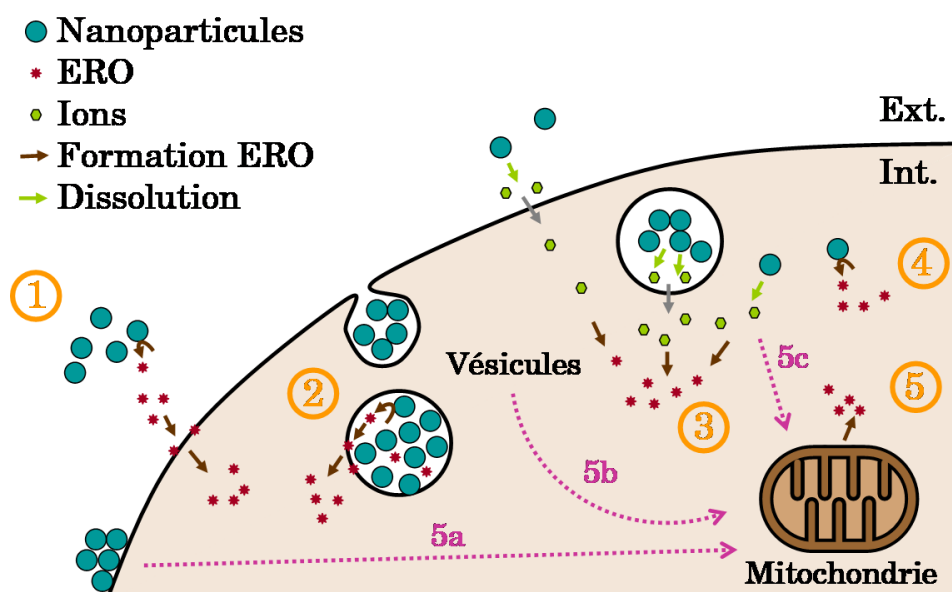


FIGURE 6.10 – Mécanismes hypothétiques et non exhaustifs de formation d'ERO intracellulaires. 1. Formation d'ERO extracellulaires conduisant à la formation d'ERO intracellulaires, 2. Formation d'ERO dans les vésicules conduisant à la formation d'ERO intracellulaires, 3. Formation d'ERO intracellulaires par l'intermédiaire de la dissolution des nanoparticules, 4. Formation d'ERO intracellulaires directement par les nanoparticules libres dans le cytoplasme et 5. Formation indirecte d'ERO intracellulaires par les mitochondries en réponse à un stress physique provoqué par l'adsorption des nanomatériaux qui conduit à une augmentation de l'activité mitochondriale couplée naturellement à une production d'ERO afin de pallier la contrainte physique par endocytose avec succès (5b) ou non (5a), ou par action des ions libérés altérant l'activité mitochondriale (5c).

Les mécanismes directs font intervenir l'activité catalytique des nanoparticules qui permet une production directe d'ERO (voir figure 6.11). Cette production a déjà été montrée pour les nanoparticules de TiO_2 avec (Shen et al., 2006) ou sans UV (Limbach et al., 2007; Jiang et al., 2008), les nanoparticules de noir de carbone (Foucaud et al., 2007) et les SWCNT dopés en métaux (Kagan et al., 2006; Jacobsen et al., 2008). Elle est corrélée à la quantité de surface ou taille des nanoparticules et dépend de leur forme cristalline et de leur état de surface (utilisation d'un surfactant, complexation avec le milieu, etc...). Elle peut avoir lieu directement dans la cellule dans le cas où les nanoparticules sont libres dans le cytoplasme (figure 6.10 4), ce qui est *a priori* faible pour les nanoparticules d'oxyde métallique. Dans le cas où les ERO ne sont pas produites directement dans la cellule (figure 6.10 1 et 2), elles peuvent conduire à la formation d'ERO intracellulaires en passant par une peroxydation lipidique de la membrane (Esterbauer et al., 1991; Moore and Roberts, 1998). Seuls les NtC contenant du Fe et les nanoparticules TiO_2 P25, TiO_2 rut-NP et TiO_2 ana-P semblent présenter ce dernier mécanisme d'action puisque ce sont les seuls à provoquer une production d'ERO proportionnelle à leur concentration surfacique (voir figure 6.3 page 164).

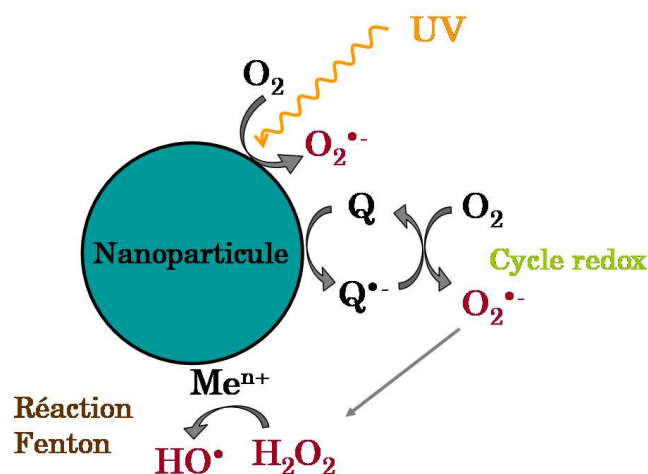


FIGURE 6.11 – Exemples de mécanismes de production d'ERO mettant en jeu l'activité catalytique surfacique des nanoparticules (d'après Nel et al. (2006)).

Les mécanismes indirects conduisent à la formation d'ERO sans passer par l'activité catalytique des nanoparticules. Deux mécanismes indirects sont proposés. Le premier tient compte d'une dissolution possible des nanoparticules et passage des ions formés dans le cytoplasme (figure 6.10 3). Ces ions pourraient induire de façon directe ou indirecte la formation d'ERO intracellulaire (Limbach et al., 2007). La quantité d'ions dissouts est certainement proportionnelle à la quantité de surface ou à la quantité de matière, les effets dans ce cas là devraient être proportionnels à la quantité de nanoparticules. Ainsi seuls les NtC contenant du

Fe et les nanoparticules TiO_2 P25, TiO_2 rut-NP et TiO_2 ana-P pourraient passer par ce mécanisme. Nous n'avons pas montré de dissolution dans l'eau de ces nanoparticules (voir chapitre 3.2.3 page 100) mais cela n'exclue pas une dissolution dans le milieu de culture, ou en contact avec le surfactant alvéolaire ou encore dans les vésicules pouvant être des lysosomes au contenu très agressif. En effet des études montrent une dissolution du Fe de NtC synthétisés par CVD par des solutions salines (Lyon and Stevenson, 2007) ou une dissolution de nanoparticules d'oxyde métallique par des matières organiques (Mukherjee et al., 2005). Mais il est difficile d'expliquer en quoi les autres nanoparticules de TiO_2 ont un comportement différents, à moins que cette dissolution ne joue pas sur la formation d'ERO. Le deuxième imagine qu'en présence de nanoparticules les cellules nécessitent une production intense en énergie par les mitochondries conduisant spontanément à une production d'ERO plus importante (figure 6.10 5). Ce besoin en énergie pourrait venir d'un besoin de se délivrer par endocytose des nanoparticules adsorbées sur la membrane plasmique. Comme nous l'avons discuté précédemment, ce mécanisme pourrait convenir à tous les nanoparticules étudiés.

6.3.2 Un mécanisme de cytotoxicité non résolu

Si certaines nanoparticules (TiO_2 P25, TiO_2 ana-P et TiO_2 rut-NP, NtC contenant du fer) entraînent une production d'ERO dépendante de la dose, en particulier après 24 h d'exposition, pour les autres non. Ainsi pour les nanoparticules de TiO_2 anatase, il n'y a pas de relation confondue entre la quantité d'ERO intracellulaires et la quantité de surface en nanoparticules comme c'est le cas entre le taux de mortalité cellulaire et la quantité de surface en nanoparticules. Cela montre qu'il n'y a pas de corrélation entre les effets cytotoxiques observés et la production d'ERO intracellulaires. Notre hypothèse de départ s'avère donc fausse : le mécanisme d'action conduisant à la mort cellulaire ne passe pas par une production d'ERO intracellulaires. Cela montre aussi que pour les nanoparticules induisant une production d'ERO intracellulaires mais n'ayant pas un effet cytotoxique plus prononcé, le stress oxydant n'est pas suffisamment fort pour être dommageable à la cellule.

D'autres mécanismes permettant d'expliquer la mort cellulaire peuvent être proposés (voir figure 6.12), tous compatibles avec l'effet de surface de spécifique constaté (voir chapitre 5.11 page 149). Le premier fait intervenir une dissolution des nanoparticules et donc une toxicité chimique associée aux ions libérés. Cette hypothèse semble peu probable car nous avons montré une stabilité chimique de TiO_2 dans l'eau mais comme nous l'avons déjà dit, il est possible que ce

ne soit plus le cas dans les milieux biologiques et les conditions intracellulaires (Lyon and Stevenson, 2007; Mukherjee et al., 2005).

Le deuxième mécanisme imagine un stress purement mécanique dû à la présence des nanoparticules en grande quantité sur la membrane cytoplasmique. Ce stress aurait pour conséquence des lésions membranaires ou un "étouffement" de la membrane conduisant à une perturbation des échanges membranaires. Il pourrait aussi induire une suractivité mortelle des cellules qui tenterait de se débarrasser de ces nanoparticules perturbatrices par endocytose, comme cela a été montré. Cette hypothèse paraît possible en particulier pour les NtC avec lesquels un relargage du contenu cytoplasmique a été suggéré (Kang et al., 2007), ce qui expliquerait aussi l'absence de différence d'effet cytotoxique pour les NtC avec ou sans fer. Par contre, elle paraît beaucoup moins probable pour les nanoparticules d'oxyde métallique puisque nous avons observé des différences entre Al_2O_3 et TiO_2 , et les formes cristallines anatase et rutile. S'il s'agissait d'un mécanisme purement mécanique, aucune différence n'aurait été constatée à quantité de surface équivalente.

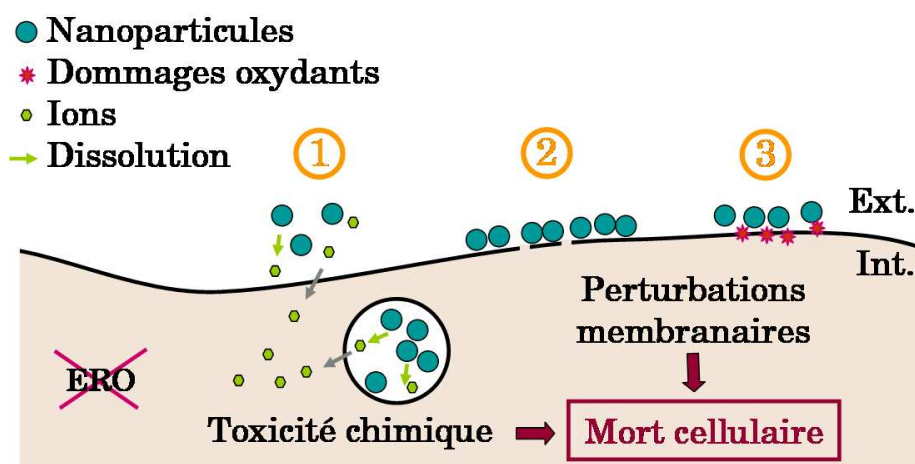


FIGURE 6.12 – Proposition de mécanismes d'action conduisant à la mort cellulaire passant par : 1. une dissolution des nanoparticules et une toxicité chimique des ions libérés, 2. un stress mécanique conduisant à une perturbation des fonctions membranaires et 3. des dommages oxydants sur la membrane plasmique provoqués par la réactivité de surface des nanoparticules et conduisant aussi à une perturbation des fonctions membranaires.

La troisième hypothèse nous paraît la plus probable pour les nanoparticules d'oxyde métallique et permet d'expliquer l'influence de la nature chimique et de la cristallinité de ces nanoparticules. Elle s'appuie sur la réactivité de surface des nanoparticules qui conduit à des dommages oxydants membranaires et donc à une perturbation de la fonction membranaire.

6.3.3 Peu de cassures à l'ADN

D'après les observations microscopiques du chapitre 5, les nanoparticules étudiées n'entrent pas en contact direct avec le matériel génétique. Elles ne peuvent donc provoquer directement des dommages à l'ADN. Cependant, nous avons constaté une production d'ERO intracellulaires qui pourrait induire indirectement à ce type de dommage. Les quelques expériences préliminaires qui ont été conduites, ne laissent apparaître que très peu de dommages à l'ADN par le test des comètes. Cette absence de comètes a déjà été montrée sur d'autres modèles cellulaires en présence de SiO₂ (Barnes et al., 2008; Yang et al., 2008a), Fe₂O₃ (Auffan et al., 2006) ou de SWCNT (Yang et al., 2008a).

Cependant, ces résultats doivent être confirmés et enrichis par des expériences complémentaires avec des gammes de concentration en nanoparticules et des temps d'expositions plus court, puisque nous avons constaté une production d'ERO plus importante après 4 h d'exposition. En effet d'autres études ont montrés des effets génotoxiques plus important (Gurr et al., 2005; Kisin et al., 2007; Pacurari et al., 2008; Wang et al., 2007) en particulier sur le même modèle cellulaire suite à 4 h d'exposition à des nanoparticules de TiO₂ et des NtC (Karlsson et al., 2008). Comme pour les autres effets biologiques, il apparaît que l'intensité des effets génotoxiques dépend des modèles cellulaires, des conditions d'exposition (temps, concentration) et de la nature et des caractéristiques des nanoparticules.

Par ailleurs, nous avons constaté que le test de l'immunomarquage de l'histone γ -H₂AX et dans une moindre mesure le test des micronoyaux ne sont pas adaptés à l'étude des effets génotoxiques des nanoparticules sur les cellules A549. En effet, une réflexion de fluorescence a été observée et confirmée (voir chapitre 3.3 page 101), ce qui rend difficile l'interprétation des photographies. Il est probable que cette interférence soit propre à ce modèle cellulaire qui comme nous l'avons déjà montré est propice à une forte adsorption des nanoparticules, vraisemblablement en raison de la sécrétion de surfactant alvéolaire (Lieber et al., 1976; Balis et al., 1984).

6.4 Synthèse du chapitre

Chapitre 6

Mécanismes d'action des nanoparticules

- Une production d'ERO intracellulaires a été constatée lorsque les cellules sont exposées à des nanoparticules et NtC. Cette production varie en fonction du type de nanoparticule et de leurs caractéristiques. Ainsi pour des temps d'exposition courts, une influence de la présence de fer dans les NtC a été mise en évidence. Pour les nanoparticules aucune règle n'a pu être établie d'après les caractéristiques que nous avons étudiées. En effet, des différences entre nanoparticules de caractéristiques proches étant constatées, il est probable que d'autres caractéristiques différentielles non déterminées en soit à l'origine. La stabilité chimique des nanoparticules dans l'environnement cellulaire peut aussi être mise en cause et est suspectée pour les nanoparticules Al_2O_3 .
- Différents mécanismes aboutissant à une production d'ERO intracellulaires ont été proposés et classés en deux catégories : les mécanismes directs faisant intervenir l'activité catalytique des nanomatériaux et les mécanismes indirects faisant intervenir une dissolution des nanoparticules ou un stress physique. Ces derniers mécanismes peuvent correspondre à toutes les nanoparticules étudiées tandis que les mécanismes directs n'apparaissent possible que pour les NtC dopés en fer, TiO_2 P25, TiO_2 rut-NP et TiO_2 ana-P qui montrent une production d'ERO intracellulaires dépendante de la surface en nanoparticules.
- Il n'y a pas de corrélation entre la capacité à produire des ERO intracellulaires et les effets cytotoxiques quantifiés dans le chapitre 4. Un autre mécanisme que la production d'ERO est probablement à l'origine des effets cytotoxiques. Trois hypothèses sont proposées : la première passant par la dissolution des nanoparticules conduisant à une toxicité chimique, la deuxième considérant un stress purement physique conduisant à une perturbation de la membrane et/ou de l'activité cellulaire et la troisième se basant sur l'activité de surface des nanoparticules qui provoquerait des dommages oxydants sur la membrane et donc son dysfonctionnement.
- Peu de dommages à l'ADN ont été observés mais ces résultats doivent être confirmés. Par ailleurs le test d'immunomarquage des histones $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ et dans une moindre mesure le test des micronoyaux ne sont pas adaptés à la quantification des effets génotoxiques des nanoparticules sur les cellules A549.

Conclusions et perspectives

Ce travail a pour but d'enrichir les connaissances sur les effets biologiques des nanoparticules à la fois sur les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes. Pour cela des études *in vitro* ont été réalisées sur deux bactéries à Gram négatif (*Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* MG1655) permettant de se placer dans un contexte environnemental, et sur des cellules humaines alvéolaires (Pneumocytes II A549) permettant de se placer dans un contexte d'exposition de l'homme par voie respiratoire. Les études *in vitro* ont été choisies dans le but d'accéder plus finement aux mécanismes d'action au niveau cellulaire mais aussi parce qu'elles permettent de tester un plus grand nombre de nanoparticules et de conditions. Ainsi des nanoparticules d'oxyde métallique (TiO_2 et Al_2O_3) et des nanotubes de carbone multifeuillets possédant différentes caractéristiques physico-chimiques ont été étudiés. L'objectif final était d'évaluer et de comprendre l'influence des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules sur les effets biologiques et les mécanismes d'action observés.

La démarche de l'étude fut la suivante : les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules étudiées et leur état d'agglomération dans les milieux d'exposition ont tout d'abord été déterminés afin de les mettre en relation avec les effets biologiques constatés. Leurs effets sur la viabilité cellulaire et leur localisation cellulaire ont ensuite été déterminés. Enfin l'hypothèse de mécanisme d'action par génération d'espèces réactives de l'oxygène conduisant éventuellement à des dommages génotoxiques a été examinée. Les principales conclusions et perspectives déduites vont maintenant être décrites.

Des effets variables en fonction du modèle bactérien et une mise en évidence de la relation entre pénétration de la paroi et effet cytotoxique pour *E.coli* MG1655 :

Nous avons vu que les nanoparticules n'ont pas le même effet sur la viabilité cellulaire des deux modèles bactériens étudiés. En effet, un effet cytotoxique a été constaté uniquement sur *E. coli* MG1655 et a été relié à une pénétration de la paroi bactérienne n'ayant lieu que pour les nanoparticules sphériques de taille inférieure à 50 nm et étant chargées positivement. Les mêmes nanoparticules pénétrant aussi la paroi bactérienne de *C. metallidurans* CH34, il est supposé que cette dernière est beaucoup plus résistante aux dommages causés par les nanoparticules. Ainsi deux conséquences sur l'environnement peuvent être prédites : une perturbation des écosystèmes dans le cas d'un effet cytotoxique (*E. coli* MG1655) ou dispersion et une contamination de l'environnement dans le cas d'une résistance et d'une fixation des nanoparticules (*C. metallidurans* CH34). Par ailleurs il serait intéressant d'enrichir l'étude en ajoutant d'autres modèles bactériens, en particulier des bactéries à gram positif, ce qui permettrait de plus de confirmer ou infirmer le rôle de la paroi et de sa composition dans les effets observés.

Le mécanisme de cytotoxicité reste à déterminer plus clairement, mais le rapport entre effet cytotoxique et pénétration de la paroi laisse penser qu'il a pour origine une perturbation de l'activité membranaire ou un efflux du contenu cytoplasmique par formation de puits. Le mécanisme de pénétration doit aussi être élucidé, l'hypothèse la plus probable aurait pour origine une fixation des particules chargées positivement sur la paroi chargée négativement suivi d'une formation d'espèces réactives de l'oxygène formant des trous dans la paroi bactérienne. Ces travaux peuvent donc être poursuivis par un dosage des composants (ADN, ARN,...) du milieu extracellulaire pour déceler un efflux cytoplasmique, une étude de la capacité intrinsèque des nanoparticules à produire des ERO en utilisant une sonde marquée, une étude des effets cytotoxiques en présence d'antioxydants qui pourrait permettre de révéler l'importance du stress oxydant dans le mécanisme d'action ou encore une étude de la peroxydation lipidique permettant de mettre en évidence des dommages membranaires.

Des effets sur la viabilité cellulaire faibles chez les pneumocytes II

Nous avons confirmé, que les nanoparticules TiO_2 et Al_2O_3 ainsi que les nanotubes de carbone multifeuillets ne sont pas inertes pour les pneumocytes II A549. Cependant, les effets cytotoxiques n'apparaissent que pour des concentrations élevées qui ne reflètent par forcément une exposition dans des conditions envi-

ronnementales. Ces résultats permettent donc uniquement de mettre en garde sur un effet néfaste de ces nanoparticules pour la santé humaine, qui doit être confirmé par des études *in vitro* en exposition chronique à de faibles doses et des études *in vivo* en condition d'inhalation réelle.

Une internalisation massive chez les pneumocytes II

Nous avons observé une forte internalisation, essentiellement dans des vésicules, des nanoparticules d'oxyde métallique qui est non dépendante de leur forme, de leur taille et de leur nature. Pour les nanotubes de carbone cette internalisation dans des vésicules est moins prononcée et n'a été mise en évidence que pour les plus courts dont la longueur est inférieure à 1 μm . En raison de la taille des vésicules, un phénomène de macropinocytose est suspecté et doit être confirmé. Par ailleurs, d'après nos observations, il est possible que les nanoparticules entrent dans le cycle de recyclage du surfactant alvéolaire et perturbent celui-ci.

Une importance de la surface spécifique des nanoparticules

Nous avons montré très clairement une influence de la surface spécifique des nanoparticules, à la fois pour *E. coli* MG1655 et pour les cellules A549 puisque les taux de mortalité obtenus pour des particules de TiO_2 anatase de tailles différentes, suivent la même tendance une fois que les concentrations sont exprimées en quantité de surface de nanoparticules. Cependant pour *E. coli* MG1655, cette influence intervient seulement lorsque les nanoparticules ont un diamètre inférieur à 50 nm ce qui signifie que pour ce modèle d'autres paramètres interviennent comme la taille mais aussi la charge (puisque toutes les nanoparticules inférieures à 50 nm de diamètre sont chargées positivement, à l'inverse des plus grosses).

Cette influence de la surface spécifique nous a laissé penser que la réactivité de surface des nanoparticules entre en jeu dans leurs mécanismes d'action. C'est pourquoi, en plus de l'incapacité des nanoparticules à agir directement sur les constituants cellulaires en raison de leur compartimentation dans des vésicules, l'hypothèse d'un mécanisme passant par une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaires a été mise en avant et regardée chez les cellules A549.

Un mécanisme de cytotoxicité qui reste à élucider

La production d'ERO intracellulaires dans les cellules A549 exposées aux nanoparticules s'est révélée inattendue. En effet, nous avons montré que les nanopar-

ticules étudiées engendrent une production d'ERO intracellulaires dont l'intensité est dépendante du temps d'exposition et du type de nanoparticule, mais qu'il n'y a pas de corrélation entre cette production et les effets cytotoxiques mesurés. Ainsi notre hypothèse de départ impliquant la production d'ERO intracellulaires dans le mécanisme de cytotoxicité s'avère non vérifiée. Cela pourrait être vérifié par une étude des effets cytotoxiques en présence de différents antioxydants. Trois autres hypothèses compatibles, avec l'effet de surface spécifique constaté, ont donc été proposées et restent à vérifier.

La première fait intervenir une dissolution des nanoparticules et donc une toxicité chimique associée aux ions libérés, elle sera cependant difficile à vérifier et à doser dans les cellules. De plus les effets cytotoxiques de TiO_2 ne pourront pas être comparés avec les formes solubles car les ions Ti^{4+} ne sont pas stables dans l'eau.

La deuxième imagine un stress purement physique conduisant à une perturbation des échanges membranaires ou à une suractivité destructrice. Elle paraît probable pour les NtC et permet d'expliquer l'absence de différence d'effet cytotoxique entre les différents NtC étudiés. Par contre elle ne permet pas d'expliquer les différences d'effets observées entre les nanoparticules d'oxyde métallique et ne semble donc pas applicable à ces dernières.

La dernière se base sur la réactivité de surface des nanoparticules qui en contact avec la membrane cytoplasmique provoque des dommages oxydant et donc une perturbation de la fonction membranaire. Elle permet d'expliquer les différences d'effet cytotoxique observées entre les nanoparticules d'oxyde métallique et nous paraît donc la plus probable pour ces dernières.

Les conséquences du stress oxydant mis en évidence dans cette étude restent aussi à déterminer. Les premières études menées ici sur la génotoxicité des nanoparticules mettent en évidence peu d'effets, mais ceci doit être confirmé pour différents temps d'exposition et une gamme de concentrations plus large. Une étude de la peroxydation lipidique peut aussi être envisagée afin de mettre en évidence des dommages membranaires.

Une influence des caractéristiques physico-chimiques

Tout au long de cette étude, nous avons pris soin de regarder et d'identifier les caractéristiques physico-chimiques pouvant influencer les effets observés. Ainsi nous avons montré et parfois supposé que les effets biologiques et mécanismes d'action dépendent de différentes caractéristiques qui n'ont pas forcément pu être dissociées.

La taille et la surface spécifique. Nous avons montré à la fois pour *E. coli* MG1655 et pour les cellules A549 que l'intensité des effets cytotoxiques des nanoparticules TiO_2 dépendent de ces paramètres qui sont corrélés. Pour *E. coli* MG1655 et *C. metallidurans* CH34, il y a aussi une influence purement de taille puisqu'au dessus de 50 nm de diamètre aucune pénétration de la paroi bactérienne n'est observée, pénétration qui pour le premier modèle bactérien est corrélée aux effets cytotoxiques.

La nature chimique. Les nanoparticules d'oxyde métallique TiO_2 et Al_2O_3 ne montrent pas les mêmes effets cytotoxiques. Si pour les cellules A549 les nanoparticules TiO_2 ont effet plus prononcé qu' Al_2O_3 , il s'avère que pour *E. coli* MG1655 c'est l'inverse.

La cristallinité et/ou la forme. En absence de lumière, les nanoparticules TiO_2 anatase ont un effet plus cytotoxique que les rutilés à la fois pour *E. coli* MG1655 et pour les cellules A549. Cette différence peut s'expliquer par une plus grande réactivité surfacique chez les anatases. Cependant cette caractéristique est difficilement dissociable de la forme puisque les nanoparticules rutilés étudiées diffèrent aussi par leur forme en épingle. Malgré tout n'ayant pas observé de différence de comportement majeure dans les cellules A549 (contrairement à *E. coli* MG1655 chez qui ces nanoparticules ne pénètrent pas la paroi bactérienne), il s'agit plus probablement pour ce modèle d'une influence de la cristallinité.

La charge surfacique. Nous avons observés que seules les nanoparticules chargées positivement pénètrent la paroi de nos deux modèles bactériens. Néanmoins, il peut s'agir d'une coïncidence puisque ce sont ces mêmes nanoparticules qui sont de forme sphérique, de diamètre inférieur à 50 nm et de cristallinité anatase pour TiO_2 .

La présence d'impuretés semble jouer un rôle dans la capacité à engendrer une production d'ERO intracellulaire. Cela a été montré pour la présence de fer dans les nanotubes qui semble être à l'origine d'une production plus importante d'ERO intracellulaires. Il est possible aussi que ce soit le cas pour les nanoparticules TiO_2 rut-NP qui contiennent du silicium en surface.

La stabilité chimique des nanoparticules (ou capacité à se dissoudre) est suspectée dans les mécanismes hypothétiques proposés afin d'expliquer la production d'ERO intracellulaires ou les effets cytotoxiques. Elle n'a cependant été vérifiée uniquement dans l'eau où les nanoparticules se révèlent stables, et serait à expérimenter dans les milieux biologiques ou dans les cellules. Cette capacité à se dissoudre est aussi suspectée pour les nanoparticules Al_2O_3 avec qui une inhibition de la SOD a été constaté, inhibition qui est connue des ions Al^{3+} par fixation sur le site catalytique de l'enzyme.

D'autres différences d'effet n'ont pas pu être expliquées en particulier en ce qui concerne la production d'ERO intracellulaires à 24 h qui est importante en présence de TiO₂ P25 et nulle en présence de TiO₂ CEA. Ces deux nanoparticules ayant des caractéristiques physico-chimiques très proches (à l'exception de la taille qui reste tout de même inférieure à 60 nm pour les deux), cela nous laisse penser qu'une caractéristique majeure qui reste à déterminer est l'origine de cette différence d'effet. Il serait de plus intéressant d'enrichir ces travaux en étudiant d'autres nanoparticules ne différant de préférence que par une seule caractéristique à la fois en commençant par des nanoparticules de TiO₂ rutile, de forme sphérique et chargée positivement dans l'eau.

Dans cette étude il apparaît donc clairement que certaines nanoparticules peuvent avoir des effets biologiques plus prononcés que d'autres et que l'intensité de ces effets dépend de la nature des nanoparticules mais aussi de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Bibliographie

- Adams, L. K., Lyon, D. Y., and Alvarez, P. J. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res*, 40(19) :3527–3532.
- Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Dommann, E., and Schnettler, R. (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25(18) :4383–4391.
- Alvarez-Román, R., Naika, A., Kalia, Y., Guy, R., and Fessia, H. (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99 :53–62.
- Andrews, R., Jacques, D., Qian, D., and Dickey, E. (2001). Purification and structural annealing of multiwalled carbon nanotubes at graphitization temperatures. *Carbon*, 39(11) :1681–1687.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., Meo, M. D., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J.-L., Botta, A., Wiesner, M. R., and Bottero, J.-Y. (2006). In vitro interactions between dmsa-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts : A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ Sci Technol*, 40(14) :4367–4373.
- Baan, R. A. (2007). Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers : recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal Toxicol*, 19 Suppl 1 :213–228.

- Bachmann, B. (1996). *Escherichia coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology*, chapter Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, pages 2460–2488. ASM Press.
- Balis, J. U., Bumgarner, S. D., Paciga, J. E., Paterson, J. F., and Shelley, S. A. (1984). Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells : description of an in vitro model for human type II cell dysfunction. *Exp Lung Res*, 6(3-4) :197–213.
- Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P., and Waggoner, A. S. (2004). Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem*, 15(1) :79–86.
- Barlow, P. G., Clouter-Baker, A., Donaldson, K., Maccallum, J., and Stone, V. (2005). Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part Fibre Toxicol*, 2 :11.
- Barnes, C., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Lesniak, A., Salvati, A., Hanrahan, J., Jong, W., Dziubatowska, E., Stepnik, M., Rydzynski, K., McKerr, G., Lynch, I., Dawson, K., and Howard, C. (2008). Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. *Nano Lett*, 8(9) :3069–3074.
- Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*, 195(1) :133–140.
- Benabbou, A. K., Derriche, Z., Felix, C., and Guillard, P. L. C. (2007). Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV radiation. *Applied catalysis B : Environmental*, 76 :257–263.
- Benmerah, A. and Lamaze, C. (2002). Endocytose : chaque voie compte ! *Médecine Sciences*, 18 :1126–36.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331) :1453–1474.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24(2-3) :119–124.

- Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., and Mustelin, T. (2006). Multi-walled carbon nanotubes induce t lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett*, 160(2) :121–126.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., and Desjardins, R. (1999). Live/dead baclight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods*, 37(1) :77–86.
- Boveris, A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol*, 78 :67–82.
- Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 128(3) :617–630.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., and Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett*, 6(4) :866–870.
- Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles : a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol*, 175(3) :191–199.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., and Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60 :309–319.
- Brunekreef, B. (1997). Air pollution and life expectancy : is there a relation? *Occup Environ Med*, 54(11) :781–784.
- Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., and Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles : comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*, 40(14) :4374–4381.
- Buford, M. C., Hamilton, R. F., and Holian, A. (2007). A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 4 :6.
- Bussy, C., Cambedouzou, J., Lanone, S., Leccia, E., Heresanu, V., Pinault, M., Mayne-L'hermite, M., Brun, N., Mory, C., Cotte, M., Doucet, J., Boczkowski, J., and Launois, P. (2008). Carbon nanotubes in macrophages : Imaging and chemical analysis by x-ray fluorescence microscopy. *Nano Lett*.

- Buzea, C., Pacheco, I. I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles : sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4) :MR17–MR71.
- Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., Lyng, F. M., Byrne, H. J., and Chambers, G. (2007a). Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon*, 45(1) :34–40.
- Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F., Byrne, H., and Chambers, G. (2007b). Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon*, 45 :1425–1432.
- Casey, A., Herzog, E., Lyng, F. M., Byrne, H. J., Chambers, G., and Davoren, M. (2008). Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicol Lett*, 179(2) :78–84.
- Cathcart, R., Schwieters, E., and Ames, B. N. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem*, 134(1) :111–116.
- Chang, Q., Yan, L., Chen, M., He, H., and Qu, J. (2007). Bactericidal mechanism of Ag/Al₂O₃ against *Escherichia coli*. *Langmuir*, 23(22) :11197–11199.
- Chen, X. and Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials : Synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical Reviews*, 107(7) :2891–2959.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B., and Wan, L. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett*, 163(2) :109–120.
- Cherukuri, P., Bachilo, S. M., Litovsky, S. H., and Weisman, R. B. (2004). Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc*, 126(48) :15638–15639.
- Cho, Y. J., Seo, M. S., Kim, J. K., Lim, Y., Chae, G., Ha, K. S., and Lee, K. H. (1999). Silica-induced generation of reactive oxygen species in Rat2 fibroblast : role in activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 262(3) :708–712.
- Commissariat à l’Energie Atomique (2005). Clefs du cea n°52 : Le nanomonde, de la science aux applications.

- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., and Zimmerli, S. (2000). Phagocytic uptake of encephalitozoon cuniculi by nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 68(12) :6939–6945.
- Cross, P. C. and Mercer, K. (1995). *Ultrastructure cellulaire et tissulaire : Approche fonctionnelle*. De Boeck & Larcier.
- Cross, S. E., Innes, B., Roberts, M. S., Tsuzuki, T., Robertson, T. A., and McCormick, P. (2007). Human skin penetration of sunscreen nanoparticles : In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol*, 20 :148–154.
- Cui, D., Tian, F., Ozkan, C. S., Wang, M., and Gao, H. (2005). Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett*, 155(1) :73–85.
- Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H. J., and Lyng, F. M. (2007). In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro*, 21(3) :438–448.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*, 115(1) :61–69.
- Di, J., Yao, K., Han, W., and Bi, S. (2006). Study on the interaction of copper-zinc superoxide dismutase with aluminum ions by electrochemical and fluorescent method. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 65(3-4) :896–900.
- Ding, L., Stilwell, J., Zhang, T., Elboudwarej, O., Jiang, H., Selegue, J. P., Cooke, P. A., Gray, J. W., and Chen, F. F. (2005). Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett*, 5(12) :2448–2464.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., and Alexander, A. (2006). Carbon nanotubes : a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci*, 92(1) :5–22.
- Drimalova, E., Velebny, V., Sasinkova, V., Hromadkova, Z., and Ebringerova, A. (2005). Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers*, 61 :420–426.
- Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3) :396–397.

- Dumortier, H., Lacotte, S., Pastorin, G., Marega, R., Wu, W., Bonifazi, D., Briand, J.-P., Prato, M., Muller, S., and Bianco, A. (2006). Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett*, 6(7) :1522–1528.
- Elgrabli, D., Abella-Gallart, S., Aguerre-Chariol, O., Robidel, F., Rogerieux, F., Boczkowski, J., and Lacroix, G. (2007). Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies. *Nanotoxicology*, 1 :4 :266–278.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1) :81–128.
- Fabian, E., Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Wiench, K., Wohlleben, W., and van Ravenzwaay, B. (2008). Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol*, 82(3) :151–157.
- Fang, J., Lyon, D. Y., Wiesner, M. R., Dong, J., and Alvarez, P. J. J. (2007). Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environ Sci Technol*, 41(7) :2636–2642.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualite chimique*, 6 :108–115.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, 147(1-2) :29–36.
- Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J. B., and Fubini, B. (2006). Reactivity of carbon nanotubes : free radical generation or scavenging activity? *Free Radic Biol Med*, 40(7) :1227–1233.
- Foucaud, L., Wilson, M. R., Brown, D. M., and Stone, V. (2007). Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett*, 174(1-3) :1–9.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualite chimique*, 6 :91–96.
- Garrett, D. R. H., Grisham, C. M., and Lubochinsky, B. (2000). *Biochimie*. De Boeck Université.
- Garza, K. M., Soto, K. F., and Murr, L. E. (2008). Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int J Nanomedicine*, 3(1) :83–94.

- Geiser, M., Casaulta, M., Kupferschmid, B., Schulz, H., Semmler-Behnke, M., and Kreyling, W. (2008). The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38(3) :371–376.
- GeoYearbook (2007). Emerging challenges : Nanotechnology and the environment.
- Glory, J., Mierczynska, A., Pinault, M., Mayne-L’Hermite, M., and Reynaud, C. (2007). Dispersion study of long and aligned multi-walled carbon nanotubes in water. *Journal of Nanosciene and Nanotechnology*, 7(10) :3458–3462.
- Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., and Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles : effect of particle composition. *Environ Health Perspect*, 115(3) :403–409.
- Grassian, V. H., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., O’shaughnessy, P. T., and Thorne, P. S. (2007). Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles : Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology*, 1 :221226.
- Gun’ko, V., Zarko, V., Leboda, R., and Chibowski, E. (2001). Aqueous suspension of fumed oxides : particle size distribution and zeta potential. *Advances in colloid and interface science*, 91(1) :1–112.
- Gurr, J.-R., Wang, A. S. S., Chen, C.-H., and Jan, K.-Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2) :66–73.
- Gurtovenko, A. A. and Anwar, J. (2007). Modulating the structure and properties of cell membranes : the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem B*, 111(35) :10453–10460.
- Hajmeer, M., Ceylan, E., Marsden, J. L., and Fung, D. Y. C. (2006). Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157 :H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. *Food Microbiol*, 23(5) :446–452.
- Harris, P. J. F. (1999). *Carbon Nanotubes and Related Structures. New Materials for the Twenty-First Century*. Cambridge University Press.
- Hillyer, J. F. and Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*, 90(12) :1927–1936.

- Huang, L., Li, D.-Q., Lin, Y.-J., Wei, M., Evans, D. G., and Duan, X. (2005). Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *J Inorg Biochem*, 99(5) :986–993.
- Hullmann, A. (2006). The economic development of nanotechnology - an indicators based analysis. Technical report, European Commission, Unit of Nano S&T - Convergent Science and Technologies.
- Hund-Rinke, K. and Simon, M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (tio₂) on algae and daphnids. *Environ Sci Pollut Res Int*, 13(4) :225–232.
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., and Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*, 19(7) :975–983.
- Hyung, H., Fortner, J. D., Hughes, J. B., and Kim, J.-H. (2007). Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environ Sci Technol*, 41(1) :179–184.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354 :56–58.
- Invitrogen (2008). Live/dead : baclight viability kit.
- Ireland, J. C., Klostermann, P., Rice, E. W., and Clark, R. M. (1993). Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Appl Environ Microbiol*, 59(5) :1668–1670.
- Jacobsen, N. R., Pojana, G., White, P., Møller, P., Cohn, C. A., Korsholm, K. S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S., and Wallin, H. (2008). Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade markMouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*, 49(6) :476–487.
- Jain, A. K., Mehra, N. K., Lodhi, N., Dubey, V., Mishra, D. K., Jain, P. K., and Jain, N. K. (2007). Carbon nanotubes and their toxicity. *Nanotoxicology*, 1 :167–197.
- Jani, P., McCarthy, D., and Florence, A. (1994). Titanium dioxide (rutile) nanoparticle uptake from the rat gastrointestinal tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International journal of pharmaceuticals*, 105(2) :157–168.
- Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., and Guo, X. (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials : single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*, 39(5) :1378–1383.

- Jiang, J., Oberdörster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P., and Biswas, P. (2008). Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology*, 2 :33–42.
- Jong, W. H. D., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J. A. M., and Geertsma, R. E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29(12) :1912–1919.
- Kaegi, R., Burkhardt, M., Sinnet, B., and Boller, M. (2008). Nanoparticles detected in the runoff of an urban area. In *NanoECO : Nanoparticles in the Environment Implications and Applications. Book of Abstracts*.
- Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Konduru, N. V., Potapovich, A. I., Osipov, A. N., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., and Shvedova, A. A. (2006). Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages : role of iron. *Toxicol Lett*, 165(1) :88–100.
- Kane, A. B. and Hurt, R. H. (2008). Nanotoxicology : The asbestos analogy revisited. *Nature Nanotechnology*, 3 :378–379.
- Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D., and Elimelech, M. (2008). Antibacterial effects of carbon nanotubes : Size does matter ! *Langmuir*.
- Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L. D., and Elimelech, M. (2007). Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir*, 23(17) :8670–8673.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., and Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic : a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*, 21(9) :1726–1732.
- Kaszuba, M. (1999). The measurement of nanoparticles using photon correlation spectroscopy and avalanche photo diodes. *Journal of Nanoparticle Research*, 1 :405–409.
- Kattumuri, V., Katti, K., Bhaskaran, S., Boote, E. J., Casteel, S. W., Fent, G. M., Robertson, D. J., Chandrasekhar, M., Kannan, R., and Katti, K. V. (2007). Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles : in vivo pharmacokinetics and x-ray-contrast-imaging studies. *Small*, 3(2) :333–341.

- Kendall, M. (2007). Fine airborne urban particles (PM_{2.5}) sequester lung surfactant and amino acids from human lung lavage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293(4) :L1053–L1058.
- Kennedy, A. J., Hull, M. S., Steevens, J. A., Dontsova, K. M., Chappell, M. A., Gunter, J. C., and Weiss, C. A. (2008). Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem*, page 1.
- Keston, A. S. and Brandt, R. (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem*, 11 :1–5.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., and Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(1) :95–101.
- Kisin, E. R., Murray, A. R., Keane, M. J., Shi, X.-C., Schwegler-Berry, D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W. E., Kagan, V. E., and Shvedova, A. A. (2007). Single-walled carbon nanotubes : geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*, 70(24) :2071–2079.
- Kreyling, W. and Scheuch, G. (2000). *Particle-Lung Interactions*, chapter Chapter 7 : Clearance of particles deposited in the lungs, pages 323–376. Marcel Dekker, Inc., Publishers.
- Kulmala, M., Vehkamäki, H., Petaja, T., Dal Maso, M., Lauri, A., Kerminen, V., Birmili, W., and McMurry, P. (2004). Formation and growth rates of ultrafine atmospheric particles : a review of observations. *Journal of aerosol science*, 35(2) :143–176.
- Kusters, K. A., Pratsinis, S. E., Thoma, S. G., and Smith, D. M. (1994). Energy-size reduction laws for ultrasonic fragmentation. *Powder Technology*, 80(3) :253–263.
- Lademann, J., Weigmann, H.-J., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G., and Sterry, W. (1999). Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 12 :247–256.
- Lecoanet, H. F. and Wiesner, M. R. (2004). Velocity effects on fullerene and oxide nanoparticle deposition in porous media. *Environ Sci Technol*, 38(16) :4377–4382.

- Legrand, C., Bour, J. M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., and Duval, D. (1992). Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. *J Biotechnol*, 25(3) :231–243.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*, 17(1) :62–70.
- Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D., and Stark, W. J. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts : effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol*, 39(23) :9370–9376.
- Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., and Stark, W. J. (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells : influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol*, 41(11) :4158–4163.
- Lin, D. and Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles : inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut*, 150(2) :243–250.
- Lin, W., Huang, Y.-W., Zhou, X.-D., and Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 217(3) :252–259.
- Linsebigler, A., Lu, G., and Yates, T. (1995). Photocatalysis on TiO_2 surfaces - principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Reviews*, 95(3) :735–758.
- Lippmann, M. (1990). Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ Health Perspect*, 88 :311–317.
- Liu, D. (1981). A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol*, 26(2) :145–149.
- Liu, R. and Zhao, D. (2007). Reducing leachability and bioaccessibility of lead in soils using a new class of stabilized iron phosphate nanoparticles. *Water research*, 41(12) :2491–2502.
- Liu, Y., Li, J., Qiu, X., and C, B. (2007). Bactericidal activity of nitrogen doped metal oxide nanocatalysts and the influence of bacterial extracellular polymeric substances (EPS). *J Photochem Photobiol A Chem*, 190 :94–100.

- Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry, G. V., and Veronesi, B. (2006). Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2) : implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol*, 40(14) :4346–4352.
- Lovern, S. B. and Klaper, R. (2006). *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25(4) :1132–1137.
- Luther, W. (2004). Industrial application of nanomaterials-chances and risks. Technical report, Future Technologies Division of VDI Technologiezentrum.
- Lyon, D. Y., Adams, L. K., Falkner, J. C., and Alvarez, P. J. J. (2006). Antibacterial activity of fullerene water suspensions : effects of preparation method and particle size. *Environ Sci Technol*, 40(14) :4360–4366.
- Lyon, D. Y., Brunet, L., Hinkal, G. W., Wiesner, M. R., and Alvarez, P. J. J. (2008). Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC60) is not due to ROS-mediated damage. *Nano Lett*, 8(5) :1539–1543.
- Lyon, J. L. and Stevenson, K. J. (2007). Anomalous electrochemical dissolution and passivation of iron growth catalysts in carbon nanotubes. *Langmuir*, 23(22) :11311–11318.
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J. W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., and Forró, L. (2006). Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett*, 6(6) :1121–1125.
- Makhluf, S., Dror, R., Nitzan, Y., Abramovich, Y., Jelinek, R., and A, G. (2005). Microwave assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide. *Adv Function Mat*, 15 :1708–1715.
- Mandzy, N., Grulke, E., and Druffel, T. (2005). Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder technology*, 160(2) :121–126.
- Manna, S. K., Sarkar, S., Barr, J., Wise, K., Barrera, E. V., Jejelowo, O., Rice-Ficht, A. C., and Ramesh, G. T. (2005). Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. *Nano Lett*, 5(9) :1676–1684.
- Marieb, E. N. (2000). *Biologie humaine : Anatomie et Physiologie*. De Boeck.

- Mashino, T., Okuda, K., Hirota, T., Hirobe, M., Nagano, T., and Mochizuki, M. (1999). Inhibition of *e. coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. *Bioorg Med Chem Lett*, 9(20) :2959–2962.
- Mashino, T., Usui, N., Okuda, K., Hirota, T., and Mochizuki, M. (2003). Respiratory chain inhibition by fullerene derivatives : hydrogen peroxide production caused by fullerene derivatives and a respiratory chain system. *Bioorg Med Chem*, 11(7) :1433–1438.
- Mavon, A., Miquela, C., Lejeune, O., Payre, B., and Moretto, P. (2007). *in vitro* percutaneous absorption and *in vivo* stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol*, 20 :10–20.
- Maynard, A. and Aitken, R. (2007). Assessing exposure to airborne nanomaterials : current abilities and future requirements. *Nanotoxicology*, 1 :26–41.
- Maynard, A. and Maynard, R. (2002). A derived association between ambient aerosol surface area and excess mortality using historic time series data. *Atmospheric Environment*, 36 :5561–5567.
- Meng, H., Chen, Z., Xing, G., Yuan, H., Chen, C., Zhao, F., Zhang, C., and Zhao, Y. (2007). Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity : explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicol Lett*, 175(1-3) :102–110.
- Mergeay, M., Houba, C., and Gerits, J. (1978). Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions : evidence from curing in a pseudomonas. *Arch Int Physiol Biochim*, 86(2) :440–442.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., and Gijsegem, F. V. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol*, 162(1) :328–334.
- Mühlfeld, C., Geiser, M., Kapp, N., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2007). Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index" : Evidence for clearance through microvasculature. *Part Fibre Toxicol*, 4 :7.
- Mitoraj, D., Janczyk, A., Strus, M., Kisch, H., Stochel, G., Heczko, P. B., and Macyk, W. (2007). Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium dioxide. *Photochem Photobiol Sci*, 6(6) :642–648.
- Möller, W., Felten, K., Sommerer, K., Scheuch, G., Meyer, G., Meyer, P., Häussinger, K., and Kreyling, W. G. (2008). Deposition, retention, and translocation of

- ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(4) :426–432.
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., Wang, Y. Y., and Nemanich, R. J. (2005a). Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes. *Nanomedicine*, 1(4) :293–299.
- Monteiro-Riviere, N. A., Nemanich, R. J., Inman, A. O., Wang, Y. Y., and Riviere, J. E. (2005b). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett*, 155(3) :377–384.
- Moore, K. and Roberts, L. J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 28(6) :659–671.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., and Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 :2346–2353.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2) :55–63.
- Mueller, N. C. and Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol*, 42(12) :4447–4453.
- Mukherjee, A., Raichur, A. M., and Modak, J. M. (2005). Dissolution studies on TiO₂ with organics. *Chemosphere*, 61(4) :585–588.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., and Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci*, 101(2) :239–253.
- Murr, L. and Soto, K. (2004). Tem comparison of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbon nanotubes. *Journal of materials science*, 39(15) :4941–4947.
- Murr, L., Soto, K., Esquivel, E., Bang, J., Guerrero, P., Lopez, D., and Ramirez, D. (2004). Carbon nanotubes and other fullerene-related nanocrystals in the environment : A tem study. *JOM*, 56(6) :28–31.
- Naicker, P., Cummings, P., Zhang, H., and Banfield, J. (2005). Characterization of titanium dioxide nanoparticles using molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(32) :15243–15249.

- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P. H., and Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5) :372–386.
- Neal, A. L. (2008). What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, 17(5) :362–371.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., and Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761) :622–627.
- Oberdörster, E. (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*, 112(10) :1058–1062.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J. N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A. C. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 96(96) :5–74 ; disc. 75–86.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., and Group, I. L. S. I. R. F. S. I. N. T. S. W. (2005a). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials : elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*, 2 :8.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005b). Nanotoxicology : an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113(7) :823–839.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, 16(6-7) :437–445.
- Oskam, G. (2006). Metal oxide nanoparticles : synthesis, characterization and application. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 37 :161–164.
- Ostiguy, C., Lapointe, G., Ménard, L., Cloutier, Y., Trottier, M., Boutin, M., Antoun, M., and Normand, C. (2006). Les nanoparticules. connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

- Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., and Ménard, L. (2008). Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.
- Pacurari, M., Yin, X. J., Zhao, J., Ding, M., Leonard, S. S., Schwegler-Berry, D., Ducatman, B. S., Sbarra, D., Hoover, M. D., Castranova, V., and Vallyathan, V. (2008). Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect*, 116(9) :1211–1217.
- Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70(1) :158–169.
- Pal, S., Tak, Y. K., and Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? a study of the gram-negative bacterium escherichia coli. *Appl Environ Microbiol*, 73(6) :1712–1720.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., and Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*, 154(2) :536–541.
- Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., and Dasgupta, A. K. (2007). Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(2) :111–119.
- Peters, A., Wichmann, H. E., Tuch, T., Heinrich, J., and Heyder, J. (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(4) :1376–1383.
- Peters, K., Unger, R. E., Kirkpatrick, C. J., Gatti, A. M., and Monari, E. (2004). Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro : studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med*, 15(4) :321–325.
- Pignon, B., Maskrot, H., Guyot Ferreol, V., Leconte, Y., Coste, S., Gervais, M., Pouget, T., Reynaud, C., Tranchant, J.-F., and Herlin-Boime, N. (2008). Versatility of laser pyrolysis applied to synthesis of TiO₂ nanoparticles, application to UV attenuation. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 6 :883–889.
- Pinault, M., Mayne-L’Hermite, M., Reynaud, C., Pichot, V., Launois, P., and Bal-lutaud, D. (2005). Growth of multiwalled carbon nanotube during the initial stages of aerosol-assisted ccvd. *Carbon*, 116 :1 :2968–2976.
- Pitkethly, M. (2003). Nanoparticles as building blocks? *NanoToday*, 12 :36–42.

- Poland, C. A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W. A. H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., and Donaldson, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology*, 3 :423–428.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2003). *Microbiologie*. De Boeck University.
- Pulskamp, K., Diabaté, S., and Krug, H. F. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett*, 168(1) :58–74.
- Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D. G., and Schiffmann, D. (2002). Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect*, 110(8) :797–800.
- Raja, P. M. V., Connolley, J., Ganesan, G. P., Ci, L., Ajayan, P. M., Nalamasu, O., and Thompson, D. M. (2007). Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells. *Toxicol Lett*, 169(1) :51–63.
- Ramanakumar, A. V., Parent, M.-E., Latreille, B., and Siemiatycki, J. (2008). Risk of lung cancer following exposure to carbon black, titanium dioxide and talc : results from two case-control studies in montreal. *Int J Cancer*, 122(1) :183–189.
- Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., and Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett*, 90(213902) :2139021–2139023.
- Reilly, R. M. (2007). Carbon nanotubes : potential benefits and risks of nanotechnology in nuclear medicine. *J Nucl Med*, 48(7) :1039–1042.
- Reith, F., Rogers, S. L., McPhail, D. C., and Webb, D. (2006). Biomineralization of gold : biofilms on bacterioform gold. *Science*, 313(5784) :233–236.
- Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., and Glasebrook, A. L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt xtt. *J Immunol Methods*, 142(2) :257–265.
- Rothkamm, K. and Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of dna double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9) :5057–5062.

- Sager, T. M., Porter, D. W., Robinson, V. A., Lindsley, W. G., Schwegler-Berry, D. E., and Castranova, V. (2007). Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology*, 1 :2 :118–129.
- Sato, Y., Yokoyama, A., ichiro Shibata, K., Akimoto, Y., ichi Ogino, S., Nodasaka, Y., Kohgo, T., Tamura, K., Akasaka, T., Uo, M., Motomiya, K., Jeyadevan, B., Ishiguro, M., Hatakeyama, R., Watari, F., and Tohji, K. (2005). Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Mol Biosyst*, 1(2) :176–182.
- Sauter, C., Pohl, M., and Schuchmann, H. P. (2006). Ultrasound for dispersing nanoparticles. In *12th European Conference on Mixing*.
- Sayes, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J. M., Moore, V. C., Doyle, C. D., West, J. L., Billups, W. E., Ausman, K. D., and Colvin, V. L. (2006a). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol Lett*, 161(2) :135–142.
- Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., and Colvin, V. L. (2006b). Correlating nanoscale titania structure with toxicity : a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*, 92(1) :174–185.
- SCENIHR (2006). The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Technical report, Commission Européenne.
- Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C.-M., Schäfer, U. F., Becker, K., Schnekenburger, J., Isfort, C. S., Landsiedel, R., and Wohlleben, W. (2008). Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2 :2 :51–61.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., and Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48(17) :4827–4833.
- Seipenbusch, M., Rothenbacher, S., Weber, A. P., and Kasper, G. (2007). Interparticle forces in nanoparticle agglomerates. In *European Aerosol Conference*.
- Shainkin-Kestenbaum, R., Adler, A. J., Berlyne, G. M., and Caruso, C. (1989). Effect of aluminium on superoxide dismutase. *Clin Sci (Lond)*, 77(5) :463–466.

- Sharma, C. S., Sarkar, S., Periyakaruppan, A., Barr, J., Wise, K., Thomas, R., Wilson, B. L., and Ramesh, G. T. (2007). Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 7(7) :2466–2472.
- Shen, B., Scaiano, J. C., and English, A. M. (2006). Zeolite encapsulation decreases TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol*, 82(1) :5–12.
- Shvedova, A. A., Castranova, V., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Murray, A. R., Gandelsman, V. Z., Maynard, A., and Baron, P. (2003). Exposure to carbon nanotube material : assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A*, 66(20) :1909–1926.
- Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Murray, A. R., Johnson, V. J., Potapovich, A. I., Tyurina, Y. Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, A. F., Antonini, J., Evans, D. E., Ku, B.-K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V. E., Castranova, V., and Baron, P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(5) :L698–L708.
- Simakov, S. A. and Tsur, Y. (2007). Surface stabilization of nano-sized titanium dioxide : Improving the colloidal stability and the sintering morphology. *Journal of nanoparticle research*, 9(3) :403–417.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1) :184–191.
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., and Kostarelos, K. (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9) :3357–3362.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Höhr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P. J. A., and Schins, R. P. F. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂ : role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222(2) :141–151.
- Slater, T. F., Sawyer, B., and Strauvel, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*, 77 :383–393.

- Smith, C. J., Shaw, B. J., and Handy, R. D. (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*oncorhynchus mykiss*) : respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 82(2) :94–109.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., and Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem*, 175(2) :408–413.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1) :76–85.
- Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent : a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, 275(1) :177–182.
- Soto, K., Garza, K. M., and Murr, L. E. (2007). Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater*, 3(3) :351–358.
- Soto, K. F., Carrasco, A., Powell, T. G., Garza, K. M., and Murr, L. E. (2005). Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research*, 7 :145–169.
- Spurr, R. A. and Myers, H. (1957). Quantitative analysis of anatase-rutile mixtures with an x-ray diffractometer. *Analytical Chemistry*, 29 :760 – 762.
- Stearns, R. C., Paulauskis, J. D., and Godleski, J. J. (2001). Endocytosis of ultra-fine particles by a549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(2) :108–115.
- Studart, A. R., Amstad, E., and Gauckler, L. J. (2007). Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions. *Langmuir*, 23(3) :1081–1090.
- Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S., and Kanno, J. (2008). Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*, 33(1) :105–116.
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W. G., Lentner, B., Möller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., Heyder, J., and Schulz, H. (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol*, 18(10) :733–740.

- Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the tryptan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation*, 2 :685–694.
- Theodore, L. and Kunz, R. G. (2005). *Nanotechnology : Environmental Implications and Solutions*, chapter 2 Nanotechnology : Turning Basic Science into Reality, pages 61–105. John Wiley & sons.
- Theron, J., Walker, J. A., and Cloete, T. E. (2008). Nanotechnology and water treatment : Applications and emerging opportunities. *Critical review in microbiology*, 34(1) :43–69.
- Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., and Flank, A. M. (2006). Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ Sci Technol*, 40(19) :6151–6156.
- Tian, F., Cui, D., Schwarz, H., Estrada, G. G., and Kobayashi, H. (2006). Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, 20(7) :1202–1212.
- Tinkle, S. S., Antonini, J. M., Rich, B. A., Roberts, J. R., Salmen, R., DePree, K., and Adkins, E. J. (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect*, 111 :1202–1208.
- Tratnyek, P. G. and Johnson, R. L. (2006). Nanotechnologies for environmental cleanup. *NanoToday*, 1 :44–48.
- Tsao, N., Luh, T.-Y., Chou, C.-K., Chang, T.-Y., Wu, J.-J., Liu, C.-C., and Lei, H.-Y. (2002). In vitro action of carboxyfullerene. *J Antimicrob Chemother*, 49(4) :641–649.
- UnionEuropéenne (2008). Recommandation de la commission du 7 février 2008 concernant un code de bonne conduite pour une recherche responsable en nanosciences et nanotechnologies. Journal officiel de l'Union européenne.
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., and Lorenzon, G. (1994). A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells : performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol*, 10(5-6) :415–421.
- Verbeken, D., Dierckx, S., and Dewettinck, K. (2003). Exudate gums : occurrence, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(1) :10–21.

- Vodenicarova, M., Drimalova, G., Hromadkova, Z., Malovikova, A., and Ebringerova, A. (2006). Xyloglucan degradation using different radiation sources : A comparative study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13 :157–164.
- Wagner, A. J., Bleckmann, C. A., Murdock, R. C., Schrand, A. M., Schlager, J. J., and Hussain, S. M. (2007). Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *J Phys Chem B*, 111(25) :7353–7359.
- Wang, J. J., Sanderson, B. J. S., and Wang, H. (2007). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*, 628(2) :99–106.
- Warheit, D. B., Webb, T. R., Reed, K. L., Frerichs, S., and Sayes, C. M. (2007). Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-tio2 particles : differential responses related to surface properties. *Toxicology*, 230(1) :90–104.
- Wasylnka, J. A. and Moore, M. M. (2002). Uptake of aspergillus fumigatus conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro : quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun*, 70(6) :3156–3163.
- Wick, P., Manser, P., Limbach, L. K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W. J., and Bruinink, A. (2007). The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 168(2) :121–131.
- Williams, D. N., Ehrman, S. H., and Holoman, T. R. P. (2006). Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. *J Nanobiotechnology*, 4 :3.
- Win, K. Y. and Feng, S.-S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15) :2713–2722.
- Witschger, O. and Fabries, J. F. (2005a). Particules ultra-fines et santé au travail. 1- caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail*, 199 :ND2227.
- Witschger, O. and Fabries, J. F. (2005b). Particules ultra-fines et santé au travail. 2- sources et caractérisation de l'exposition. *Hygiène et sécurité du travail*, 199 :ND2228.
- Wörle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K., and Krug, H. F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett*, 6(6) :1261–1268.

- Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., and Nel, A. E. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*, 6(8) :1794–1807.
- Yamago, S., Tokuyama, H., Nakamura, E., Kikuchi, K., Kananishi, S., Sueki, K., Nakahara, H., Enomoto, S., and Ambe, F. (1995). In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene : ^{14}C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol*, 2(6) :385–389.
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., and Xi, Z. (2008a). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials : the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*.
- Yang, L. and Watts, D. J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol Lett*, 158(2) :122–132.
- Yang, W., Peters, J. I., and Williams, R. O. (2008b). Inhaled nanoparticles—a current review. *Int J Pharm*, 356(1-2) :239–247.
- Yoon, K.-Y., Byeon, J. H., Park, J.-H., and Hwang, J. (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ*, 373(2-3) :572–575.
- Zenga, Q., Li, Z., and Zhoua, Y. (2006). Synthesis and application of carbon nanotubes. *Journal of Natural Gas Chemistry*, 15 :235–246.
- Zhang, H. and Banfield, J. (1998). Thermodynamic analysis of phase stability of nanocrystalline titania. *Journal of Materials Chemistry*, 8(9) :2073–2076.
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., and York, D. (2007). Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J Nanoparticle Res*, 9 :479–489.
- Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., Hristovski, K., and Crittenden, J. C. (2008). Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. *Water Res*, 42(8-9) :2204–2212.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BET : Brunauer Emmett et Teller

BSA : Albumine de sérum bovin

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CI₅₀ : Concentration pour laquelle on obtient 50% d'Inhibition cellulaire ou mort cellulaire

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : DiMethyl SulfOxide

DO : Densité Optique

DRX : Diffraction des Rayons X

EDS : analyse dispersive en énergie

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

GA : Gomme Arabique

GPx : Glutathion Peroxydase

GRED : Glutathion REDuctase

GSH : Glutathion

HRMET : Microscope Electronique en Transmission à Haute Résolution

IARC : International Agency for Research on Cancer

ICP-MS : Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif

LDH : Lactate DesHydrogénase

MET : Microscope Electronique en Transmission

METB : Microscope Electronique en Transmission en mode balayage(STEM)

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MTT : Bromure de 3(4.5-diméthylthiazol-2-yl)-2.5-diphényltétrazolium

MWCNT : Multi-Walled Carbon Nanotubes

NtC : Nanotubes de Carbone

NP : Nanoparticules

PBS : Phosphate Buffer Saline

SCP : Spectroscopie par Correlation de Photon

SOD : SuperOxide Dismutase

SWCNT : Single-Walled Carbon Nanotubes

TSM : Tris Salt Medium

TpP : Tampon Phosphate 100 mM à pH = 7,8

TpP-EDTA : Tampon Phosphate 100 mM à pH = 7,8 contenant 10 mM EDTA

UV : Ultra-Violets

XTT : 2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2Htetrazolium-5-carboxyanilide

Amphiphile	Qui possède à la fois une partie hydrophile (aimant l'eau) et une partie hydrophobe ou lipophile (n'aimant pas l'eau).
Anthropogénique	Causé ou généré par l'Homme.
Apoptose	Mort cellulaire programmée
Aquifère	Couche de terrain ou roche, suffisamment poreuse et perméable pour contenir une nappe d'eau souterraine.
Biofilms	Communauté de microorganismes adhérant entre eux par une matrice extracellulaire composée de polymères.
Cytotoxicité	Propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.
Diamètre hydrodynamique	Celui-ci comprend à la fois la taille de la particule mais aussi l'épaisseur de la couche de solvatation qui représente en général quelques nm.
Diffusion	Déplacement d'une molécule ou particule d'une zone plus concentrée vers une zone moins concentrée.
Effet « nano »	Effets dus à une réactivité différente aux très faibles tailles
Endocytose	Mécanisme de transport de molécules ou de particules vers l'intérieur de la cellule, par invagination de la membrane formant ainsi des vésicules.

Espèce radicalaire	Espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe.
Fibre	Particule ayant un rapport longueur/diamètre supérieur à 3/1 et des côtés approximativement parallèles. Ce rapport supérieur à 3/1 est essentiellement basé sur un consensus établi par les hygiénistes. Les minéralogistes préfèrent souvent utiliser un rapport 5/1, voire 10/1, pour définir une structure fibreuse.
Fluorochrome	On appelle fluorochrome ou fluorophore une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons pi.
Fluorochrome	On appelle fluorochrome ou fluorophore une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons pi.
Génotoxicité	Propriété qu'a une substance ou un rayonnement de compromettre l'intégrité du génome par modification de la molécule d'ADN.
Instillation intratrachéale	Technique d'administration d'un composé : ce dernier est directement introduit dans les poumons via la trachée.
Lysosome	Vésicule intracytoplasmique, pourvue d'une membrane, qui contient des enzymes (hydrolases) capables de digérer des molécules intracellulaires.
Osmole	nombre de moles de particules qui peuvent être osmotiquement actives dans une solution, c'est à dire qui sont l'origine de l'osmose.
Osmose	Désigne le phénomène de diffusion de molécules de solvant (l'eau de façon générale) à travers une membrane semi-perméable qui sépare deux liquides de concentrations en soluté différentes. La diffusion se faisant

	du compartiment le moins concentré au plus concentré.
Particules primaires	Particules originelles, ne tenant pas compte de leur aggrégation ou agglomération.
Photocatalytique	Capacité à augmenter la vitesse d'une réaction chimique par interaction de photons à la surface du catalyseur.
Photovoltaïque	Capacité à générer une tension électrique suite à l'absorption de photons.
Surfactant (i.e tensio-actif)	Agent diminuant la tension superficielle entre deux surfaces.
Translocation	Passage des barrières physiologiques
Viabilité cellulaire	Capacité d'une cellule à vivre c'est à dire à se reproduire

Liste des figures

1.1	Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Energie Atomique, 2005) .	6
1.2	Évolution du rapport surface volume et de la fraction d'atomes présents à la surface de la particule en fonction du diamètre de la particule	7
1.3	Arrangement cristallographique des atomes de TiO_2 anatase et rutile	13
1.4	Les nanotubes de carbone	14
1.5	Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement	15
1.6	Distributions granulométriques d'un aérosol atmosphérique en environnement urbain (d'après Witschger and Fabries, 2005b)	17
1.7	Dépôt de particules dans les différentes régions des poumons . . .	20
1.8	Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules (en rouge) et devenir dans le corps humain (bleu) (d'après Buzea et al., 2007). . . .	22
1.9	Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine décrit dans la littérature	24
1.10	Démarche de l'étude	36
2.1	Photographie des nanoparticules	40
2.2	Montage du sonicateur.	41
2.3	Evolution du diamètre hydrodynamique moyen de TiO_2 P25 en fonction du temps de sonication	42
2.4	La spectroscopie par corrélation de photons	43
2.5	Données obtenues par spectroscopie à corrélation de photon : exemple de TiO_2 P25.	44

2.6	Charge et potentiels électriques d'une particule.	45
2.7	Variation du potentiel zêta en fonction du pH de la solution de TiO ₂ CEA.	46
2.8	Principe de la DRX.	47
2.9	Données obtenues par DRX	48
2.10	Montage du dispositif microfaisceau permettant les mesures de DRX.	49
2.11	Montage et principe de l'ICP-MS	50
2.12	Les différentes étapes de mesure de la surface spécifique par la méthode de BET	53
2.13	Observations des bactéries étudiées au MET	54
2.14	Principe du kit Live/Dead® BacLight TM	58
2.15	Relation entre le rapport de fluorescence vert sur rouge et le pour- centage de viabilité cellulaire.	59
2.16	Localisation et observation microscopique des pneumocytes II . . .	60
2.17	Principe du test MTT.	62
2.18	Principe du test XTT.	63
2.19	Principe du test à la résazurine	64
2.20	Principe du test LDH	65
2.21	Principe du dosage du glutathion total.	68
2.22	Principe du dosage de la glutathion peroxydase.	69
2.23	Principe du dosage de la superoxyde dismutase	70
2.24	Principe du dosage de la catalase	71
2.25	Observations microscopiques des comètes.	72
2.26	L'immunomarquage des histones γ -H ₂ AX	74
2.27	Observation microscopique de micronoyaux.	75
2.28	Schéma simplifié d'un microscope électronique en transmission ² .	77
3.1	Observations microscopiques des nanotubes de carbone	84
3.2	Dimensions des NtC d'après les photographies au MET	85
3.3	Relation entre longueur et diamètre des NtC	87
3.4	Observations microscopiques des particules d'oxyde métallique. . .	88

3.5	Répartition de taille des nanoparticules sphériques.	90
3.6	Analyse chimique de la surface des nanoparticules par EDS.	94
3.7	Etats de dispersion des particules	95
3.8	Etats de dispersion des NtC suite à une sonication dans différentes solutions	96
3.9	Stabilisation des NtC dans l'eau par la gomme arabique	97
3.10	Etat de dispersion des nanoparticules dans l'eau. Diamètre hydrodynamique mesuré par SCP.	97
3.11	Evolution au cours du temps du diamètre hydrodynamique des nanoparticules de TiO ₂ P25	98
3.12	Etat de dispersion des nanoparticules dans le milieu DMEM. Diamètre hydrodynamique mesuré par SCP.	100
3.13	Absorbance des nanoparticules à 600 nm.	101
3.14	Vérification de la non-fluorescence des nanoparticules	102
3.15	Interférences des nanoparticules dans les conditions d'excitation et d'émission du filtre FITC utilisé en microscopie à épifluorescence.	103
4.1	Courbe de croissance d' <i>E. coli</i> MG1655 cultivée en présence de nanoparticules	110
4.2	Effets des nanoparticules sur la viabilité de <i>C. metallidurans</i> CH34 suite à une exposition de 24 h dans l'eau. Evaluation par la technique des dénombrements sur boîte.	112
4.3	Observations directes de <i>C. metallidurans</i> CH34 suite à une exposition aux nanoparticules	112
4.4	Interférences des nanoparticules avec le test Live/Dead® BacLight TM	113
4.5	Viabilité à 24 h d'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de nanotubes de carbone.	114
4.6	Viabilité à 24 h d'exposition de <i>E. coli</i> MG1655 en présence de nanotubes de carbone.	115
4.7	Viabilité à 24 h de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de nanoparticules d'oxyde métallique.	116
4.8	Viabilité à 24 h d'exposition de <i>E. coli</i> MG1655 en présence de nanoparticules d'oxyde métallique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non exposé.	117

4.9	Viabilité à 24 h d'exposition de <i>E. coli</i> MG1655 en présence de nanoparticules de TiO_2 en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules calculée à partir de la surface spécifique par la méthode de BET	117
4.10	Viabilité à 24 h d'exposition de <i>E. coli</i> MG1655 en présence de nanoparticules de TiO_2 en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules calculée à partir de la surface spécifique théorique .	118
4.11	Interférences des nanoparticules avec les tests à la résazurine et au rouge neutre.	119
4.12	Interférence des NtC avec le test au bleu trypan.	120
4.13	Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanotubes de carbone. Evaluation par le test de viabilité cellulaire MTT. . . .	121
4.14	Evolution au cours du temps de l'effet cytotoxique des nanotubes de carbone par le test MTT.	121
4.15	Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanotubes de carbone. Evaluation par les tests de viabilité cellulaire XTT et LDH.	122
4.16	Evolution au cours du temps de l'effet cytotoxique des nanoparticules d'oxyde métallique par le test MTT	124
4.17	Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanoparticules d'oxyde métallique. Evaluation par le test de viabilité cellulaire MTT.	124
4.18	Mortalité des cellules A549 exposées pendant 48 h aux nanoparticules d'oxyde métallique en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules	125
4.19	Interaction des nanotubes de carbone avec le test MTT	132
5.1	Observations microscopiques directes des bactéries exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NtC pendant 24 h.	138
5.2	Changements morphologiques d' <i>E. coli</i> MG1655 en présence de nanoparticules.	138
5.3	Observations microscopiques des bactéries exposées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules anatases.	140
5.4	Observations microscopiques au METB et analyse EDS d'une coupe d' <i>E. coli</i> MG1655 exposée à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules TiO_2 CEA.	141

5.5	Observations microscopiques des bactéries exposées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de particules anatases et nanoparticules rutilés.	142
5.6	Observations microscopiques des bactéries exposées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules d' Al_2O_3	143
5.7	Cartographie par EDS d'une coupe d' <i>E.coli</i> MG1655 exposée à des nanoparticules d' Al_2O_3	143
5.8	Observations microscopiques des cellules A549 exposées aux NtC pendant 48 h	144
5.9	Observations microscopiques des cellules A549 exposées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules d'oxyde métallique.	146
5.10	Observations microscopiques de nanoparticules d'oxyde métallique libres dans le cytoplasme des cellules A549.	147
5.11	Observations microscopiques des vésicules contenant les nanoparticules d'oxyde métallique.	149
5.12	Observations microscopiques de l'interaction entre nanoparticules d'oxyde métallique et membrane plasmique.	150
5.13	Organisation de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif.	151
5.14	Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries.	153
5.15	Les différentes voies d'endocytose	154
5.16	Synthèse et recyclage du surfactant alvéolaire	155
6.1	Les principales voies de formation et de détoxification des ERO	162
6.2	Dosage des ERO intracellulaires par la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ suite à une exposition des cellules A549 aux nanoparticules pendant 4 h (a.) et 24 h (b.). Expression en fonction de la concentration massique en nanoparticules. La significativité des différences entre les moyennes des échantillons exposés et le contrôle non exposé a été évaluée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).	163
6.3	Dosage des ERO intracellulaires par la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ suite à une exposition des cellules A549 aux nanoparticules d'oxyde métallique pendant 4 h (a.) et 24 h (b.). Expression en fonction de la concentration surfacique en nanoparticules.	164

6.4	Dosage des systèmes intervenant dans la régulation du stress oxydant dans les cellules A549 exposées aux nanoparticules.	166
6.5	Les lésions de l'ADN causées par les radicaux libres (Favier, 2003).	167
6.6	Exemple de photographies de comètes : le contrôle positif a été obtenu en exposant les cellules à 100 μM d'étoposide pendant 24 h et TiO_2 P25 suite à une exposition à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant 24 h.	168
6.7	Longueur de la queue des comètes mesurée après une exposition à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanoparticules pendant 24 h. Les tailles des comètes ont été évaluées à l'aide du logiciel COMET IV.	168
6.8	Observations microscopiques des cassures doubles brins suite à une exposition aux nanoparticules.	169
6.9	Observations microscopiques des micronoyaux suite à une exposition aux nanoparticules.	170
6.10	Mécanismes hypothétiques et non exhaustifs de formation d'ERO intracellulaires.	174
6.11	Exemples de mécanismes de production d'ERO mettant en jeu l'activité catalytique surfacique des nanoparticules.	175
6.12	Proposition de mécanismes d'action conduisant à la mort cellulaire.	177

Liste des tableaux

1.1	Évolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique (d'après Luther, 2004).	8
1.2	Principales sources de nanoparticules	9
1.3	Principales nanoparticules manufacturées ayant un intérêt commercial (d'après Theodore and Kunz, 2005).	11
1.4	Prédiction des concentrations en nanoparticules de TiO ₂ , d'Ag et NtC dans les différents compartiments environnementaux	16
1.5	Effets biologiques des nanoparticules sur les bactéries. Avec CMI : concentration minimale inhibitrice, CMB : concentration minimale bactéricide et ERO : espèces réactives de l'oxygène.	27
1.6	Effets biologiques des nanoparticules d'oxyde métallique décrits dans des études <i>in vitro</i>	29
1.7	Effets biologiques des nanotubes de carbone décrits dans des études <i>in vitro</i>	31
2.1	Principales énergies de rayons X réémis utilisées pour l'identification élémentaire par analyse EDS.	52
2.2	Composition des milieux de culture Tris Salt Medium (TSM) et Luria-Bertani (LB).	56
3.1	Paramètres de distribution des longueurs et des diamètres des NtC	86
3.2	Paramètres de distribution de taille des particules et nanoparticules étudiées.	89
3.3	Surfaces spécifiques et diamètres moyens des nanoparticules.	91

3.4	Point isoélectrique des nanoparticules et leur potentiel zêta dans les conditions d'exposition. Avac nd : non déterminé.	92
3.5	Structure cristalline des oxydes de titane étudiés	93
3.6	Diamètres moyens en nm des nanoparticules TiO ₂ P25 après dispersion dans différentes solutions et après dilution des suspensions obtenues dans les milieux d'exposition bactérien (TSM) et cellulaire (DMEM) pendant 24 h.	99
3.7	Analyse par ICP des éléments solubilisés dans les surnageants des suspensions de nanoparticules	100
4.1	Temps de génération en h des bactéries <i>C. metallidurans</i> CH34 et <i>E. coli</i> MG1655 cultivées en présence de 100 µg.mL ⁻¹ de nanoparticules.	111
4.2	Comparaison de la mortalité cellulaire des cellules A549 obtenue par différents tests de viabilité cellulaire.	126

Annexes

Annexe 1 : Références des produits utilisés

A

Al_2O_3 : Degussa, Aeroxide® AluC

Acide gluconique : Sigma-Aldrich, ref. G9005

Acide bicinchonique (BCA) : Sigma-Aldrich, ref. B9643

Albumine de serum bovin (BSA), standard de protéines : Sigma-Aldrich, ref. P0914

ATB : Sigma-Aldrich, ref. P0781

B

Bromure d'ethidium (BET) : Sigma-Aldrich, ref. E1510

C

CaCl_2 : Sigma-Aldrich, ref. C5050

CdCl_2 : Aldrich, ref. 20,298-8

Cytochalasine B : Sigma-Aldrich, ref. C6762

D

DMEM : Sigma-Aldrich, ref. D6429

DMEM sans rouge de phénol : Sigma-Aldrich, ref. D1145

DMSO : Sigma-Aldrich, ref. D5879

E

EDTA : Sigma-Aldrich, ref. E5134

Etoposide : Sigma-Aldrich, ref. E1383

F

Fe(NH₄) Citrate : F5879

G

Glutamine : Sigma-Aldrich, ref. G7513

Glutaraldehyde : Sigma-Aldrich, ref. G5882

Gomme arabique : Sigma-Aldrich, ref. G9752

H

H₂O₂ stable : Sigma-Aldrich, ref. H1009

H₂DCF-DA : Invitrogen, ref. D399

K

KCl : Sigma-Aldrich, ref. P9333

L

LB : Sigma-Aldrich, ref. L3072

LB agar : Sigma-Aldrich, ref. L2897

LDH (kit) : Sigma-Aldrich, ref. TOX7

Live/Dead® BacLightTM : Invitrogen, ref. L7012

M

MgCl₂ : Sigma-Aldrich, ref. M2670

MTT : Sigma-Aldrich, ref. M2003

N

NaCl : Sigma-Aldrich, ref. S3014

Na₂SO₄ : Sigma-Aldrich, ref. S6547

Na₂HPO₄ : Sigma-Aldrich, ref. S0876

P

Paraquat : Sigma-Aldrich, ref. 36541

PMS : Sigma-Aldrich, ref. P9625

PMSF : Sigma-Aldrich, ref. 78830

R

Resazurine : Sigma-Aldrich, ref. R6892

Rouge neutre (kit) : Sigma-Aldrich, ref. TOX4

S

Serum de veau foetal (SVF) : Sigma-Aldrich, ref. 7524

Sonificateur : Fisher Scientific Bioblock, N75043 le sonificateur, N72422 le coupleur et N72403 la microsonde conique

Sulfate de cuivre(II) : Sigma-Aldrich, ref. C2284

T

Tampon phosphate salin (PBS) : Invitrogen, ref. 70011-044 ou Sigma-Aldrich, ref. P5493

Tampon de lyse cellulaire : Promega, ref. E3971

Tampon de lyse bactérien (CellLytic B) : Sigma-Aldrich, ref. B7435

Ter-butyl hydroperoxide : Sigma-Aldrich, ref. 416665

TiO₂ P25 : Degussa, Aeroxide® P25

TiO₂ ana-NP : Sigma-Aldrich, ref. 637254

TiO₂ ana-P : Sigma-Aldrich, ref. T8141

TiO₂ rut-NP : Sigma-Aldrich, ref. 637262

TiO₂ rut-P : Sigma-Aldrich, ref. 224227

Tris HCl : Sigma-Aldrich, ref. T3253

Trypsine : Sigma-Aldrich, ref. T3924

X

XTT : Invitrogen, ref. X6493

Annexe 2 : Caractéristiques des nanoparticules données par les fournisseurs

Caractéristiques des TiO₂ de Sigma-Aldrich

	TiO ₂ ana-NP	TiO ₂ ana-P	TiO ₂ rut-NP	TiO ₂ rut-P
Référence	637254	T8141	637262	224227
Pureté	99,7%	≥ 99%	99,5%	99,9%
Traces	métaux	-	< 6000 ppm métaux, Si	< 1000 ppm métaux
Forme	nanopoudre	poudre	nanopoudre	poudre
Taille des particules	< 25 nm	< 44 µm	≈ 10 x 40 nm	< 5 µm
S _{spé} en m ² .g ⁻¹	200-220	-	130-190	-
Point de fusion	1825 °C	1855 °C	-	-
Densité	3,9 g.ml ⁻¹ à 25°C		4,17 g.ml ⁻¹ à 25°C	

Product Information

▶ AEROXIDE® TiO₂ P 25

Hydrophilic Fumed Titanium Dioxide

AEROXIDE® TiO₂ P 25 is a highly dispersed titanium dioxide manufactured according to the AEROSIL® - process.

Applications and Properties

Applications

- Catalyst carrier
- Active component for photocatalytic reactions
- Heat stabilizer for silicone rubber

Properties

- Process related high purity
- Heat stabilizing properties for silicone-elastomers through its effect on redox reactions
Thereby:
 - Improvement of ageing properties at high temperature (= 200 °C)
 - Positive impact on flammability protection

Physico-chemical Data

Properties	Unit	Typical Value
Specific surface area (BET)	m ² /g	50 ± 15
Average primary particle size	nm	21
Tapped density* (approx. value), acc. to DIN EN ISO 787/11, Aug. 1983	g/l	approx. 130
Moisture* 2 hours at 105 °C	wt. %	≤ 1.5
Ignition loss, 2 hours at 1000 °C, based on material dried for 2 hours at 105 °C	wt. %	≤ 2.0
pH in 4% dispersion		3.5 - 4.5
Titanium dioxide based on ignited material	wt. %	≥ 99.50
Fe₂O₃ - content based on ignited material	wt. %	≤ 0.010
HCl - content based on ignited material	wt. %	≤ 0.300
Sieve residue (by Mocker, 45µm), acc. to DIN EN ISO 787/18, Apr. 1984	wt. %	≤ 0.050

*ex plant

The data represents typical values and not production parameters.

Safety and Handling

With every sample or initial shipment of our products, we will send a Material Safety Data Sheet. Of course you can also request an MSDS or any other information regarding product safety at any time, or download it as registered user at www.aerosil.com.

Packaging and Storage

AEROXIDE® TiO₂ P 25 is supplied in multiple layer 10 kg bags. We recommend to store the product in closed containers under dry conditions and to protect the material from volatile substances. AEROXIDE® TiO₂ P 25 should be used within 2 years after production.

Registration

AEROXIDE® TiO ₂ P 25					
CAS-No.	EINECS	TSCA (USA), AICS (Australia), CEPA (Canada)	MITI (Japan)	ECL (Korea)	NEPA (China)
13463-67-7	236-675-5	Registered	1-558	Registered	Registered

* Data refer to the inorganic substance used

► For further information please contact:

Commercial Contact

Degussa AG

Business Line Aerosil
Weissfrauenstrasse 9
D-60287 Frankfurt am Main,
Germany
Phone: +49 69/218-2532
Fax: +49 69/218-2533
E-Mail: aerosil@degussa.com
<http://www.aerosil.com>

NAFTA

Degussa Corporation

Business Line Aerosil
379 Interpace Parkway,
P. O. Box 677
Parsippany, NJ 07054-0677
Phone: +1 (800) AEROSIL
Phone: +1 (973) 541-8510
Fax: +1 (973) 541-8501

Asia (without Japan)

Aerosil Asia Marketing Office

c/o NIPPON AEROSIL CO., LTD.
P. O. Box 7015
Shinjuku Monolith 13F
3-1, Nishi-Shinjuku 2-chome
Shinjuku-ku, Tokyo
163-0913 Japan
Phone: +81-3-3342-1786
Fax: +81-3-3342-1761

Japan

NIPPON AEROSIL CO., LTD.

Sales & Marketing Division
P. O. Box 7015
Shinjuku Monolith 13F
3-1, Nishi-Shinjuku 2-chome
Shinjuku-ku, Tokyo
163-0913 Japan
Phone: +81-3-3342-1763
Fax: +81-3-3342-1772

Technical Contact

Degussa AG

Technical Service Aerosil
Rodenbacher Chaussee 4
P. O. Box 1345
D-63403 Hanau-Wolfgang,
Germany
Phone: +49 6181/59-3936
Fax: +49 6181/59-4489

NAFTA

Degussa Corporation

Technical Service Aerosil
2 Turner Place
Piscataway, NJ 08855-0365
Phone: +1 (888) SILICAS
Phone: +1 (732) 981-5000
Fax: +1 (732) 981-5275

Asia (without Japan)

Degussa AG

Technical Service Aerosil
Rodenbacher Chaussee 4
P. O. Box 1345
D-63403 Hanau-Wolfgang,
Germany
Phone: +49 6181/59-3936
Fax: +49 6181/59-4489

Japan

NIPPON AEROSIL CO., LTD.

Applied Technology Service
3 Mita-cho
Yokkaichi, Mie
510-0841 Japan
Phone: +81-593-45-5270
Fax: +81-593-46-4657

Or your local Degussa Representative

The information in this document is based on our best knowledge. We disclaim any warranty and liability whatsoever as to accuracy and completeness of such information as well as to the potential infringement of any proprietary rights. We reserve the right to effect technical alterations. Any user of our products shall bear the full risk connected to their use including but not limited to their properties and fitness for any purpose.

Product Information

▶ AEROXIDE® Alu C

Highly Dispersed Fumed Metal Oxide

AEROXIDE® Alu C is produced analogous to the AEROSIL®- process developed by Degussa. It is a very fine fumed metal oxide with a high specific surface area. Due to the electropositive chargeability, AEROXIDE® Alu C leads to specific properties in various applications.

Applications and Properties

Applications

In following applications AEROXIDE® Alu C shows special advantages:

- in **PET-films** as **antiblocking agent**
- in **fluorescent tubes** and **light bulbs** as additive for a **homogenous light emission**, better **flowability** of the fluorescent mix during the electrostatic coating
- in **powder coatings** to improve **chargeability**
- in **coatings of high quality ink-jet-paper** to provide **high gloss** and **excellent printing**.

Physico-chemical Data

Properties	Unit	Typical Value
Specific surface area (BET)	m ² /g	100 ± 15
Average primary particle size	nm	13
Tapped density* (approx. value) acc. to DIN EN ISO 787/11, Aug. 1983	g/l	approx. 50
Moisture* 2 hours at 105 °C	wt. %	≤ 5.0
Ignition loss 2 hours at 1000 °C, based on material dried for 2 hours at 105 °C	wt. %	≤ 3.0
pH in 4% dispersion		4.5 - 5.5
Al₂O₃- content based on ignited material	wt. %	≥ 99.6
Sieve residue (by Mocker 45 µm) acc. to DIN EN ISO 787/18, Apr. 1984	wt. %	≤ 0.050

* ex plant

The data represents typical values and not production parameters.

Safety and Handling

With every sample or initial shipment of our products, we will send a Material Safety Data Sheet. Of course you can also request an MSDS or any other information regarding product safety at any time, or download it as registered user at www.aerosil.com.

Packaging and Storage

AEROXIDE® Alu C is supplied in multiple layer 10 kg bags. We recommend to store the product in closed containers under dry conditions and to protect the material from volatile substances. AEROXIDE® Alu C should be used within 2 years after production.

Registration

AEROXIDE® Alu C					
CAS-No.	EINECS	TSCA (USA), AICS (Australia), DSL (Canada)	ENCS (Japan)	ECL (Korea)	IECS (China)
1344-28-1	215-691-6	Registered	1-23	KE-01012	Registered

► For further information please contact:

Commercial Contact

Degussa AG

Business Line Aerosil
Weissfrauenstrasse 9
D-60287 Frankfurt am Main,
Germany
Phone: +49 69/218-2532
Fax: +49 69/218-2533
E-Mail: aerosil@degussa.com
<http://www.aerosil.com>

NAFTA

Degussa Corporation

Business Line Aerosil
379 Interpace Parkway,
P. O. Box 677
Parsippany, NJ 07054-0677
Phone: +1 (800) AEROSIL
Phone: +1 (973) 541-8510
Fax: +1 (973) 541-8501

Asia (without Japan)

Aerosil Asia Marketing Office

c/o NIPPON AEROSIL CO., LTD.
P. O. Box 7015
Shinjuku Monolith 13F
3-1, Nishi-Shinjuku 2-chome
Shinjuku-ku, Tokyo
163-0913 Japan
Phone: +81-3-3342-1786
Fax: +81-3-3342-1761

Japan

NIPPON AEROSIL CO., LTD.

Sales & Marketing Division
P. O. Box 7015
Shinjuku Monolith 13F
3-1, Nishi-Shinjuku 2-chome
Shinjuku-ku, Tokyo
163-0913 Japan
Phone: +81-3-3342-1763
Fax: +81-3-3342-1772

Technical Contact

Degussa AG

Technical Service Aerosil
Rodenbacher Chaussee 4
P. O. Box 1345
D-63403 Hanau-Wolfgang,
Germany
Phone: +49 6181/59-3936
Fax: +49 6181/59-4489

NAFTA

Degussa Corporation

Technical Service Aerosil
2 Turner Place
Piscataway, NJ 08855-0365
Phone: +1 (888) SILICAS
Phone: +1 (732) 981-5000
Fax: +1 (732) 981-5275

Asia (without Japan)

Degussa AG

Technical Service Aerosil
Rodenbacher Chaussee 4
P. O. Box 1345
D-63403 Hanau-Wolfgang,
Germany
Phone: +49 6181/59-3936
Fax: +49 6181/59-4489

Japan

NIPPON AEROSIL CO., LTD.

Applied Technology Service
3 Mita-cho
Yokkaichi, Mie
510-0841 Japan
Phone: +81-593-45-5270
Fax: +81-593-46-4657

Or your local Degussa Representative

The information in this document is based on our best knowledge. We disclaim any warranty and liability whatsoever as to accuracy and completeness of such information as well as to the potential infringement of any proprietary rights. We reserve the right to effect technical alterations. Any user of our products shall bear the full risk connected to their use including but not limited to their properties and fitness for any purpose.

Annexe 3 : Fiche IARC de TiO_2

TITANIUM DIOXIDE (Group 2B)

[The text of these Summaries and Evaluations may be edited for language and clarity during the checking of the main text of the Monographs.]

VOL.: 93

5. Summary of Data Reported

5.1 Exposure data

Titanium dioxide was first produced commercially in 1923 and accounts for approximately 70% of the total volume of pigment production. Relatively small quantities of titanium dioxide are used for non-pigmentary purposes. In 2004, worldwide production of titanium dioxide was 4.4 million tonnes.

Titanium dioxide is obtained from a variety of ores that contain ilmenite, rutile, anatase and leucoxene, which are mined from deposits located throughout the world. Most titanium dioxide pigment is produced from titanium mineral concentrates by the chloride or sulfate process, either as the rutile or the anatase form. The primary particles are typically between 0.2 and 0.3 μm in diameter, although larger aggregates and agglomerates are formed. Titanium dioxide pigments are generally coated with a variety of oxides and oxyhydrates. They are usually hydrophilic unless they are coated with a silicon compound.

Ultrafine grades of titanium dioxide have a primary particle size of 10–50 nm and are used predominantly as ultraviolet blockers in sunscreens and plastics, and in catalysts.

Levels of occupational exposure to titanium dioxide during its manufacture have been reported from the USA and Europe between 1970 and 2000. The highest levels of exposure were observed during packing and milling, although high exposure also occurred in occupations such as site cleaning and maintenance. Levels of exposure to respirable dust in these occupations ranged between < 1 and 5 mg/m^3 (geometric mean) but have declined over time. No data were available that would allow the characterization or quantification of exposure to ultrafine primary particles. Workers in the titanium dioxide manufacturing industry may also be exposed to ore and other dusts, strong acids and asbestos.

Exposure to titanium dioxide in user industries is difficult to estimate and characterize due to the paucity of data. However, exposure levels are assumed to be lower in the user industries, with the possible exception of workers who handle large quantities of titanium dioxide. No significant exposure to titanium dioxide is thought to occur during the use of products in which titanium dioxide is bound to other materials, such as in paints.

5.2 Human carcinogenicity data

Three epidemiological cohort studies and one population-based case–control study from North America and western Europe were available for evaluation.

The largest of the cohort studies was among white male production workers in the titanium dioxide industry in six European countries. The study indicated a slightly increased risk for lung cancer compared with the general population. However, there was no evidence of an exposure–response relationship within the cohort. No increase in the mortality rates for kidney cancer was found when the cohort was compared with the general population, but there was a suggestion of an exposure–response relationship in internal analyses. The other cohort studies, both of which were conducted in the USA, did not report an increased risk for lung cancer or cancer at any other site; no results for kidney cancer were reported, presumably because there were few cases.

One population-based case–control study conducted in Montreal did not indicate an increased risk for lung or kidney cancer.

In summary, the studies do not suggest an association between occupational exposure to titanium dioxide as it occurred in recent decades in western Europe and North America and risk for cancer.

All the studies had methodological limitations; misclassification of exposure could not be ruled out. None of the studies was designed to assess the impact of particle size (fine or ultrafine) or the potential effect of the coating compounds on the risk for lung cancer.

5.3 Animal carcinogenicity data

Pigmentary and ultrafine titanium dioxide were tested for carcinogenicity by oral administration in mice and rats, by inhalation in rats and female mice, by intratracheal administration in hamsters and female rats and mice, by subcutaneous injection in rats and by intraperitoneal administration in male mice and female rats.

In one inhalation study, the incidence of benign and malignant lung tumours was increased in female rats. In another inhalation study, the incidences of lung adenomas were increased in the high-dose groups of male and female rats. Cystic keratinizing lesions that were diagnosed as squamous-cell carcinomas but re-evaluated as non-neoplastic pulmonary keratinizing cysts were also observed in the high-dose groups of female rats. Two inhalation studies in rats and one in female mice were negative.

Intratracheally instilled female rats showed an increased incidence of both benign and malignant lung tumours following treatment with two types of titanium dioxide. Tumour incidence was not increased in intratracheally instilled hamsters and female mice.

Oral, subcutaneous and intraperitoneal administration did not produce a significant increase in the frequency of any type of tumour in mice or rats.

5.4 Mechanistic considerations and other relevant data

Humans can be exposed to titanium dioxide via inhalation, ingestion or dermal contact. In human lungs, the clearance kinetics of titanium dioxide is poorly characterized relative to that in experimental animals. (General particle characteristics and host factors that are considered to affect deposition and retention patterns of inhaled, poorly soluble particles such as titanium dioxide are summarized in the monograph on carbon black.) With regard to

inhaled titanium dioxide, human data are mainly available from case reports that showed deposits of titanium dioxide in lung tissue as well as in lymph nodes. A single clinical study of oral ingestion of fine titanium dioxide showed particle size-dependent absorption by the gastrointestinal tract and large interindividual variations in blood levels of titanium dioxide. Studies on the application of sunscreens containing ultrafine titanium dioxide to healthy skin of human volunteers revealed that titanium dioxide particles only penetrate into the outermost layers of the stratum corneum, suggesting that healthy skin is an effective barrier to titanium dioxide. There are no studies on penetration of titanium dioxide in compromised skin.

Respiratory effects that have been observed among groups of titanium dioxide-exposed workers include decline in lung function, pleural disease with plaques and pleural thickening, and mild fibrotic changes. However, the workers in these studies were also exposed to asbestos and/or silica.

No data were available on genotoxic effects in titanium dioxide-exposed humans.

Many data on deposition, retention and clearance of titanium dioxide in experimental animals are available for the inhalation route. Titanium dioxide inhalation studies showed differences — both for normalized pulmonary burden (deposited mass per dry lung, mass per body weight) and clearance kinetics — among rodent species including rats of different size, age and strain. Clearance of titanium dioxide is also affected by pre-exposure to gaseous pollutants or co-exposure to cytotoxic aerosols. Differences in dose rate or clearance kinetics and the appearance of focal areas of high particle burden have been implicated in the higher toxic and inflammatory lung responses to intratracheally instilled vs inhaled titanium dioxide particles. Experimental studies with titanium dioxide have demonstrated that rodents experience dose-dependent impairment of alveolar macrophage-mediated clearance. Hamsters have the most efficient clearance of inhaled titanium dioxide. Ultrafine primary particles of titanium dioxide are more slowly cleared than their fine counterparts.

Titanium dioxide causes varying degrees of inflammation and associated pulmonary effects including lung epithelial cell injury, cholesterol granulomas and fibrosis. Rodents experience stronger pulmonary effects after exposure to ultrafine titanium dioxide particles compared with fine particles on a mass basis. These differences are related to lung burden in terms of particle surface area, and are considered to result from impaired phagocytosis and sequestration of ultrafine particles into the interstitium.

Fine titanium dioxide particles show minimal cytotoxicity to and inflammatory/pro-fibrotic mediator release from primary human alveolar macrophages *in vitro* compared with other particles. Ultrafine titanium dioxide particles inhibit phagocytosis of alveolar macrophages *in vitro* at mass dose concentrations at which this effect does not occur with fine titanium dioxide. In-vitro studies with fine and ultrafine titanium dioxide and purified DNA show induction of DNA damage that is suggestive of the generation of reactive oxygen species by both particle types. This effect is stronger for ultrafine than for fine titanium oxide, and is markedly enhanced by exposure to simulated sunlight/ultraviolet light.

In-vivo studies have shown enhanced micronucleus formation in bone marrow and peripheral blood lymphocytes of intraperitoneally instilled mice. Increased *Hprt* mutations were seen in lung epithelial cells isolated from titanium dioxide-instilled rats. In another study, no enhanced oxidative DNA damage was observed in lung tissues of rats that were

intratracheally instilled with titanium dioxide. The results of most in-vitro genotoxicity studies with titanium dioxide were negative.

6. Evaluation and rationale

There is *inadequate evidence* in humans for the carcinogenicity of titanium dioxide.

There is *sufficient evidence* in experimental animals for the carcinogenicity of titanium dioxide.

Overall evaluation

Titanium dioxide is *possibly carcinogenic to humans (Group 2B)*.

Rationale

To follow

Posted 27 February 2006

Annexe 4 : Analyse de l'osmolarité des nanoparticules



BULLETIN D'ANALYSE

Test d'osmolalité

Réf : CNR DM / 02 / 035

N° interne : 1723, 1724, 1725, 1726, 1727, 1728

Référence procédure(s) d'analyse : PA 239 version 01

Catégorie essai : Routine

☒

Développement

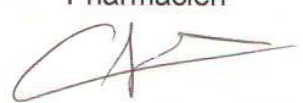
☐

Stabilité

☐

Date de début des essais : 27 / 03 / 2008

ESSAIS	NORMES	RESULTATS
Test d'osmolalité		
LPS 01	TiO ₂ CEA 100 µg.mL ⁻¹	2 mosmol / kg
LPS 02	TiO ₂ Ana-NP 100 µg.mL ⁻¹	2 mosmol / kg
LPS 03	TiO ₂ Rut-NP 100 µg.mL ⁻¹	2 mosmol / kg
LPS 04	Al ₂ O ₃ 100 µg.mL ⁻¹	2 mosmol / kg
LPS 05	TiO ₂ CEA 10 µg.mL ⁻¹	2 mosmol / kg
LPS 06	TSM	461 mosmol / kg

Date :	27/03/2008	27.03/2008	27/03/2008
Visa :	Delphine MONTAVA Technicienne 	Pascal DELVORDRE Ingénieur 	Christian SARBACH Pharmacien 



PRIX

1996

"Coup de Cœur" Anvar

CHALLENGE
DES JEUNES ENTREPRISES
DES HAUTS DE SEINEENVOI 97
INDUSTRIE
LAUREAT

Annexe 5 : Publications scientifiques



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol



In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes

A. Simon-Deckers^a, B. Gouget^{a,1}, M. Mayne-L'Hermite^b, N. Herlin-Boime^b, C. Reynaud^b, M. Carrière^{a,*}

^a Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS UMR9956, IRAMIS, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France

^b Laboratoire Francis Perrin, CEA-CNRS URA2453, IRAMIS, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Received in revised form 2 September 2008

Accepted 3 September 2008

Available online 17 September 2008

Keywords:

Nanotubes

Oxide nanoparticles

In vitro

Toxicity

Lung epithelial cells

TEM

ABSTRACT

If released in the environment, nanomaterials might be inhaled by populations and cause damage to the deepest regions of the respiratory tract, i.e., the alveolar compartment. To model this situation, we studied the response of A549 human pneumocytes after exposure to aluminium oxide or titanium oxide nanoparticles, and to multi-walled carbon nanotubes. The influence of size, crystalline structure and chemical composition was investigated. After a detailed identification of nanomaterial physico-chemical characteristics, cells were exposed *in vitro* and viability and intracellular accumulation were assessed. In our conditions, carbon nanotubes were more toxic than metal oxide nanoparticles. Our results confirmed that both nanotubes and nanoparticles are able to rapidly enter into cells, and distribute in the cytoplasm and intracellular vesicles. Among nanoparticles, we demonstrate significant difference in biological response as a function of size, crystalline phase and chemical composition. Their toxicity was globally lower than nanotubes toxicity. Among nanotubes, the length did not influence cytotoxicity, neither the presence of metal catalyst impurities.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The massive development of nanotechnologies leads to considerable concern regarding the potential biological effects and human toxicity of nanomaterials (Oberdorster et al., 2005a,b). The lung, which is directly exposed after inhalation of contaminated air, is one of the first target organs of nanomaterials. Due to their size, nanomaterials distribute in the whole respiratory tract and can reach pulmonary alveoli (Borm et al., 2006; Nel et al., 2006; Oberdorster et al., 2005a,b).

In vitro biological impact on lung of titanium oxide nanoparticles (NP-TiO₂) was addressed on bronchial epithelial cells (Gurr et al., 2005), lung macrophages (Soto et al., 2007) and with the A549 human type II alveolar epithelium cell line (Park et al., 2007; Sayes et al., 2006; Singh et al., 2007; Soto et al., 2007; Stearns et al., 2001). The cytotoxicity of NP-TiO₂ depends on the particles morphology and crystalline phase. Sayes et al. (2006) demonstrate a classic dose–response and time-dependent cytotoxicity of NP-TiO₂ at high concentrations (>100 µg/ml), anatase NP-TiO₂ being more cytotoxic than rutile NP-TiO₂ of the same size (5–10 nm, loosely

agglomerated): in their study cytotoxicity thus does not depend on nanoparticles size but rather on phase composition. Park et al. (2007) observe cytotoxicity of 30 nm nanoparticles and 1 µm particles of TiO₂ at concentrations higher than 50 µg/ml, the largest particles leading to the most important morphological changes in cells. On the contrary, Soto et al. (2007) observe no cytotoxicity of 5–40 nm anatase and 2–60 nm rutile TiO₂ nanoparticles on murine and human alveolar macrophages, and a low toxicity of these nanoparticles on A549 cells.

In vitro, the biological impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) was investigated on various respiratory models (Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006; Muller et al., 2005; Pulskamp et al., 2007). Multiple processes of synthesis, leading to various types of MWCNTs render difficult the comparison of their biological effects. As a function of the considered publication, parameters influencing their toxicity include surface structure (Bottini et al., 2006; Magrez et al., 2006; Tian et al., 2006); length (Sato et al., 2005); agglomeration state, i.e., presence of a dispersing agent; and contamination of metal catalyst and amorphous carbon (Pulskamp et al., 2007). For example, on A549 cells, it is the presence of metal trace impurities contained in MWCNT which causes the release of reactive oxygen species (ROS) and the decrease of mitochondrial membrane potential (Pulskamp et al., 2007).

Results from these studies still need to be validated. They are often controversial and every condition leads to a different biological response. Still no correlation can be identified between the

* Corresponding author. Tel.: +33 1 69 08 52 35; fax: +33 1 69 08 69 23.

E-mail address: marie.carriere@cea.fr (M. Carrière).

¹ Permanent address: AFSSA, Scientific Department, 27/31 avenue du Général Leclerc, 94701 Maisons-Alfort, France.

biological impact of nanomaterials and their size, surface structure, crystalline phase, chemical composition, presence of metal trace impurities. Moreover nanomaterials are not always fully characterized before and in the course of the experiment. Finally, to our knowledge, very few studies directly compared the impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes on the same cell model, during the same experiment.

Our aim was to compare the biological response of A549 cells to nanomaterials of different forms (particles or tubes), size, crystalline phase and chemical composition. Here we report the first results of our investigations: cytotoxicity effects and accumulation. The originality of the study is that it was done with a panel of well-characterized nanomaterials on the same cell model. Metal oxide nanoparticles (TiO_2 and Al_2O_3) and multi-walled carbon nanotubes were chosen since they represent, today, the most produced nanomaterials, and are already integrated in the composition of domestic goods (<http://www.nanotechproject.org>). TiO_2 nanoparticles are either rutile or anatase, their size range from 12 to 140 nm. Al_2O_3 diameter is comparable to one of the TiO_2 nanoparticles under study. The carbon nanotubes considered here differ in terms of length and presence of catalyst impurities and are well dispersed. For their purification we did not use any acid treatment to avoid the formation of highly reactive sites at the surface of the nanotubes. After a detailed characterization of these nanomaterials, cytotoxicity and intracellular accumulation were taken as endpoints. Three-independent cytotoxicity assays were used to avoid the artefacts involved by adsorptive properties of nanotubes (Casey et al., 2007b; Worle-Knirsch et al., 2007). Intracellular accumulation of nanomaterials was observed, together with morphological damage in cells, by transmission electron microscopy (TEM).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Chemicals and cell culture media and supplement were obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Nanomaterials

2.2.1. Powders

MWCNT and TiO_2 -CEA originate from our institute (Francis Perrin Laboratory, CEA Saclay, France). MWCNT were synthesized by aerosol-assisted catalytic chemical vapour deposition (CVD) using Fe as catalyst (Pinault et al., 2005). Raw MWCNT are 500 μm long and well aligned. They contain residual iron-based catalyst mainly encapsulated in the central core of MWCNT and almost no by-product such as amorphous carbon and encapsulated metallic particles. After synthesis, nanotubes were heated under argon atmosphere at 2000 °C during 2 h in order to remove iron-based phases (Pinault et al., 2005). Therefore, iron content in raw MWCNT and in annealed MWCNT is 4.24 and 0.08 wt.%, respectively. TiO_2 -CEA nanoparticles were synthesized by laser pyrolysis (Pignon et al., 2008), and then annealed under air at 400 °C during 3 h to remove free carbon impurities. DRX analysis determined that their crystalline structure is 95% anatase. The effects of these nanotubes and nanoparticles were compared to effects of commercial nanoparticles. TiO_2 -P25 (Aeroxide® P25, 75% anatase) and Al_2O_3 (Aeroxide® AluC) nanoparticles were obtained from Degussa AG (Düsseldorf, Germany). TiO_2 -Sigma-rutile (ref. 637262, 100% rutile) and TiO_2 -

Sigma (ref. T8141, 100% anatase) were obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2.2. Suspensions

Suspensions of nanomaterials were prepared in ultrapure sterile water (pH 5.5). For nanotubes, Arabic gum (0.25 wt.%) was added to sterile water. Nanomaterials were dispersed by sonication (Autotune 750 W, Bioblock Scientific) at 4 °C, using a pulsed mode, during 30 min for nanoparticles, 30 min for nanotubes having the longest size (designated “long nanotubes”) and 8 h for the shorter ones (designated “short nanotubes”). Indeed the sonication is known to induce breakage of the nanotubes, the final length of the nanotube samples will be shorter for the longer duration (Glory et al., 2007). The concentration of suspensions was 1 g/L for nanotubes and 10 g/L for nanoparticles. These suspensions will be called “stock suspensions” in the following text.

For cell exposure, stock suspensions were diluted in cell culture medium (DMEM medium supplemented with 50 UI/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin). These suspensions will be called “exposure suspensions”.

2.3. Characterization of nanomaterial suspensions

The characteristic of nanoparticle powders are summarized in Table 1. The morphologies and sizes of nanomaterials in stock suspensions were determined by transmission electron microscopy (TEM), using a Philips EM208 microscope at 80 kV (CCME Orsay, France). A drop of stock suspension was deposited on a TEM grid, allowed to dry and directly observed. Size was measured on 150–200 nanoparticles or nanotubes, randomly chosen. Specific surface areas were measured by the classical method of Brunauer Emmett and Teller (BET) consisting in isothermal gas-adsorption (Brunauer et al., 1938) using a Micromeritics FlowSorb 2300 (Norcross, USA). For round-shaped nanoparticles, BET diameter was calculated as $D = 6/(\rho \times \text{SSA})$, where D (m) is BET diameter, ρ (g/cm^3) is the density of nanomaterial and SSA (m^2/g) is the specific surface area. Density of nanomaterials was taken as $\rho = 3.90$ for anatase TiO_2 and 3.99 for Al_2O_3 .

In exposure suspensions, agglomeration state was identified by photon correlation spectroscopy (PCS). This technique cannot be applied to non-spherical nanomaterials, such as nanotubes and rutile nanoparticles. Isoelectric point was determined by zeta potential measurement. Both parameters were determined using a Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern, Worcestershire, UK) equipped with MPT-1 titrator.

2.4. Cell culture

A549 human type II lung epithelium cell line, classically used for lung toxicity assays, was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA, CCL-185) (Lieber et al., 1976). They were grown in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 UI/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. They were maintained at 37 °C in a 5% CO_2 and passed at 80% of confluence. Exposures to nanomaterials were done on sub-confluent cells.

2.5. Toxicity assays

Cells were seeded in 96-well plates. After 24 h they were exposed to 100 μL of exposure suspensions of nanomaterials, from 0.25 to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ during 1 to 72 h (see figure legends for details). Fetal bovine serum was avoided since it was proven to interact with nanotubes (Casey et al., 2007b).

Interactions of single-walled carbon nanotubes with several dyes commonly used for cytotoxicity testing were demonstrated (Casey et al., 2007a; Worle-Knirsch et al., 2007). This interaction has never been demonstrated for MWCNT. Among these tests, LDH, WST-1 and XTT assays are considered reliable. Consequently, we performed a battery of classical cytotoxicity tests in order to ensure that our results were not false positive, and in order to detect any interaction between MWCNT and cytotoxicity assays. Cell metabolic activity, reflecting nanomaterial cytotoxicity, was assessed by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

Table 1
Characteristics of nanomaterials^a.

	Supplier, reference	Morphology	Size TEM (measured)	SSA (m^2/g)	Size BET (calculated)	Ip
Al_2O_3	Degussa, Aeroxide® AluC	Spherical	11 ± 3 nm (13 nm)	83 ± 1 (100 ± 15)	18	8.4
TiO_2 -Degussa-P25	Degussa, Aeroxide® TiO_2 P25	Spherical	25 ± 7 nm (21 nm)	46 ± 1 (50 ± 15)	33	7
TiO_2 -CEA	CEA	Spherical	12 ± 3 nm	82 ± 4	19	6.4
TiO_2 -Sigma	Sigma, T8141	Spherical	142 ± 36 nm (<44 μm)	10 ± 1	152	–
TiO_2 -Sigma-rutile	Sigma, 637262	Elongated	L: 68 ± 17 nm (<100 nm), D: 9 ± 3 nm	118 ± 1	–	–
Long nanotubes	CEA	Elongated	L[0.1–12] μm , D[10–160] nm	42 ± 2	–	–
Short nanotubes	CEA	Elongated	L[0.1–3.5] μm , D[10–160] nm	42 ± 2	–	–

^a Size was determined by transmission electron microscopy observation. SSA: specific surface area, measured according to Brunauer Emmett and Teller protocol. The indication into brackets is the theoretical values given by the supplier. Ip: isoelectric point obtained by zeta potential measurements. Crystal structure was deduced from XRD diagram. L: length, D: diameter.

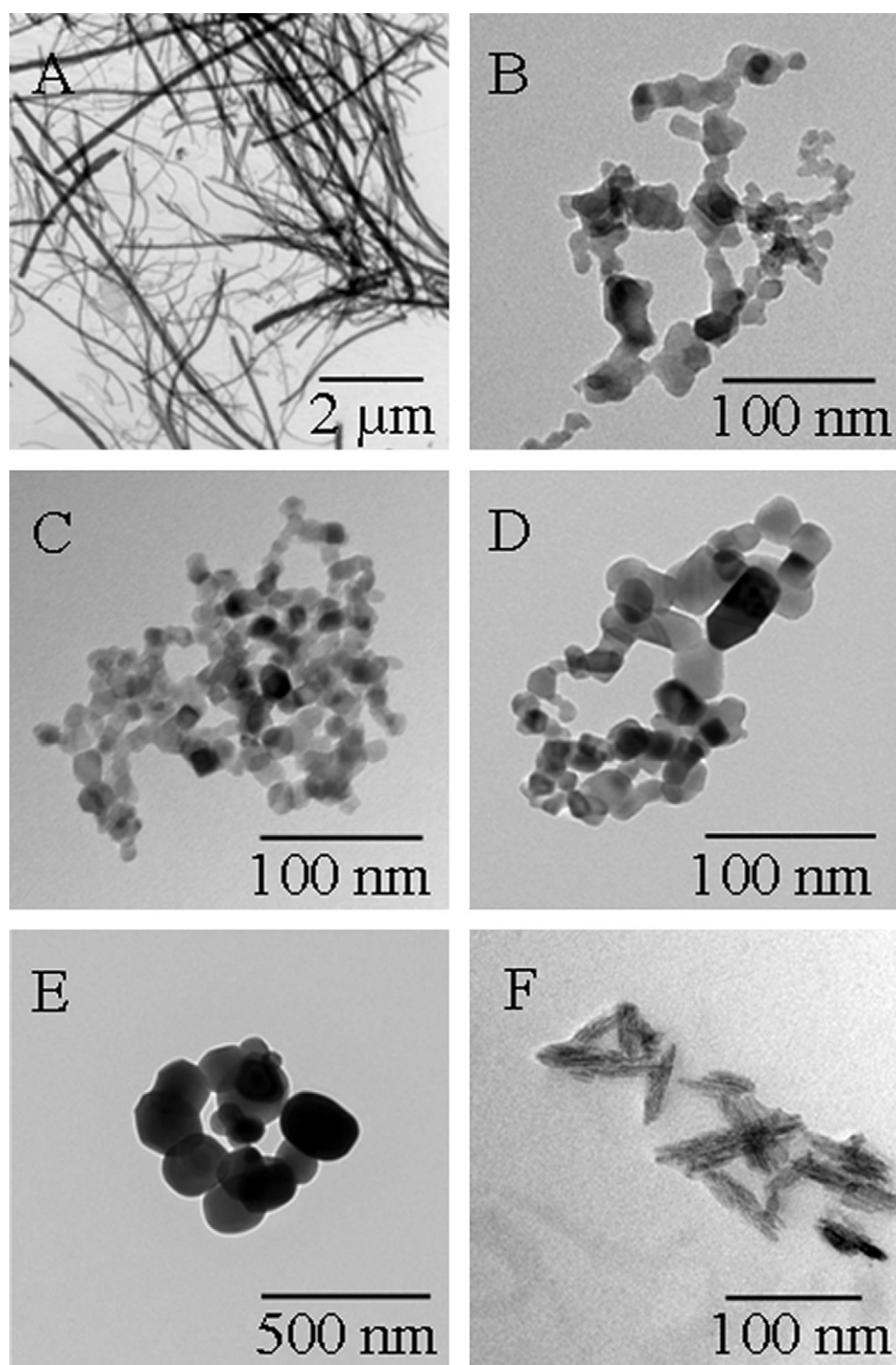


Fig. 1. TEM observation of nanomaterials. A drop of nanomaterial suspension was deposited on a TEM grid, allowed to dry under air and nanomaterials were directly observed. Long MWCNT (A), Al_2O_3 (B), TiO_2 -CEA (C), TiO_2 -Degussa-P25 (D), TiO_2 -Sigma (E), TiO_2 -Sigma-rutile (F).

(MTT) (Mosmann, 1983) and 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate (XTT) (Scudiero et al., 1988) assays. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells reduce MTT to water-insoluble blue formazan crystals; this assay thus indicates cell mitochondrial activity impairment. After exposure, 10 μL of a 5 mg/ml MTT solution was added to each well (MTT) or exposure medium was replaced by 100 μL of XTT (0.2 mg/ml in DMEM without phenol red) containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of phenazine methosulfate (XTT). After 1 h at 37 °C, medium was then replaced by 100 μL of dimethyl sulfoxide (MTT) or 100 μL of XTT reagent (XTT) and mixed thoroughly to dissolve the formazan crystals. Nanomaterials were allowed to sediment during 1 h and 50 μL of each well (MTT and XTT) was then transferred to another plate. Absorbance was measured at 570 nm (MTT)

or 450 nm (XTT). For assessment of cell membrane integrity, lactate dehydrogenase (LDH) release in exposure medium was measured with LDH assay (Legrand et al., 1992) following the indications of the supplier (Sigma-Aldrich). Cell viability was determined as a percentage of the negative control (untreated cells).

2.6. Cell preparation for transmission electron microscopy (TEM)

A549 cells were exposed during 6 and 48 h to nanoparticles (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or during 48 h to nanotubes (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). They were fixed with 2.5% glutaraldehyde, post-fixed with OsO_4 and dehydrated in graded concentrations of ethanol (Strum et al., 1971), then embedded in Epon (nanoparticles) or Spurr (nanotubes). Ultra-thin sections

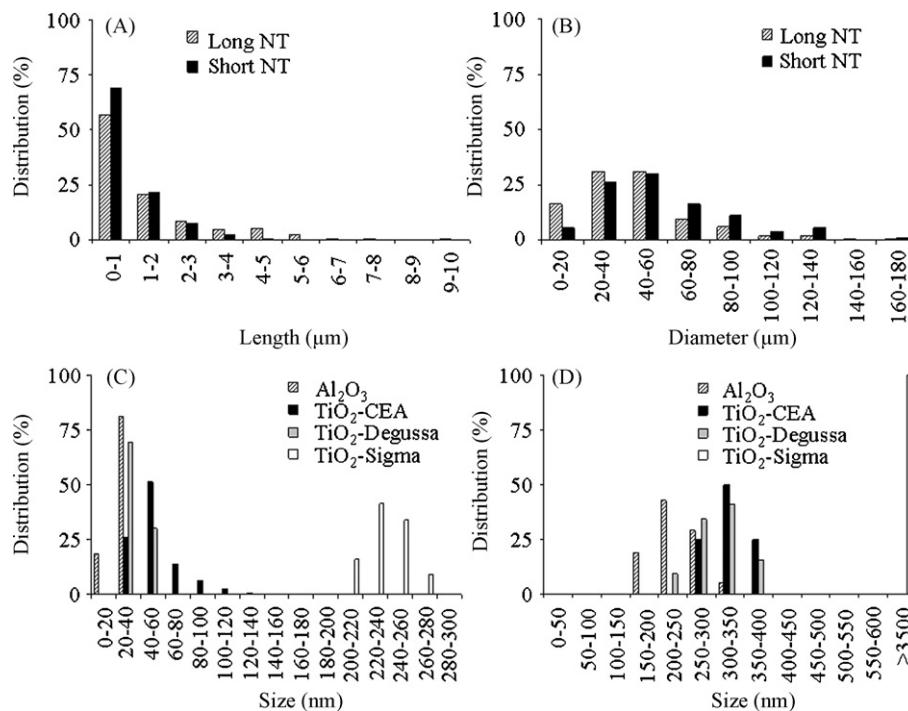


Fig. 2. Nanomaterial size distribution. Distribution of length (A) and diameter (B) of carbon nanotubes initial aqueous suspension, determined by TEM observation. The size of nanoparticles was measured by PCS on the initial aqueous suspension, after sonication (C) and after sonication and then dilution in exposure medium (D).

were cut (80 nm), counterstained with lead citrate and uranyl acetate and observed with a CM 12 Philips electron microscope at 80 kV.

3. Results

3.1. Physico-chemical characterization

Since this study is focused on the biological effect of individualized nanoparticles or nanotubes, suspensions were characterized in terms of agglomeration. The terminology described by Oberdorster et al. (2007) is used for aggregation and/or agglomeration of nanoparticles.

3.1.1. Characterization of stock suspensions

TEM images of the nanomaterials we used are presented in Fig. 1. These images allowed to measure nanoparticle and nanotube primary sizes in stock suspensions. All the characteristics of nanomaterials in suspension are summarized in Table 1.

To obtain non-agglomerated multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), Arabic gum was added to the preparation in order to maintain suspension stability. Arabic gum is a mixture of saccharides and glycoproteins; its addition does not reflect the reality of an environmental contamination but mimics a biological environment (pulmonary mucus). Three MWCNT preparations were used: short and long MWCNT containing Fe impurities (4.24 wt.%) and purified

long MWCNT (0.08 wt.% of Fe). Sonication of MWCNT suspensions involves nanotube breakage (Glory et al., 2007), thus their length shortens. TEM observation of 1 μg/ml suspension (Fig. 1A) revealed a large distribution of their length and diameter (Fig. 2A and B). The length/diameter ratio was higher than 3 for all types of nanotubes, meaning that they can be considered as fibers. The length of long MWCNT ranged from 110 nm to 13 μm, with a mean length of 1.5 μm and a median at 875 nm (Tables 1 and 2). Their diameter ranged from 8 to 167 nm, with a mean diameter of 44 nm and a median at 42 nm. Length did not differ from the purified and the non-purified MWCNT. Concerning the short MWCNT, their length ranged from 83 nm to 5 μm, with a mean length of 972 nm and a median at 708 nm. Their diameter ranged from 8 to 185 nm with a mean diameter of 26 nm and a median at 40 nm (Tables 1 and 2). Slight differences in diameters certainly come from the use of different batches of production. Finally, the major difference between long and short nanotubes is presence of nanotube longer than 5 μm in the “long nanotubes” suspension.

MWCNT suspensions in Arabic gum were negatively charged whatever the pH, the zeta potential value reaching −50 mV, which suggests that they will not form strong agglomerates in neutral cell culture medium. TEM observation (Fig. 1A) show individualized nanotubes which are partially entangled due to the high nanotube content deposited on the grids, and confirms the absence of agglomeration suggested by the zeta potential measurement.

Table 2
Characterization of nanotubes.

	Long NT			Short NT		
	Length (nm)	Diameter (nm)	Aspect ratio	Length (nm)	Diameter (nm)	Aspect ratio
Mean	1506	44	37	972	26	19
Minimum	111	8	4	83	8	1
Maximum	12944	167	190	5000	185	84
Median	875	42	24	708	40	16
d10	222	21	6	250	20	6
d90	3872	104	85	2000	104	3

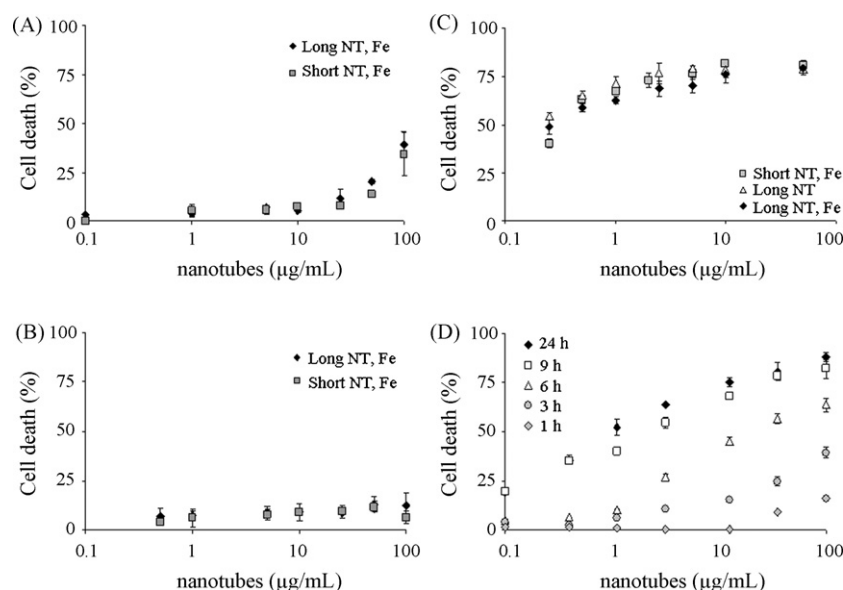


Fig. 3. Cell death induced by MWCNT. A549 cells were exposed during 48 h to increasing MWCNT concentrations. Cell death was assessed with LDH (A), XTT (B) or MTT (C) and expressed as a percentage of the control (untreated cells). The kinetics of MTT response was evaluated when A549 cells were exposed to long MWCNT with Fe (D).

Nanoparticle (NP) size was determined by TEM (Fig. 1B–F and Table 1). 100–200 NP per sample were measured. The diameter of primary Al_2O_3 NP was 11 ± 3 nm (Fig. 1B). TiO_2 -CEA primary NP diameter was 12 ± 3 nm (Fig. 1C), i.e., the same range of size than Al_2O_3 . TiO_2 -Degussa-P25 NP were twice as large as TiO_2 -CEA, with a mean primary diameter of 24 ± 7 nm (Fig. 1D). TiO_2 -Sigma particles were much larger, with a mean primary diameter of 142 ± 36 nm (Fig. 1E). Contrary to all the other TiO_2 NP we used, TiO_2 -Sigma-rutile NP are of elongated shape, with a mean length of 68 ± 17 nm and a mean diameter of 9 ± 3 nm (Fig. 1F). From TEM observations, it seemed that NP were aggregated and formed chain-like structures of 50–200 nm for Al_2O_3 , TiO_2 -CEA, TiO_2 -Sigma-rutile and TiO_2 -Degussa-P25, 200–500 nm for TiO_2 -Sigma. The hydrodynamic diameter of NP in stock suspensions, i.e., the diameter of

particles including the first solvation shell was calculated thanks to complementary photon correlation spectroscopy (PCS) analyses. The results (Fig. 2C) confirmed TEM observations: hydrodynamic diameter of Al_2O_3 NP was between 1 and 40 nm, TiO_2 -CEA was between 20 and 100 nm, TiO_2 -Degussa-P25 was between 20 and 60 nm and TiO_2 -Sigma was between 200 and 280 nm. These diameters are superior to geometrical diameters measured by TEM, due to the first solvation shell but also to the nanoparticle aggregation in stock suspensions. Specific surface areas (SSA) were measured by BET; results are presented in Table 1. From this data BET diameter was calculated, with the formula given in Section 2. For all the NP, BET diameter is comparable to the size measured by TEM, suggesting that NP porosity is low. Zeta potential curves were determined on stock suspensions. For all NP, the isoelectric point was

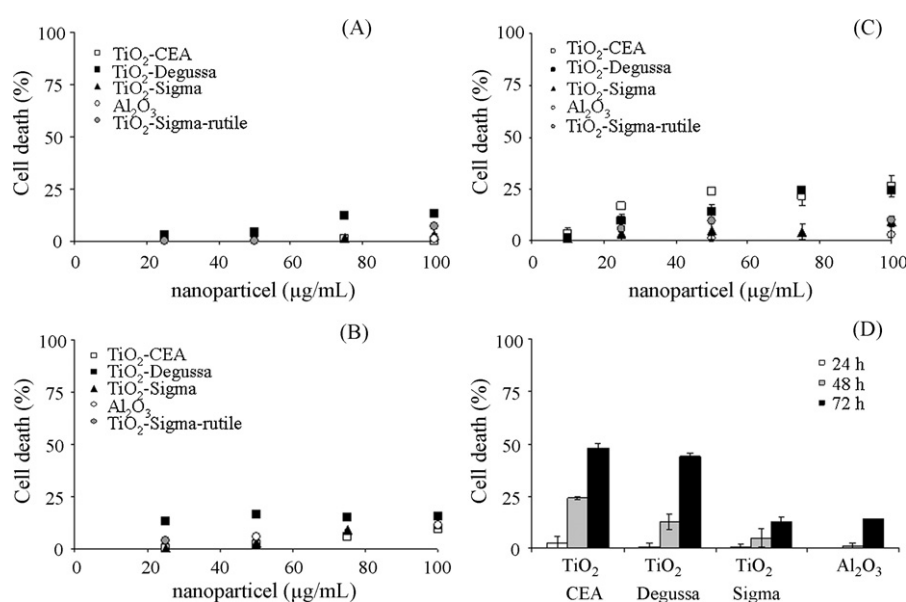


Fig. 4. Cell death induced by TiO_2 and Al_2O_3 nanoparticles. A549 cells were exposed during 48 h to increasing nanoparticles concentrations. Cell death was assessed with MTT (A), XTT (C) or LDH (D) and expressed as a percentage of the control (untreated cells). The kinetics of cell death when exposed to 50 μg/ml of nanoparticles was evaluated with the MTT assay (B).

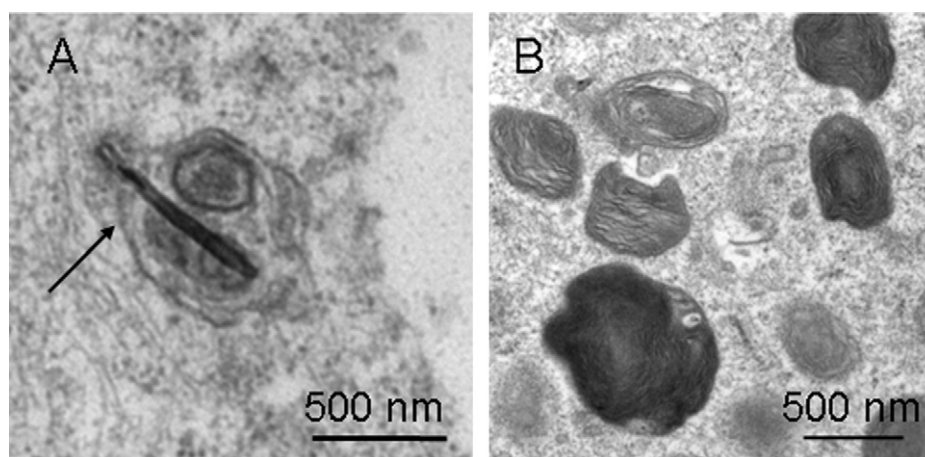


Fig. 5. TEM observation of A549 cells exposed to MWCNT. Cells were exposed during 48 h to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MWCNT. MWCNT were internalized in cells, and localized in cytoplasm, the majority of them being surrounded by a membrane (A, arrow). Morphological modifications of cells were observed, particularly the presence of multiple multi-lamellar bodies (B).

nearly neutral (Table 1), suggesting a lack of stability of these NP in neutral media such as cell culture media.

3.1.2. Characterization of exposure suspensions

We determined the agglomeration state of nanoparticles by PCS after dilution in exposure medium (pH 7.4). Since isoelectric point is nearly neutral, all these NP may agglomerate in exposure medium. In all nanoparticle suspensions, PCS size was 150–400 nm (Fig. 2D), which confirms the agglomeration. The agglomerates of TiO_2 -Sigma were larger than 3 μm .

3.2. Cytotoxicity

Interactions of single-walled carbon nanotubes (SWCNT) with several cytotoxicity assays such as MTT have been demonstrated (Casey et al., 2007b; Worle-Knirsch et al., 2006). To be sure that observed cytotoxicity was not a false positive, cytotoxicity was first assessed with LDH assay, considered to be reliable. We observed a MWCNT concentration-dependent increase in LDH release from

cells, suggesting increased cell membrane damage due to MWCNT (Fig. 3A). After exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ during 48 h, membrane damage hit 35–40% of the cells. This result demonstrated the cytotoxicity of MWCNT. In addition, it is important to note that LDH release did not depend on NT length.

Among the classically used formazan-based cytotoxicity assays, WST-1 and XTT assays have been shown not to interact with SWCNT, contrary to MTT assay. We wondered if these interactions would also be demonstrated with MWCNT. When using XTT assay, MWCNT cytotoxicity was low but significant, with a maximum of 10% of cell death after 48 h of exposure to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of either long or short NT (Fig. 3B). When assessed with the MTT assay, the response of the assay – cytotoxicity of MWCNT or interaction of MTT with MWCNT – increased in a concentration-dependent manner. Response was drastic; the CI_{50} (nanomaterial concentration leading to 50% of cell death) was 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after 48 h of exposure (Fig. 3C). No difference was observed between long and short MWCNT, and between MWCNT containing Fe impurities or the purified ones. Response was nearly immediate, since it appeared after only 1 h of

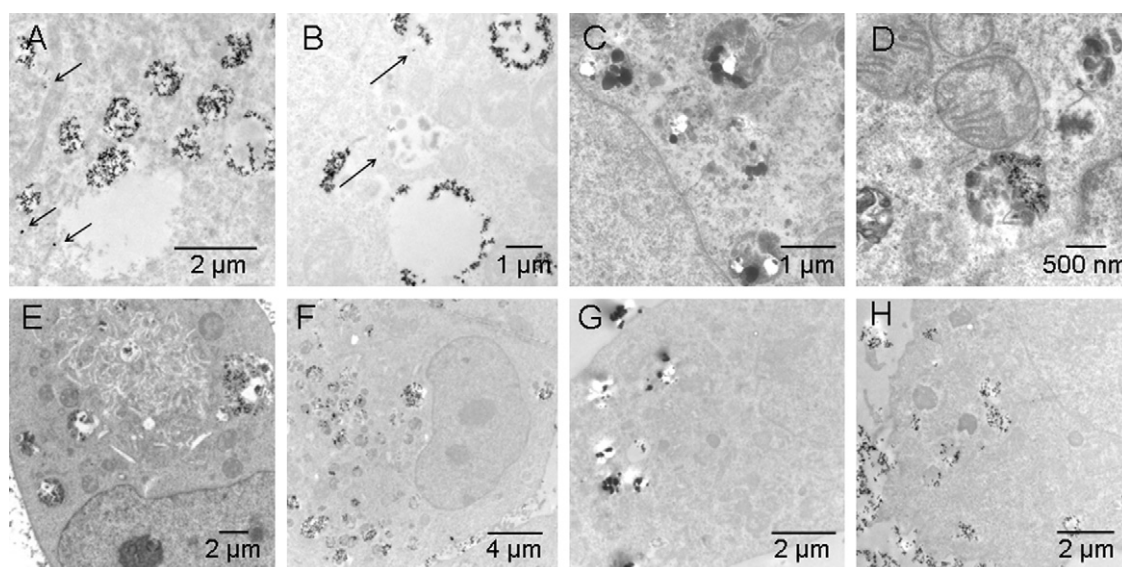


Fig. 6. TEM observation of A549 cells exposed to nanoparticles. Cells were exposed during 6 h (A–D) or 48 h (E–H) to TiO_2 -CEA (A and E) or TiO_2 -Degussa-P25 (B and F), TiO_2 -Sigma (C and G) or Al_2O_3 (D and H). TiO_2 are observed in cytoplasmic compartments or free in the cytoplasm (arrow).

exposure to 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MWCNT (Fig. 3D), it increased with time of exposure. Response was a linear function of the logarithm of MWCNT concentration.

The cytotoxicity of NP was low but significant; it slightly increased with concentration (Fig. 4A–C). When assessed with LDH assay, all these NP induced weak but significant cell membrane damage (Fig. 4A). When assessed with XTT assay, cell death reached 15% after 48 h of exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of all these NP (Fig. 4B). As observed with the MTT assay (Fig. 4C), the cell death rate after 48 h of exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NP was 26% for TiO_2 -CEA, 24% for TiO_2 -Degussa-P25, 10% for TiO_2 -Sigma-rutile, 9% for TiO_2 -Sigma, and 3% for Al_2O_3 .

At higher NP concentrations and up to 1 mg/ml, the percentage of cell death did not increase. Cell death increased with duration of exposure, as shown in Fig. 4D. Cytotoxicity reached 50% after exposure of A549 cells to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TiO_2 -CEA during 72 h, while it only reached 14% after exposure to Al_2O_3 .

3.3. Intracellular accumulation and distribution

TEM observations of A549 thin sections were made after exposure during 6 and 48 h to NP and 48 h to MWCNT.

MWCNT were internalized in A549 cells (Fig. 5). Only the smallest ones were observed inside cells, with a maximal length of 2–3 μm . In cells, MWCNT are localized in the cytoplasm, mostly in vesicles (Fig. 5A, arrow). Still some MWCNT are not surrounded by membranes. Nanotubes were not agglomerated inside cells but rather isolated. We never observed them in cell nuclei. The presence of Fe did not influence cellular internalization. The morphology of cells exposed to MWCNT changed as compared to control cells: much more multi-lamellar bodies were observed (Fig. 5B).

After 6 h of exposure, NP were observed in the cytoplasm of almost every cell (Fig. 6A–D) whatever their chemical composition (TiO_2 , Fig. 6A–C; Al_2O_3 , Fig. 6D) and size (TiO_2 —12 nm, Fig. 6A; TiO_2 —25 nm, Fig. 6B; TiO_2 —142 nm, Fig. 6C). They were either isolated (Fig. 6A and B, arrows) or entrapped in vacuoles (Fig. 6B) or cytoplasmic compartments resembling lysosomes (Fig. 6C and D). In cytoplasm, we observed a higher proportion of agglomerated and/or aggregated NP than isolated NP. Even the largest NP, TiO_2 -Sigma, were able to reach cell cytoplasm as soon as after 6 h of exposure. After 24 h (not shown) or 48 h (Fig. 6E–G) all the NP were entrapped in lysosomes or in intracytoplasmic vacuoles. Even if they sometimes went close to cell nuclei, we never observed NP inside. Neither did we observe NP in mitochondria or Golgi apparatus. The amount of intracellular accumulation seemed to depend neither on size, nor on chemical composition.

4. Discussion

For the first time, we report a study on cytotoxicity of a panel of nanomaterials on the same cell model, namely A549 type II alveolar epithelium cells. The biological effects of metal oxide NP and carbon NT can thus be directly compared. A panel of sizes and crystalline structures of TiO_2 NP was studied, together with Al_2O_3 NP of the same size as one TiO_2 NP sample. Multi-walled carbon NT were either contaminated with Fe impurities or purified by heat treatment and exhibit different length.

Size, aggregation and agglomeration, surface area, zeta potential of all these nanomaterials were characterized. In initial aqueous suspensions, the characteristics of commercial NP were concordant with the information of suppliers. TEM observation led to the suggestion that NP were slightly aggregated and/or agglomerated; however we cannot exclude that it is not an artefact coming from preparation of TEM samples. In exposure media, NP

were agglomerated, probably due to neutral pH and high ionic force: at pH 7.4 (pH of cell medium) all NP are near their isoelectric point. However inside cells, NP are less agglomerated than in exposure medium. After 6 h of exposure, NP were internalized in cells, either as aggregates/agglomerates or free in the cytoplasm. As previously mentioned, surface-tension-mediated disaggregation of electrostatically or loosely agglomerated particulates can occur when nanomaterials are introduced in biological media (Soto et al., 2007). It is possible that such a phenomenon occurs when nanomaterials are at the vicinity or inside cells. Cells would then engulf large agglomerates and then dissociate them in their cytoplasm. Another explanation would be that cells internalize only the smallest agglomerates and free NP by two-independent internalization pathways. The only way cells can internalize agglomerates is endocytosis Conner and Schmid (2003). Two broad categories of endocytosis exist: phagocytosis, restricted to specialized cells such as macrophages, monocytes and neutrophils; and pinocytosis including macropinocytosis (for particles $>1 \mu\text{m}$), clathrin-mediated endocytosis ($\sim 120 \text{ nm}$), caveolin-mediated endocytosis ($\sim 60 \text{ nm}$) or clathrin- and caveolin-independent endocytosis ($\sim 90 \text{ nm}$). Due to their size, nanoparticle agglomerates would rather be internalized in cells through macropinocytosis, even if we do not observe any membrane ruffling, characteristic of this pathway. In the hypothesis that free NP are internalized independently from agglomerates, these free NP can enter cells by any pinocytosis pathway or even by simple diffusion through plasma membrane as some viruses do Marsh and Pelchen-Matthews (2000). After 48 h, all the NP are grouped in intracellular compartments, vacuoles or lysosomes and no free NP is observed. For this reason we rather think that two-independent pathways of NP internalization occur in cells: NP would then be entrapped in cytoplasmic vesicles as a defence reaction. All these pathways of pinocytosis can derive from non-specific interaction of cargoes with plasma membrane or specific linking via membrane receptors. The existence of specific receptors to NP is improbable, but NP may exploit receptors dedicated to the uptake of large protein. The specificity of pinocytosis still needs to be assessed, and potentially implicated receptors need to be identified. This rapid intracellular accumulation has already been shown after 4 h of exposure of A549 cells to 20–80 nm TiO_2 NP (Singh et al., 2007). In this study, the authors did not see any particle free in the cytoplasm, contrary to what we observed (Singh et al., 2007). This difference might be due to the difference of size of the NP they used (20–80 nm), which were bigger than the ones we used (TiO_2 -CEA, 12 nm).

It is striking to note that even if all these NP are efficiently internalized in cells, their cytotoxicity is generally low. The maximum cytotoxicity of TiO_2 NP is 25% (MTT) or 15% (XTT and LDH) of cell death after exposure during 48 h to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In our conditions, anatase TiO_2 NP are slightly more toxic than rutile TiO_2 . Sayes et al. (2006) previously showed that NP- TiO_2 anatase induced a cytotoxic response two orders of magnitude more important than NP- TiO_2 rutile (for both of them, grain size was $\sim 5 \text{ nm}$), the CI_{50} was 3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for NP- TiO_2 anatase and 550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for NP- TiO_2 rutile, i.e., the NP they used were much more toxic than the ones we studied since we never reached 50% of cell death when cells were exposed to up to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The difference in cytotoxicity may be explained by size and consequently internalization pathway. In the present study, among anatase TiO_2 NP, the smallest (TiO_2 -CEA and TiO_2 -Degussa-P25, 12 and 25 nm, respectively) are slightly but significantly more toxic than the largest (TiO_2 -Sigma, 140 nm). Previously published results show that larger particles, 1 μm TiO_2 -Degussa, induce more important morphological changes than TiO_2 -Degussa-P25 (Park et al., 2007), which means that what we perceive with the 140 nm particles might be the

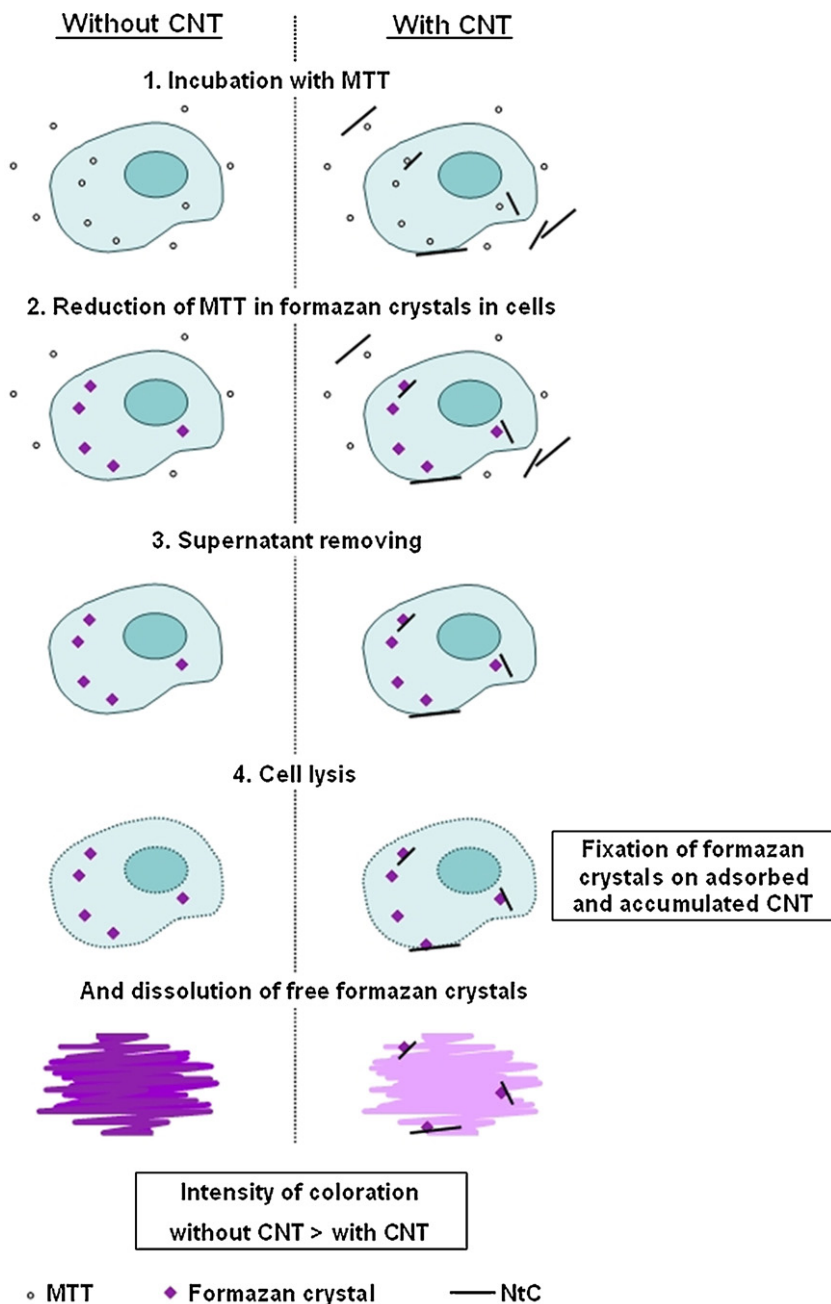


Fig. 7. Interaction of CNT with MTT assay: a hypothetical CNT absorption/accumulation assay.

premise of a more general influence of size on biological impact. The chemical composition of NP also influences their toxicity since 12 nm TiO_2 NP are more toxic than 11 nm Al_2O_3 NP. In conclusion, size, crystal structure and chemical composition slightly influence the biological impact of TiO_2 NP, but toxicity is globally very low.

In our conditions, MWCNT are accumulated in cells as isolated tubes, and the majority of them localize in vesicles. As nanoparticles, MWCNT uptake may occur via endocytosis, particularly macropinocytosis. MWCNT were more toxic than NP, as demonstrated with LDH assay. The maximum cell death rate after exposure to MWCNT was 40% at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (LDH). This assay has been demonstrated to be reliable for the identification of nanotubes toxicity. XTT assay is also considered reliable, in our conditions it led to a maximum of 10% of cell death, which is lower than response of LDH assay. MWCNT impact on cells may be an early

damage of cell membranes, shown by LDH release, followed by mitochondrial damages, shown by XTT assay. Moreover, TEM observation of cells exposed to MWCNT in our conditions contained more multi-lamellar bodies than control cells, which might be a mechanism of defence of cells, confirming that cells may be stressed by intracellular accumulation of MWCNT. Finally, MTT assay led to a maximum of 75% of cell death. Results of MTT assay were previously shown to be controversial with SWCNT: interference between the dye and SWCNT may result in false positives (Casey et al., 2007a; Pulskamp et al., 2007; Worle-Knirsch et al., 2007). We also observed MWCNT interference with MTT assay since a positive result in this assay was observed after only 1 h of exposure while it appears after 48 h of exposure with other assays. Carbon nanotubes were shown to be able to fix formazan crystals (Casey et al., 2007b). These crystals were only formed inside cells, so only

accumulated or adsorbed carbon nanotubes can interfere with MTT assay (Fig. 7). So, in absence of cytotoxicity, this assay highlights adsorption and/or accumulation of carbon nanotubes. In our conditions, cytotoxic effects were only observed after 48 h of exposure when using LDH and XTT assays. Consequently the apparent cytotoxicity observed after only 1 h with MTT assay probably highlights a quick adsorption/accumulation of MWCNT into the cells.

Magrez et al. (2006) used gelatin to stabilize MWCNT suspension, which prevented agglomeration. As in the present study, they observe MWCNT toxicity when using MTT assay on several cell types, after 48 h exposure of cells to MWCNT concentrations as low as 0.05 µg/ml. In their study MWCNT are less toxic than carbon nanofibers and carbon black nanoparticles, and toxicity depends on surface chemistry, since decorated MWCNT (carboxylated or hydroxylated) are more toxic than non-modified MWCNT. We also see only little agglomeration of MWCNT when using Arabic gum as dispersing agent, not toxic by itself (data not shown). This is a crucial difference of our work with that of Pulskamp et al. in which no cytotoxicity was observed (Pulskamp et al., 2007) when SWCNT and MWCNT are prepared without dispersant and are thus most probably agglomerated. The authors show that MWCNT were internalized in cells as bundles. Isolated in exposure medium, the MWCNT we used may be more available to cells and it may explain their toxicity. Another explanation would be that their intracellular accumulation pathway may be different from that of large bundles. Isolated MWCNT, with aspect ratio ranging from 1 to 190, internalized in cells, might display a mechanical toxicity.

Cell damage was not correlated to the presence of Fe impurities in MWCNT, contrary to what was previously shown (Pulskamp et al., 2007). For MWCNT purification, we used heat treatment instead of the classical acidic treatment. Strong acid treatment leads to the oxidation of nanotube surface, and the generation of carboxyl groups, which increases their dispersion (Bianco et al., 2005), but may also increase their surface reactivity, possibly leading to the generation of ROS. MWCNT toxicity highly depends on their surface chemistry (Bottini et al., 2006; Magrez et al., 2006; Tian et al., 2006). In the MWCNT preparation we used, raw and purified MWCNT have a similar chemical surface state. This may explain the absence of over-cytotoxicity of purified MWCNT. The presence of Arabic gum as a dispersing agent would also protect MWCNT from surface reactivity. Moreover in the MWCNT suspension we used, Fe is present but it is mainly encapsulated inside MWCNT, and thus not directly available on the external surface. This may explain the absence of no over-toxicity of non-purified MWCNT. The last important point is that, in our conditions, MWCNT toxicity did not depend on length, and thus on aspect ratios in the range examined (e.g. [4–190] range for long MWCNT and [1–84] range for short MWCNT). We observed that only the shorter ones (up to 3 µm) entered cells.

5. Conclusions

In this study we assessed the toxicity of TiO₂ NP-rutile or anatase, of different size and surface area –, Al₂O₃ NP and multi-walled carbon NT with different length either containing Fe impurities or purified by heat treatment – on A549 cells. All these nanomaterials were shown to be efficiently internalized in cells. MWCNT were more toxic than NP, their toxicity was depending neither on their length, nor on the presence of Fe impurities. Toxicity of NP was low and was depending on some extent on chemical composition, crystalline structure and size. It is the first time the same cell model is exposed to such a panel of nanomaterials, allowing a direct and rigorous comparison of their biological impact. Some questions still need to be answered: do nanomaterials uptake in

cells occur via fusion or penetration at the cell surface, via endocytosis or via a combination of these two pathways? Is there a unique route of endocytosis, and which one is it? Is the uptake specific, and if so, which receptor is implicated? All these answers will lead to a better understanding of nanomaterial toxicity and dangers for health.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

We thank D. Jaillard and J. Degrouard from Orsay CCME (Centre commun de microscopie électronique) for transmission electron microscopy experiments.

Funding: This work was supported by ADEME, Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie and by the Région Ile-de-France in the framework of C'Nano IdF. C'Nano-IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by CNRS, CEA, MESR and Région Ile-de-France.

References

- Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M., 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 674–679.
- Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E., 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* 3, 11.
- Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., Mustelin, T., 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol. Lett.* 160, 121–126.
- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309–319.
- Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., Lyng, F.M., Byrne, H.J., Chambers, G., 2007a. Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon* 45, 34–40.
- Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F.M., Byrne, H.J., Chambers, G., 2007b. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 45, 1425–1432.
- Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.
- Glory, J., Mierczynska, A., Pinault, M., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., 2007. Dispersion study of long and aligned multi-walled carbon nanotubes in water. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 3458–3462.
- Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H., Jan, K.Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213, 66–73.
- Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., Guo, X., 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1378–1383.
- Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D., et al., 1992. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J. Biotechnol.* 25, 231–243 (corrected).
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G., 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17, 62–70.
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J.W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., Forro, L., 2006. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.* 6, 1121–1125.
- Marsh, M., Pelchen-Matthews, A., 2000. Endocytosis in viral replication. *Traffic* 1, 525–532.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B., Lison, D., 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221–231.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622–627.
- Oberdorster, E., Stone, V., Donaldson, K., 2007. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 1, 2–25.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., 2005a. Principles for characterizing the potential human health effects

- from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol. 2, 8.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005b. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Park, S., Lee, Y.K., Jung, M., Kim, K.H., Chung, N., Ahn, E.K., Lim, Y., Lee, K.H., 2007. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 19 (Suppl. 1), 59–65.
- Pignon, B., Maskrot, H., Leconte, Y., Coste, S., Reynaud, C., Herlin-Boime, N., Gervais, M., Guyot Ferreol, V., Pouget, T., Tranchant, J.F., 2008. Versatility of laser pyrolysis applied to synthesis of TiO₂ nanoparticles, application to UV attenuation. *Eur. J. Inorg. Chem.*
- Pinault, M., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Pichot, V., Launois, P., Ballutaud, D., 2005. Growth of multiwalled carbon nanotube during the initial stages of aerosol-assisted CCVD. *Carbon* 116, 2968–2976.
- Pulskamp, K., Diabate, S., Krug, H.F., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Lett.* 168, 58–74.
- Sato, Y., Yokoyama, A., Shibata, K., Akimoto, Y., Ogino, S., Nodasaka, Y., Kohgo, T., Tamura, K., Akasaka, T., Uo, M., Motomiya, K., Jeyadevan, B., Ishiguro, M., Hatakeyama, R., Watari, F., Tohji, K., 2005. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Mol. Biosyst.* 1, 176–182.
- Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A., Liu, Y., West, J.L., Ausman, K.D., Warheit, D.B., Colvin, V.L., 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 92, 174–185.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, 4827–4833.
- Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., van Berlo, D., Hohr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I., Borm, P.J., Schins, R.P., 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 141–151.
- Soto, K., Garza, K.M., Murr, L.E., 2007. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater.* 3, 351–358.
- Stearns, R.C., Paulauskis, J.D., Godleski, J.J., 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 108–115.
- Strum, J.M., Wicken, J., Stanbury, J.R., Karnovsky, M.J., 1971. Appearance and function of endogenous peroxidase in fetal rat thyroid. *J. Cell Biol.* 51, 162–175.
- Tian, F., Cui, D., Schwarz, H., Estrada, G.G., Kobayashi, H., 2006. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 20, 1202–1212.
- Worle-Knirsch, J.M., Kern, K., Schleh, C., Adelhelm, C., Feldmann, C., Krug, H.F., 2007. Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 331–336.
- Worle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., Krug, H.F., 2006. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6, 1261–1268.

Impact of gold nanoparticles combined to X-Ray irradiation on bacteria

A. Simon-Deckers¹, E. Brun², B. Gouget¹, M. Carrière¹, C. Sicard-Roselli²

¹ Laboratoire Pierre Süe, UMR9956 CEA-CNRS, Gif sur Yvette, France

² Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000 CNRS-Université Paris 11, Orsay, France

Abbreviations:

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DMEM: Dulbecco's Modified Essential Medium

GNP: Gold nanoparticle

LB: Luria Bertani

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NIR: Near-Infrared

NP: Nanoparticle

PEG: Polyethylene glycol

TEM: Transmission Electron Microscopy

Abstract

Recent increase of multi drug-resistant bacteria represents a crucial issue of public health. As innovative approaches are required to face that problem, those emerging from nanotechnology are of great interest. In that context we propose the possibility to use gold nanoparticles combined with ionising radiation to destroy pathogenic bacteria. For that, we investigated the potential X-Rays enhanced reduction of bacterial cell viability, following nanoparticle exposure, on a bacterial model, *Escherichia coli*. Our first concern was to confirm the absence of toxicity of the colloidal solution used. Then, we developed an X-Ray irradiation system and showed that gold nanoparticles increased the efficiency of ionising radiation to induce bacteria cell death.

Introduction

Since the last decade, nanomaterials showed an exponential progression in domains such as chemistry and biology. Thus, development of nanotechnologies may lead to an increasing nanomaterials release in the environment and so potential risks for ecosystems. Few studies deal with the impact of nanoparticles on the ecosystem [1, 2]. Most of them concern aquatic animals [3] and bacteria. Two concerns are important in case of bacterial contamination with nanomaterials: if nanomaterials are toxic for environmental bacteria, they can have devastating effects on the ecosystems and lead to a global destabilization. On the opposite, if bacteria are resistant to nanomaterials, adsorb them onto their membrane or absorb them in their periplasm or cytoplasm, they can be responsible for their transfer in the environment. This mobilization can thus lead to the transfer of nanoparticles from the site of contamination to non-contaminated areas. Some nanoparticles (NPs), such as silver NPs, have been shown to have antibacterial properties [4, 5]. Their mode of action was proposed to be identical to the one of Ag ions, *i.e.* the positively charged Ag NPs interact strongly with the cell membrane modifying its permeability. For this reason they are used for industrial purposes, for example as adjuvant in textiles [6, 7] or in bone cement [8, 9]. They are described to be able to inhibit the proliferation of pathogens [10], and thus have interesting medicinal applications. If this toxicity is beneficial for such applications, it suggests ecotoxicological issues in case of dissemination in the environment, which makes it difficult to consider them as potentially usable for other technological developments. On the opposite and due to their interesting properties, gold nanoparticles (GNPs) have been considered for several potential biological applications going from drug delivery [11, 12] and imaging [13] to therapy [14, 15]. Concerning cancer therapies the most studied effect is known as the photothermal effect: spherical NPs but also nanorods when submitted to a laser beam emit heat enough to kills cells [16]. Another application of GNPs was presented as a radio-sensitizing effect when gold is submitted to an X-Ray beam [17, 18]. All these promising applications would necessitate GNPs vectorisation to target specifically cancer cells and to avoid high dose GNPs injections. Nevertheless, human exposure to nanoparticles requires nanotoxicologic research to ensure the absence of toxicity of the particles but also of the targeting coating. Cytotoxicity of NPs is an emerging field of research [19-22] and their impact on human cell lines was recently reviewed by Lewinski *et al* [23]. The variety of tests, cell types and nanoparticles (coating, concentration and incubation time) make difficult an accurate comparison. Nevertheless a general trend can be drawn *i.e.* GNPs do not induce high cell mortality.

Curiously, only few studies deal with impact of GNPs on microbial cells [24, 25]. Williams *et al* did not note significant decrease in bacterial growth of *Escherichia coli* (*E. coli*) exposed to up to $1.1 \cdot 10^{-4}$ g mL⁻¹ PEG-coated GNPs whereas Huang and Zharov teams combined GNPs and near infra-red (NIR) light or laser pulses to potentially use GNPs

for antimicrobial activities. As for us, we got interested in the destruction of bacteria using GNPs and ionising radiation and precisely on the possible radio-enhancement effect of GNPs. Our first goal was to check the absence of toxicity of GNPs on *E. coli* under our conditions and then to determine the ability of GNPs to enhance X-Ray-induced degradation. For that we designed an X-Ray system devoted to biological samples irradiation.

Materials and methods

Nanoparticles synthesis and characterization

Non-functionalized gold nanoparticles synthesis

All glassware used for GNPs synthesis was thoroughly washed with aqua regia (3:1 HNO₃, HCl), rinsed extensively with water and oven-dried at 60°C. The colloidal gold nanoparticles were prepared by the Turkevitch method [26, 27], *i.e.* citrate thermal reduction. Typically, 4.2 mL of a 1% (w/v) solution of tri-sodium citrate were added to 100 mL of a 10⁻³ mol. L⁻¹ KAuCl₄ aqueous solution. The mixture was heated under moderate stirring until 10 minutes after the solution had turned purple. It was then subjected to centrifugation (2300 g, 20 min) and the pellet of NPs was collected. The final concentration was 6 mg/mL of gold.

Electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was used to obtain images of the NPs. A drop of stock solution of GNPs suspension was placed on carbon-coated copper grids (300 mesh) and dried before being placed in the TEM for imaging. NPs diameter distribution was determined with ImageJ software [28] by analyzing more than 400 particles.

Characterization of the interaction of GNPs with bacteria was done after exposure to 50 µg.mL⁻¹ for 24 h. For that, bacterial pellets were fixed with 2.5% glutaraldehyde, post-fixed with OsO₄ and dehydrated in graded concentrations of ethanol, then embedded in Epon resin. 80 nm thin sections were cut, and observed with a CM 120 Philips electron microscope at 80 kV at the CCME (Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay).

Cell culture

NRK-52E cell line is a model for rat kidney proximal tubules and Hep-G2 hepatocarcinoma cell line are classically used for human liver toxicity assessment. NRK-52E were purchased from ATCC (CRL-1571), and Hep-G2 kindly given by Dr. D. Cassio (INSERM U442). These cell models were chosen since in case of contamination and of translocation of GNPs in the bloodstream, liver and kidneys, as detoxification organs, are the more probable targets of GNPs toxicity. They were grown in DMEM supplemented with 10% (V/V) foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 UI/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. They were maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator and passed at 80% of confluence. Exposures to nanomaterials were done on sub-confluent cells.

Toxicity assays

Cells were seeded in 96-well plates and exposed after 24 h to 100 µL of GNPs in the presence or absence of citrate (0-200 µg/mL) in cell culture medium without serum to avoid interaction with nanoparticles (see figure legends for details). Cell metabolic activity, reflecting cytotoxicity, was assessed by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) [29]. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells reduce MTT to water-insoluble blue formazan crystals; this assay thus indicates cell mitochondrial activity impairment. After exposure, 10 µL of a 5 mg/mL MTT solution were added to each well. After 1 h at 37°C, medium was then replaced by 100 µL of dimethyl sulfoxide and mixed thoroughly to dissolve the formazan crystals. Nanoparticles were allowed to sediment during 1 h and 50 µL of each well was then transferred to another plate. Absorbance was measured at 570 nm with a Gemini X spectrophotometer (Molecular Devices, St Grégoire, France).

Bacterial strain and growth conditions

E. coli K-12 MG1655 bacteria (CGSC 7740) [30] were grown aerobically at 37°C in Luria Bertani broth (LB) medium under 200 rpm agitation. This strain was chosen since it approximates wild-type *E. coli*, because it was subjected to minimal genetic manipulations. For GNPs exposure, a preculture was obtained by growing cells until mid-exponential phase. Since GNPs immediately aggregate when the suspension is diluted in LB medium due to its high ionic strength, cells were washed and exposed to GNPs in sterile ultrapure water. Equivalent volumes of bacteria (DO = 6 at 600 nm) and of GNPs were incubated prior to irradiation. Control cultures were grown under identical conditions in the absence of GNPs. Exposures were conducted with a constant 300 rpm shaking for 24 h.

Live/Dead toxicity assay

Following GNPs exposure, the bacteria were stained using the Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instruction. This assay uses two dye components, the green-fluorescent SYTO[®] 9 stain and the red-fluorescent propidium iodide stain. These stains differ in their ability to penetrate healthy bacterial cells: SYTO 9 stain labels both live and dead bacteria while propidium iodide penetrates only bacteria with damaged membranes. Thus, live bacteria with intact membranes fluoresce green, while dead bacteria with damaged membranes fluoresce red. Live and dead bacteria can be quantified separately by fluorescence microscopy (excitation at 470 nm; emission at 525 and 625 nm; Gemini X spectrophotometer, Molecular Devices, St Grégoire, France). Percentage of cell viability was calculated after bacteria exposure to GNPs compared to control.

Irradiations and dosimetry

A new X-Ray irradiation system was designed and adapted for biological samples. This system is based on a crystallographic generator with a ceramic diffraction tube. The originality of

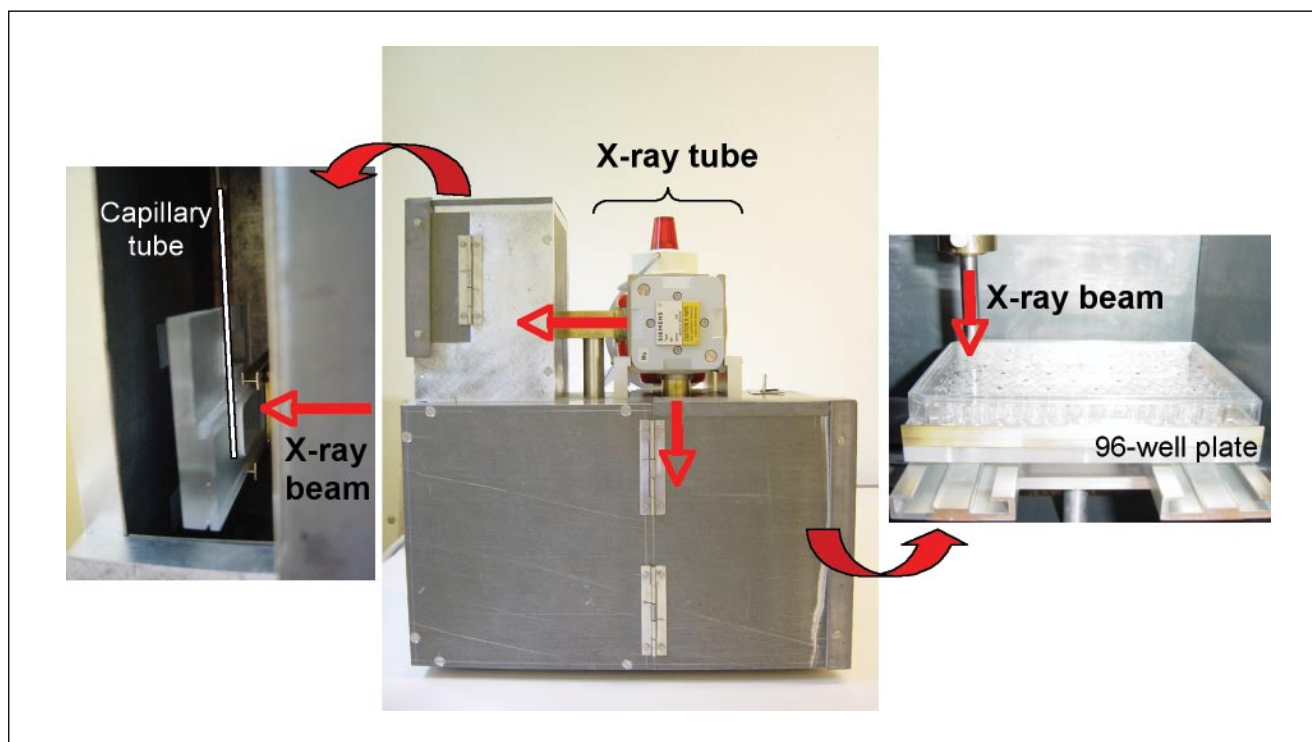


Figure 1

Pictures of the X-ray irradiation system. The X-ray beam is guided along two perpendicular directions. Two cages allow respectively experiments with samples in capillary tubes (left part) and with cell samples in 96-well plates (right part)

this apparatus resides in its two perpendicular windows (Figure 1). In the first one, the horizontal beam allows the irradiation of samples in Lindemann capillary tubes (Glas Technik&Konstruktion, Germany) or plastic cuvettes. Several tubes can be irradiated at the same time. The second beam is vertical and equipped with a sample holder designed to irradiate cells contained in 96-well plates. Temperature regulation of the plate is under realisation. These two beams can be used simultaneously and independently. In addition, dose rate can be easily tuned, playing with the generator power and the sample distance from

the source. In the present case, irradiations were performed in plastic cuvettes with a copper anti-cathod (Diffractis 601 Enraf Nonius X-ray generator, 40 kV, 20 mA). The predominant photon energy was about 8 keV.

As the irradiation system was new, an accurate dosimetry was necessary. A usual dosimeter for high-energy photons is the chemical Fricke dosimeter. Under irradiation, Fe(II) ions in an acidic solution are converted into Fe(III). This oxidation yield is known with high precision for gamma radiation and hard X-rays. But for X-rays with energies between 1.5-10 keV,

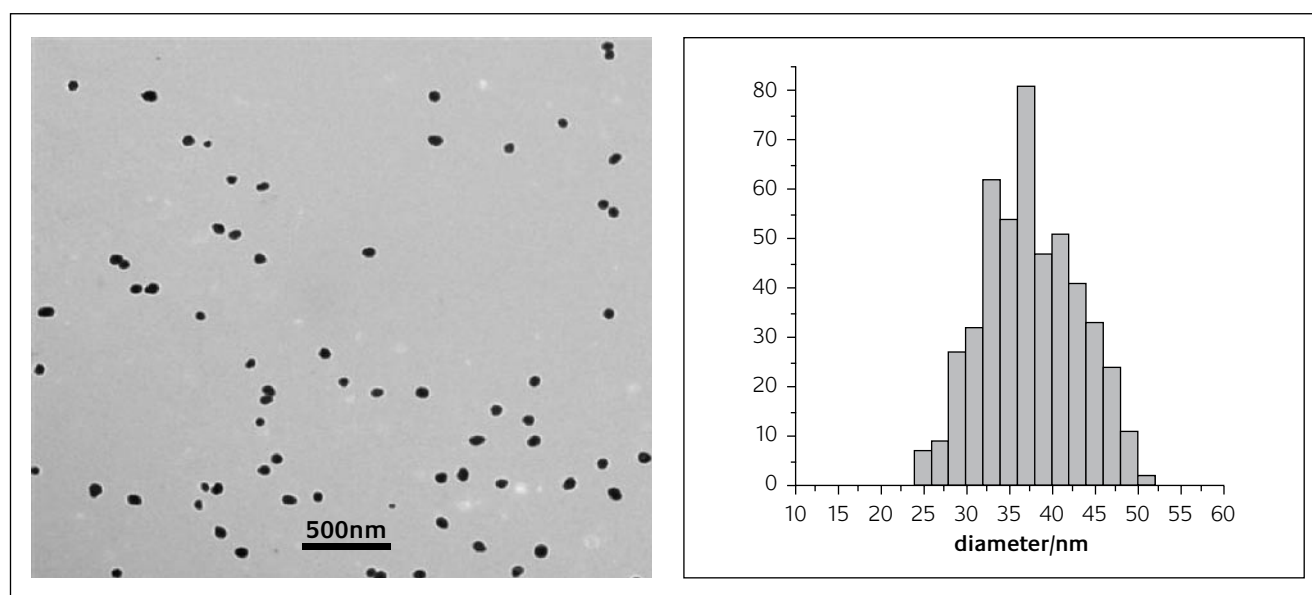


Figure 2

Transmission electron microscopy images of gold nanoparticles (LEFT) and size distribution (RIGHT)

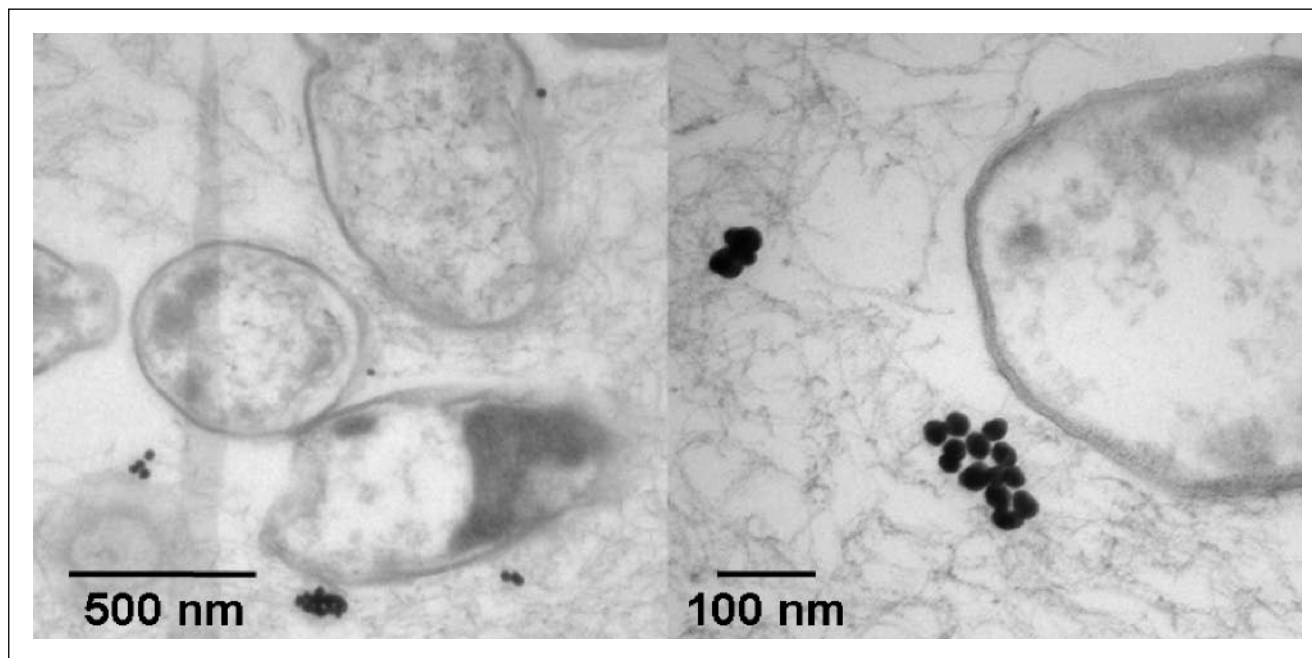


Figure 3

Transmission electron microscopy observation of *E. coli* exposed to gold nanoparticles. Bacteria were cultivated in LB medium, then rinsed and exposed to GNPs in water during 24 h. After embedding in Epon, thin sections were cut and directly observed

available values of $G(\text{Fe}^{3+})$ are more controversial [31]. So we turned to a radiochromatic dosimetry for the newly-developed X-rays generator. Dose rate measurement using Gafchromic® HD-810 radiochromatic dosimetry film (ISP Technologies INC, Wayne, NJ) are described thoroughly elsewhere [32]. Briefly, this film has a nominal 7- μm -thick radiation sensitive layer on a 100 μm polyester base. Film samples were placed in plastic cuvettes and exposed to X-rays for various durations. After storage in the dark for 48h, they were scanned with a CanoScan LIDE 500F scanner and blue channel images were analysed with ImageJ software [28]. The absorbance was defined as $\log_{10}(I_0/I)$ where I_0 and I are the mean values resulting from the ImageJ histograms for respectively non-exposed and exposed zones of the samples. The conversion from absorbance to absorbed dose in water resulted from previous work [33]. For all experiments, the equivalent dose rate in water obtained was 10.7 Gy/min. Bacteria were always kept at 37°C except for irradiation that was done at room temperature under normal atmosphere.

Results and discussion

Gold nanoparticles / bacterial cells interaction and toxicity

Gold nanoparticles were synthesized using the well-known method of citrate reduction. The spherical particles obtained were characterized using transmission electron microscopy. Their size distribution was determined by analysing more than 400 objects. Figure 2 shows that the average size is 37.5 ± 5.6 nm. The concentration of citrate versus gold salts is known to govern the size and shape of the colloids obtained [34]. In our case, we used an excess of citrate to obtain this

size of nanoparticles. Therefore, citrate is still present at the surface of the GNPs, and plays then a double role: reducing agent and stabilizer. Bacteria NPs interaction was investigated using electron microscopy. As already mentioned by Huang *et al.* [35], non-modified GNPs show no specific interaction with the cell walls of the bacteria (Figure 3), due to repulsive forces caused by negative surface charges of bacteria and nanoparticles. In our conditions, GNPs were observed either isolated at the vicinity of bacteria, or grouped in small clusters of 5-15 NPs. No specific modification of bacteria morphology was observed: they presented large intracellular vacuoles but so did control bacteria. These vacuoles certainly come from the stress generated by exposure in water. However these vacuoles did not inhibit bacterial growth when they were re-seeded in LB medium, *i.e.* this stress was reversible. Nanoparticles sometimes went close to bacteria, were rarely adsorbed on bacterial surface, but we never observed nanoparticles in bacterial periplasm or cytoplasm.

Toxicity of GNPs was investigated on this bacterial strain. We have chosen not to functionalize nanoparticles in order to get rid of functionalizing molecule self toxicity, which would introduce artefacts in the study. Effectively Connor *et al* showed that CTAB [21] used as a stabilizer of the nanoparticles induces cell toxicity. Since our synthesis procedure induces contamination of nanoparticle suspension with citrate, the first control consisted in bacteria exposed to citrate only. To do so, nanoparticles were centrifuged and the supernatant was collected. The absence of nanoparticles in the supernatant was verified by UV-Visible absorption (not shown). 40 μL of a bacteria solution ($\text{DO} = 3.5$) was incubated with 50 μL of nanoparticle suspension supernatant, or with 50 μL of water, or 50 μL of gold nanoparticles to quantify their respective toxicities. Figure 4 shows that the three samples exhibit the

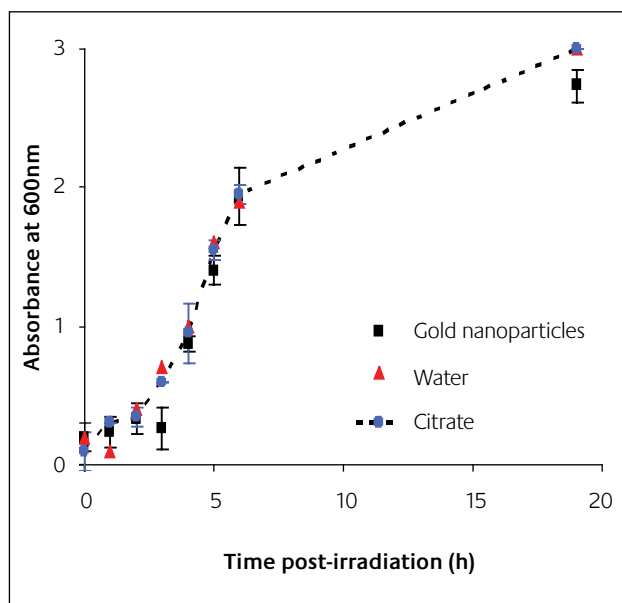


Figure 4

Growth curve of *E. coli*. Bacteria were rinsed and exposed 24 h in water either to GNP synthesized in citrate, or to an aqueous citrate solution. They were then seeded in LB medium and allowed to grow

same behaviour *i.e.* the bacteria possess the same lag phase and the same growing profile in the presence of water or citrate, and also in the presence of gold nanoparticles. We can then conclude from that experiment that GNPs synthesized in the presence of citrate do not induce any toxicity on *E. coli* even at high concentration of GNPs (3mg/mL final). In their article, Huang *et al* did not discuss GNPs toxicity to bacterial strains, they rather focused on GNPs plus NIR photothermal

treatment effect on several bacterial strains [35]. From their results, it seems that non-functionalized GNPs are not toxic to *E. coli* DH5 α bacteria, but GNPs functionalized with vancomycin (GNP@van) are toxic. Moreover GNPs did not adsorb onto bacterial membranes while GNP@van did. Our results thus confirm these data, since the GNPs we used were not toxic and did not adsorb onto bacterial membrane.

To consider GNPs as potentially radio-sensitizing, it is essential to validate that they are not toxic to human cells. We performed toxicity experiments on NRK-52E and Hep-G2 cells, models for liver and kidneys which would be the most probably exposed organs if GNPs reach the bloodstream in case of a contamination. Indeed, in rats, 50 nm-diameter GNPs injected intravenously were shown to accumulate preferentially in liver and spleen [22]. NRK-52E and Hep-G2 cells were exposed to 0-200 μ g/mL GNPs during 24 h. We found gold nanoparticles as non cytotoxic, as only 0 to 10% of cell death was measured on both cell lines using MTT assay (not shown). In fact, up to now, few studies describe citrate/GNPs toxicity on human cells [21, 36, 37]. Connor *et al* found citrate/GNPs of 18 nm non-toxic up to 250 μ M (gold atoms) on K562 Leukaemia cells. Conversely, when higher concentration of GNPs were used by Pernodet *et al*, it could be evidenced a toxicity of citrate/GNP (0.1 and 0.6 mg/ml) on human dermal fibroblasts showing a dose-dependent decrease in cell density and area. The difference between this result and ours can come from the size of GNPs, which have a 20 nm-diameter in the study of Pernodet, and around 40 nm in our study. Moreover cell type can be an explanation and dermal fibroblasts might then be more sensitive to GNPs than NRK-52E and HepG2 cells.

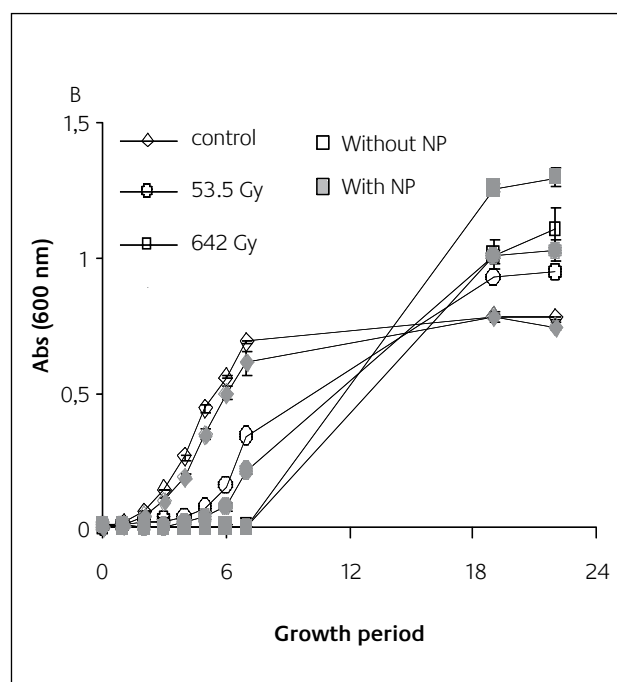
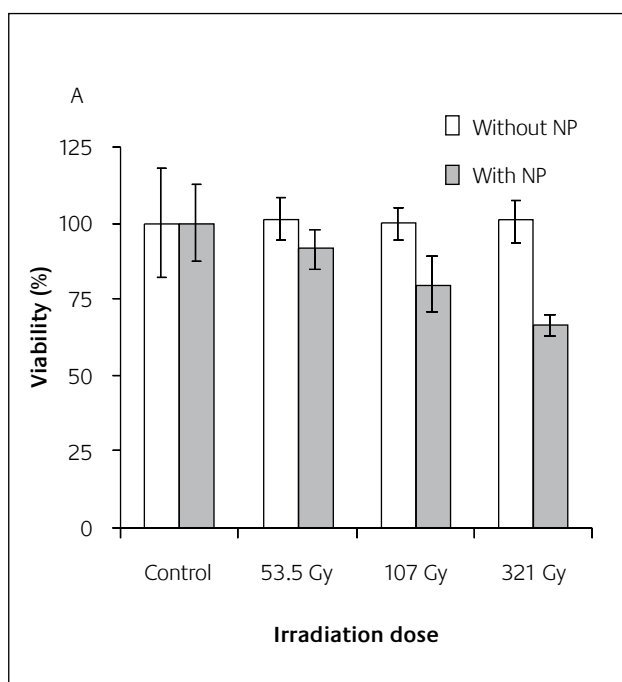


Figure 5

Impact of irradiation on *E. coli* pre-exposed to gold nanoparticles or not. Viability of *E. coli* after 0, 53.5, 107, 321 or 642 Gy of irradiation, after exposure to gold nanoparticles (grey) or not (white). Global viability was assessed with the live/dead assay (A) or growth curves construction after re-seeding in LB medium (B)

Radio-sensitizing effect of gold nanoparticles

Nanoparticles possess many potential therapeutical applications. For example, many theoretical as applied studies deal with their photothermal capacity *i.e.* their property to induce an increase in temperature sufficient to kill cells. For example, El-Sayed *et al* showed that the presence of gold nanorods reduces by a factor of 2 the laser power necessary to kill cancer cells [16]. Recently, nanoparticles were applied as photothermal agents for selective-killing of pathogenic bacteria [25, 38]. Non-functionalized gold nanoparticles could induce the destruction of pathogenic bacteria after a near-infrared illumination [35]. This phenomenon is enhanced when nanoparticles are selectively anchored onto the cell walls, using vancomycin or antibodies-coating.

Besides, Herold *et al* [18] and more recently Hainfeld *et al* [17] showed that gold nanoparticles could be used as a radio-sensitizing agent for radiotherapy. The first experiments conducted showed that nanoparticles, resuspended in cell culture or in tumour tissues, and submitted to X-ray radiation induce a higher degradation of malign cells or tumours than radiation alone. This radio-sensitizing effect was also reported *in vitro* for DNA [39, 40] and proteins [33]. In this work, we investigated the capacity of non-functionalized spherical-shaped gold nanoparticles to induce bacterial cell death after X-ray irradiation. The nanoparticles we used had approximately the same size as those used by Huang *et al* [35], *i.e.* 30-40 nm diameter. Ionising radiation is well-known to induce cell death which is quantified using the D value. This value, expressed in kiloGrays (kGy), represents the radiation dose required to reduce by a 1- $\log_{10}$ factor the viability of cells. D is known to vary with the different types of cells and irradiation conditions. In our case, the doses used here are one order of magnitude lower than those necessary to abrogate viability [41]. Figure 5A shows the influence of nanoparticles exposure on bacterial viability after 0, 53.5, 107 or 321 Gy of X-ray irradiation. Nanoparticle-exposed bacterial cells viability was normalized to non-exposed bacterial cell viability. A global tendency to enhanced bacterial death is observed, decreased viability was significant after 321 Gy. This result shows that GNPs have a radio-sensitizing effect on bacteria. When these GNP- and X-ray exposed bacteria were then reseeded in culture medium and allowed to grow, it was observed that X-ray irradiation induced a dose-dependent decrease in bacterial viability, demonstrated by an increased lag-phase (5B). However when comparing growth curves, irradiated bacteria were still able to proliferate, and the growth curve had the same appearance (Figure 5B). Lag phases and growth speed were statistically similar. It might be that irradiation caused the death of some bacteria but not all, and that viable bacteria proliferated as non-irradiated bacteria.

Cell-killing properties of vancomycin-coated, 30 nm-diameter gold nanoparticles combined to near-infrared irradiation have been demonstrated on pathogenic bacteria - [35]. In this previous work, gold nanoparticles were

polygonal-shaped, and their selective-killing activity was related to photothermal properties, due to their capacity to absorb NIR light, leading to hyperthermia. After 5-min of NIR irradiation in the presence of nanoparticles, the temperature increases to lethal temperature for the bacteria, estimated to be at least 50°C, resulting in bacteria killing. This cell death was further amplified by the presence of functionalized gold nanoparticles. Our report suggests that even non-functionalized gold nanoparticles, which do not adhere on bacterial cell wall, have bacterial killing properties when combined to X-Ray radiation. The difference of bacterial cell killing efficiency of the nanoparticles we used compared to those used by Huang *et al* [35] can be attributed to the kind of irradiation *i.e.* the photon energy. It is highly probable that the mechanisms involved are different. Contrary to NIR light, X-ray radiation has not been shown to induce significant temperature elevation, though the mechanism is still unclear. Most probably direct or indirect damages are generated, respectively DNA strand breaks and generation of free radicals from the ionization of water molecules.

Conclusion

We have generated gold nanoparticles which are not toxic to bacterial cells, and which did not accumulate in bacteria. These nanoparticles are ecotoxically safe, and will not be mobilized by bacteria, *i.e.* transferred in the ecosystems, leading to their dissemination. We also adapted an X-ray irradiation system, especially designed for biological samples. Combined to X-ray irradiation, pre-exposure of bacteria to these nanoparticles led to a tendency of radio-sensitization of bacteria, but this tendency was not statistically significant. Future work will focus on nanoparticles functionalization, in order to induce specific adsorption of nanoparticles on bacterial cell walls, which could enhance the radio-sensitizing effect. However special care should be taken when using functionalization as such nanoparticles could be less safe than those we used in the present study.

Gold nanoparticles submitted to X-ray radiation appear to be a potential tool for anti-microbial proliferation system or pathogenic bacteria killing system. For example, they could be used as antibacterial gold nanocomposite coatings on materials, decontaminated by the application of X-ray radiation. The emergence of resistant bacteria to traditional antibiotics motivates such a development of new antibacterial systems.

Acknowledgements: Collaboration between the teams was initiated within the framework of Gold-Nano Research group (CNRS). The authors would like to thank Catherine Louis, manager of the group. We thank D. Jaillard (Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay) for her help in TEM preparations and observation and D. Cassio (INSERM U442) for providing Hep-G2 cells. We also thank G. Keller for his great help for the X-ray system adaptation.

About the authors



Angélique Simon-Deckers is a PhD student working at the Pierre Süe Laboratory, CEA-CNRS UMR 9956, Saclay, France. Her research focuses on biological effects of nanomaterials on *in vitro* cultured cells and on bacteria.



Emilie Brun is a PhD student working at the Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris XI Orsay, CNRS UMR 8000, Orsay, France. Her research interest includes gold nanoparticle radio-sensitizing effect.



Dr. Barbara Gouget was permanent researcher at the Pierre Süe Laboratory, CEA-CNRS UMR 9956, Saclay, France when these experiments were done. She is now working at the Scientific Department of the French Food Safety Agency, Maisons-Alfort, France.



Dr. Marie Carrière is permanent researcher at the Pierre Süe Laboratory, CEA-CNRS UMR 9956, Saclay, France. Her area of research includes human and ecotoxicity of environmental pollutants *i.e.* metals, radionuclides, and nanomaterials. Models employed are *in vitro* cultured cells, bacteria and plants cultivated in hydroponic solutions.



Dr. Cécile Sicard-Roselli is an Associate Professor in the Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris XI Orsay, CNRS UMR 8000, Orsay, France. Her area of research includes radiobiology, analytical chemistry and nanosciences (gold nanoparticles).

References

- 1 V.L. Colvin, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1166
- 2 B. Nowak, T.D. Bucheli, *Environ. Poll.*, 2007, **150**, 5
- 3 M.N. Moore, *Environ. Int.*, 2006, **32**, 967
- 4 J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, *Nanomedicine*, 2007, **3**, 95
- 5 C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K. Tam, J.F. Chiu, C.M. Che, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 527
- 6 T. Yuranova, A.G. Rincon, C. Pulgarin, D. Laub, N. Xantopoulos, H.-J. Mathieu, J. Kiwi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2006, **181**, 363
- 7 T. Yuranova, A.G. Rincon, A. Bozzi, S. Parra, C. Pulgarin, P. Albers, J. Kiwi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2003, **161**, 27
- 8 Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, W. Wang, *Biomaterials*, 2006, **27**, 2440
- 9 V. Alt, T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, *Biomaterials*, 2004, **25**, 4383
- 10 N. Tsao, P.P. Kanakamma, T.Y. Luh, C.K. Chou, H.Y. Lei, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, **43**, 2273
- 11 G. Han, P. Ghosh, V.M. Rotello, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, **620**, 48
- 12 G.F. Paciotti, L. Myer, D. Weinreich, D. Goia, N. Pavel, R.E. McLaughlin, L. Tamarkin, *Drug Deliv.*, 2004, **11**, 169
- 13 D. Nagesha, G.S. Laevsky, P. Lampton, R. Banyal, C. Warner, C. DiMarzio, S. Sridhar, *Int. J. Nanomedicine*, 2007, **2**, 813
- 14 I.H. El-Sayed, X. Huang, M.A. El-Sayed, *Cancer Lett.*, 2006, **239**, 129
- 15 D. Pissuwan, S.M. Valenzuela, M.B. Cortie, *Trends Biotechnol.*, 2006, **24**, 62
- 16 X. Huang, I.H. El-Sayed, W. Qian, M.A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 2115
- 17 J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, H.M. Smilowitz, *Phys. Med. Biol.*, 2004, **49**, N309
- 18 D.M. Herold, I.J. Das, C.C. Stobbe, R.V. Iyer, J.D. Chapman, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, **76**, 1357
- 19 M. Tsoi, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, G. Schmid, *Small*, 2005, **1**, 841
- 20 P. Mukherjee, R. Bhattacharya, N. Bone, Y.K. Lee, C.R. Patra, S. Wang, L. Lu, C. Secreto, P.C. Banerjee, M.J. Yaszemski, N.E. Kay, D. Mukhopadhyay, *J. Nanobiotech.*, 2007, **5**, 4
- 21 E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, *Small*, 2005, **1**, 325
- 22 W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J. Sips, R.E. Geertsma, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1912
- 23 N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small*, 2008, **4**, 26
- 24 D.N. Williams, S.H. Ehrman, T.R. Pulliam Holoman, *J. Nanobiotech.*, 2006, **4**, 3
- 25 V.P. Zharov, K.E. Mercer, E.N. Galitovskaya, M.S. Smeltzer, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 619
- 26 J. Turkevitch, *Gold Bull.*, 1985, **18**, 86
- 27 J. Turkevitch, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Faraday Soc.*, 1951, **11**, 55
- 28 M.D. Abramoff, P.J. Magelhaes, S.J. Ram, *Biophoton. Int.*, 2004, **11**, 36
- 29 T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55
- 30 F.R. Blattner, G. Plunkett, 3rd, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science*, 1997, **277**, 1453
- 31 R. Watanabe, N. Usami, K. Kobayashi, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1995, **68**, 113
- 32 Z. Cai, X. Pan, D. Hunting, P. Cloutier, R. Lemay, L. Sanche, *Phys. Med. Biol.*, 2003, **48**, 4111

- 33 E. Brun, P. Duchambon, Y. Blouquit, L. Sanche, C. Sicard-Roselli, *Actually submitted*, 2008
- 34 S. Kumar, K.S. Gandhi, R. Kumar, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007, **46**, 3128
- 35 W.C. Huang, P.J. Tsai, Y.C. Chen, *Nanomed*, 2007, **2**, 777
- 36 X.L. Wei, Z.H. Mo, B. Li, J.M. Wei, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2007, **59**, 100
- 37 N. Pernodet, X. Fang, Y. Sun, A. Bakhtina, A. Ramakrishnan, J. Sokolov, A. Ulman, M. Rafailovich, *Small*, 2006, **2**, 766
- 38 R.S. Norman, J.W. Stone, A. Gole, C.J. Murphy, T.L. Sabo-Attwood, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 302
- 39 E.A. Foley, J.D. Carter, F. Shan, T. Guo, *Chem. Comm. (Camb)*, 2005, 3192
- 40 Y. Zheng, D.J. Hunting, P. Ayotte, L. Sanche, *Radiat. Res.*, 2008, **169**, 19
- 41 A. Trampuz, K.E. Piper, J.M. Steckelberg, R. Patel, *J. Med. Microbiol.*, 2006, **55**, 1271

Résumé

A l'aube du XXI^{ème} siècle, les nanosciences et nanotechnologies promettent des progrès remarquables dans de nombreux domaines, mais soulèvent aussi de nombreuses inquiétudes en particulier au sujet de leurs effets sur la santé humaine et l'environnement. Cette étude a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à la compréhension de la nature et de l'origine des effets biologiques de nanoparticules manufacturées : les oxydes de titane et les nanotubes de carbone. Pour cela les effets sur la viabilité cellulaire, la localisation cellulaire et la capacité à provoquer un stress oxydant, d'un panel de ces nanoparticules caractérisées de façon poussée ont été regardés *in vitro* sur deux modèles cellulaires : les cellules alvéolaires humaines A549 permettant de se placer dans un contexte d'exposition de l'homme par voie respiratoire et les bactéries *Escherichia coli* MG1655 et *Cupriavidus metallidurans* CH34 permettant de se placer dans un contexte de contamination environnementale. Il apparaît que les nanoparticules étudiées ne sont pas inertes pour ces différents modèles et que la nature et l'intensité des effets observés dépendent non seulement du modèle mais surtout des conditions d'exposition et des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules qui pour certaines ont pu être identifiées comme prépondérantes.

Mots clés : nanoparticule, oxyde métallique, nanotube de carbone, bactéries, cellules A549, caractéristiques physico-chimiques, cytotoxicité, localisation cellulaire, stress oxydant.

Abstract

Development of nanosciences and nanotechnologies may lead to considerable release of nanoparticles in the environment, potentially toxic for ecosystems and human health. Therefore, nanotoxicology attracts attention of public and governments worldwide. In this work comparative *in vitro* toxicological assessment, cellular localization and oxidative stress of titanium oxide nanoparticles and carbon nanotubes was carried out on one eukaryotic model, the human pneumocyte II A549 cell line allowing to simulate contact after inhalation, and on two prokaryotic model, *Escherichia coli* MG1655 and the soil bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 allowing to simulate contamination of the environment. Results show biological responses to nanoparticles which depends on models, on exposure's conditions and on physico-chemical characteristics of nanoparticles.

Key words: nanoparticle, metal oxide, carbon nanotube, bacteria, A549 cell, physico-chemical characteritics, cytotoxicity, cellular localisation, oxidative stress.

