

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**Bioaccumulation et distribution de l'argent
dissous et nanoparticulaire chez le pétoncle
d'Islande (*Chlamys islandica*)**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© Maya AL-SID-CHEIKH

décembre 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

COMPOSITION DU JURY :

**CHRISTIAN GAGNON, EXAMINATEUR EXTERNE, PRÉSIDENT DU JURY,
ENVIRONNEMENT CANADA**

**ÉMILIE PELLETIER, DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITÉ DU
QUÉBEC À RIMOUSKI**

**CLAUDE ROULEAU, CODIRECTEUR DE RECHERCHE, INSTITUT MAURICE-
LAMONTAGNE**

**JONATHAN GAGNON, EXAMINATEUR INTERNE, UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
À RIMOUSKI**

DÉPÔT INITIAL LE 10 AOÛT 2010

DÉPÔT FINAL LE DÉCEMBRE 2010

L'Arbre tient bon ; le Roseau
plie. Le vent redouble ses efforts, et fait
si bien qu'il déracine celui de qui la tête
au Ciel était voisine et dont les pieds
touchaient à l'Empire des Morts.

(La Fontaine)

À ma mère qui a toujours su me
soutenir dans les moments les plus
difficiles.

Remerciements

Je tiens à remercier Émilien Pelletier pour m'avoir donné la chance de me former dans le domaine de la nanotoxicologie appliquée au milieu marin. Ce projet m'a permis de me rendre réellement compte de ce qui me passionnait dans la recherche. Son savoir et son humanisme ont été très réconfortants et véritablement motivants pour passer au travers d'un tel projet.

Je tiens également à remercier de tout mon cœur Claude Rouleau qui a toujours été là pour m'aider avec le radiomarquage. Sa bonne humeur fut un véritable cadeau qui me permit d'apprécier encore plus ce que je faisais.

Il est impossible que j'oublie de remercier Isabelle Desbiens pour son aide et ses conseils en laboratoire. De même pour Sylvie Saint-Pierre qui a su me donner d'excellents conseils.

Je veux également remercier Christian Gagnon que j'ai rencontré en congrès. Nos échanges scientifiques ont été un réel plaisir et m'ont permis de m'orienter dans l'interprétation de mes résultats.

Je tiens à remercier le CRSNG pour l'apport financier de cette recherche qui a été effectuée en lien avec la Chaire de recherche en écotoxicologie moléculaire appliquée aux milieux côtiers froids.

Je veux également remercier tous ceux qui m'ont mis des bâtons dans les roues car ils m'ont rendue plus forte. Ma mère et mon frère Sindbad m'ont été d'un grand soutien dans les moments les plus difficiles, et grâce à eux et leur amour inconditionnel, j'ai su trouver la force de me relever et d'aller plus loin, de dépasser mes limites. Merci, d'être là et d'être qui vous êtes. Je vous dédie mon travail.

RÉSUMÉ

L'utilisation accrue des nanoparticules (Np) dans les produits de consommation augmentera leur rejet dans l'environnement. Les quelques études qui se sont intéressées aux risques environnementaux que représentent les Np ont été effectuées dans l'écosystème d'eau douce. Les masses d'eaux océaniques possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes des eaux continentales, ce qui peut influencer l'agrégation des Np. Cependant, ces processus restent pratiquement inconnus. Il a été mis en évidence que les Np sont plus toxiques pour les organismes filtreurs lorsque la salinité augmente. De plus, les Np d'argent (NpAg) et de cuivre ont présenté une toxicité plus importante que les autres Np métalliques. Ainsi, ce projet a abordé la question des risques des NpAg par la détermination de la cinétique d'accumulation/élimination et la distribution des NpAg dans un bivalve marin d'intérêt commercial, le *Chlamys islandica*. Pour ce faire, il a d'abord décrit une méthode, reproductible et fiable, de synthèse de nanoparticules d'argent (NpAg) à froid (sans radioactivité) pour contrôler la taille des particules utilisant un polymère qui stabilise les Np en solution aqueuse. Cette méthode a ensuite été adaptée à la production de NpAg radioactives avec l'isotope d'argent ^{110m}Ag . Par la suite, des bivalves (*Chlamys islandica*) ont été exposés aux Np ^{110m}Ag de différentes tailles ainsi qu'à l'argent dissous ($^{110m}\text{Ag}_{\text{Dis}}$), afin de comparer les vitesses de bioaccumulation, de dépuration et de distribution tissulaire. Des différences dans les cinétiques ont été observées seulement dans le cas de l'élimination où la constante cinétique d'élimination pour les grosses nanoparticules était 5 fois plus grande que pour les deux autres formes de l'argent. Les constantes de vitesse d'élimination des petites Np et de l'argent dissous ont été similaires. La distribution tissulaire a été différente entre les Np et l'argent dissous. La concentration de l'argent a été observée principalement dans l'hétopancreas. Une agrégation sur le bouclier gastrique pour les Np a été particulièrement remarquable. Ces agrégats ont été plus ou moins gros en fonction de la taille. Le système digestif a semblé réagir à la présence de l'intrus et agir pour l'éliminer par un mécanisme d'endocytose ou de phagocytose. Notre hypothèse est que les lysosomes peuvent hydrolyser le polymère recouvrant les NpAg. Par la suite, les peroxysomes oxydent peut-être la NpAg pour la dissoudre partiellement. En conclusion, les NpAg sont facilement et rapidement bioaccumulés par le bivalve marin *Chlamys islandica* et se distribuent essentiellement dans son système digestif et pratiquement pas dans son muscle adducteur comestible. La taille des nanoparticules joue un rôle majeur dans la cinétique d'élimination et ce facteur devra faire l'objet d'études subséquentes pour en déterminer l'importance environnementale.

Mots clés : nanoparticule d'argent, exposition, accumulation, élimination, cinétique, distribution tissulaire, synthèse, radiomarquage, argent ^{110m}Ag métastable, *Chlamys islandica*.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	vi
RÉSUMÉ.....	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	XV
Chapitre 1 Introduction générale	1
1.1. HISTOIRE ET INDUSTRIE DES NANOMATÉRIAUX.....	1
1.2. TERMINOLOGIE	5
1.3. PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES NP	6
1.4. LES TYPES DE MATÉRIAUX	8
1.4.1. <i>Les nanocarbones</i>	8
1.4.2. <i>Les points quantiques (QD)</i>	8
1.4.3. <i>Les dendrimères</i>	9
1.4.4. <i>Les nanoparticules métalliques</i>	9
1.5. REVUE DES MÉTHODES D'ÉVALUATION POUR L'EXPOSITION DES NANOPARTICULES DANS L'ENVIRONNEMENT.....	10
1.6. FLUX ET COMPORTEMENTS DES NANOPARTICULES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.....	11
1.6.1. <i>Flux et comportements des nanoparticules dans l'environnement aquatique : agrégations des colloïdes organiques et des Np dans l'eau</i>	12
1.6.2. <i>Les nanoparticules comme polluants : Effet sur les organismes</i>	18
1.6.3. <i>Interaction entre les organismes, les Np et les contaminants</i>	20
1.7. LES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX DES NANOPARTICULES.....	23
1.8. LES NANOPARTICULES D'ARGENT	24
1.8.1. <i>Méthodes de préparation des nanoparticules</i>	24
1.8.2. <i>Synthèse de nanoparticules d'argent par réduction des sels d'argent</i>	25
1.9. APPLICATIONS DES NANOPARTICULES D'ARGENT.....	27
1.10. APPROCHE ET OBJECTIFS	28
1.10.1. <i>Approche</i>	28
1.10.2. <i>Objectifs</i>	29
Chapitre 2 Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'argent radioactif ^{110m}Ag à haute activité spécifique pour application en sciences environnementales.....	31

2.1.	RÉSUMÉ	31
2.2.	INTRODUCTION.....	32
2.3.	MATÉRIAUX ET MÉTHODES	34
2.3.1.	<i>Produits chimiques</i>	34
2.3.2.	<i>Préparation des NpAg-PAAm</i>	34
2.4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	38
2.4.1.	<i>Synthèses des NpAg à froid</i>	38
2.4.2.	<i>Radiomarquage des NpAg</i>	46
2.4.3.	<i>Autoradiographie</i>	48
2.5.	CONCLUSION.....	50
Chapitre 3 Étude biocinétique de l'argent dissous et de différentes tailles de nanoparticules d'argent radiomarquées (Np^{110m}Ag) durant l'accumulation et l'élimination du pétoncle d'Islande (<i>Chlamys islandica</i>)		
3.1.	RÉSUMÉ	51
3.2.	INTRODUCTION.....	53
3.3.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	55
3.3.1.	<i>Organisme, radiotraceur et procédure expérimentale</i>	55
3.3.2.	<i>Radioanalyse et traitement des données</i>	57
3.3.3.	<i>Modèles cinétiques d'accumulation et d'élimination</i>	58
3.3.4.	<i>Autoradiographie</i>	59
3.3.5.	<i>Analyses statistiques</i>	62
3.4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	62
3.4.1.	<i>Cinétique d'accumulation et d'élimination de trois formes de l'argent, mesurée par comptage gamma in vivo</i>	62
3.4.2.	<i>Les mécanismes d'action de l'hépatopancréas sur les NpAg</i>	75
3.4.3.	<i>Mécanisme de dissolution des Np et composition de la solution de NpAg</i>	78
3.5.	CONCLUSION	80
Chapitre 4 Conclusion..... 81		
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 85		

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : quelques méthodes de synthèse utilisées pour la fabrication des nanoparticules en solution avec le nitrate d'argent (tirée de Nair et Laurencin, 2007).....	26
Tableau 2 : constante de vitesse d'accumulation et d'élimination, temps de demie-vie et de 95 %, taille des compartiments lors de l'élimination.	64

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Nombre total des produits de consommation contenant des nanomatériaux inventoriés de 2005 à 2009 (www.nanotechproject.org) 2
- Figure 2 : Énumération des éléments les plus utilisés dans les nanomatériaux de 2006 à 2009 (www.nanotechproject.org)..... 3
- Figure 3 : Échelle de taille montrant le nanomètre en contexte. La longueur de l'échelle s'étend de 1 m à 10^{-10} m, la taille de la méduse et de l'oursin permet une comparaison avec le fullerène, molécule composée de 60 carbones (C60). La section de 10^{-7} m (100 nm) à 10^{-9} m (1 nm) est agrandie sous l'échelle de taille. Cette section correspond à la définition des nanomatériaux en nanoscience et en nanotechnologie (figure adaptée de *Royal Society & The Royal Academy of Engineering*, 2004)..... 7
- Figure 4 : Les voies les plus importantes d'exposition des nanoparticules dans l'environnement aquatique (modifiée de Farré *et al.*, 2009)..... 13
- Figure 5 : Np organiques et inorganiques produites naturellement et les différentes tailles des phases solides du compartiment aquatique (tirée Klaine, 2008) 14
- Figure 6 : Modification des Np dans l'environnement (modifiée de Farré *et al.*, 2009). 16
- Figure 7 : Scénario des interactions des Np avec les composés toxiques (Tox A et B), les sels ioniques (SI), et la matière organique (MO) comme les acides humiques produits par les plantes, les bactéries et les algues (tirée de Navarro *et al.*, 2008)19
- Figure 8 : Schéma de l'interaction des polluants, des Np et des micro-organismes. (a) adsorption et accumulation de polluants (b) adsorption et accumulation des Np (c) adsorption (ou absorption) des polluants Np et réduction des polluants accumulés par les organismes et (d) adsorption des Np avec les polluants adsorbés (ou absorbés) et possibilité d'accumulation des Np-polluants 22
- Figure 9 : Synthèse des NpAg par réduction et stabilisation par un polymère (tiré de Sardar *et al.*, 2007)..... 27
- Figure 10 : Spectre d'absorbance lors de la synthèse des NpAg dans les conditions de Sardar *et al.*, 2007..... 39
- Figure 11 : Images en microscopie AFM -a- Image typique 3D d'une préparation de NpAg sur support de mica (700 x 700 nm en mode semi-contact). Environ 5 μ L d'échantillons de NpAg ont été appliqués au support fraîchement clivé, permettant 1 min d'adsorption, et suivi d'un rinçage abondant d'eau déionisée.

b- Analyse de particules pour une image en 2 x 2 μm ; -c- Histogramme des tailles des NpAg; -d- Grossissement haute résolution de l'image-b- (280 x 280 nm).	40
Figure 12 : Image microscopie électronique à transmission pour des NpAg de temps de synthèse de 1h.	41
Figure 13 : -a- Spectres d'absorbance en fonction du temps de synthèse des NpAg, à $t_0+67\text{h}$, $\lambda_{\text{max}}=440\text{nm}$; -b- Image de microscope électronique à balayage (MEB) à $t_0+67\text{h}$, $\varnothing_{\text{NpAg}} = 650 \text{ nm}$	42
Figure 14 : -a- Courbes UV-vis normalisées. Variations des concentrations en PAAm pour faire varier la taille des NpAg; -b- Tailles des NpAg en fonction des maximums d'absorbance. Le tableau correspond aux données expérimentales des grosses NpAg par variation de la concentration de polymère.....	43
Figure 15 : -a- Suivi cinétique de la synthèse de NpAg en fonction de l'ajout de PAAm -b- Granulométrie de l'échantillon à $t_0+ 3\text{h}00$, la taille des NpAg est en moyenne de $68,3 \pm 0,4 \text{ nm}$	45
Figure 16 : Synthèse de radiomarquage des grosses nanoparticules d'argent. Le tableau présente les rendements des synthèses des NpAg radiomarquées.....	46
Figure 17 : Image par microscopie électronique à balayage des Np de grandes tailles pour évaluer l'influence de l'acide nitrique lors de la synthèse de NpAg.	47
Figure 18 :-a- Anatomie générale du pétoncle (modifié de Shumway <i>et al.</i> , 2006) ; -b- À gauche : photo d'une section de pétoncle d'Islande exposé pendant 12h aux $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$; à droite : l'autoradiogramme correspondant.	49
Figure 19 : Calcul de la constante de vitesse lors de l'accumulation par régression linéaire avec C_A en fonction de $\int C_w dt$, où k_{up} est la pente de la droite et x est $\int C_w dt$	59
Figure 20 : -a- Anatomie générale du pétoncle (modifié de Shumway <i>et al.</i> , 2006) ; -b- À gauche : photo d'une section de pétoncle d'Islande exposé pendant 12h aux $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$; à droite : l'autoradiogramme correspondant.	61
Figure 21 : Courbe d'accumulation des trois formes de l'argent.....	63
Figure 22 : Constante de vitesse d'accumulation (K_{up}) des trois formes de l'argent. .	63
Figure 23 : Autoradiogrammes à la fin de l'accumulation. Les images de la colonne gauche sont les photos des sections pour les autoradiogrammes de la colonne de droite. A) exposition au $^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{I})_{\text{Dis}}$; B) exposition aux $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$; C) exposition au $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$	66
Figure 24 : Indice de concentration (I_c) de chaque organe après 12 h d'accumulation.	67
Figure 25 : Courbes d'élimination des trois formes de l'argent.....	68

- Figure 26 : Autoradiogrammes après une semaine d'élimination. Les images de la colonne gauche sont les photos des sections pour les autoradiogrammes de la colonne de droite. A) exposition au $^{110m}\text{Ag}(\text{I})_{\text{Dis}}$; B) exposition aux $\text{PNp}^{110m}\text{Ag}(0)$; C) exposition au $\text{GNp}^{110m}\text{Ag}(0)$ 70**
- Figure 27 : Indice de concentration (I_c) de chaque organe après une semaine d'élimination. 72**
- Figure 28 : Autoradiogrammes à la fin de l'élimination. Les images de la colonne gauche sont les photos des sections pour les autoradiogrammes de la colonne de droite. A) exposition au $^{110m}\text{Ag}(\text{I})_{\text{Dis}}$; B) exposition aux $\text{PNp}^{110m}\text{Ag}(0)$; C) exposition au $\text{GNp}^{110m}\text{Ag}(0)$ 73**
- Figure 29 : Indice de concentration (I_c) de chaque organe à la fin de l'élimination.... 75**

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

$^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$	Argent (I) radioactif dissous
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et excrétion
$\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$	Grosses nanoparticules d'argent radioactif
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
NM	Nanomatériaux
Np	Nanoparticules
NpAg	Nanoparticules d'argent
NpAgs	Nanoparticules d'argent stabilisées (par un polymère)
PAAm	Polyallylamine
$\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$	Petites nanoparticules d'argent radioactif
RDM	Résistance cellulaire multi-drogue

Chapitre 1 Introduction générale

1.1. HISTOIRE ET INDUSTRIE DES NANOMATÉRIAUX

Les nanoparticules (Np) ne sont pas uniquement de source anthropique. Elles existent naturellement depuis le début de l'histoire de la Terre. Des Np de 10 000 ans ont été trouvées dans des carottes de l'âge glaciaire (Murr *et al.*, 2004). On rapporte également la présence de Np naturelles dans les sédiments à la limite du Crétacé-Tertiaire (Verma *et al.*, 2002). Plusieurs mécanismes de formation, géologiques ou biologiques, expliquent la présence de celles-ci. Les mécanismes géologiques sont des processus physico-chimiques d'effritement, d'autogénèse / néoformation (par exemple, dans les sols) et les processus volcaniques. En considérant uniquement les poussières atmosphériques, la production annuelle de Np naturelles est estimée à un million de tonnes (Kellogg et Griffin, 2006), tandis que la production de Np anthropiques par les usines est estimée à quelques milliers de tonnes par an pour chaque grand type de matériau (Borm *et al.*, 2006). Toutefois, la production industrielle est appelée à augmenter très rapidement.

Le marché mondial de la nanotechnologie a augmenté de 11,6 milliards de dollars en 2007 à 12,7 milliards en 2008. Il devrait atteindre 27 milliards en 2013, avec un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 16,3 % (Oliver et Crull, 2009). Les nanomatériaux ont dominé le marché en 2007 et représentent 87 % du marché global des nanotechnologies (Oliver et Crull, 2009). L'électronique, le biomédical et les applications domestiques ont des taux de croissance élevés de l'ordre de 30,3 %, 56,2 % et 45,9 % pour les cinq prochaines années (Oliver et Crull, 2009).

En juin 2007, le *Woodrow Wilson Institut* (WWI) a listé 500 produits contenant des nanomatériaux (Ata, 2007). Entre mars 2006 et juin 2007, les produits de consommation en contenant sont passés de 212 à 580 produits. En août 2009,

l'inventaire des produits de consommation contenant des nanomatériaux était de 1015 produits. Cela correspond à une augmentation de 379 % (212 à 1015 produits) depuis mars 2006 (www.nanotechproject.org) (figure 1).

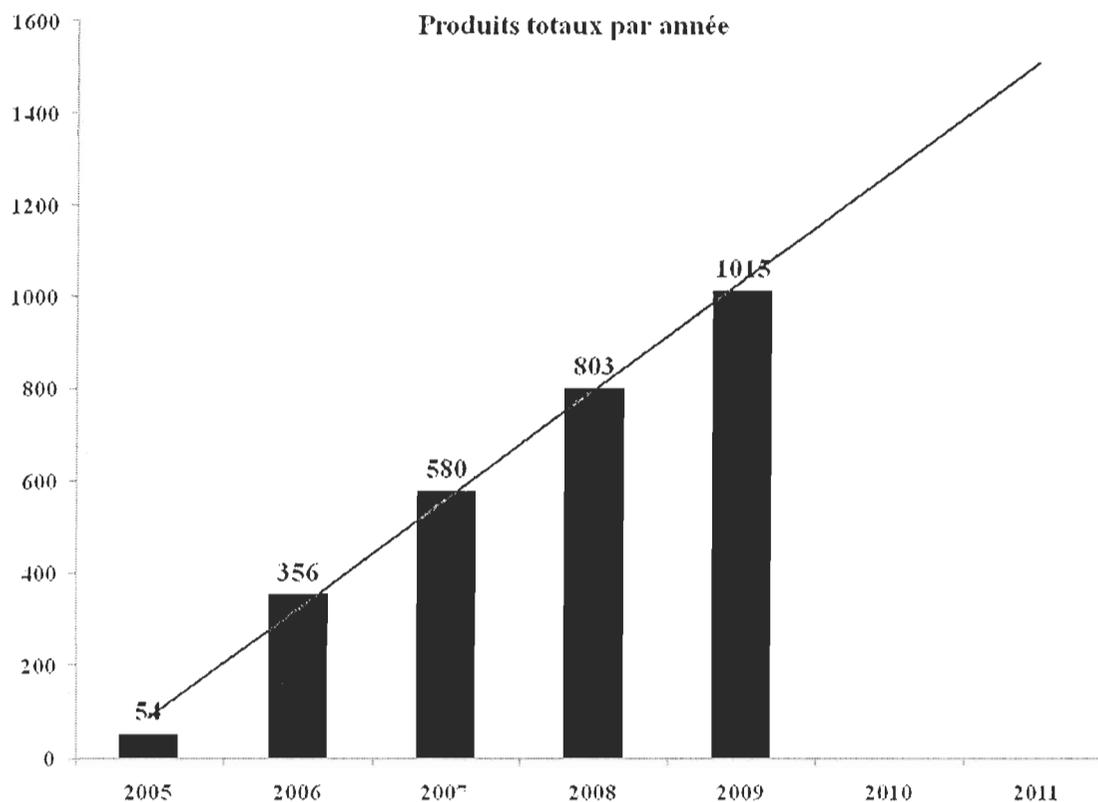


Figure 1 : Nombre total des produits de consommation contenant des nanomatériaux inventoriés de 2005 à 2009 (www.nanotechproject.org)

L'argent a pris une place prépondérante dans la fabrication des nanomatériaux (figure 2).

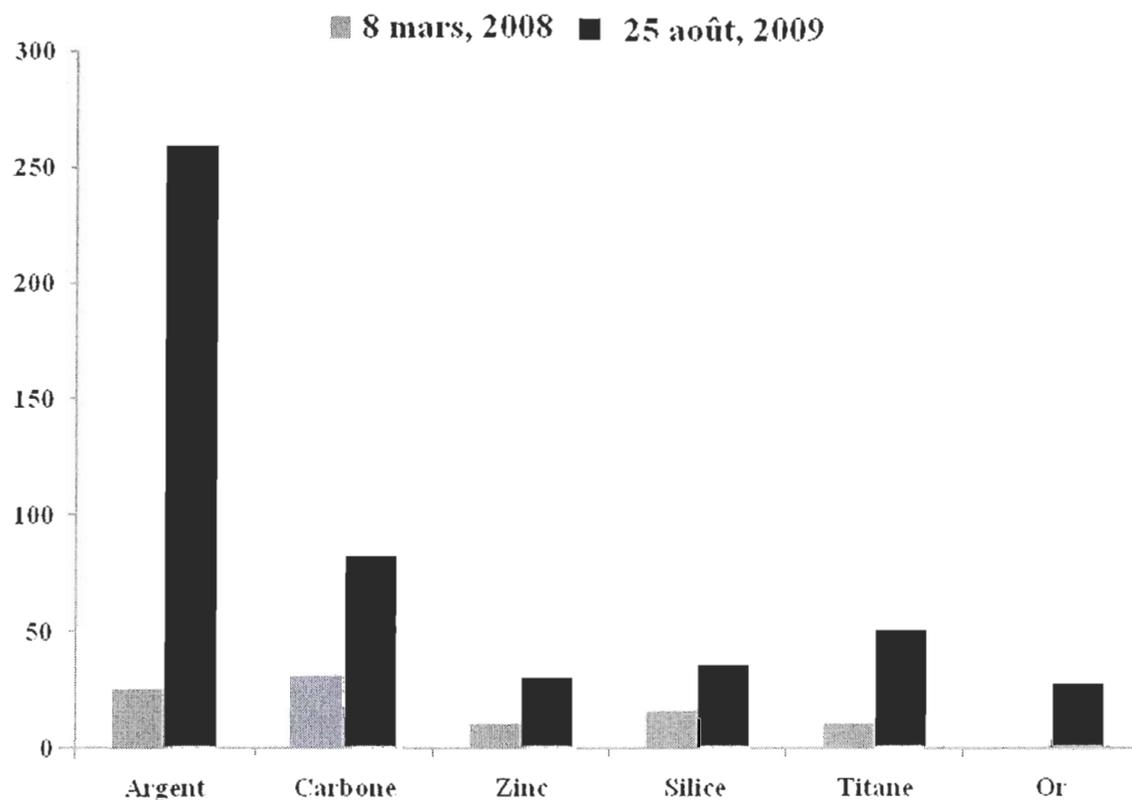


Figure 2 : Énumération des éléments les plus utilisés dans les nanomatériaux de 2006 à 2009 (www.nanotechproject.org).

Pour illustrer cette explosion du marché, le *Nanotechnology Consumer Products Inventory* a répertorié les produits utilisant les nanomatériaux. En voici quelques exemples :

Produits de soins cosmétiques et personnels :

RevitaLift Intense Lift Treatment Mask de L'Oréal utilise des nanoparticules de type capsule pour accroître le transport des ingrédients à travers les couches de la peau et les libérer à l'intérieur des cellules.

Suppléments alimentaires et agents conservateurs :

MesoZinc™ (*Purest Colloids, Inc.*) est un supplément alimentaire contenant 30 mg/kg de nanoparticules de zinc.

FresherLonger™ *Miracle Food Storage* (*Shaper Image*) est un conservateur alimentaire qui contient des nanoparticules d'argent comme agent antibactérien.

Électroménager :

Samsung® *Washing Machine* (*Samsung®*) contient une nanotechnologie qui stérilise les vêtements.

Daewoo® *Vaccum Cleaner* (*Daewoo®*) est un appareil dont le tambour métallique est recouvert d'un manteau de nanoargent comme agent antibactérien.

Samsung® *Air Conditionner* contient des nanoparticules d'argent dans le filtreur d'air.

Les vêtements :

Les chaussettes de sport (*Ag Active*) sont traitées avec les nanoparticules d'argent (typiquement de 25 nm) comme agent antibactérien et fongicide.

Il est difficile de connaître la composition exacte des produits commerciaux. Les usines gardent le secret de leur technologie. Cependant, beaucoup de ces produits contiennent un ou plusieurs nanomatériaux. Ces derniers peuvent être constitués de carbone, de métaux ou oxydes de métaux, ou encore de céramique. Les NpAg sont essentiellement préparées par la réduction contrôlée du sel d'argent en solution, qui est faite en utilisant des agents réducteurs tels que le borohydrure de sodium, le citrate, l'alcool ou encore les polyols (Nair et Laurencin, 2007).

Plusieurs études ont résumé les récents développements dans le domaine de la nanotechnologie. Ceux qui ont retenu le plus d'attention concernent l'implication des Np en toxicologie et en santé humaine (Oberdörster *et al.*, 2005; Helland *et al.*, 2006; Kreyling *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2006; Nel *et al.*, 2006), ainsi que leur comportement

dans l'environnement (Biswas et Wu, 2005; Helland *et al.*, 2006; Wiesner *et al.*, 2006) et en écotoxicologie (Colvin et Sayes, 2004; Moore, 2006; Oberdörster *et al.*, 2006).

1.2. TERMINOLOGIE

Le concept de nanotechnologie a été établi par Richard Feynman en 1959 dans une communication orale intitulée : « There's Plenty of room at the Bottom » (Feynman, 1960). Il a ensuite été repris en 1974 par Taniguchi, chercheur japonais à l'Université de Tokyo, pour désigner la fabrication de matériaux à l'échelle du nanomètre (Taniguchi, 1974). Dans les années 1980, le développement de la microscopie à effet tunnel (STM) a aussi favorisé l'intérêt pour la nanotechnologie (Hunt, 2004).

Plusieurs définitions des nanoparticules ont été proposées. Les termes « particules ultrafines » ou « nanoparticules » sont définis différemment selon leur taille et le domaine d'étude. En toxicologie et en science des matériaux, les nanoparticules (Np) sont définies comme étant des particules de diamètre inférieur à 100 nm (Roco, 2003). Cependant, en écotoxicologie, les nanomatériaux (NM) sont inclus dans la nanoéchelle. La taille des particules de ces NM est supérieure à 100 nm et peut aller jusqu'à quelques centaines de nanomètres (Handy et Shaw, 2007; Handy *et al.*, 2008). À une plus grande échelle, dans les domaines de la combustion et de l'industrie pharmaceutique, les Np sont définies comme étant toutes les particules $\varnothing < 1 \mu\text{m}$ (1000 nm) (Oberdörster, 2007).

Les organismes gouvernementaux *US National Nanotechnology Initiative* (NNI) et *Royal Society and the Royal Academy of Engineering* définissent la nanoscience comme étant l'étude de phénomènes et de la manipulation de matériaux à l'échelle atomique, moléculaire ou macromoléculaire, d'une taille comprise entre 1 et 100 nm, ce qui est la définition la plus répandue. D'autre part, la nanotechnologie est définie comme étant la création et l'utilisation de structures, de matériaux et de systèmes qui ont de nouvelles propriétés et fonctions, différentes de celles à grande échelle. Nous retiendrons dans nos travaux la définition de Np comme étant toute particule dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm.

Dans les eaux naturelles, il existe plusieurs tailles de particules (figure 3). En effet, la fraction dissoute a été communément définie comme étant tout composé passant au travers un filtre ayant un seuil de coupure à $0,45 \mu\text{m}$ (Nowack et Bucheli, 2007), et elle tend à diminuer vers un seuil de $0,22 \mu\text{m}$ (220 nm). La fraction colloïdale a été définie comme étant formée des composés dont la taille est comprise entre 1 mm et 1 nm (Buffle, 2006). De façon classique, la fraction particulaire est constituée de tous les composés ayant une taille supérieure à $0,22 \mu\text{m}$ ($\varnothing > 0,22 \mu\text{m}$). La séparation entre chaque fraction a été définie de façon empirique par les techniques de filtration existantes, ce qui peut introduire des artefacts et des limitations pratiques (Lead et Wilkinson, 2006). La nouvelle classe des nanoparticules se situe à l'interface de la fraction dissoute et de la fraction colloïdale (figure 3). Ainsi, la définition de la fraction colloïdale doit être reconsidérée. En effet, les nouvelles techniques d'analyse permettent de définir la fraction particulaire comme étant formée des particules $\varnothing > 100 \text{ nm}$, suivie par la fraction nanoparticulaire comprise entre 1 et 100 nm . Toutefois, un débat persiste sur la limite supérieure de la fraction nanoparticulaire en fonction des domaines d'étude.

1.3. PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES NP

Les propriétés des Np sont dépendent de leur taille, leur forme et leur surface. En effet, les Np peuvent avoir des formes sphériques, tubulaires ou irrégulières et peuvent exister sous forme d'agrégats (Buzea *et al.*, 2007).

Le comportement des nanoparticules est particulier, car leur dimension leur confère de nouvelles propriétés physico-chimiques. En émettant l'hypothèse qu'une particule ait une forme sphérique d'un rayon de $2,5 \text{ nm}$ et une densité de 5 g.cm^{-3} , la surface des Np serait de $240 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (Borm *et al.*, 2006). Cela signifie que près de 20% des atomes sont à la surface de la particule (Borm *et al.*, 2006). Or, la surface d'une nanoparticule n'est jamais nue, et elle entraîne une forte capacité d'interaction avec les éléments l'entourant. La variation de leur composition, c'est-à-dire leur taille ou leur composition de surface, peut modifier les propriétés physiques et chimiques des nanoparticules (Borm *et al.*, 2006).

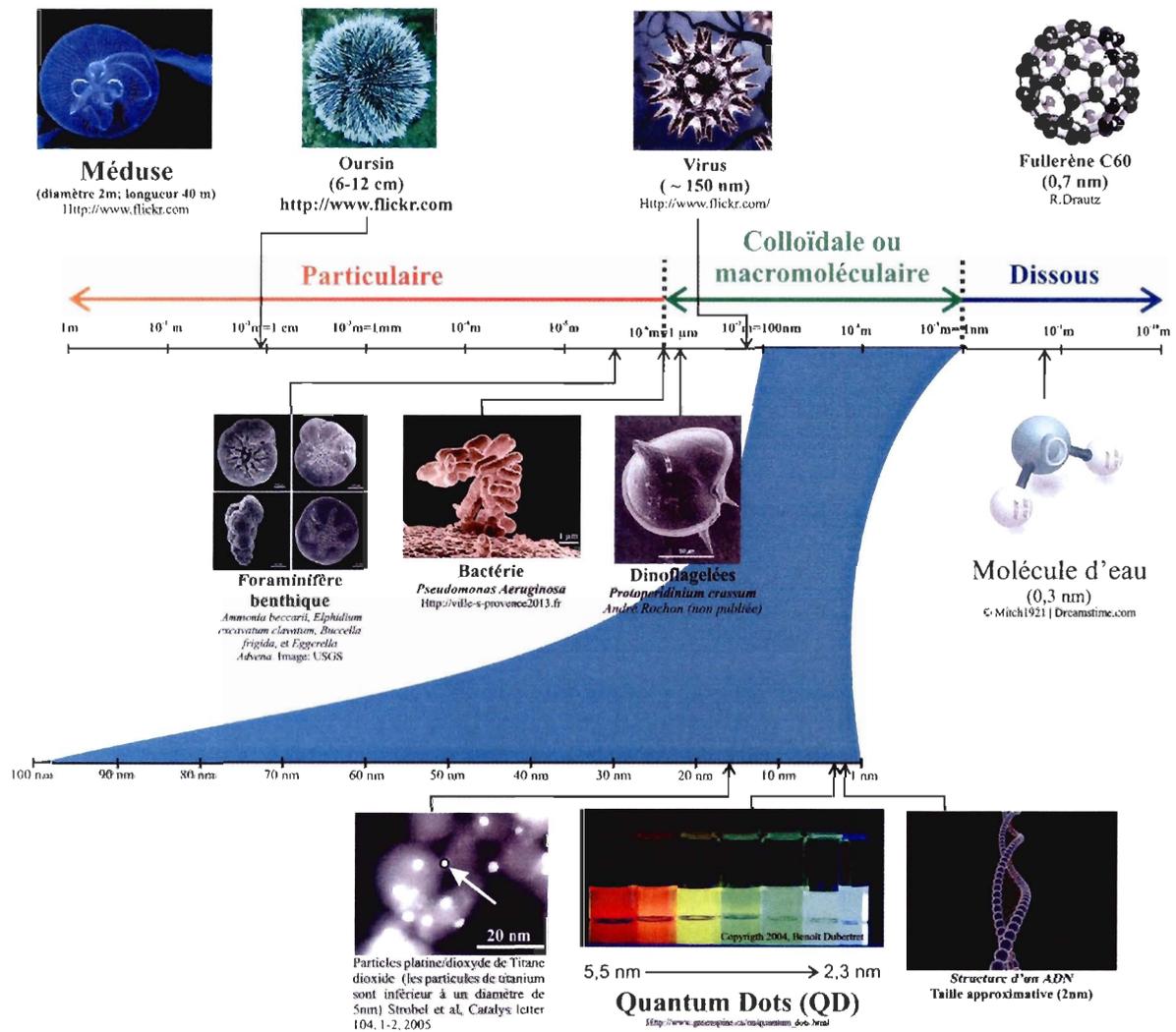


Figure 3 : Échelle de taille montrant le nanomètre en contexte. La longueur de l'échelle est de 1 m à 10-10m, la taille de la méduse et de l'oursin permettent une comparaison avec le fullerène, molécule composée de 60 carbones (C60), connus sous le nom de « Buckyball ». La section de 10-7m (100nm) à 10-9m (1nm) est grossie sous l'échelle de taille. Cette longueur d'échelle correspond à la définition des nanomatériaux en nanoscience et la nanotechnologie (adapté de The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004).

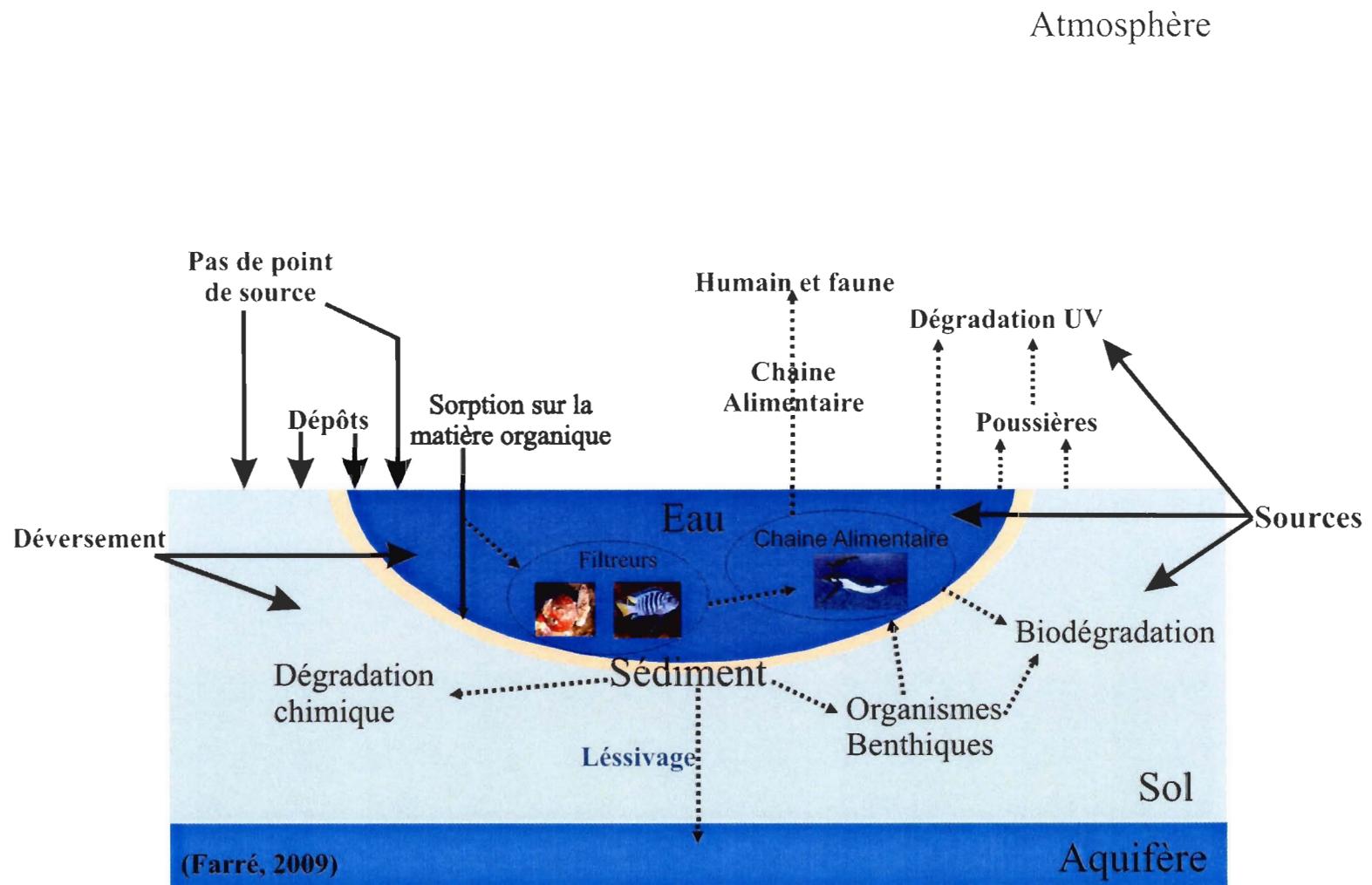


Figure 4 Les voies les plus importantes d'exposition des nanoparticules dans l'environnement aquatique (modifié de Farré, 2009)

Lors de la synthèse de nanoparticules, la plupart de ces paramètres peuvent être contrôlés. Toutefois, si les propriétés de surface ne peuvent l'être, les nanoparticules se transforment rapidement en agglomérat (Borm *et al.*, 2006). Il est important de comprendre ce comportement des Np, car il permet de prédire leur devenir dans l'environnement et ainsi d'évaluer le risque qu'elles représentent pour la santé humaine et la qualité de l'environnement.

1.4. LES TYPES DE MATÉRIAUX

1.4.1. LES NANOCARBONES

Les nanotubes de carbone (CNTs) sont des cylindres de carbone qui possèdent une résistance exceptionnelle et des propriétés électriques inhabituelles. Leurs caractéristiques dépendent de leur composition, de leur taille et de leur orientation. Les CNTs sont constitués d'une ou plusieurs couches d'atomes de graphite. Ceux en simple couche sont appelés *single-walled carbon nanotube* (SWNT) alors que ceux en multicouche sont appelés *multi-walled carbon nanotube* (MWCNT). Le diamètre des SWNT est généralement compris entre 0,4 et 2,5 nm et il peut atteindre plusieurs centaines de nanomètres pour les MWCNT (Sellers, 2009).

Le fullerène est une particule sphérique contenant, pour sa forme la plus commune, 60 atomes de carbone (C₆₀) arrangés en 20 hexagones. Le diamètre du fullerène C₆₀ est d'environ 1 nm (Sellers, 2009). Les propriétés du fullerène dépendent de sa structure, de sa dérivatisation et de son degré d'agglomération. Le fullerène pur a une faible solubilité dans l'eau. Les nanocomposites contenant du fullerène sont utilisés dans des applications optiques et photochimiques, ou encore comme agents thérapeutiques dans le domaine médical (Lyon *et al.*, 2006).

1.4.2. LES POINTS QUANTIQUES (QD)

Un point quantique est un semi-conducteur nanocristallin d'une taille comprise entre 1 et 10 nm. Les différentes tailles des QD influencent la couleur que ces particules réfléchissent. Ainsi, plus les QD sont gros, plus la couleur réfléchie se décale vers le rouge, alors qu'une petite particule d'une longueur d'onde plus courte se réfléchit plutôt dans le bleu (Park, 2007). Les QD peuvent être couplés les uns aux autres ou à

différentes entités organiques ou inorganiques et ils peuvent ainsi servir de marqueurs optiques. Ces caractéristiques leur permettent d'être très utilisés dans les études de biologie et de médecine (Alivisatos *et al.*, 2005).

1.4.3. LES DENDRIMÈRES

Les dendrimères sont des macromolécules constituées de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. Ils peuvent être considérés de dimension nanométrique (~ 15 nm) (Park, 2007). Leur structure, leur flexibilité, leur porosité, et leur morphologie peuvent être adaptées à loisir pour l'obtention d'une propriété désirée (Flomenbom *et al.*, 2005). Les dendrimères constituent de véritables pièges à métaux et jouent un rôle déterminant dans les processus classiques de catalyse (récupération et recyclage du catalyseur à base de dendrimères, par ultrafiltration), ainsi que dans le processus de traitement des effluents (membranes à base de dendrimères).

1.4.4. LES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES

Les nanomatériaux métalliques couvrent une large gamme de métaux tels que l'aluminium, le cuivre, le fer, le cobalt, l'or et l'argent. Ces nanométaux ont un large éventail d'applications incluant la remédiation, les batteries et les explosifs. Par exemple, les Np d'aluminium (NpAl) ont été utilisées pour leur propriété pyrotechnique (<http://www.nanoscale.com/markets.asp>, 2006). Les Np de fer (NpFe), appelées les *Zero Valent Iron* (ZVI), ont quant à elles une grande surface réactive, ce qui leur procure une capacité de transformation et de détoxification importante pour une grande quantité de contaminants, tels que les solvants chlorés, les pesticides organochlorés et les biphényles polychlorés (Zhang *et al.*, 2003). Le cas des Np d'argent est développé dans la section 1.8 ci-après.

Le groupe des oxydes métalliques est le plus grand groupe des nanoparticules métalliques. Les nano-oxydes les plus répandus sont l'oxyde de titane, l'oxyde de zinc et l'oxyde de silice. Les oxydes de zinc se retrouvent régulièrement dans les cosmétiques. Les formes nanométriques des oxydes de fer ont trouvé leur application dans les cosmétiques et la catalyse, par exemple dans la catalyse d'oxydation du diesel où les Np

d'oxyde de fer peuvent être employées seules ou avec des Np d'oxyde de cérium (Park, 2007).

Il existe un marché important où les Np d'oxyde de titane (TiO_2) sont utilisées comme pigments dans plusieurs applications telles que les peintures, le papier (Park, 2007) et la protection solaire (Wakefield *et al.*, 2004). L'oxyde de titane peut également décomposer les composés organiques en absorbant la lumière (Park, 2007) et éliminer les contaminants dans l'eau (Matthews, 1992).

Les Np de chalcogènes sont des Np d'un métal lié au soufre, au sélénium ou encore au tellure. Elles ont des applications prometteuses dans le marquage fluorescent en biologie et en médecine (Parak *et al.*, 2003) ainsi qu'en photo-catalyse (Zhang *et al.*, 2007). Ces Np sont capables de pénétrer dans les cellules, de passer à travers différents organes, d'y persister pendant de longues périodes (Ballou *et al.*, 2004), et d'avoir des effets toxiques encore mal compris (Derfus *et al.*, 2004; Lovrić *et al.*, 2005; Hardman, 2006; Cho *et al.*, 2007). Étant donné que les Np chalcogènes sont largement commercialisées, ces résultats ont soulevé des questions sur le danger qu'elles représentent pour l'environnement (Oberdorster *et al.*, 2005; Robichaud *et al.*, 2005; Hardman, 2006).

1.5. REVUE DES MÉTHODES D'ÉVALUATION POUR L'EXPOSITION DES NANOPARTICULES DANS L'ENVIRONNEMENT

Le développement des méthodes analytiques pour les Np en est à ses débuts. Le domaine des colloïdes aquatiques étant un domaine d'étude important, il existe plusieurs méthodes d'analyse qui peuvent être utiles pour l'étude des Np (Lead et Wilkinson, 2006), comme les méthodes microscopiques (par exemple la microscopie électronique et la microscopie à force atomique), le fractionnement par taille (par exemple, l'ultrafiltration, la *Field-flow fractionation* (FFF) ou la centrifugation) et la chromatographie (par exemple, la chromatographie par exclusion de taille ou de perméation sur gel (CET et CPG)).

La méthode de référence pour la séparation des colloïdes et des particules est actuellement la filtration à flux tangentiel par rapport à l'osmose inverse ou la

nanofiltration. Cependant, l'importance de la FFF pour la séparation et la caractérisation des colloïdes aquatiques est en pleine croissance en raison de sa facilité de couplage aux techniques de détection sensible. Par exemple, un couplage de plus en plus répandu est celui du FFF avec la torche à plasma et la spectrométrie de masse (ICP-MS) (Lyvén *et al.*, 2003; Stolpe *et al.*, 2005).

De nombreuses techniques ont été utilisées pour identifier et caractériser les Np inorganiques naturelles (Burlison *et al.*, 2004). Les plus souvent utilisées sont la microscopie électronique à transmission (MET) ou à balayage (MEB) et la microscopie par sonde (par exemple : la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie à effet tunnel). Ces techniques permettent d'obtenir des images des Np. Cependant, elles connaissent leurs limites, car seule une infime fraction de matière est caractérisée par elles, ce qui signifie qu'il peut être extrêmement difficile d'assurer une caractérisation représentative de l'échantillon. De plus, la préparation des échantillons et les conditions de mesure peuvent souvent modifier la structure des Np (Burlison *et al.*, 2004). L'application des techniques connues pour les colloïdes montre quant à elle certaines difficultés et même des résultats divergeant entre les méthodes disponibles (Domingos *et al.*, 2009). L'étude du devenir environnemental des nanoparticules et de leur toxicité potentielle nécessite le développement de nouvelles méthodes d'analyse, car la faible taille de ces particules est un handicap majeur pour leur détection.

1.6. FLUX ET COMPORTEMENTS DES NANOPARTICULES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE

Plusieurs études ont mis en évidence les récents développements dans le domaine de la nanotoxicologie. L'implication des Np en toxicologie et en santé humaine (Oberdorster *et al.*, 2005; Helland *et al.*, 2006; Kashiwada, 2006; Kreyling *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2006; Nel *et al.*, 2006), le comportement des Np dans l'environnement (Biswas et Wu, 2005; Helland *et al.*, 2006; Wiesner *et al.*, 2006) et l'écotoxicologie des Np (Colvin, 2003; Moore, 2006; Oberdorster *et al.*, 2006) retiennent l'attention de la communauté scientifique. En effet, pour évaluer les risques des Np dans l'environnement, il est important de comprendre leur mobilité, leur biodisponibilité et leur toxicité. Il est donc important de dépister les voies de transfert des Np dans

l'environnement (figure 4). Étant donné que les connaissances sur l'interaction des nanostructures avec les écosystèmes aquatiques et terrestres sont fragmentaires et que les domaines à étudier sont vastes, la suite de cette introduction s'intéresse plus particulièrement aux connaissances actuelles sur l'impact des Np dans l'environnement aquatique.

1.6.1. FLUX ET COMPORTEMENTS DES NANOPARTICULES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE : AGRÉGATIONS DES COLLOÏDES ORGANIQUES ET DES NP DANS L'EAU

À l'heure actuelle, aucune donnée n'existe sur les quantités de Np anthropiques présentes dans l'environnement. Cela est dû aux comportements complexes qu'elles y ont et aux limitations analytiques. Ainsi, les connaissances sur le flux, le comportement et l'écotoxicologie des Np dans l'environnement aquatique sont très limitées, car la nature du système aquatique est complexe par sa chimie, son hydrologie et son écologie.

Il existe différentes fractions de particules dans le système aquatique. La phase solide en suspension dans les eaux naturelles est un mélange complexe de matériaux de compositions chimiques et de tailles différentes. La figure 5 montre les différents types et phases de matériaux rencontrés dans le milieu aquatique (Klaine *et al.*, 2008).

Les propriétés de surface sont les facteurs prépondérants qui régissent la stabilité et la mobilité des Np. Par exemple, des Np stables en suspension sont un préalable pour une interaction efficace avec les microalgues, car elles peuvent conduire à une accumulation ou à des effets toxiques (Navarro *et al.*, 2008a).

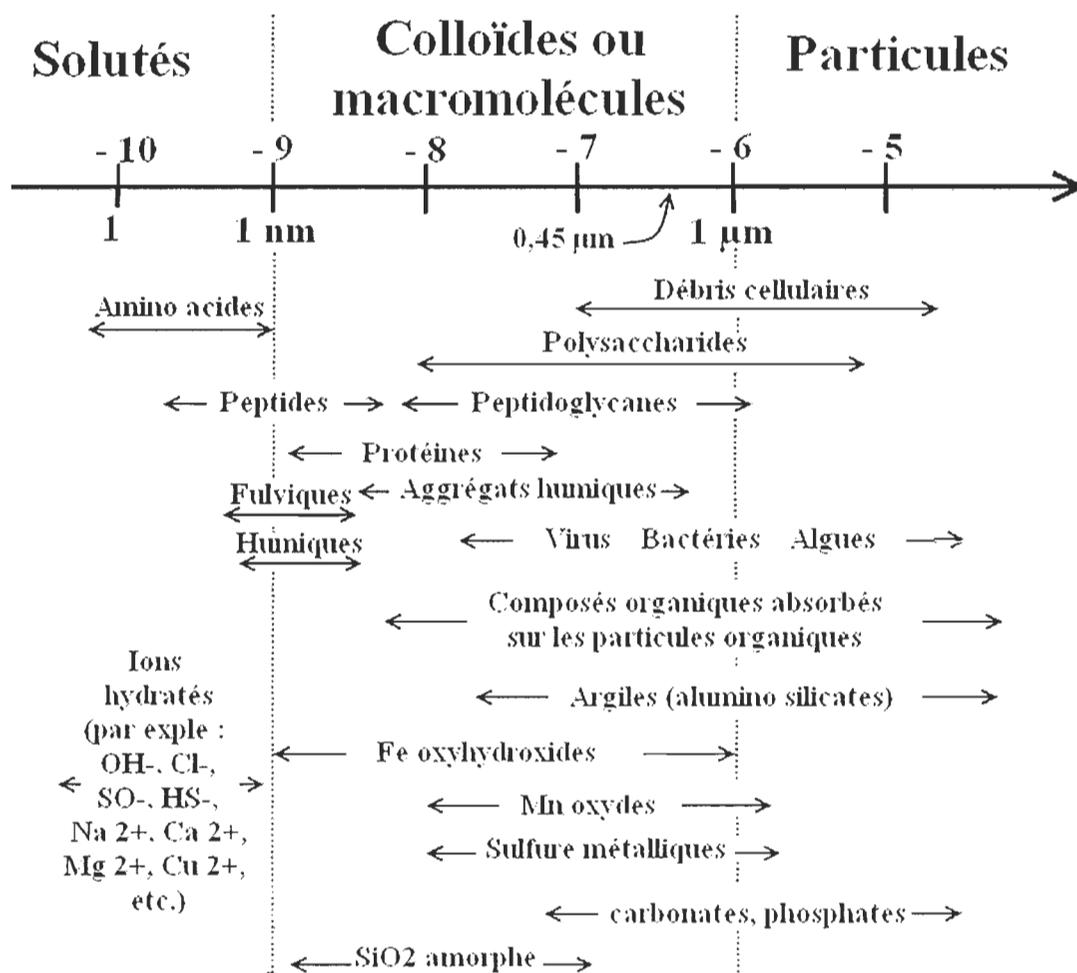


Figure 5 : Np organiques et inorganiques produites naturellement et les différentes tailles des phases solides du compartiment aquatique (tirée de Klaine, 2008)

Les Np métalliques sont généralement enrobées par des composés inorganiques ou organiques tels que le citrate, la cystéine et les carbonates, par des tensioactifs comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) (Mafune *et al.*, 2000), ou encore par des polymères tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP) et le polyéthylène glycol (PEG), ce qui maintient leur stabilité en suspension. Par conséquent, dans le milieu aquatique, les Np métalliques sont fortement dépendantes de la composition de leur manteau stabilisateur (Mafune *et al.*, 2000).

Dans l'environnement aquatique naturel, les Np peuvent interagir avec les colloïdes organiques ou les Np naturelles pour former des agrégats (figure 6). Afin de quantifier leur compartiment dans l'environnement, il faut tenter de prévoir leur stabilité en suspension et leur tendance à s'agréger ou à interagir avec d'autres particules (Mackay *et al.*, 2006). L'agrégation et la sédimentation des particules sont des phénomènes étroitement liés (Wiesner *et al.* 2006). L'agrégation décrit l'interaction entre deux objets mobiles, alors que la sédimentation renvoie à une liaison avec une particule de phase immobile. En ce sens, la cinétique de sédimentation/agrégation peut être définie par un processus à deux étapes d'un transport de particules suivi d'une liaison (Elimelech et O'melia, 1990). Le transport colloïdal des particules (1 nm à 1 µm) est déterminé par convection et diffusion (mouvement Brownien), alors que la liaison avec d'autres particules/surface est contrôlée par les forces d'interaction colloïdales (Navarro *et al.*, 2008a). Ce processus de sédimentation/agrégation est déterminé par les propriétés de surface des Np, qui sont essentiellement dépendantes de paramètres tels que la température, la force ionique du milieu, le pH, la concentration en particules et la taille (Dunphy Guzman *et al.*, 2006).

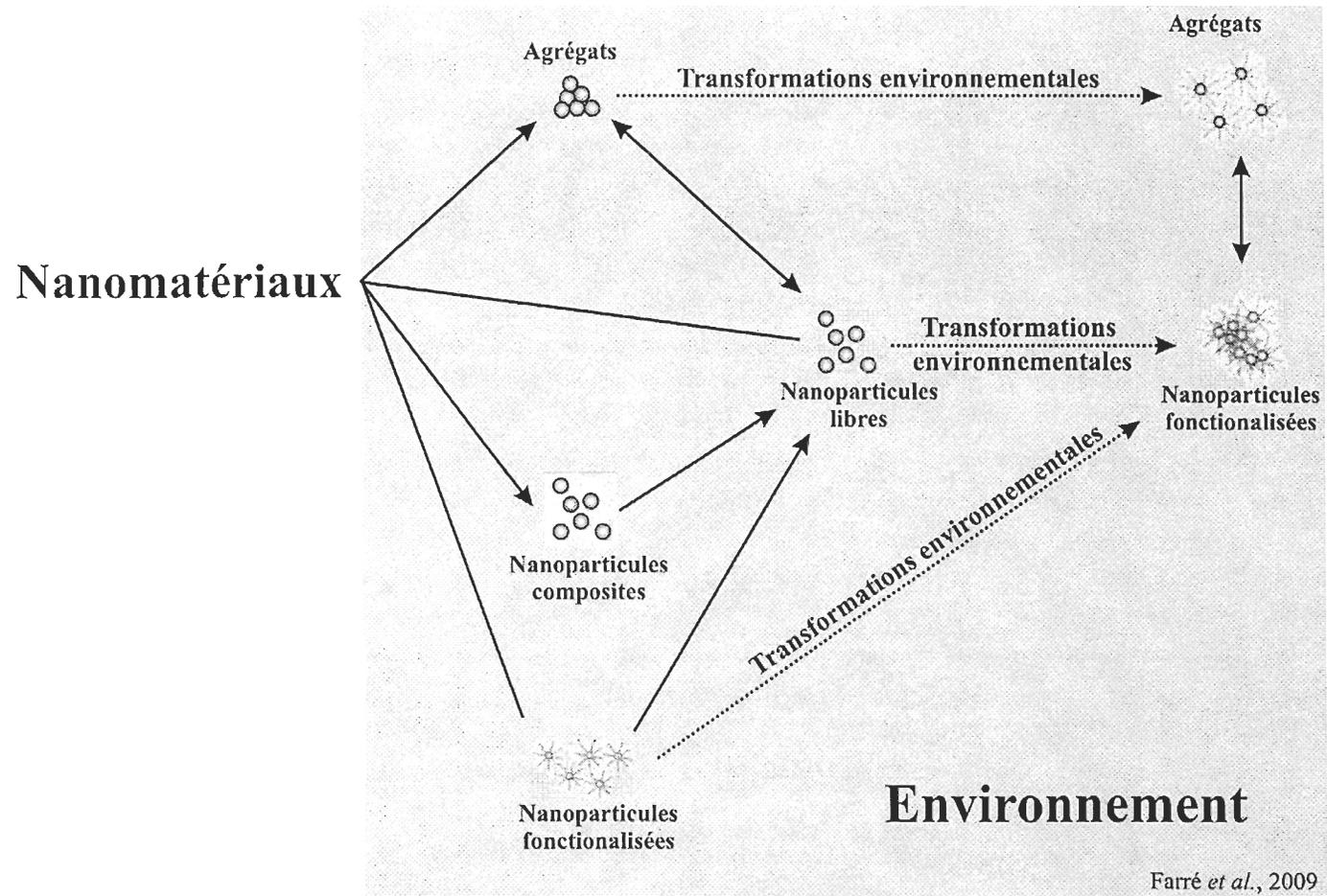


Figure 6 : Modification des Np dans l'environnement (modifiée de Farré *et al.*, 2009).

Le comportement des Np dans l'environnement est également gouverné par la modification de leur nature même lors du processus d'adsorption (Fukushi et Sato, 2005) et plus spécifiquement par la charge de leur surface, qui joue un rôle dominant (Kallay et Zalac, 2001; Kallay et Zalac, 2002). Les facteurs environnementaux tels que la lumière, les oxydants ou les microorganismes affectent eux aussi le comportement des Np dans les eaux naturelles (Nowack et Bucheli, 2007). Cela se traduit par des modifications chimiques ou biologiques ou encore par une dégradation de l'enrobage de la Np. Ainsi, une surface peut être fonctionnalisée ou dégradée et peut libérer des Np dans l'environnement (Nowack et Bucheli, 2007).

La matière organique naturelle (MON), toujours présente en milieu naturel, peut influencer la spéciation et la charge des Np, et ainsi affecter leurs propriétés d'agrégation/sédimentation (Navarro *et al.*, 2008a). Les composés organiques peuvent être sorbés à la surface des Np par des interactions électrostatiques, des liaisons d'hydrogène et des interactions hydrophobiques (Ojamae *et al.*, 2006). Selon Buffle *et al.* (1998) trois groupes de composés ayant des propriétés biophysiques différentes peuvent être distingués dans la MON :

- Les biopolymères rigides, incluant les polysaccharides et les peptidoglycanes produits par le phytoplancton ou les bactéries (Myklestad, 1995),
- Les composés fulviques, principalement de source terrestre, provenant de la dégradation des débris de plantes,
- Les biopolymères flexibles composés de matière organique réfractaire aquatique issue de la recombinaison des produits de la dégradation microbienne.

Par conséquent, les interactions entre les Np et la MON pourront finalement déterminer le flux des Np dans le milieu aquatique. La formation de plus gros agrégats par des composés de la MON de haut poids moléculaire favorisera une sédimentation des Np et diminuera leur biodisponibilité (Navarro *et al.*, 2008a). Par opposition, la solubilisation par les tensioactifs naturels, comme les composés de faible poids

moléculaire de la MON, augmenteront leur mobilité et la biodisponibilité des Np (Navarro *et al.*, 2008a) (figure 7).

1.6.2. LES NANOPARTICULES COMME POLLUANTS : EFFET SUR LES ORGANISMES

Beaucoup de Np comme les fullerènes, les nanotubes et l'argent sont considérées toxiques ou potentiellement toxiques.

✓ **Accumulation et toxicité**

Les Np sont accumulées par une large gamme de cellules et peuvent traverser la membrane cellulaire (Lynch *et al.*, 2006; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2006; Smart *et al.*, 2006). L'accumulation des Np dépend en particulier de leur taille (Limbach *et al.*, 2005; Chithrani *et al.*, 2006). L'agrégation et la taille des Np ou leur diffusion à travers la cellule sont des paramètres déterminants dans l'accumulation (Limbach *et al.*, 2005). Cette dernière se produit par endocytose ou phagocytose dans les cellules spécialisées. Une hypothèse proposée est que par le changement de conformation des protéines, un revêtement protéinique se forme autour de la Np. Cela occasionne une accumulation des Np par endocytose ou phagocytose dans les cellules grâce à des structures spécialisées. Cela limite l'accumulation à des Np d'une taille inférieure à 120 nm (Lynch *et al.*, 2006). En effet, la structure moléculaire de la clathrine est telle qu'il existe une limite naturelle de taille (~120nm), et les particules supérieures à ce seuil de coupure ne peuvent pas utiliser la route endocytotique.

À l'intérieur des cellules, le stockage des Np est très localisé (par exemple : dans les vésicules et les mitochondries) et peut provoquer une réponse toxique. L'importante aire de surface et l'habileté à générer des espèces réactives oxygénées jouent un rôle majeur dans cette toxicité (Nel *et al.*, 2006). Les Np peuvent provoquer des inflammations et des fibroses dans l'organisme entier, tandis qu'au niveau cellulaire, on observe un stress oxydatif, une activité antioxydante et une cytotoxicité (Oberdorster *et al.*, 2005).

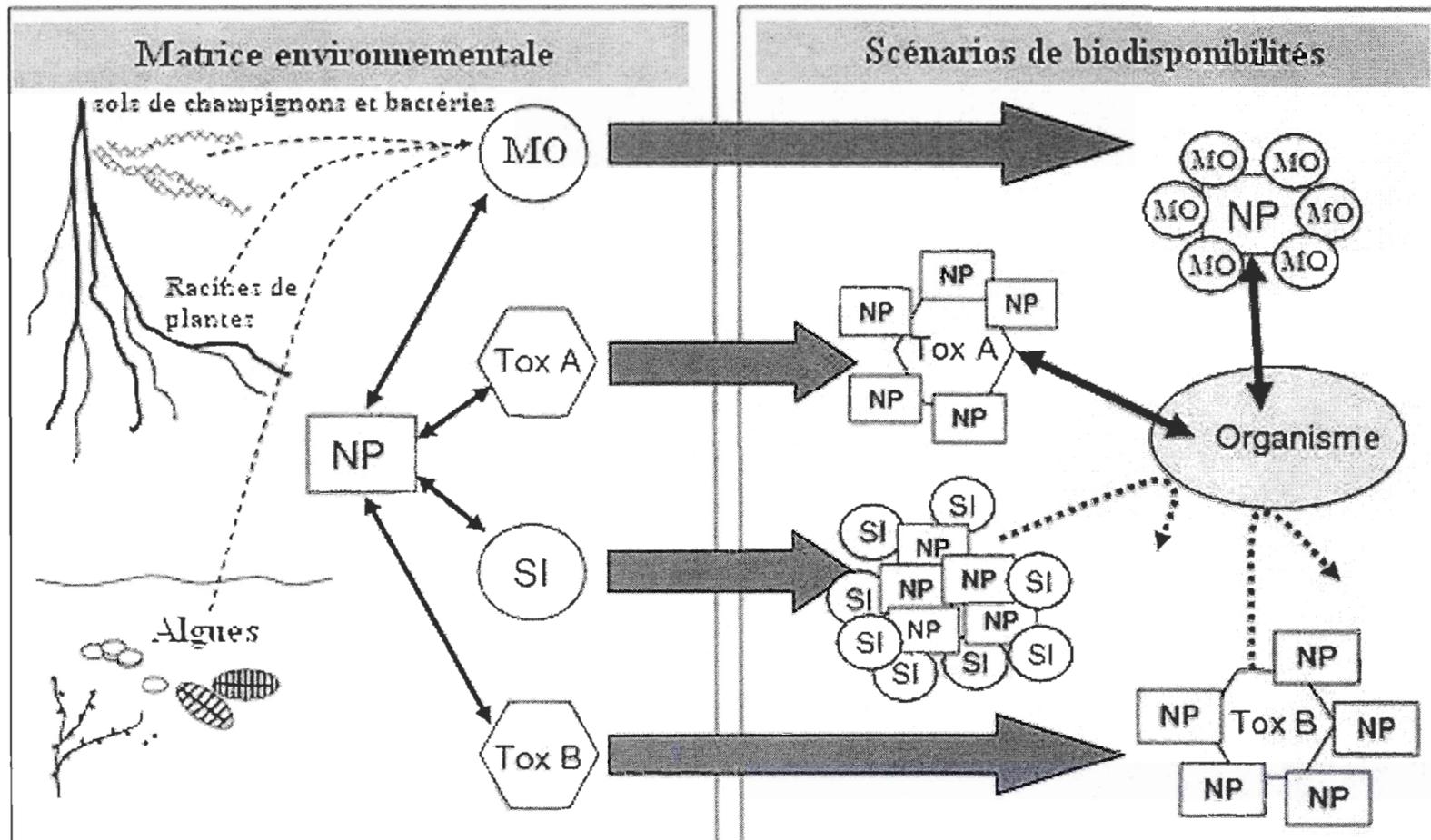


Figure 7 : Scénario des interactions des Np avec les composés toxiques (Tox A et B), les sels ioniques (SI), et la matière organique (MO) comme les acides humiques produits par les plantes, les bactéries et les algues (tirée de Navarro et al., 2008)

Les études toxicologiques ont principalement porté sur les cellules de mammifères et les Np exposées sur des cultures contenant un mélange de protéines et d'autres composés biologiques. Les résultats de ces quelques études *in vitro* ne sont pas comparables à celles menées dans les conditions environnementales où les voies d'accumulation peuvent être soit une ingestion directe, soit une entrée par les interfaces épithéliales telles que les branchies ou les parois corporelles. Au niveau cellulaire, les procaryotes, comme les bactéries, peuvent être largement protégés contre l'accumulation de nombreux types de Np, car ils ne suivent pas le mécanisme de transport des particules colloïdales à travers les parois cellulaires (Moore, 2006).

La bioaccumulation de certaines Np a aussi été étudiée. Par exemple, des œufs du poisson *Oryzia latipes* ont été exposés à des Np de latex. Le poisson adulte a accumulé des Np, principalement dans les branchies et l'intestin. On a aussi détecté des particules dans le cerveau, le foie et le sang (Kashiwada, 2006).

Des études écotoxicologiques montrent que les Np d'argent (NpAg) sont aussi toxiques pour les organismes aquatiques que pour les organismes unicellulaires (bactéries) et les cellules animales (invertébrés ou poissons). En présence de NpAg, les cellules bactériennes sont endommagées et montrent la formation de cavités dans la paroi cellulaire. Des Np d'argent ont aussi été trouvées accumulées dans la membrane bactérienne. Cela augmente la perméabilité de la cellule et entraîne la mort de l'organisme (Sondi et Salopek-Sondi, 2004). L'interaction avec les cellules dépend de la taille des Np (Morones *et al.*, 2005), ce qui montre également que l'interaction dépend de la forme de la particule (Pal *et al.*, 2007). Les NpAg apparaissent aussi plus toxiques que les ions Ag^+ pour *E. Coli* (Lok *et al.*, 2006).

1.6.3. INTERACTION ENTRE LES ORGANISMES, LES NP ET LES CONTAMINANTS

Les Np peuvent être la clé des espèces chimiques interagissant avec les polluants et les pathogènes dans l'eau naturelle. La petite taille et la morphologie des Np augmentent la surface spécifique ce qui explique principalement ce phénomène (Doucet *et al.*, 2004). En effet, cela implique que les Np anthropiques vont avoir la capacité de se lier à une large quantité de polluants et d'interagir fortement avec les virus pathogènes et les bactéries.

L'association entre les Np et les polluants risque de modifier leur transport et leurs effets toxiques. Les polluants ou pathogènes peuvent former des complexes avec les Np. Ce point a été discuté en termes d'agrégation et de sédimentation dans les eaux douces, qui affectent le transport et la percolation dans les sols et les eaux souterraines. Les Np manufacturées facilitent le transport des polluants à condition qu'ils disposent d'une phase liante, de manière à ce que le complexe Np-polluants soit suffisamment petit pour être transporté à travers les pores de la matrice avec un minimum de rétention (Lead, 2006). Les Np naturelles sont susceptibles d'interagir avec les Np manufacturées, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'augmenter à la fois la vitesse de transport et la distance parcourue.

L'interaction des Np avec les composés toxiques et organiques peut amplifier ou réduire la toxicité de ceux-ci (Nowack et Bucheli, 2007). En opposition aux effets nocifs mentionnés précédemment, les Np peuvent parfois avoir un rôle avantageux dans l'environnement. Les interactions possibles entre les organismes, les Np et les polluants sont illustrées à la figure 8. L'influence des polluants sur les organismes est montrée par la figure 8a tandis que l'interaction des organismes avec les Np est présentée dans la figure 8b. La troisième partie de la figure 8 montre un organisme en interaction avec des polluants et des Np. Dans ce cas-là, deux chemins d'interaction sont possibles. Dans la figure 8c, les Np peuvent être adsorbées ou absorber le polluant; par conséquent, la concentration des polluants libres est réduite, ce qui entraîne une réduction de leur toxicité (Nowack et Bucheli, 2007). Si la cellule accumule les Np et les polluants (figure 8d), la toxicité qui en résultera dépendra de la combinaison des deux, qui sera soit l'addition, soit la synergie de leurs effets toxiques intrinsèques. Cependant, il est possible qu'il n'y ait aucun effet, par exemple si le polluant lié n'est plus biodisponible et si les Np ne montrent aucune toxicité.

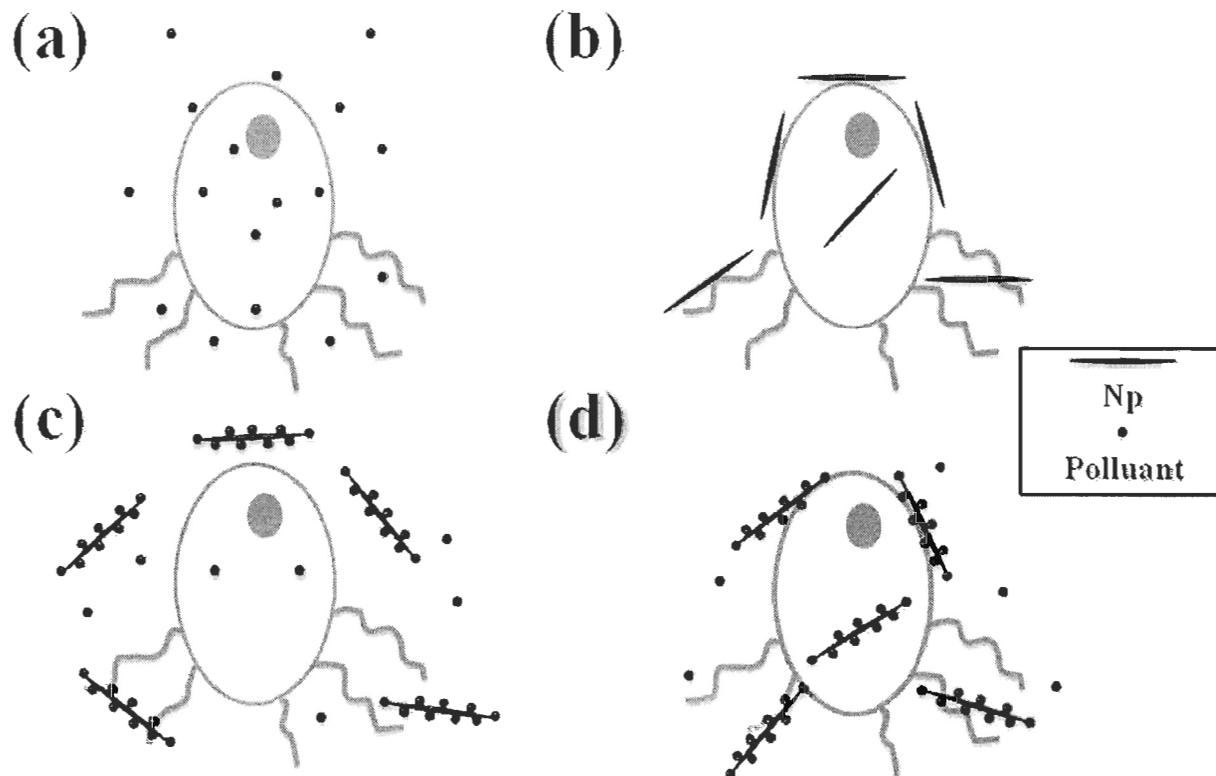


Figure 8 : Schéma de l'interaction des polluants, des Np et des micro-organismes. (a) adsorption et accumulation de polluants (b) adsorption et accumulation des Np (c) adsorption (ou absorption) des polluants Np et réduction des polluants accumulés par les organismes et (d) adsorption des Np avec les polluants adsorbés (ou absorbés) et possibilité d'accumulation des Np-polluants

1.7. LES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX DES NANOPARTICULES

L'exposition environnementale aux Np varie en fonction de certaines conditions comme l'usure des matériaux, le déversement et la répartition des nanomatériaux dans les différents compartiments environnementaux, ainsi qu'en fonction de la mobilité et de la persistance de ces nanomatériaux dans les divers compartiments. Plusieurs recherches sont actuellement consacrées à ces sujets. Les connaissances sur le comportement et la toxicité des nanomatériaux sont nécessaires pour permettre une évaluation réaliste des risques représentés par la présence des Np dans l'environnement. Toutefois, les données actuelles sont insuffisantes, et aucune évaluation des quantités déversées dans l'environnement n'est disponible. Pourtant, cette information est cruciale pour l'évaluation des risques environnementaux que constituent ces contaminants émergents. À ce jour, on ne sait rien sur cette question, que ce soit d'un point de vue analytique (par exemple, les mesures réelles de Np dans l'environnement), ou d'un point de vue théorique (les études de modélisation, par exemple). Il est donc important d'avoir une vue d'ensemble sur les risques présents et futurs que représente l'exposition aux Np dans l'environnement. Les données écotoxicologiques actuelles portent principalement sur les espèces classiquement utilisées dans les tests et les organismes d'eau douce (Handy *et al.*, 2008). Les données sur les espèces terrestres, les espèces marines et les plantes manquent particulièrement. L'étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) reste à effectuer sur des espèces de phyla majeures, bien qu'il existe quelques données sur les poissons (Handy *et al.*, 2008).

Il existe différentes formes, tailles et compositions de Np d'argent. Chaque méthode de préparation entraîne une Np particulière. Les principales préparations des Np sont présentées à la section suivante.

1.8. LES NANOPARTICULES D'ARGENT

1.8.1. MÉTHODES DE PRÉPARATION DES NANOPARTICULES

Il existe deux voies principales de synthèse des nanoparticules d'argent. La voie de préparation sèche s'appuie sur des techniques physiques telles que l'atomisation, la mécano-synthèse, l'ablation laser, la sonification et les procédés lithographiques. Ainsi, les nanoparticules sont fabriquées par réduction de la taille des fragments. Cependant, ces méthodes restent complexes, nécessitent un équipement très spécialisé et ne permettent pas toujours un contrôle suffisant sur les caractéristiques dimensionnelles et structurales des nanoparticules.

La seconde voie de préparation, dite humide, s'appuie sur des techniques de synthèse chimique. C'est une approche à l'échelle atomique qui permet de réaliser des réactions chimiques rendant possible le contrôle de la taille et de la forme des nanoparticules.

Un engouement certain est apparu pour la fabrication de nouveaux matériaux à base de nanoparticules métalliques, particulièrement l'or et l'argent, pour leurs propriétés optiques et électroniques et pour leur usage dans des applications biomédicales (Nair et Laurencin, 2007). La haute réactivité des nanoparticules d'argent, comparée à celle de l'or, augmente la difficulté de la production de solutions colloïdales d'argent et de leurs applications (Nair et Laurencin, 2007). Cependant, les recherches en chimie ont permis le développement de techniques de préparation plus adéquates pour la synthèse de ces nanoparticules. Ainsi, plusieurs méthodes *in-situ* et *ex-situ* ont été développées pour les nanostructures composites d'argent polymérique à des fins d'applications médicales (Patakfalvi *et al.*, 2004).

1.8.2. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'ARGENT PAR RÉDUCTION DES SELS D'ARGENT

✓ Réduction par le citrate vs le borohydrure

La réduction du nitrate d'argent en solution aqueuse nécessite la présence d'un agent réducteur. Plusieurs études ont proposé la réduction par le citrate et le borohydrure. Van Hoonacker et Englebienne (2006) ont comparé la taille et la stabilité des particules formées par la réduction du nitrate d'argent par ces deux réducteurs. La taille des NpAg formées par la méthode du citrate était de ~ 40 nm. Celles-ci restent stables après plusieurs mois de stockage en présence de citrate. Les NpAg formées par la méthode au borohydrure sont plus petites. Contrairement à celles réduites par le citrate, les NpAg formées par cette méthode ne sont pas stables avec le temps. Durant le stockage, elles subissent un phénomène de nucléation et de vieillissement d'Oswalt (Oswalt reopening) probablement causé par des interactions particule-particule. Toutefois, on peut stabiliser les Np par l'addition d'un tensioactif.

✓ Réduction par un solvant

Il existe plusieurs exemples de réduction de métaux par des solvants organiques. Toshima et ses collaborateurs ont longtemps utilisé l'éthanol, probablement le solvant le plus populaire, pour la préparation de NpAg produites pour les applications de catalyse (Hirai *et al.*, 1979; Wang et Toshima, 1997). La méthode des polyols est également intéressante pour sa capacité à obtenir des Np de différentes tailles (Fievet *et al.*, 1989; Ducamp-Sanguesa *et al.*, 1992). Le *N,N*-diméthylformamide (DMF) est un autre exemple d'agent réducteur utilisé pour la synthèse de NpAg à partir des sels d'argent, et il a été démontré que la réaction est plus rapide lorsque la température de synthèse augmente (Pastoriza-Santos et Liz-Marzán, 2000). D'autre part, Kurihara *et al.* (1995) ont démontré qu'il est possible de préparer des NpAg avec un agent réducteur moins puissant, comme les polyols, en augmentant la température de la réaction. Cette méthode nécessite un système à reflux où le sel d'argent réagit avec l'éthylène glycol (EG) ou le tétraéthylène glycol (TEG) à 120°-200°C pendant 1 à 2 heures. Ainsi, un mélange 75 : 25 ou 1 : 99 (EG : Eau) donne, respectivement, une taille de NpAg ~ 20 nm ou ~ 70 nm,

qui ont précipité quatre jours plus tard. Il existe également des réductions par biosynthèse, irradiation laser ou encore irradiation ultrasonique (tableau 1).

Tableau 1 : Quelques méthodes de synthèse utilisées pour la fabrication des nanoparticules en solution avec le nitrate d'argent (tirée de Nair et Laurencin, 2007)

Méthodes	Références
Réduction par le borohydrure de sodium	(Chou et Ren, 2000; Van Hoonacker et Englebienne, 2006)
Réduction par le DMF	(Pastoriza-Santos et Liz-Marzán, 2000)
Réduction par les polyols	(Kurihara <i>et al.</i> , 1995; Chou et Ren, 2000)
Réduction par l'acide ascorbique	(Chou et Ren, 2000; Velikov <i>et al.</i> , 2003)
Réduction par les monosaccharides	(Raveendran <i>et al.</i> , 2003; Panigrahi <i>et al.</i> , 2004)
Biosynthèse par les microorganismes	(Klaus <i>et al.</i> , 1999; Mukherjee <i>et al.</i> , 2001; Ahmad <i>et al.</i> , 2003)
Irradiation Gamma	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
Irradiation ultrasonique	(Li et Zhu, 2006)

✓ **Stabilisation des nanoparticules d'argent en solution**

En raison d'une réactivité importante des NpAg, celles-ci ne sont généralement pas stables en solution aqueuse et s'agglomèrent rapidement. Cependant, la formation d'agglomérats peut être significativement réduite en introduisant un agent stabilisateur approprié.

Les techniques de stabilisation électrostatique ou stérique ont été développées pour isoler les NpAg en solution. Le principe de ces techniques, qui visent à éviter le contact

entre les Np et la solution, consiste à envelopper les Np dans une couche protectrice en utilisant des composés thiols, ou encore à les encapsuler avec un polymère.

Sardar *et al.* (2007) ont développé une méthode de synthèse dans l'eau avec le sel d'argent (AgNO_3) et le polyallylamine (PAAm). Le PAAm joue à la fois le rôle de réducteur et de stabilisateur des NpAg. Les NpAg ainsi synthétisées sont des NpAg polymères-stabilisés (NpAgs) (ou nanocomposites d'argent) et elles sont stables dans l'eau à température ambiante pendant plusieurs mois. De plus, la taille et la dispersion de taille peuvent être contrôlées par la variation de la concentration en polymère PAAm.

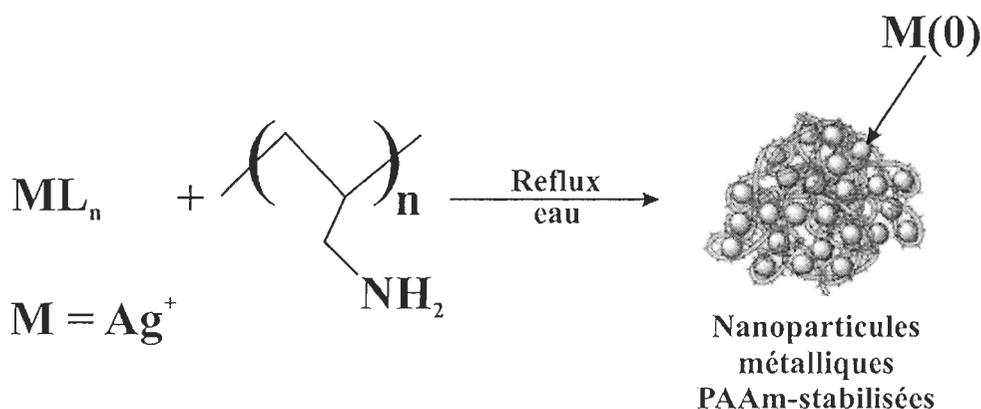


Figure 9 : Synthèse des NpAg par réduction et stabilisation par un polymère (tiré de Sardar *et al.*, 2007)

1.9. APPLICATIONS DES NANOPARTICULES D'ARGENT

L'utilisation des NpAg comme agent antibactérien est bien documentée (Klasen, 2000). L'argent a été décrit comme oligodynamique en raison de son habilité de bactéricide à faible concentration (Nair et Laurencin, 2007). L'ion argent est connu pour être hautement réactif en se liant rapidement aux charges négatives des anions et des protéines (Richards *et al.*, 1984), ainsi qu'à l'ARN et l'ADN (Nair et Laurencin, 2007). Par conséquent, les propriétés antibactériennes de l'ion argent ont été attribuées à son interaction avec les groupements thiols (Liau *et al.*, 1997), ainsi qu'avec les carboxylates, les phosphates, les hydroxyles, les imidazoles, les indoles et les amines (Nair et Laurencin, 2007).

Les NpAg sont utilisées dans les pansements, particulièrement pour les brûlures, les ulcères chroniques et les blessures diabétiques et traumatiques (Nair et Laurencin,

2007). On propose également d'utiliser les matériaux contenant de l'argent pour réduire les infections dans un grand nombre de conditions, incluant les greffes vasculaires, les matériaux dentaires et les biomatériaux métalliques (Costerton *et al.*, 2004).

Des études indiquent certaines limites à l'application de l'argent sous forme ionique. En effet, Panáček *et al.* (2006) évaluent que les propriétés antibactériennes des NpAg (25-50 nm) sont plus grandes que celles de l'argent dissous, notamment pour aider à la résistance aux médicaments. D'autres études ont démontré la capacité des NpAg à améliorer l'activité antibactérienne des antibiotiques (Shahverdi *et al.*, 2007). En effet, l'activité antibactérienne de la pénicilline G augmente en présence de celles-ci (~22,5 nm). Morones *et al.* (2005) ont étudié l'effet de la taille des NpAg pour différents types de bactéries. Cette étude prouve que l'activité antibactérienne des particules augmente avec la diminution de leur taille. De plus, la dose létale de NpAg pour les bactéries étudiées est de 75 µg/mL. La taille et la forme des Np ont donc un effet significatif sur l'efficacité antibactérienne. Auparavant, l'argent (Ag) avait été montré comme inhibiteur à la photosynthèse (Soldo et Behra, 2000). Dans ce sens, Navarro *et al.* (2008b) ont étudié l'inhibition de la photosynthèse de l'Ag vs les NpAg. Leurs résultats ont montré le rôle déterminant de l'Ag⁺ libre dans la toxicité des NpAg, avec l'apparition d'interactions entre elles et les algues. Ainsi, ce ne sont pas uniquement les facteurs abiotiques ou les conditions chimiques de l'environnement (Navarro *et al.*, 2008b) qui influencent la dissolution, la forme et la surface des NpAg (Borm *et al.*, 2006b). À présent, nous devons considérer les interactions biotiques pour évaluer les risques des nanomatériaux dans les écosystèmes aquatiques.

Enfin notons que Sun *et al.* (2005) ont étudié les propriétés antivirales des NpAg (~ 10 nm) sur le virus du VIH. L'étude démontre que la réplication du VIH-I était inhibée à 50 µM. Les cellules traitées avec 50 µM de NpAg montraient une réduction importante des cellules apoptotiques. Cela signifie que les NpAg sont capables d'inhiber la réplication virale de Hut/CCR5, d'où la réduction du VIH.

1.10. APPROCHE ET OBJECTIFS

1.10.1. APPROCHE

L'absence de mesures des Np dans l'environnement n'implique pas qu'elles y soient inexistantes. En effet, il n'est pas difficile de concevoir que l'importante production de nanomatériaux se trouve en partie déversée dans l'environnement par l'usage et l'abrasion des nanomatériaux (NM), par une élimination inappropriée des déchets de production dans les eaux urbaines, ou par le déversement accidentel pendant la production et le transport des NM. Les méthodes actuelles d'analyse pour prévoir les risques qu'ils représentent dans l'environnement sont limitées (section 1.5). Il devient urgent de développer des méthodes novatrices pour suivre et quantifier ces matériaux dans l'eau, les sédiments et les sols, ainsi que dans les tissus et les organes d'animaux vivant en contact avec ces milieux (Farré *et al.*, 2009). Afin d'évaluer les risques environnementaux des Np, il est nécessaire d'évaluer et de quantifier certains paramètres comme l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) dans différents organismes exposés à celles-ci. L'absence de données sur l'exposition *via* l'eau, les sédiments et la nourriture, reflète le manque d'outils appropriés pour le suivi et la mesure de ces Np. L'exposition est un facteur essentiel à inclure dans l'évaluation des risques environnementaux potentiels des NM.

L'un des outils appropriés à cette tâche est l'utilisation des traceurs radioactifs. Les isotopes permettent un suivi très précis dans la distribution tissulaire des changements au cours du temps. Cette méthode est déjà employée pour l'étude des métaux comme le cadmium, le mercure et l'étain (Rouleau *et al.*, 2001). Le radiomarquage a été utilisé pour les nanotubes (Petersen *et al.*, 2008 a, 2008 b; Petersen *et al.*, 2009), ce qui a donné des résultats prometteurs. Cette technique est également bien adaptée pour les études de laboratoire sur le devenir des NM dans les eaux naturelles, les sédiments et les sols; elle constitue donc un intérêt particulièrement important pour les études sur l'impact environnemental.

1.10.2. OBJECTIFS

L'objectif général de cette étude est de déterminer la cinétique d'accumulation/élimination et la distribution des NpAg dans une espèce de bivalve marin, le *Chlamys islandica*. Pour y parvenir, il faut atteindre les objectifs spécifiques suivants :

1. Développer une méthode reproductible de synthèse des nanoparticules d'argent (NpAg) à froid (sans radioactivité), pour contrôler la taille des particules et ensuite produire des NpAg radioactives avec l'isotope d'argent ^{110m}Ag .
2. Exposer des bivalves (*Chlamys islandica*) aux Np ^{110m}Ag de différentes tailles et comparer avec l'argent dissous ($^{110m}\text{Ag}_{\text{Dis}}$).
3. Déterminer la distribution tissulaire des Np et de l'argent dissous par autoradiographie.
4. Comparer les données d'autoradiographie et de cinétique de bioaccumulation pour ces différents types d'exposition.

Ce projet s'insère dans le volet d'étude plus vaste du comportement et de la toxicité des nanoparticules chez plusieurs espèces marines, dans le cadre de la chaire de recherche en écotoxicologie moléculaire appliquée aux milieux côtiers froids.

Chapitre 2

Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'argent radioactif ^{110m}Ag à haute activité spécifique pour application en sciences environnementales

Al-Sid-Cheikh¹, M., Pelletier¹, E. et Rouleau², C.

¹ Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)/ Université du Québec à Rimouski (UQAR), 310 allée des Ursulines, Rimouski, G5L 3A1, Canada.

² Institut Maurice-Lamontagne, Ministère des Pêches et Océans, CP 1000, Mont-Joli, Québec, G5H 3Z4, Canada

2.1. RÉSUMÉ

Des nanoparticules d'argent (NpAg) radioactives ont été synthétisées en solution aqueuse par la réduction du nitrate d'argent ($^{110m}\text{AgNO}_3$), en utilisant le poly(allylamine) comme agent réducteur et stabilisateur des nanoparticules. La vitesse de réaction et la taille des particules ont été déterminées par spectroscopie UV-visible, analyse granulométrique, et microscopie électronique à balayage et à transmission. Cette synthèse a été effectuée pour différentes tailles de nanoparticules en variant la concentration du polymère et la durée de la période de synthèse. La taille des NpAg obtenues est de 10 à 30 nm pour les petites NpAg (PNp ^{110m}Ag) et de 70 à 90 nm pour les grosses NpAg (GNp ^{110m}Ag). Le rendement de synthèse a été respectivement de 75,9 et 83,2 % pour les PNpAg et GNp ^{110m}Ag . La distribution des PNp ^{110m}Ag a été déterminée dans les tissus du pédoncle d'Islande par autoradiographie.

Mots clés : nanoparticules d'argent, isotopes, radiomarquage, synthèse, autoradiographie, taille.

2.2. INTRODUCTION

La synthèse de nanoparticules (Np) composées de métaux nobles a fait l'objet de nombreuses publications. Les Np peuvent être de forme sphérique, cubique, tubulaire ou irrégulière et peuvent exister sous la forme d'agrégats (Buzea *et al.*, 2007). Plusieurs études ont porté sur le contrôle de leur taille et de leur forme (Wiley *et al.*, 2004; Sang *et al.*, 2005; Wiley *et al.*, 2005, 2007; Xiong et Xia, 2007; Kilin *et al.*, 2008; Skrabalak *et al.*, 2008).

L'absence de données sur les Np dans l'environnement n'implique pas qu'elles en soient absentes. En effet, il n'est pas difficile de concevoir que la production industrielle de nanomatériaux (NM) peut entraîner leur déversement accidentel dans l'environnement, soit pendant la production et le transport, soit par l'usure des matériaux, ou encore par l'élimination inappropriée de déchets de production qui se retrouvent dans des eaux usées urbaines. Les méthodes actuelles d'analyse pour déterminer et prévoir les risques liés aux NM dans l'environnement sont limitées, d'autant plus lorsqu'il s'agit de faire l'étude de la bioaccumulation des nanoparticules dans les espèces aquatiques et terrestres.

En 2009, l'argent a pris une place prépondérante dans les matériaux de fabrication des nanomatériaux (source BCC, www.nanotechproject.org). Les nanoparticules d'argent (NpAg) sont exploitées pour leurs propriétés antibactériennes et sont ainsi utilisées dans un grand nombre de domaines tels que les cosmétiques, les emballages alimentaires, les produits et appareils ménagers, les textiles et le secteur biomédical. Ainsi, il est d'un intérêt majeur d'évaluer la nanotoxicologie des NpAg dans le milieu aquatique.

La nanotoxicologie fait face à un problème analytique de taille pour évaluer la bioaccumulation des NpAg et faire le suivi de ces particules dans l'environnement aquatique : les techniques actuelles ne sont pas encore assez puissantes pour détecter les Np dans l'environnement. C'est la raison pour laquelle il devient urgent de développer des méthodes novatrices pour suivre et quantifier ces matériaux dans l'eau, les sédiments et les sols, ainsi que dans les tissus et les organes d'animaux vivant de ces milieux (Farré

et al., 2009). Afin d'évaluer les risques environnementaux des Np, il est nécessaire d'évaluer et de quantifier certains paramètres comme l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) de celles-ci dans différents organismes exposés. L'absence de données sur l'exposition via l'eau, les sédiments et la nourriture, reflète le manque d'outils appropriés pour le suivi et la mesure de ces Np.

Le radiomarquage est employé depuis plusieurs années pour l'étude écotoxicologique des métaux dans l'environnement aquatique. Les isotopes radioactifs permettent un suivi très précis de la distribution tissulaire grâce à l'autoradiographie dans le temps par comptage gamma. Rouleau *et al.* (2001) ont utilisé cette méthode pour l'étude des métaux dans le milieu aquatique tels que le cadmium, l'argent et l'étain. Ceci a permis de mieux évaluer leur bioaccumulation chez les organismes. Cette technique est bien adaptée pour les études de laboratoire sur le devenir des NM dans les eaux naturelles, les sédiments et les sols; elle présente donc un intérêt particulier pour les études sur l'impact environnemental de ceux-ci. Par exemple, Petersen *et al.* (2008a, 2008b, 2009) ont synthétisé des nanotubes marqués au ^{14}C afin d'évaluer leur devenir dans les organismes.

Notre travail présente ici la synthèse et la caractérisation de nanoparticules avec l'argent radioactif ($^{110\text{m}}\text{Ag}$) pour une application environnementale. Cette approche permet de suivre le transfert des particules à travers les tissus d'organismes simplement et rapidement. Peu importe la forme, la taille et la surface des NpAg synthétisées, elles seront facilement suivies par comptage gamma. Il existe peu de méthodes de synthèse de nanoparticules radioactives. Oughton *et al.* (2008) ont utilisé une activation neutronique pour marquer des nanoparticules métalliques manufacturées, afin de localiser et quantifier les Np dans les matrices minérales et les tissus organiques. Cependant, leur technique peut modifier la surface des Np et les particules qui en résultent ne possèdent pas nécessairement les propriétés recherchées. D'autre part, Abbas *et al.* (2010) ont produit des Np radioactives d'oxyde de titane (TiO_2) par irradiation de protons avec l'isotope ^{48}V . Cette méthode de marquage introduit des altérations des propriétés des Np par le bombardement de protons. L'interprétation des résultats sur le comportement des Np reste par conséquent très limitée. Ici, nous proposons une synthèse humide de NpAg

utilisant directement l'isotope radioactif de l'argent 110 métastable (^{110m}Ag). Cet article est le premier à proposer la synthèse de $\text{Np}^{110m}\text{Ag}$ avec une source d'isotope ^{110m}Ag radioactive en phase aqueuse et en présence d'un polymère réducteur. Cette synthèse a permis de mesurer la distribution des NpAg par autoradiographie dans un organisme marin modèle, le pétoncle d'Islande (*Chlamys islandica*).

2.3. MATÉRIAUX ET MÉTHODES

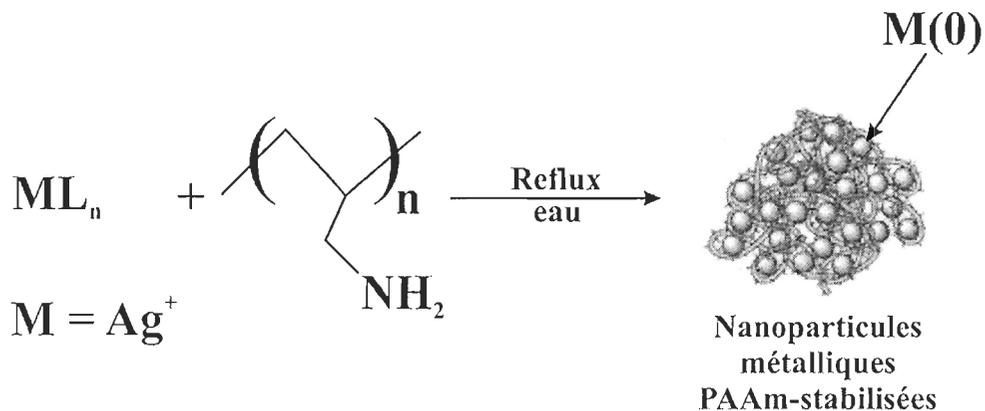
2.3.1. PRODUITS CHIMIQUES

Nous avons utilisé le nitrate d'argent (AgNO_3 en poudre, CAS 7761-88-8) et le poly(allylamine) (PAAm, 20 wt % dans l'eau, $M_w \approx 65\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'argent radioactif ^{110m}Ag ($t_{1/2} \approx 250$ jours) dans HNO_3 0,1M avec une activité spécifique de $80,3\text{ MBq}\cdot\text{mg}^{-1}$, a été obtenu de Polatom. La solution d'argent radioactif a été évaporée à sec à l'étuve à $+60\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 16 h, pour éliminer la plus grande partie de l'oxyde nitreux (NO_2) par décomposition thermique de HNO_3 . L'eau utilisée a été purifiée par le système Barnstead Nanopure Infinity UV ($18,0\text{ M}\Omega/\text{cm}$).

2.3.2. PRÉPARATION DES NPAG-PAAM

✓ La synthèse générale

Dans un premier temps, la synthèse des NpAg a été optimisée à froid (sans radioactivité) avec du AgNO_3 à partir de la méthode proposée par Sardar *et al.* (2007). Dans un ballon, la solution d' AgNO_3 (20 mg, 0,118 mmol) dans 200 mL d'eau et 10 mL de 0,04 M de poly(allylamine) ont été mélangés à température ambiante. La réaction a été réalisée à reflux ($T \approx 100^\circ\text{C}$) avec agitation constante selon l'équation ci-après :



La réaction a été suivie par spectrophotomètre UV-Vis, afin d'atteindre une amplitude maximale et de suivre le déplacement maximal du spectre d'absorption. Une fois la réaction complétée, la solution a été entreposée dans une bouteille ambrée à température de la pièce.

✓ **Le rinçage des Np et les analyses UV-vis**

La solution a été centrifugée à 20,000 rpm pendant 1 h, puis rincée à l'eau nanopure deux fois. Les spectres d'absorption ont été enregistrés entre 300 et 600 nm avec un spectrophotomètre The Genesys 10 UV scanning, de Thermo Spectronic. Les échantillons de nanoparticules-polymère-stabilisées (NPs) ont été prélevés dans le milieu réactionnel durant la synthèse et analysés sans refroidissement. Pour chaque synthèse, l'absorption en UV-vis a été suivie pour la cinétique de la synthèse.

✓ **La taille des NpAg**

La synthèse élaborée par Sardar et *al.*(2007) produit des Np de petites tailles d'un diamètre moyen de $4,4 \pm 0,9$ nm selon les auteurs. Pour optimiser la croissance de leur taille, nous avons testé deux facteurs pouvant influencer cette croissance : le temps de réaction et la concentration en polymère. Afin de tester ceux-ci, nous avons procédé à deux synthèses différentes. La première consistait à tester le temps de réaction sans aucun changement dans le procédé de synthèse, c'est-à-dire en utilisant la même concentration et la même addition proposées par Sardar et al (2007), tandis que la seconde consistait à faire varier la concentration en polymère pour augmenter le diamètre des Np et additionner le polymère en deux fois avec des volumes de quantité égale (1 mL de PAAm; [PAAm] = 10 μ L/mL). La première addition permettait le départ de la réaction, tandis que la seconde, après 30 min, permettait d'augmenter la taille des NpAg. La coloration de la solution est un indicateur de la taille et de la concentration des Np produites. Ainsi, lorsque la coloration de la solution varie du jaune pâle ($\lambda_{\max} = 405$ nm, petites Np) au jaune orangé ($\lambda_{\max} \approx 430$ nm, grosses Np), la taille des particules varie, et lorsque l'intensité de la couleur augmente, la concentration des NpAg est plus importante. Cette synthèse n'est pas sensible à l'oxydation et ne nécessite pas de précaution particulière quant à la présence d'air dans le ballon de réaction.

✓ **Analyse des tailles**

Un microscope électronique à balayage (MEB) Jeol 6460 LV a été utilisé pour observer la taille et la forme des Nps. Le voltage d'accélération a été de 20 kV et la résolution spatiale de 30 nm. Pour les NpAg de petite taille, un microscope électronique à transmission Delong Instruments LVEM 5 en mode TEM a été utilisé pour les observer et mesurer. Le voltage a été de 5 kV et la résolution spatiale de 2,5 nm. Pour l'analyse des tailles des NpAg, un microscope à force atomique (AFM NTEGRA Prima ®) ayant une limite de détection de 0,1 nm a été utilisé.

Pour les GNpAg, une analyse granulométrique a été effectuée avec un analyseur de taille des particules par diffraction laser LS 13320 de Beckman-Coulter. L'indice de réfraction utilisé (1,38) correspondait à celui du PAAm (Schauer *et al.*, 2003).

✓ **Synthèse des nanoparticules radioactives**

La synthèse radioactive a été effectuée dans des conditions identiques (concentration, température) à celles utilisées sans radioactivité, mais avec l'isotope ^{110m}Ag dans le but d'obtenir des Np radiomarquées (Np ^{110m}Ag). La quantité de ^{110m}Ag étant faible, le volume initial de 200 mL a été réduit à 4 mL, soit une réduction d'un facteur 50. Ainsi, le volume de la source ^{110m}Ag a été calculé pour obtenir une masse ^{110m}Ag de 0,20 mg. Cette quantité de ^{110m}Ag a été introduite dans un ballon de 10 mL, puis placée à l'étuve à 60°C pendant 16h. Par la suite, 4 mL d'eau nanopure ont été ajoutés dans le ballon, avec une concentration de PAAm de 0,04 M pour les Np ^{110m}Ag de ~ 10 nm, et une concentration de PAAm de 3,5 mM pour celles de ~80 nm. Le temps de synthèse a été respectivement de 1 h 45 et de 3 h pour les Np de 10 et 80 nm. La coloration était détectable à l'œil nu après une réaction de 25 min et elle s'est intensifiée en fonction de la concentration des NpAg formées.

Les mesures de radioactivité ont été faites avec un compteur gamma NaI (II) wizard 1480 (Packard) de 76 mm de diamètre. Afin de ne pas saturer le compteur, un volume de 10 μL était prélevé avant et après la synthèse. Le volume était complété jusqu'à 1 mL pour obtenir une géométrie de comptage constante. Pour l'isotope ^{110m}Ag et pour le volume de 1 mL, l'efficacité de détection de l'appareil est de 21 %. Le calcul

du rendement de synthèse est un rapport entre la quantité de désintégration initiale avant la synthèse et les désintégrations finales de la solution de $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$.

$$\phi = \frac{A_{\text{synthèse}}}{A_{\text{initiale}}}$$

✓ **Exposition des organismes et autoradiographie**

Afin de vérifier l'efficacité des $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$ synthétisées et d'étudier leur distribution dans les tissus biologiques, des pétoncles d'Islande (*Chlamys islandica*) ont été exposés aux $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$ pendant 12 h dans l'eau de mer, pour ensuite être déplacés dans un bassin avec une circulation continue d'eau de mer propre pendant 1 à 8 semaines. À la fin de la période d'accumulation et d'élimination, puis à une semaine d'élimination, deux pétoncles ont été sacrifiés et utilisés pour l'autoradiographie de l'organisme entier.

Les tissus des pétoncles ont été prélevés de leur coquille puis inclus dans un gel de carboxyméthyl cellulose, pour ensuite être congelés dans l'azote liquide. Chaque section était coupée avec un cryomicrotome (Leica CN 3600). L'épaisseur de chacune était de 50 μm . Les sections ont été lyophilisées durant 36h à -25°C et ont ensuite été exposées sur des écrans de phosphore sensibles au rayonnement beta durant une semaine. Les autoradiogrammes ont été révélés avec un Cyclone Phosphor Imager (Packard BioScience) et quantifiés avec le logiciel Optiquant®.

2.4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Trois types principaux de Np ont été rapportés : les Np nues, les Np encapsulées, et les Np réduites par un acide et stabilisées par un polymère. On observe aussi que les propriétés des Np dépendent en particulier de leur environnement immédiat (Gehr et Boyd, 1996; Billaud, 2006). En raison des objectifs poursuivis dans nos travaux, il était nécessaire de trouver des Np stables en milieu aqueux pour des applications en toxicologie environnementale. La synthèse de Sardar *et al.* (2007) remplit cette condition, car elle s'effectue dans l'eau nanopure et utilise un polymère hydrosoluble (PAAm). Ce dernier agit comme agent réducteur et stabilisateur, ce qui procure une incorporation et un recouvrement des Np qu'il produit. Cette synthèse a donc été utilisée et modifiée de façon à obtenir des Np radiomarquées de différentes tailles. Il en résulte des NpAg encapsulées pouvant servir de modèle pour étudier leur comportement en milieu aquatique et suivre leur cheminement dans les organismes aquatiques.

2.4.1. SYNTHÈSES DES NPAG À FROID

✓ Les petites NpAg

Les nanoparticules dont les dimensions sont inférieures aux longueurs d'onde du domaine visible (typiquement 500 nm) présentent des propriétés optiques étonnantes (Gehr et Boyd, 1996). Elles montrent des couleurs différentes dues à l'absorption et la réflexion de la lumière dans la région du visible. La couleur des nanoparticules métalliques dépend de leur forme, de leur taille et de la constante diélectrique du milieu environnant (Zielinska *et al.*, 2009). Chaque Np métallique présente une bande d'absorption dans des domaines de longueurs d'ondes différentes. Plusieurs auteurs rapportent que le spectre d'absorbance, pour des NpAg sphériques, varie entre 400 et 490 nm (Jana *et al.*, 1999; Manna *et al.*, 2001; Sönnichsen *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2007; Martinez-Castanon *et al.*, 2008). Dans notre étude, la figure 10 présente les spectres d'absorbance en fonction du temps (de 10 min à 24h) lors de la synthèse dans les conditions publiées par Sardar *et al.* en 2007. Les résultats montrent un maximum d'absorbance à $\lambda_{\max}=398$ nm. Un très faible déplacement du spectre d'absorbance a été observé dans ce cas et son intensité augmente en fonction de la progression de la

synthèse, ce qui est conforme aux données publiées pour les Np de petites tailles ($\varnothing < 10$ nm, PNpAg) (Sardar *et al.*, 2007).

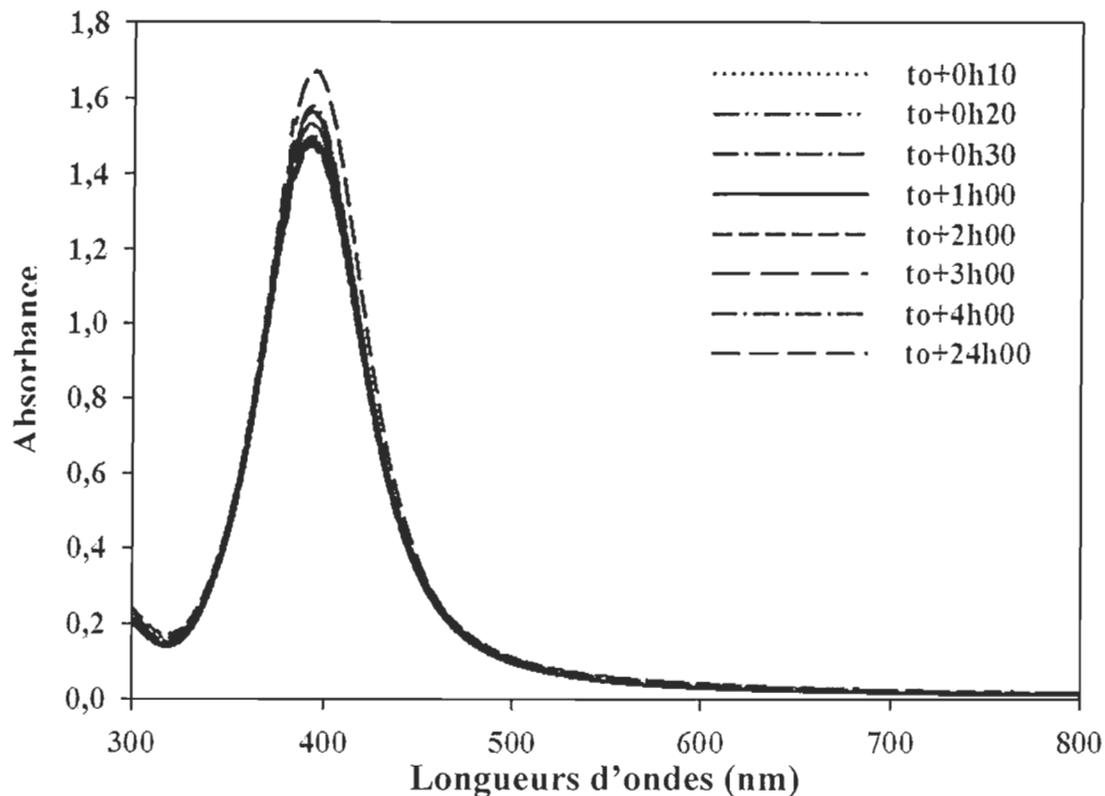


Figure 10 : Spectre d'absorbance lors de la synthèse des NpAg dans les conditions de Sardar *et al.*, 2007.

Une autre technique a été employée pour observer la taille et la forme des Np synthétisées. La figure 11 présente les résultats d'analyse par microscopie à force atomique (AFM). La figure 11-a- présente la vue tridimensionnelle de l'image AFM des NpAg. La figure 11-b- présente l'analyse des particules. La figure 11-c- présente la valeur moyenne des tailles des NpAg de l'échantillon. La figure 11-d- présente un grossissement des NpAg de l'échantillon.

La taille des NpAg observées par AFM est en moyenne de 20 nm avec une gamme variant de 5 à 35 nm. Ce sont des NpAg obtenues après 1h de synthèse. Cette observation a été confirmée grâce à une analyse par microscopie à transmission électronique (TEM) (figure 12). La taille des NpAg varie entre 10 et 25 nm. Ceci concorde avec les données AFM.

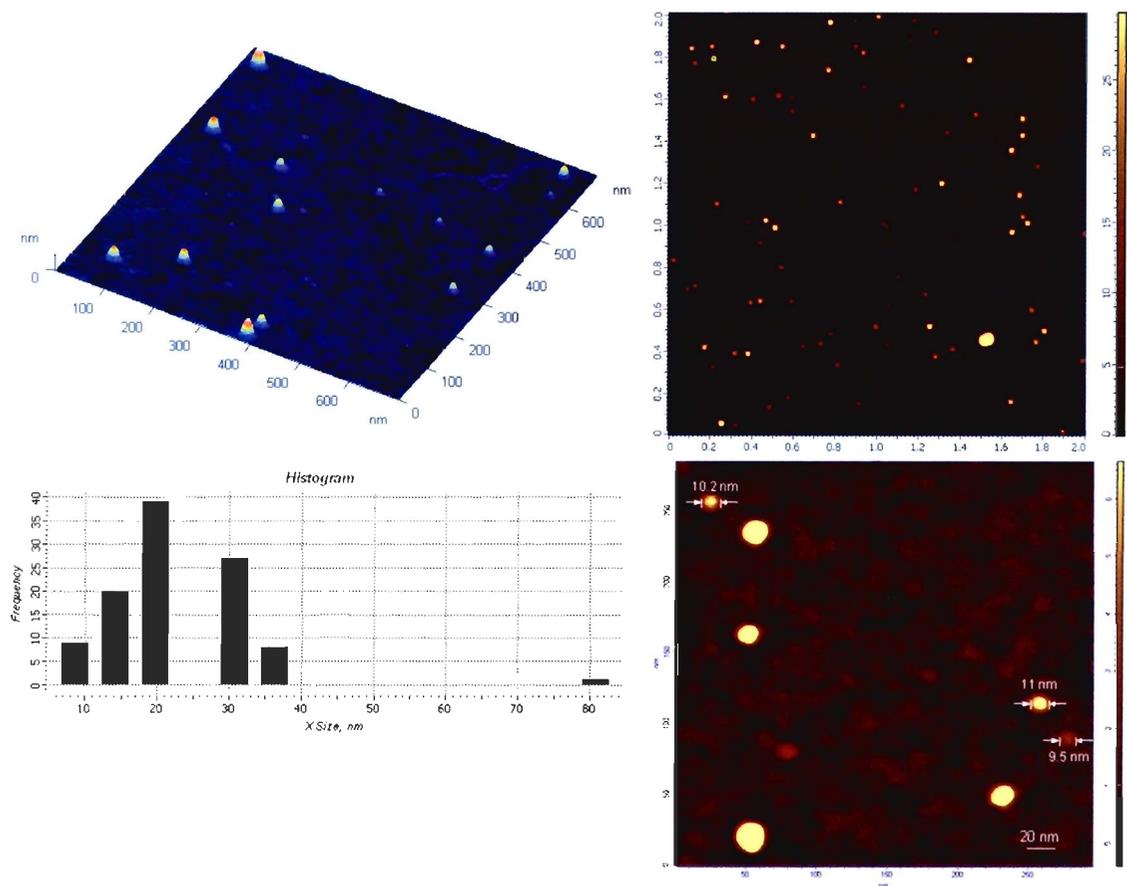


Figure 11 : images en microscopie AFM -a- image typique 3D d'une préparation de NpAg sur support de mica (700 x 700 nm en mode semi-contact). Environ 5 μL d'échantillons de NpAg ont été appliqués au support fraîchement clivé, permettant 1 min d'adsorption, et suivi d'un rinçage abondant d'eau déionisée. b- Analyse de particules pour une image en 2 x 2 μm ; -c- histogramme des tailles des NpAg; d – Grossissement haute résolution de l'image-b- (280 x 280 nm).

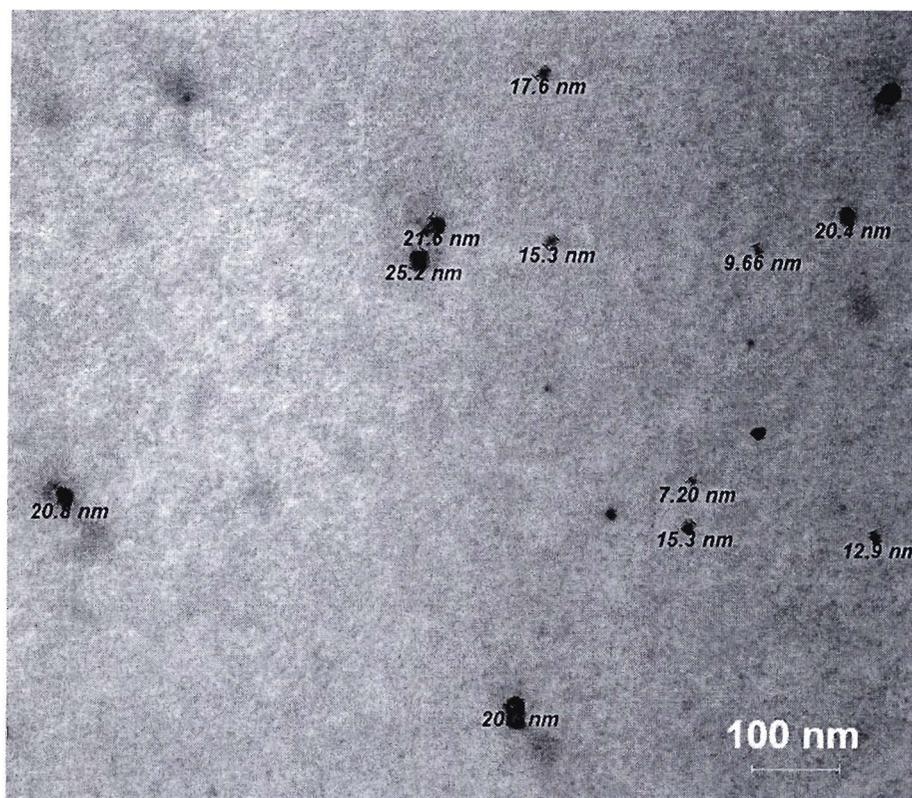


Figure 12 : Image microscopie électronique à transmission pour des NpAg de temps de synthèse de 1h.

En combinant l'analyse des deux microscopes, nous évaluons, pour la synthèse des NpAg dans les conditions de Sardar *et al.* (2007), une taille moyenne des NpAg de 20 nm avec un maximum de 40 nm.

✓ Les grosses NpAg

- Synthèse 1 : variation du temps de synthèse

La figure 13-a- représente les spectres d'absorption des NpAg lors de la variation du temps de synthèse. Des mesures ont été effectuées après 24 h, 48h et 67h de synthèse. On observe que la longueur d'onde d'absorbance maximale augmente de 405 nm à 440 nm pour des temps de synthèse de 24 h et 67h, respectivement. On note également un élargissement de la bande d'absorption, ce qui témoigne d'une large distribution de tailles des particules. En effet, on sait que leurs propriétés d'absorption macroscopiques sont particulièrement dépendantes de leur symétrie et de leurs dimensions (Billaud, 2006). La largeur et la position spectrale de cette résonance sont régies par les propriétés

intrinsèques des particules comme leur composition, leur taille et leur forme (Gehr et Boyd, 1996; Billaud, 2006). Ainsi, la bande d'absorption se déplace vers le bleu lorsque la taille diminue et vers le rouge lorsque la taille augmente (Jana *et al.*, 1999; Manna *et al.*, 2001; Sönnichsen *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2007; Martinez-Castanon *et al.*, 2008). Ceci est vérifié par l'image du microscope électronique à balayage (MEB) de la figure 13-b-, qui montre les NpAg synthétisées après 67h. Les tailles les plus importantes pour ces particules sont d'environ 650 nm. Nous avons pu observer qu'un dépôt brunâtre de Np s'était formé sur les parois du ballon, entraînant une diminution de la concentration dans la solution. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de réduire le temps de synthèse.

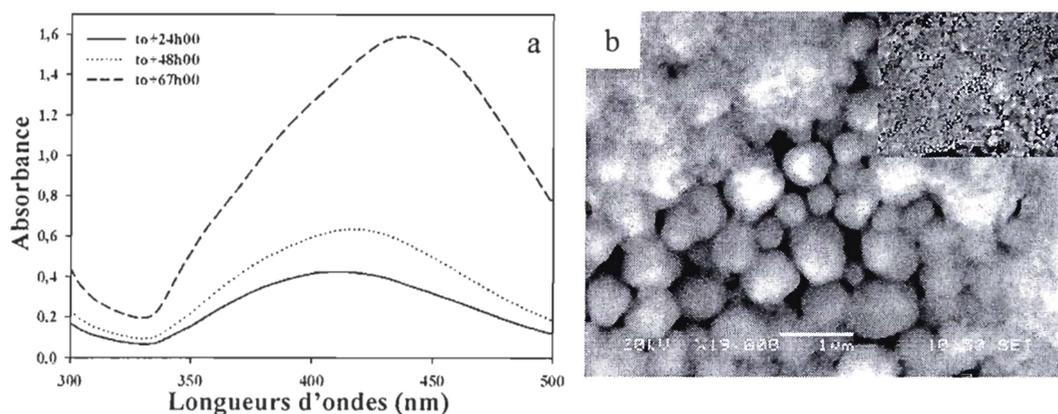
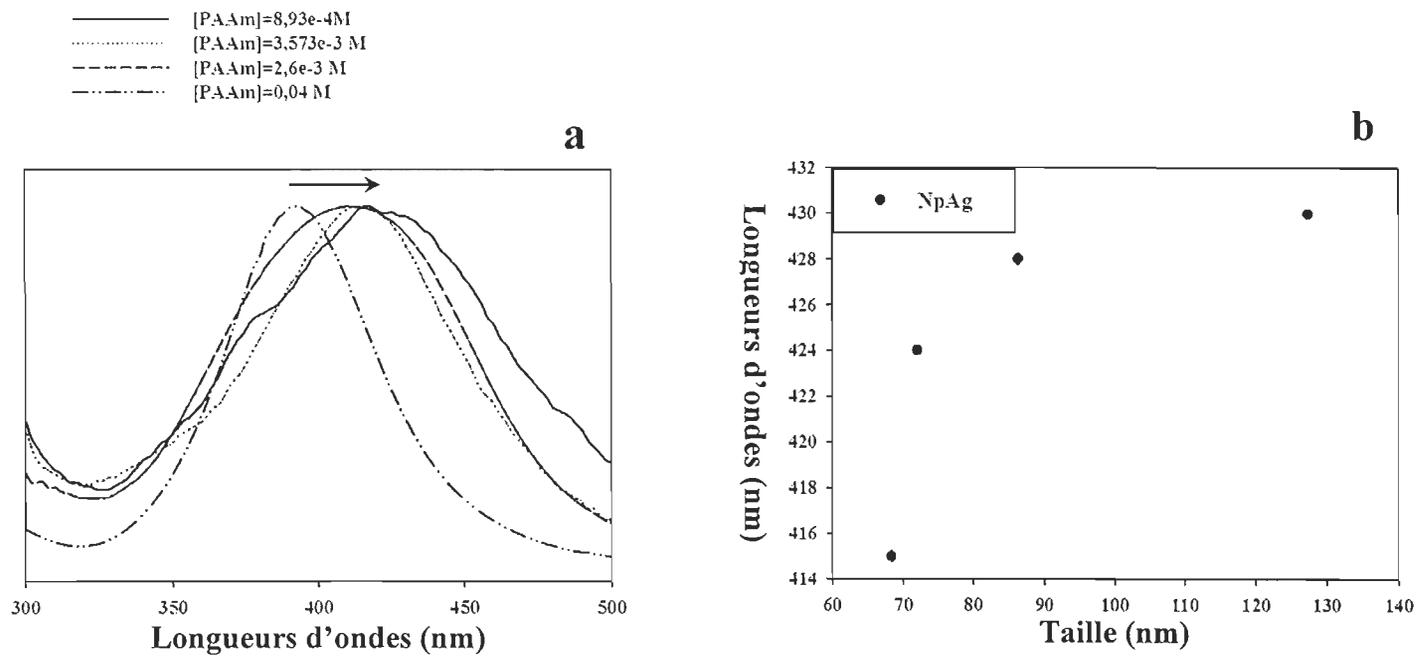


Figure 13 : -a- Spectres d'absorbance en fonction du temps de synthèse des NpAg, à t_0+67h , $\lambda_{max}=440nm$; -b- Image de microscope électronique à balayage (MEB) à t_0+67h , $\varnothing_{NpAg} = 650 nm$.

- Synthèse 2 : variation de la concentration en polyallylamine (PAAm)

Plusieurs concentrations en polymère ($[PAAm]$ (4×10^{-2} , $3,573 \times 10^{-3}$, $2,6 \times 10^{-3}$ et $8,93 \times 10^{-4} M$) ont été testées dans le but de réduire le temps de synthèse. La figure 14-a- montre les spectres d'absorbance pour les différentes synthèses effectuées à différentes concentrations de PAAm. Le temps de synthèse a été gardé constant à 3 h pour toutes les synthèses. Les figures 14-b- et -c- répertorient les tailles des NpAg et les maximums des spectres d'absorption aux différentes concentrations de PAAm. On observe un déplacement de la bande d'absorption vers de plus grandes longueurs d'ondes lorsque la concentration en PAAm diminue. D'autre part, la taille des Np augmente lorsque la bande d'absorption migre vers le rouge.



Diamètre (nm)	λ max (nm)	[PAAm] (M)	Temps (h)
20 ± 2	398	$4.0 \cdot 10^{-2}$	2
68.3 ± 0.1	415	$3.6 \cdot 10^{-3}$	3
71.7 ± 0.4	424	$2.6 \cdot 10^{-3}$	3
86.4 ± 0.5	428	$8.9 \cdot 10^{-4}$	3

Figure 14 : -a- Courbes UV-vis normalisées. Variations des concentrations en PAAm pour faire varier la taille des NpAg; -b- Tailles des NpAg en fonction des maximums d'absorbance. Le tableau correspond aux données expérimentales des grosses NpAg par variation de la concentration de polymère.

Les auteurs Van Hoonacker et Englebienne (2006) ont publié une revue de littérature sur les différentes synthèses de NpAg et ont proposé une relation entre la λ_{\max} du spectre d'absorption et le diamètre moyen des nanoparticules d'argent. En utilisant leur relation $\lambda_p = 382,6 + 1,18x$ (λ_p est le maximum d'absorption en nm et x est le diamètre des particules en nm), la taille moyenne des particules calculée est de 8, 10 et 13 nm. Cependant, les résultats de la figure 14-b- montrent que la croissance pour des Np de grosses tailles n'est pas linéaire. La tendance est asymptotique et en contradiction avec les résultats de Van Hoonacker et Englebienne (2006).

Afin d'augmenter le rendement de la synthèse et d'augmenter la concentration en NpAg dans la solution, l'ajout de polymère a été effectué en deux étapes. La figure 15-a- présente les résultats du suivi cinétique de la synthèse des NpAg en fonction de l'ajout de PAAm. Les mesures ont été effectuées toutes les heures durant 3 h. On observe que l'absorbance des NpAg augmente nettement après le second ajout de PAAm (1mL à $0,2\mu\text{L}_{\text{PAAm}}\cdot\text{L}^{-1}$) (1h), ce qui induit une augmentation de la concentration. Cette bande d'absorption a un maximum à $\lambda_{\max} = 416$ nm. À la fin des 3 h de synthèse, la taille granulométrique des NpAg était de $68,3 \pm 0,4$ nm.

Dans cette étude, les résultats observés sont en accord avec la littérature. Les longueurs d'ondes pour les petites NpAg sont comprises entre 398 et 405 nm, tandis que pour les grosses NpAg, elles sont comprises entre 420 et 440 nm.

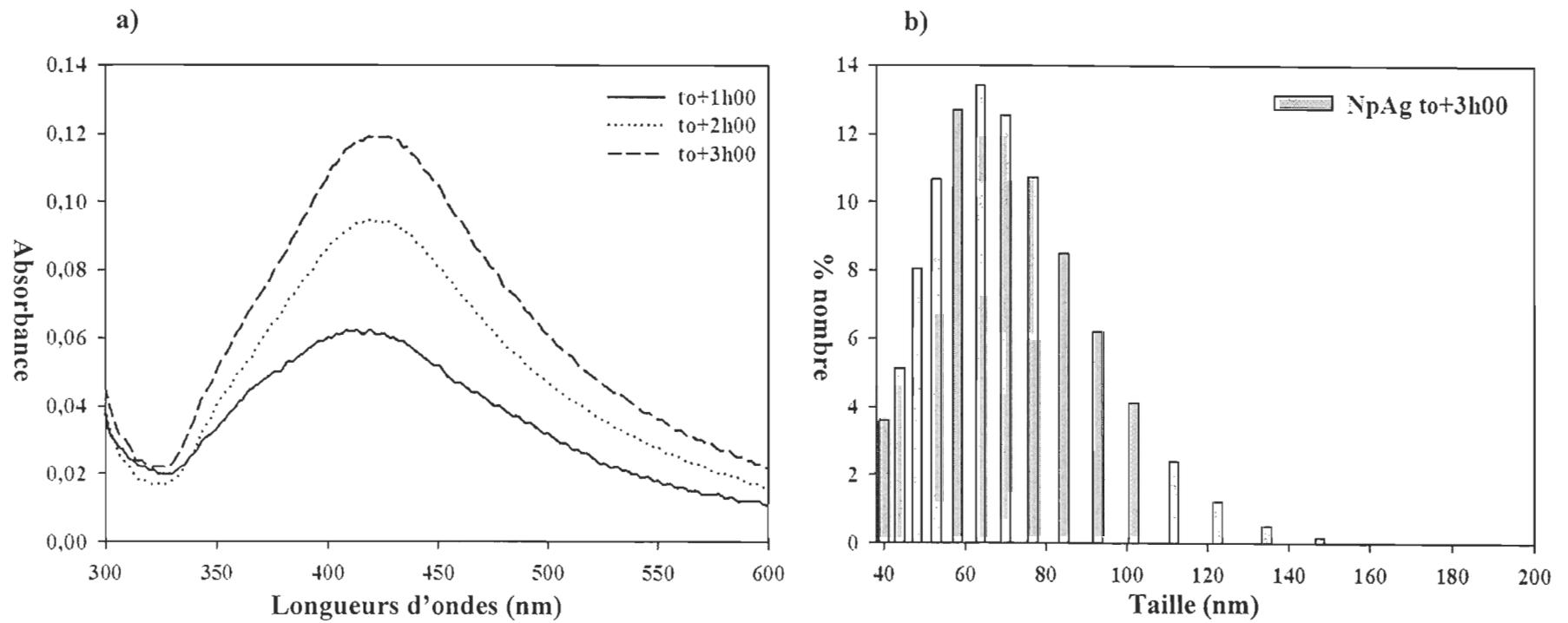


Figure 15 : -a- Suivi cinétique de la synthèse de NpAg en fonction de l'ajout de PAAM -b- Granulométrie de l'échantillon à t_0+3h00 , la taille des NpAg est en moyenne de $68,3 \pm 0,4$ nm.

2.4.2. RADIOMARQUAGE DES NPAG

✓ Les synthèses radioactives et rendement

La figure 16 présente les résultats des synthèses en radioactivité, c'est-à-dire avec l'ion $^{110m}\text{Ag}^+$. Les spectres d'absorption des synthèses à chaud sont identiques à ceux des synthèses faites à froid, avec des maximums d'absorbance à 405 nm et 420 nm pour les petites Np (PNpAg) et les plus grosses (GNpAg), respectivement. L'activité de chaque synthèse a été mesurée avant le départ du reflux, à la fin, puis après la centrifugation des Np. Les pertes d'argent ne sont que de 24,1 % et 16,8 % lors des synthèses de PNpAg et de GNpAg, ce qui indique qu'elles sont effectuées avec un bon rendement. Cette perte peut être due à des NpAg qui ont collé à la surface du ballon ou encore à de l'argent ionique non réagi durant la synthèse (figure 16).

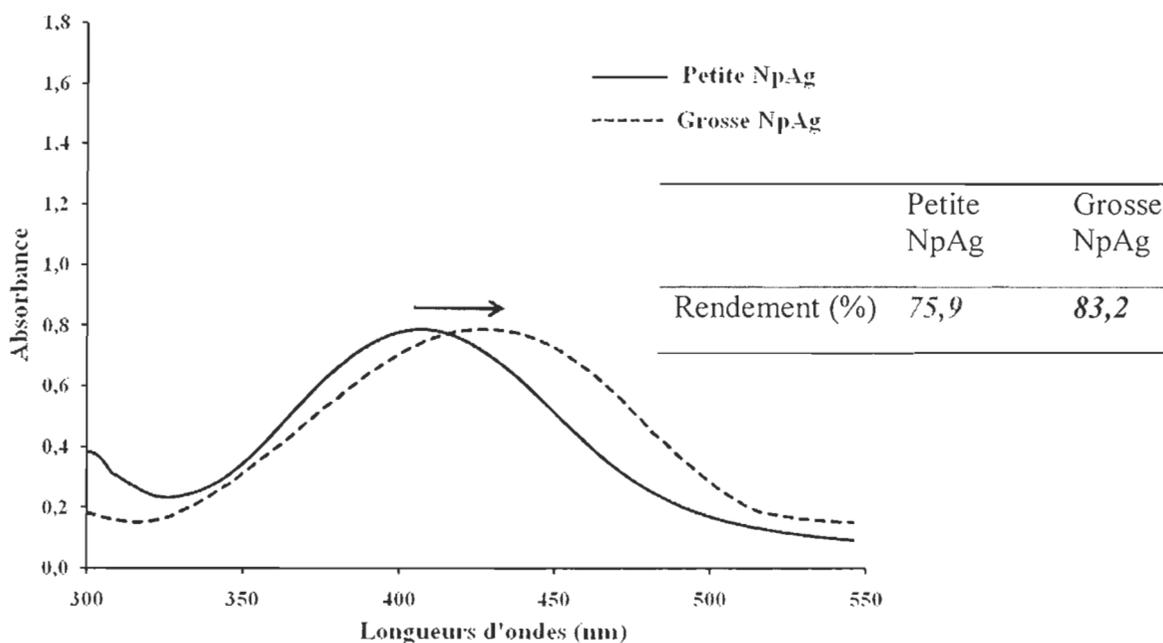


Figure 16 : Synthèse de radiomarquage des grosses nanoparticules d'argent. Le tableau présente les rendements des synthèses des NpAg radiomarquées.

✓ **Influence du HNO_3 pour la forme des Np**

Étant donné que l'argent radioactif est en solution dans l'acide nitrique, des essais sur l'effet de cette dernière ont été réalisés. Il a été rapporté par Sang *et al.* (2005) que l'acide chlorhydrique (HCl) induisait une augmentation du rendement, la perfection du cube et la monodispersion de l'échantillon. De ce fait, il devenait nécessaire d'observer l'influence possible d'un acide tel que l'acide nitrique afin de connaître la morphologie des Np synthétisées. La figure 17 représente une image MEB d'une synthèse effectuée avec une concentration de HNO_3 équivalente à celle utilisée lors de la synthèse radioactive. La forme des Np observées est cubique et non-sphérique, comme dans les autres synthèses.

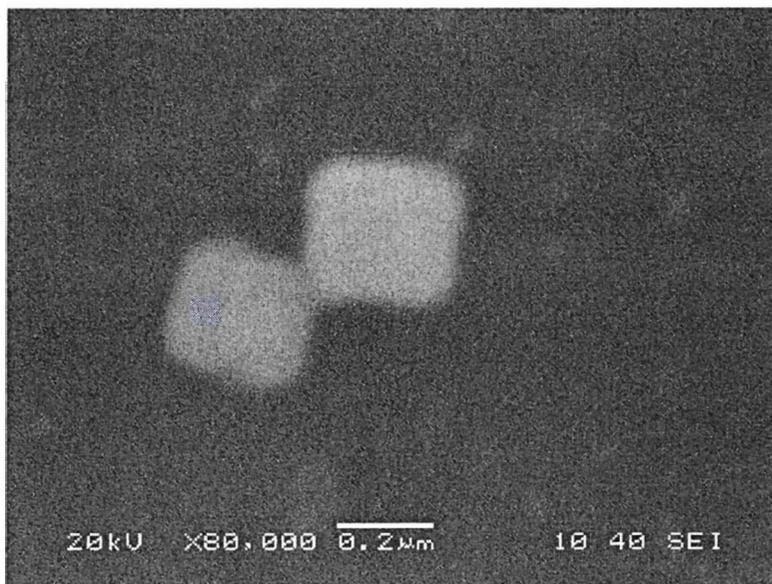
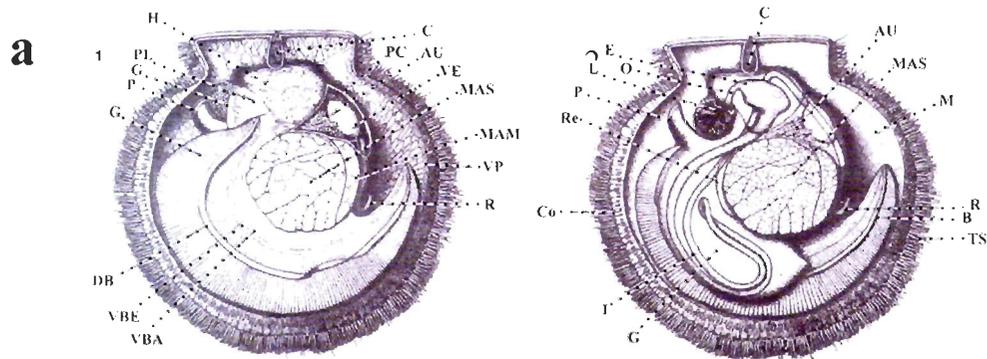


Figure 17 : Image par microscopie électronique à balayage des Np de grandes tailles pour évaluer l'influence de l'acide nitrique lors de la synthèse de NpAg.

2.4.3. AUTORADIOGRAPHIE

La figure 18-a- est une représentation schématique d'un pétoncle permettant d'identifier les organes internes de cet animal. La figure 18-b- présente une section d'un pétoncle exposé au $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$ et l'autoradiogramme correspondant. L'autoradiogramme présenté est pour un individu exposé pendant 12 h au $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$ par une contamination *via* l'eau. Tous les tissus contiennent des quantités plus ou moins élevées de $^{110\text{m}}\text{Ag}$. Ainsi, il est possible d'observer distinctement sur la figure 18-b-2 les branchies, le muscle, les reins, la gonade et l'hépatopancréas qui contiennent de $^{110\text{m}}\text{Ag}$. La concentration des $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$ accumulées est visible grâce à l'intensité de la couleur. L'échelle de couleur indique l'intensité des rayons émis par l'isotope $^{110\text{m}}\text{Ag}$. Ainsi, les faibles concentrations sont colorées en violet, alors que les plus fortes apparaissent en noir. L'autoradiogramme de la figure 18-b-2 présente de faibles concentrations pour presque tous les organes, mis à part l'hépatopancréas et les palpes labiaux.

L'accumulation est en lien avec le fonctionnement physiologique de chaque organisme. Ici, il est très net que le pétoncle accumule l'argent nanoparticulaire dans son système digestif. Cette technique est d'un réel atout pour l'étude écotoxicologique des métaux et d'autant plus pour les Np, car est la première à mettre en évidence leur comportement dans les tissus d'un organisme. Cette méthode, combinée à des études de toxicité, permettra une avancée majeure dans la compréhension de la nanotoxicologie aquatique.



Abréviations : AU, auricule; B, branchies; C, chondrophore; Co, coquille; DB, courbe dorsale des filaments de branchies; E, estomac; G, gonade; H, hépatopancréas; I, intestin; L, lèvres; M, manteau; MAS, muscle adducteur strié; MAM, muscle adducteur moelleux; O, œsophage; P, pied; PC, pericardium; PL, palléale palpe; R, rectum; Re, reins; TS, tentacules sensorielles; VBA, vaisseaux branchiaux afférent; VBE, vaisseaux branchiaux efférent; VE, vélum; VP, vaisseaux palléale.

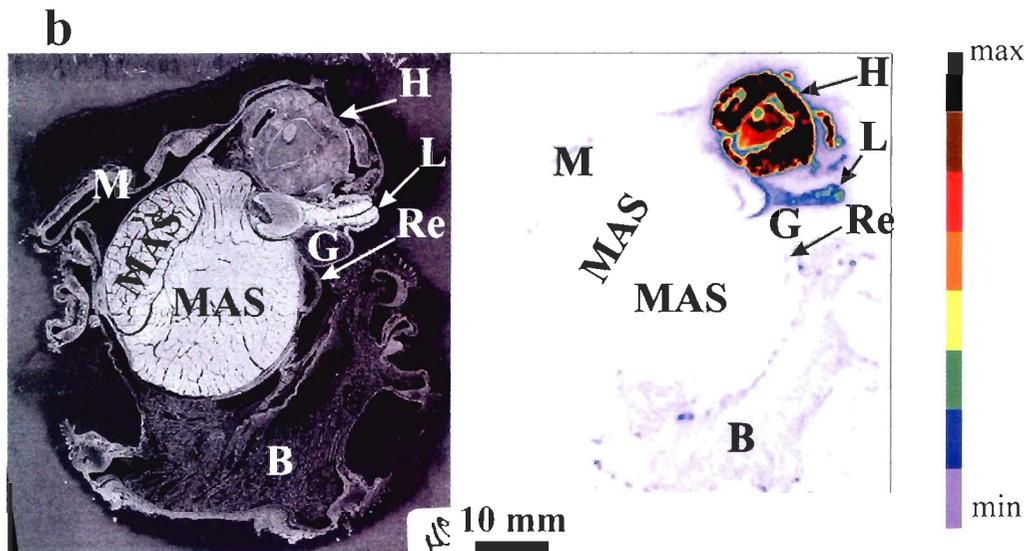


Figure 18 :-a- Anatomie générale du pétoncle (modifié de Shumway *et al.*, 2006) ; - b- À gauche : photo d'une section de pétoncle d'Islande exposé pendant 12h aux PNP^{110m}Ag; à droite : l'autoradiogramme correspondant.

2.5. CONCLUSION

En résumé, nous avons synthétisé des nanoparticules d'argent radioactives. La difficulté dans cette méthode était de faire varier la taille des nanoparticules. Le suivi de l'avancement de la réaction, par le déplacement de la bande d'absorption et les mesures par diffraction laser et microscopie électronique, a permis de mettre en évidence que les Np sont de très faibles tailles (< 10 nm) lorsque $\lambda_{\max} = 398$ nm, atteignant $\sim 68,3$ nm à $\lambda_{\max} = 415$ nm, et $86,4$ nm à $\lambda_{\max} = 428$ nm. La méthode de croissance des Np donne aussi une large distribution de leur taille. Son point fort, par rapport à une méthode par activation, est qu'elle permet d'obtenir des Np avec une forte activité spécifique. La démonstration a été faite, dans l'expérience avec un pétoncle, que ces Np^{110m}Ag permettent un suivi plus réaliste du comportement des NpAg dans les organismes vivants. Ainsi, avec cette méthode, il devient possible de suivre la distribution tissulaire et la cinétique de bioaccumulation dans ces organismes.

Chapitre 3

Étude biocinétique de l'argent dissous et de différentes tailles de nanoparticules d'argent radiomarquées (Np^{110m}Ag) durant l'accumulation et l'élimination du pétoncle d'Islande (*Chlamys islandica*)

Al-Sid-Cheikh M.¹, Pelletier E.¹ et Rouleau C.²

¹. Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER), Université du Québec à Rimouski (UQAR), 310, allée des Ursulines, Rimouski, Qc, G5L 3A1, Canada.

². Institut Maurice-Lamontagne, Ministère des Pêches et Océans Canada, C.P. 1000, Mont-Joli, Qc, G5H 3Z4, Canada.

3.1. RÉSUMÉ

L'explosion du marché mondial de la nanotechnologie entraîne une exposition humaine et environnementale accrue aux nanomatériaux. C'est pourquoi le domaine de la nanotoxicologie s'intéresse à l'effet et aux risques potentiels des particules d'une taille inférieure à 100 nm. La taille, la forme et la surface d'interaction de celles-ci sont des facteurs déterminants sur leur comportement. L'argent est connu pour être un très bon bactéricide; c'est pourquoi les nanoparticules d'argent (NpAg) sont employées pour leur propriété antibactérienne. Toutefois, les risques que représentent ces NpAg sont mal compris et leur devenir dans l'environnement est encore inconnu. Afin d'évaluer les risques écotoxicologiques que les NpAg peuvent engendrer, il est important de connaître l'impact qu'elles ont sur la biomasse aquatique. Notre étude présente les résultats de l'exposition de pétoncles d'Islande (*Chlamys islandica*) à trois formes différentes d'argent: l'argent dissous (Ag(I)_{Dis}), les petites Np d'argent d'une taille comprise entre 10 et 20 nm (PNpAg(0)), et les grosses Np d'argent d'une taille comprise entre 70 et 80 nm (GNpAg(0)). Afin de suivre l'argent sous forme nanoparticulaire dans les organes et tissus du pétoncle, les NpAg ont été synthétisées avec l'isotope radioactif 110 métastable de l'argent (^{110m}Ag(I)). Ainsi, les pétoncles ont été exposés à l'ion ^{110m}Ag(I)_{Dis}, les PNp^{110m}Ag(0) et les GNp^{110m}Ag(0), pour une période de 12 h *via* l'eau, suivie d'une période d'élimination de plusieurs semaines. Les mesures de radioactivité ont été effectuées

in vivo par comptage gamma. Des autoradiogrammes ont été réalisés afin de déterminer la distribution tissulaire des Np^{110m}Ag et de l'ion ^{110m}Ag_{Dis}. Dans les deux cas, 65 % du contenu est éliminé rapidement avec une demi-vie biologique de 4 jours. Le reste est éliminé plus lentement avec une demi-vie de 20 ± 10 jours pour la forme dissoute et de $32,5 \pm 14$ jours pour les Np. Les distributions tissulaires sont relativement semblables, sauf pour quelques points chauds observés pour les Np dans l'hépatopancréas. On observe en particulier une forte agrégation sur le bouclier gastrique pour les GNP^{110m}Ag(0). On remarque également une légère accumulation d'argent dans le cœur et les reins. Il semble qu'un mécanisme d'encapsulation des Np intervienne. De plus, il est possible que le polymère enrobant les Np se dégrade et que les Np soient en partie oxydées par les enzymes digestives du pétoncle. Un mécanisme d'encapsulation des Np expliquerait leur accumulation dans ces organes spécifiques; il demeure par conséquent un point important pour de futures études écotoxicologiques.

Mots clés : bioaccumulation, *Chlamys islandica*, nanoparticule, argent, taille, exposition, accumulation, élimination, radiomarquage.

3.2. INTRODUCTION

L'intérêt pour les nanotechnologies a pris son essor au cours des années 80 avec l'apparition du microscope à effet tunnel (Hunt, 2004). Depuis le début des années 90, la science des nanomatériaux s'est implantée dans les nouvelles technologies de pointe et a trouvé ainsi de nombreuses applications dans les domaines de l'industrie et de la médecine (Bystrzejska-Piotrowska *et al.*, 2009). En 2004, la production annuelle mondiale de nanomatériaux a été estimée à 1000 tonnes (Maynard, 2006), et on estime à plus de 800 le nombre de produits sur le marché contenant des nanomatériaux (Maynard, 2006). De plus, le marché de la nanotechnologie a été estimé à 700 milliards \$ en 2008 et est évalué à plus de 1 trillion \$ en 2015 (SCENIHR, 2006). Face à ce boom technologique, une question importante se pose : quels seront les risques environnementaux liés aux nanoparticules anthropiques (Np) ?

Pour être en conformité avec la communauté scientifique, les nanoparticules (Np) sont définies ici comme étant toute particule dont une ou plusieurs dimensions sont égales ou inférieures à 100 nm (Roco, 2003; BSI, 2005). À cause de cette petite taille et de leur surface, les Np ont un comportement faisant appel aux lois de la physique quantique. Celui-ci dépend avant tout de leur taille, leur forme, leur composition chimique, leur densité, leur niveau d'agrégation et leur chimie de surface (Borm *et al.*, 2006). Ces caractéristiques physico-chimiques contrôlent également leur disponibilité pour les organismes et leur toxicité (Nel *et al.*, 2006).

La classification des nanomatériaux continue d'évoluer. Généralement, le matériau est classé en fonction de son origine, de sa fixation (dans une structure ou librement), de sa forme et de sa composition. Les nanoparticules sont incorporées dans de nombreux produits d'utilisation quotidienne, par exemple des agents opacifiants, des catalyseurs, des produits pharmaceutiques, des lubrifiants, des cosmétiques, des appareils électroniques ou d'autres appareils domestiques (Nel *et al.*, 2006; Erickson, 2009). Les nanoparticules d'argent (NpAg) peuvent s'incorporer au plastique utilisé dans les contenants de nourriture, les

bouteilles d'eau, les comptoirs et les revêtements de sol (Erickson, 2009). Elles sont utilisées pour leurs propriétés antibactériennes et fongiques (Weir *et al.*, 2008). Tout comme les Np de cuivre, elles sont connues pour limiter la croissance des micro-organismes et elles pourraient ainsi devenir les nouveaux nanobiocides des prochaines années (Yoon *et al.*, 2007). L'argent a été décrit comme oligodynamique, dû à sa propriété de bactéricide à faible concentration (Nair et Laurencin, 2007). Actuellement, on peut retrouver des NpAg comme agent antimicrobien dans les appareils domestiques (par exemple, certains réfrigérateurs, aspirateurs et systèmes d'air conditionné), les peintures, les textiles, les plastiques et les vernis (Nair et Laurencin, 2007; Blaser *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008; Schmid et Riediker, 2008). Des études ont montré qu'il existe des limitations à l'application de l'argent sous forme ionique. En effet, Panáček *et al.* (2006) ont évalué que les propriétés antibactériennes des NpAg (25-50 nm) sont plus importantes que celles de l'argent dissous ($\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$), y compris pour les souches qui montrent une résistance multidrogue (RMD). Comparativement à l'ion argent, les NpAg de 25 nm montrent l'activité la plus importante. D'autres études ont démontré la capacité des NpAg à améliorer l'activité antibactérienne des antibiotiques (Shahverdi *et al.*, 2007). Morones *et al.* (2005) ont étudié l'effet de la taille des NpAg pour différents types de bactéries. Cette étude a démontré que l'activité antibactérienne des particules augmentait avec la diminution de leur taille. Pal *et al.* (2007) ont investigué l'influence de la forme (bâtonnet et triangle plat tronqué) des NpAg sur leur activité antibactérienne. L'étude révèle une différence significative dans l'activité antibactérienne où les particules triangulaires ont été les plus actives. Bien que certaines Np soient toxiques (Oberdorster *et al.*, 2005), leurs mécanismes de toxicité restent très mal connus à ce jour (Navarro *et al.*, 2008b; Nowack et Bucheli, 2007). Il est en effet très difficile de suivre les Np dans les compartiments environnementaux, où les effets antimicrobiens et biocides peuvent avoir des conséquences importantes. Le Federal Insecticide, Fungicide & Rodenticide Act (FIFRA) des États-Unis se préoccupe du devenir des NpAg dans l'environnement. Les antimicrobiens font partie de la classe des pesticides et l'on prévoit de les assujettir à une nouvelle réglementation dans les prochaines années (Erickson, 2009).

Les risques environnementaux associés aux nanotechnologies émergentes sont liés à une bioaccumulation possible des nanoparticules et autres nanomatériaux dans les écosystèmes naturels, par l'intermédiaire des eaux usées urbaines et industrielles (Hannah et Thompson, 2008). Plusieurs auteurs ont souligné le besoin urgent d'une nouvelle approche pour la caractérisation de ces nanoparticules dans l'environnement marin (Erickson, 2009). C'est pourquoi nous présentons ici une méthode de suivi des NpAg par radiomarquage, c'est-à-dire par l'utilisation du marquage radioactif de nanomatériaux, qui permet de suivre le comportement de nanoparticules dans divers compartiments environnementaux. Une technique de radiomarquage des NpAg a été décrite au chapitre 2 de ce mémoire. Dans le présent chapitre, nous proposons l'application de cette technique à l'étude de la bioaccumulation et de l'élimination de l'argent dissous et des nanoparticules d'argent chez un invertébré marin d'intérêt commercial, le pétoncle d'Islande (*Chlamys islandica*), organisme très utilisé et régulièrement pêché par l'Institut Maurice-Lamontagne. Le choix de cet organisme modèle repose sur sa capacité de filtrer un grand volume d'eau et donc d'accumuler les contaminants dissous ou en suspension dans l'eau. Il est important de découvrir si les nanoparticules se comportent comme une substance dissoute ou non. Il est aussi très important de quantifier les vitesses de bioaccumulation et de dépuration de ces nanoparticules, afin d'estimer leur impact possible sur la santé des organismes filtreurs et des autres organismes marins éventuellement exposés à ces composés.

3.3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.3.1. ORGANISME, RADIOTRACEUR ET PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE

Les pétoncles d'Islande ont été récoltés par le personnel technique de l'Institut Maurice-Lamontagne au large du Havre-Saint-Pierre et des îles Mingan, dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent (Québec, Canada). Avant chaque expérience, les individus ont été acclimatés et maintenus dans un bassin de 400 L d'eau de mer en circuit ouvert. La température de l'eau de mer y était de 6-8°C et sa salinité variait entre 26-28. Lors de l'exposition, chaque groupe de pétoncles a été placé dans un aquarium en verre avec 30 L d'eau de mer filtrée sur des membranes de 0,45 µm et constamment oxygénée par bullage. Le cycle de lumière a été réglé à 12 h/12 h (jour/nuit). Les pétoncles d'Islande ont été

semaines pour les GNP^{110m}Ag(0). Les autres organismes ont été conservés en cas de mortalité.

3.3.2. RADIOANALYSE ET TRAITEMENT DES DONNÉES

La présence et la concentration du radiotracer ont été suivies par comptage gamma avec un détecteur gamma NaI(Tl) Canberra®, comme décrit par Rouleau *et al.* (1998, 2001). Lors de l'accumulation, la radioactivité a été mesurée dans l'eau à différents intervalles de temps. Le premier comptage gamma de l'eau dans l'aquarium a été effectué 30 min après l'addition du radiotracer, ce qui représente le temps zéro de l'accumulation (t_{0Acc}). Les autres comptages gamma du ^{110m}Ag dans l'eau ont été pris aux temps $t_{0Acc} + 1$ h, $t_{0Acc} + 3$ h, $t_{0Acc} + 4$ h, $t_{0Acc} + 9$ h et $t_{0Acc} + 12$ h. Au temps t_{0Acc} , les organismes ont été plongés dans l'eau radiomarquée. Les comptages gamma *in vivo* des pétoncles ont été effectués aux temps $t_0 + 3$ h, $t_0 + 4$ h, $t_0 + 9$ h et $t_0 + 12$ h. À la fin de la contamination, les pétoncles ont été placés dans des aquariums d'eau non-radiomarquée, ce qui correspond au temps zéro de l'élimination (t_{0Eli}). Les comptages gamma *in vivo* ont été pris trois fois lors de la première journée d'élimination, à $t_{0Eli} + 10$ h, $t_{0Eli} + 15$ h 30 et $t_{0Eli} + 23$ h 30. Par la suite, les comptages gamma de chaque individu ont été effectués une fois par jour durant la première semaine et trois fois par semaine durant les semaines suivantes.

Le détecteur a été calibré avec un standard de pétoncles contaminés par du ^{110m}Ag. Ce standard permettait d'évaluer l'efficacité de comptage de notre détecteur en fonction de la géométrie propre au pétoncle d'Islande. Le temps de comptage était compris entre 2 et 4 minutes pour chaque pétoncle. Le temps a été adapté afin de réduire l'erreur de comptage à moins de 5 %.

3.3.3. MODÈLES CINÉTIQUES D'ACCUMULATION ET D'ÉLIMINATION

Les constantes cinétiques d'accumulation ont été calculées suivant la méthode de Borretzen et Salbu (2009), qui est une approche courante dans l'évaluation de la biodisponibilité d'un contaminant. Comme il a été démontré, la croissance d'un organisme est négligeable lors d'une courte période d'accumulation (Wang *et al.*, 1996), et l'élimination est aussi négligeable devant l'accumulation d'un contaminant. Ainsi, la concentration d'un contaminant dans un organisme peut être exprimée seulement en fonction du contaminant marqué dans l'eau (Borretzen et Salbu, 2009). Nous posons l'hypothèse que le processus cinétique est d'ordre zéro et qu'il peut être décrit par l'équation :

$$\left(\frac{dC_A}{dt} \right) = k_{up} \cdot C_w \quad (1)$$

,où C_A est la concentration du contaminant dans l'organisme en activité par masse de tissus mous en Bq.kg^{-1} , et C_w , la concentration du contaminant dans l'environnement de l'organisme. Ici, C_w est la concentration de $^{110\text{m}}\text{Ag}$ dans l'eau [Bq.L^{-1}], alors que k_{up} est la constante de vitesse d'accumulation du contaminant par unité de masse de tissus mous humides [$\text{mL.g}_{d.w.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$].

Dans un système fermé comme le nôtre, C_w dépend du temps et diminue durant la sorption et l'accumulation dans l'organisme. De ce fait, l'équation se transforme de la façon suivante :

$$C_A = k_{up} \int C_w dt \quad (2)$$

$\int C_w dt$ est calculé à partir d'un graphique de C_w dt à l'aide de la règle trapézoïdale.

Lors de l'élimination, les organismes ont été transférés dans des aquariums d'eau de mer à circuit ouvert. L'élimination s'est effectuée en deux étapes : une étape rapide et une seconde étape plus lente. Ainsi, la concentration totale du contaminant radiomarqué dans l'organisme durant l'élimination est exprimée de la façon suivante :

$$C_A = C_1 e^{-k_{e1} \cdot t} + C_2 e^{-k_{e2} \cdot t} \quad (3)$$

,où C_1 et C_2 sont les quantités (ou pourcentages) d'argent dans les compartiments C1 et C2 respectifs, tandis que k_{e1} et k_{e2} sont les constantes de vitesse d'élimination de chaque compartiment. Les constantes cinétiques (k_{e1} et k_{e2}) ont été calculées par régression non linéaire avec le logiciel LabFit®.

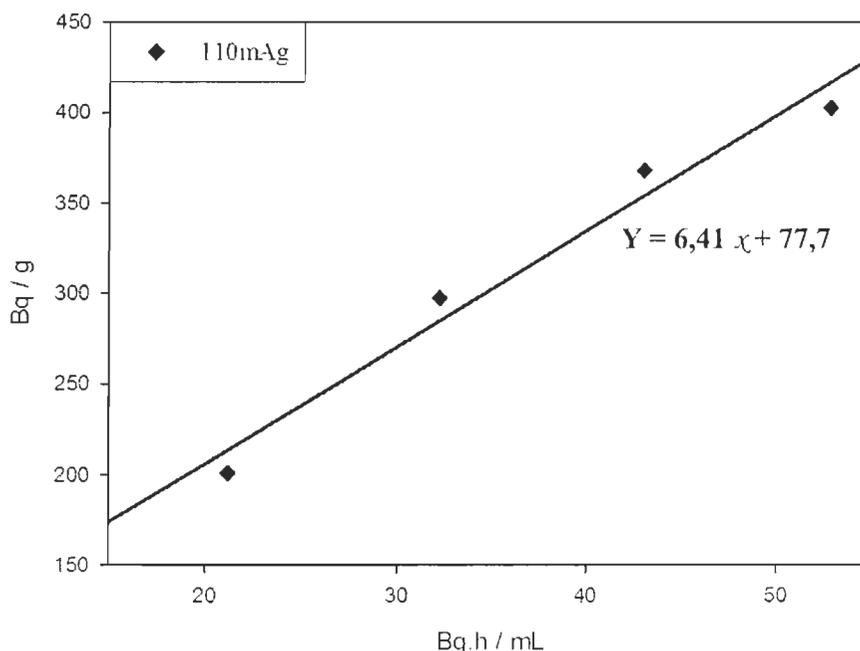


Figure 19 : Calcul de la constante de vitesse lors de l'accumulation par régression linéaire avec C_A en fonction de $\int C_w dt$, où k_{up} est la pente de la droite et x est $\int C_w dt$.

Dans cette figure (figure 19), $\int C_w dt$ est la concentration du radiomarqueur dans l'eau intégrée en fonction du temps. $\int C_w dt$ est une donnée expérimentale calculée grâce aux mesures par comptage gamma effectuées en laboratoire. À partir de celle-ci, k_{up} est obtenu par une régression linéaire en traçant C_0 en fonction de $\int C_w dt$, comme montré à la figure 19.

3.3.4. AUTORADIOGRAPHIE

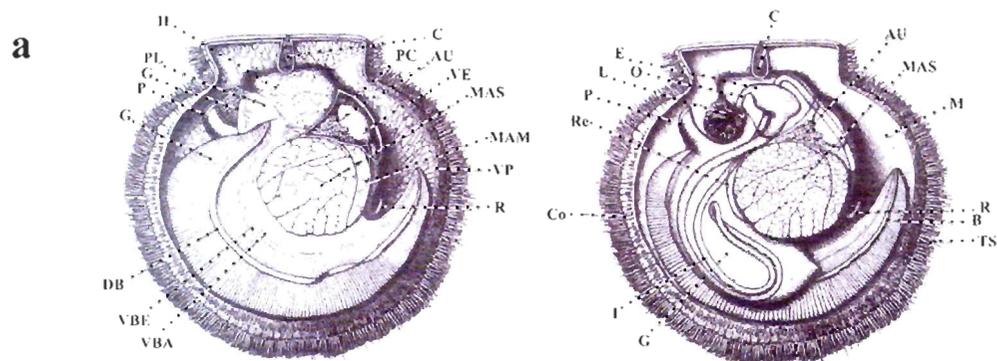
Les tissus des pétoncles ont été détachés de leur coquille, inclus dans un gel de carboxyméthyle de cellulose puis gelés à l'azote liquide. Il en a résulté un bloc qui a été sectionné avec un cryomicrotome (Leica CN 3600). Chaque section avait une épaisseur de

50 μm , et chacune a été lyophilisée durant 36 h à -25°C . Par la suite, les sections ont été exposées, durant une semaine, sur des écrans au phosphore qui ont été balayés avec un Cyclone Phosphor Imager (Packard BioScience). Les images des tissus ont été découpées pour mesurer la quantité de lumière par unité digitale par mm^2 (digital light unit per mm^2 ; $\text{DLU}\cdot\text{mm}^{-2}$) avec le logiciel Optiquant 4.0 (Canberra-Packard). La quantification de la radioactivité a été déterminée par l'indice de concentration (I_C) (Rouleau *et al.*, 2000), calculé suivant l'équation :

$$I_C = \frac{[^{110m}\text{Ag}]_{\text{dans le tissu}}}{[^{110m}\text{Ag}]_{\text{dans l'organisme entier}}} \quad (5)$$

Dans le but d'identifier les principaux organes de l'animal modèle, la figure 20-a présente une coupe schématique d'un pétoncle. La figure 20-b présente quant à elle un pétoncle exposé au $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$. La figure 20-b-1 est la photo de la section du pétoncle présentée en autoradiographie dans la figure 20-b-2. L'autoradiogramme présenté est pour un individu exposé pendant 12 h aux $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$. Il est possible de visualiser l'organisme complet grâce à l'absorption des $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$ dans tous les tissus. Ainsi, on observe distinctement sur la figure 20-b-2 les branchies, le muscle, les reins, la gonade, et l'hépatopancréas. La concentration des $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}$ accumulées est visible grâce à l'intensité de couleur. L'échelle de couleur indique l'intensité des rayons émis par l'isotope $^{110\text{m}}\text{Ag}$. Ainsi, les faibles concentrations apparaissent en violet alors que les fortes concentrations se manifestent par la couleur noire.

À la fin des périodes d'exposition de 1, 6 (pour $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$) et 8 (pour $^{110\text{m}}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$ et $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}$) semaines d'élimination, deux pétoncles ont été sacrifiés et utilisés pour l'autoradiographie de l'organisme en entier suivant la méthode de Rouleau *et al.*, (2003).



Abréviations : AU, auricule; B, branchies; C, chondrophore; Co, coquille; DB courbe dorsale des filaments de branchies; E, estomac; G, gonade; H, hépatopancréas; I, intestin; L, lèvres; M, manteau; MAS, muscle adducteur strié; MAM, muscle adducteur moelleux; O, œsophage; P, pied; PC, pericardium; PL, palléal palpe; R, rectum; Re, reins; TS, tentacules sensoriels; VBA, vaisseaux branchiaux afférents; VBE, vaisseaux branchiaux efférents; VE, vélum; VP, vaisseaux palléal.

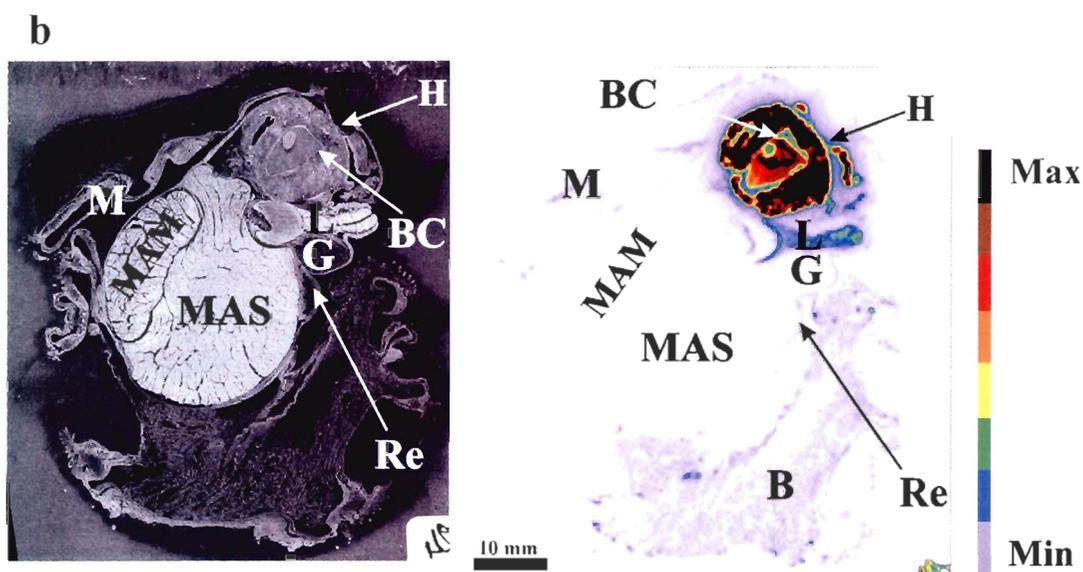


Figure 20 : -a- Anatomie générale du pétoncle (modifié de Shumway *et al.*, 2006) ; - b- À gauche : photo d'une section de pétoncle d'Islande exposé pendant 12h aux PNP^{110m}Ag; à droite : l'autoradiogramme correspondant.

3.3.5. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses effectuées pour ces données sont des analyses de variance (ANOVA) pour les vitesses de bioaccumulation et la taille de chaque compartiment lors de l'élimination. Lorsque le test d'égalité des variances n'était pas nul, les données ont été transformées en log. Pour celles qui ne satisfaisaient pas au test d'égalité des variances après transformation, nous avons utilisé le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel StatistiXL 1.8.

3.4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

La bioaccumulation désigne la capacité des espèces vivantes à absorber et concentrer des éléments dans tout ou une partie de leur organisme, c'est-à-dire dans la partie vivante telle que les tissus mous ou/et dans la partie inerte telle que la coquille du pétoncle. Chez un même organisme, cette capacité peut fortement varier selon l'âge, l'état de santé et certains facteurs externes (saison, teneur du milieu en nutriments, température, etc.). Les filtreurs sont bien adaptés pour étudier l'écotoxicologie des Np métalliques.

3.4.1. CINÉTIQUE D'ACCUMULATION ET D'ÉLIMINATION DE TROIS FORMES DE L'ARGENT, MESURÉE PAR COMPTAGE GAMMA IN VIVO

✓ L'accumulation

Les figure 21 et 22 montrent les résultats de l'accumulation pour les expositions de pétoncles à trois formes d'argent différentes : $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$, $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ et $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$. À l'aide de l'équation 2, la valeur de k_{up} a été calculée pour chaque individu. Les valeurs moyennes étaient respectivement de $8,8 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $7,83 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et $5,52 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour l'ion $^{110m}\text{Ag}_{\text{Dis}}$, les $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ et les $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ (tableau 2 et figure 22). Les valeurs de k_{up} ne diffèrent pas significativement, bien que l'on observe une tendance à la baisse de la vitesse d'accumulation en fonction de la taille des Np (tableau 2).

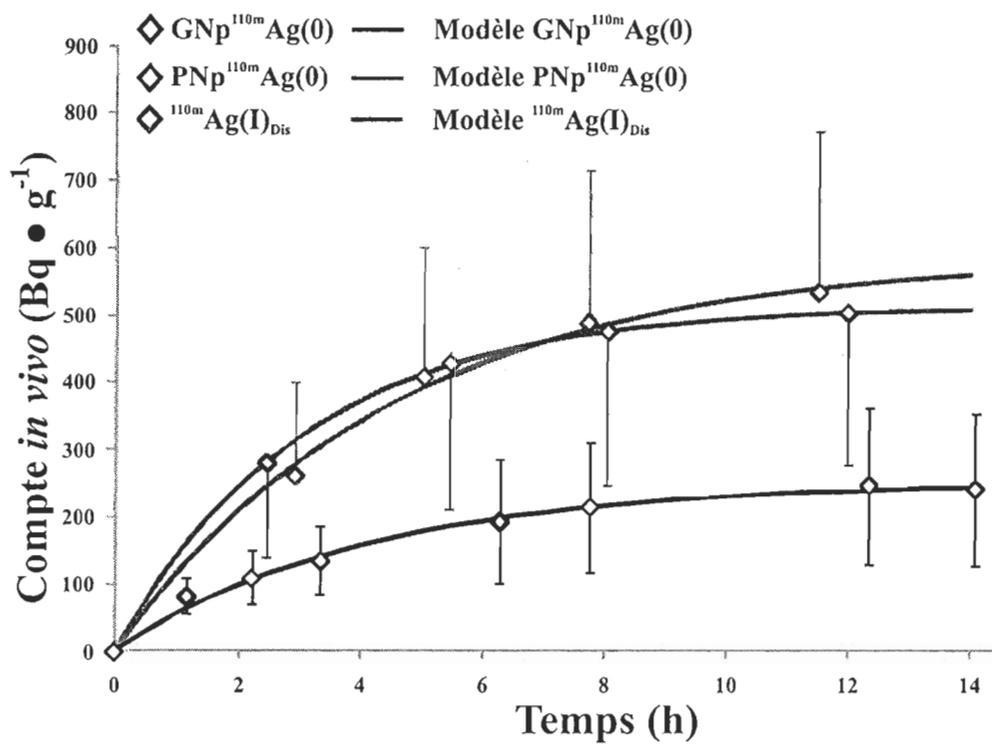


Figure 21 : Courbe d'accumulation des trois formes de l'argent

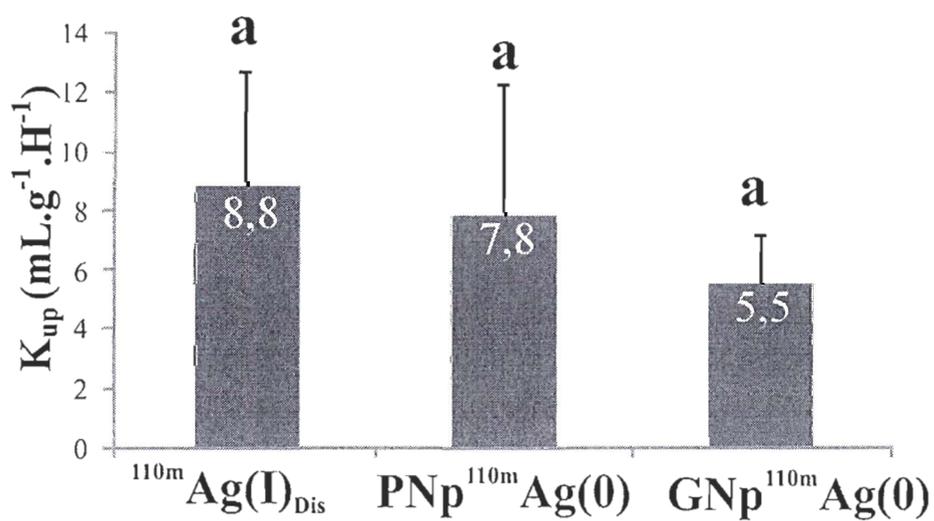


Figure 22 : Constante de vitesse d'accumulation (K_{up}) des trois formes de l'argent.

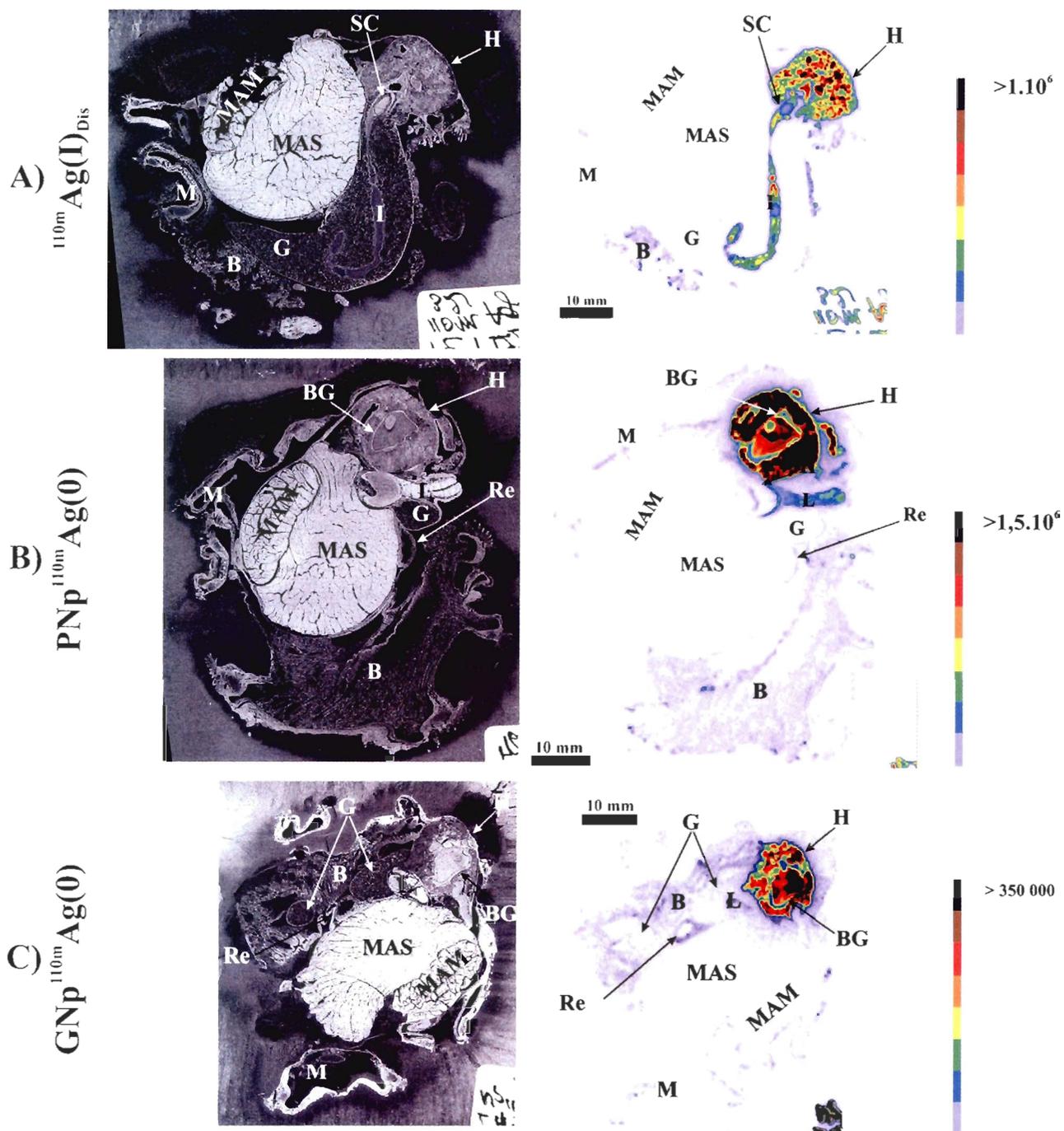
	Ag(I) dissous			Petite NpAg(0)			Grosse NpAg(0)		
Accumulation	K_{up}	$t_{0,5}$	$t_{0,95}$	K_{up}	$t_{0,5}$	$t_{0,95}$	K_{up}	$t_{0,5}$	$t_{0,95}$
	(Bq.g tissus ⁻¹ . h ⁻¹)	(h)	(h)	(Bq.g tissus ⁻¹ . h ⁻¹)	(h)	(h)	(Bq.g tissus ⁻¹ . h ⁻¹)	(h)	(h)
	8,80 ± 3,92	3,2	13,7	7,83 ± 4,45	2,1	9,3	5,52 ± 1,69	2,8	12
Élimination	K_e	$t_{0,5}$	$t_{0,95}$	K_e	$t_{0,5}$	$t_{0,95}$	K_e	$t_{0,5}$	$t_{0,95}$
	(j ⁻¹)	(j)	(j)	(j ⁻¹)	(j)	(j)	(j ⁻¹)	(j)	(j)
1 ^{er} compartiment	0,202 ± 0,026	4,1	17,8	0,183 ± 0,014	3,8	16,4	1,08 ± 1,33	0,8	3,6
2 ^{ème} compartiment	0,034 ± 0,004	23,4	101,2	0,024 ± 0,031	28,7	124,3	0,050 ± 0,022	14,3	61,9
A (%)	64,5 ± 6,3			65,6 ± 3,1			31,0 ± 2,0		
C (%)	28,5 ± 6,7			30,5 ± 3,4			66,3 ± 1,7		

Tableau 2 : Constante de vitesse d'accumulation et d'élimination, temps de demie-vie et de 95 %, taille des compartiments lors de l'élimination.

✓ **Distribution tissulaire à la fin de l'accumulation**

Pour l'ensemble des formes de l'argent, la distribution tissulaire lors de l'accumulation est majoritairement concentrée dans l'hépatopancréas. Toutefois, la distribution dans cette région apparaît différente pour chaque forme de l'argent. En effet, la distribution de l'ion $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$ est homogène (figure 23-A), tandis que la distribution des $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ présente des points chauds supérieurs à 2.10^7 $\text{DLU}\cdot\text{mm}^{-2}$ et une concentration des $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ sur le bouclier gastrique (figure 23-B). La distribution des $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ présente une distribution plus hétérogène qui peut éventuellement prendre la forme d'agrégats concentrés sur le bouclier gastrique, comme le montre la figure 24-C.

D'autre part, la figure 24 présente les indices de concentration (I_c en $\text{DLU}\cdot\text{mm}^{-2}$) par organe pour chaque individu et pour chaque forme de l'argent à la fin de l'accumulation. On remarque que tous les organes sont radiomarqués par l'argent. Cependant, une prépondérance apparaît nettement pour le système digestif. La quantité d'activité de l'isotope, pour chaque forme de l'argent, est principalement concentrée dans l'hépatopancréas. De plus, l' I_c du bouclier gastrique est plus élevé pour l'ion $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$ que pour les autres formes de l'argent.



Abréviations : B, branchies; BG, bouclier gastrique; G, gonade; H, hépatopancréas; I, intestin; L, lèvres; M, manteau; MAS, muscle adducteur strié; MAM, muscle adducteur moelleux; R, rectum; Re, reins

Figure 23 : Autoradiogrammes à la fin de l'accumulation. Les images de la colonne gauche sont les photos des sections des autoradiogrammes de la colonne de droite. A) exposition au $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$; B) exposition aux $\text{PNP } ^{110m}\text{Ag(0)}$; C) exposition au $\text{GNP } ^{110m}\text{Ag(0)}$.

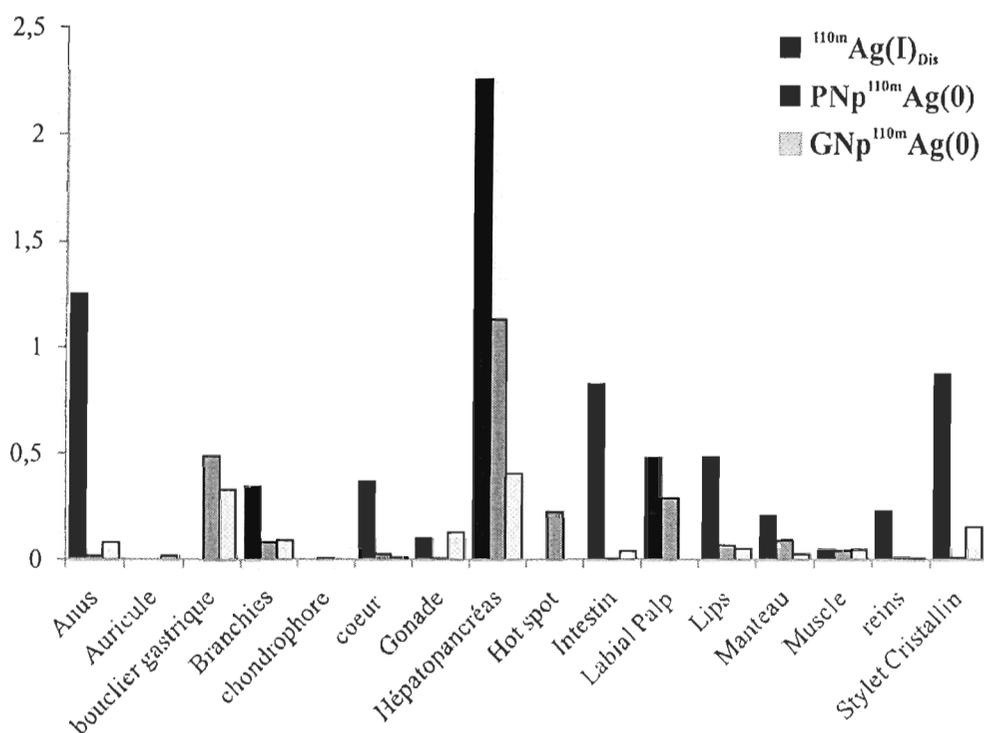


Figure 24 : Indice de concentration (Ic) de chaque organe après 12 h d'accumulation.

✓ Élimination

La cinétique de bioaccumulation des trois formes de l'argent a été similaire. Une différence a seulement été observée lors de l'élimination. En effet, la figure 25 présente les courbes d'élimination pour les trois formes de l'argent, et l'on peut y observer que l'élimination des $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$, que représente la courbe noire, est plus rapide que les deux autres éliminations. Pour toutes les formes de l'argent, l'élimination s'est effectuée en deux étapes.

La première étape d'élimination a été cinq fois plus rapide pour les $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ que pour l'ion $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$ et les $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$. En effet, les constantes de vitesse ont été pour l'ion $^{110m}\text{Ag}_{\text{Dis}}$ un k_{el} de $0,29 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et pour les $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ un k_{el} de $0,194 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, tandis que pour les $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ le k_{el} a été 4 à 6 fois plus rapide avec une valeur de $1,08 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. D'autre part, 65,6 % des $\text{PNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ et 64,5 % de l'ion $^{110m}\text{Ag}_{\text{Dis}}$ ont été éliminés en 16 et 18 jours, respectivement, alors que 31 % des $\text{GNp}^{110m}\text{Ag(0)}$ contenues dans les pétoncles ont été éliminées en 3-4 jours (tableau 2).

La seconde étape d'élimination fut plus lente. Le temps de demi-vie biologique ($t_{0,5}$) pour l'argent dissous $^{110m}\text{Ag}(\text{I})_{\text{Dis}}$ et les $\text{PNp}^{110m}\text{Ag}(0)$ a été respectivement de 23 et 29 jours, tandis que pour les $\text{GNp}^{110m}\text{Ag}(0)$, le $t_{0,5}$ a été de 14 jours, ce qui est presque deux fois plus court que pour les deux autres composés (tableau 2).

Les analyses statistiques ont permis de voir des différences significatives entre les trois expositions. Ainsi, le premier compartiment des $\text{GNp}^{110m}\text{Ag}(0)$ est significativement différent de ceux pour l'ion $^{110m}\text{Ag}(\text{I})_{\text{Dis}}$, et les $\text{PNp}^{110m}\text{Ag}(0)$ ($p = 0,028$, $p = 0,002$, respectivement). Cela est également vrai pour le second compartiment ($p = 0,017$, $p = 0,002$, respectivement pour l'ion $^{110m}\text{Ag}(\text{I})_{\text{Dis}}$ et les $\text{PNp}^{110m}\text{Ag}(0)$).

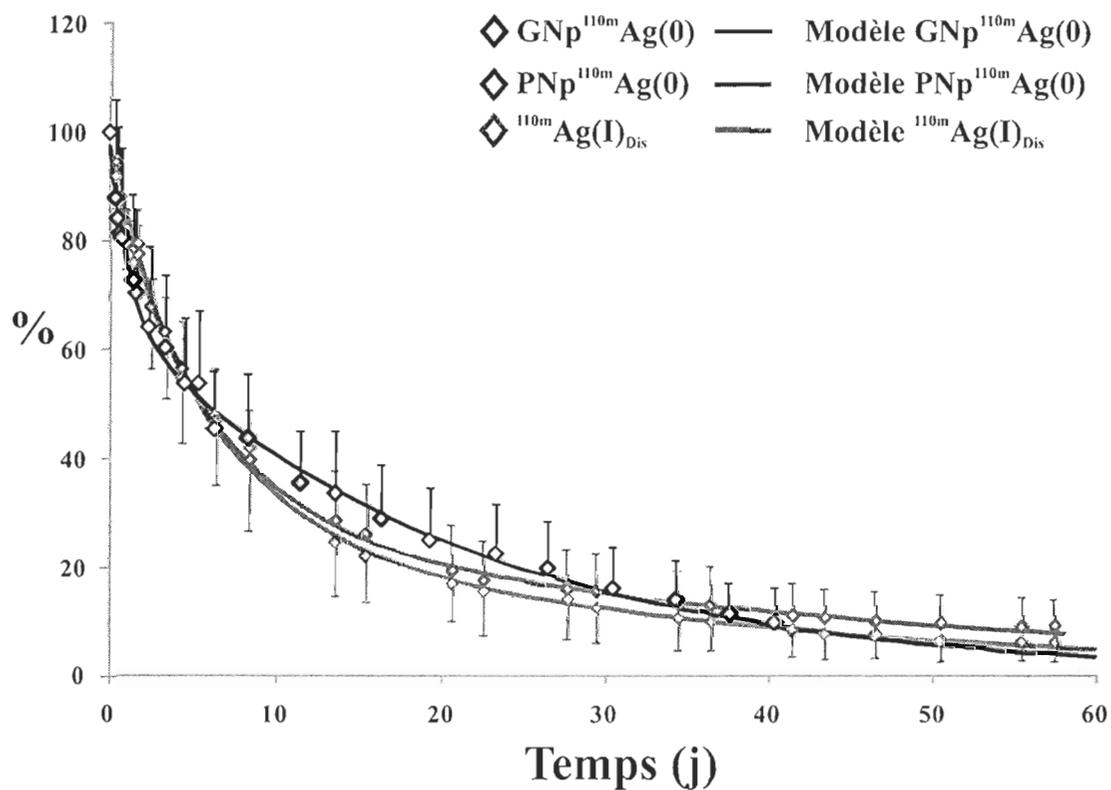
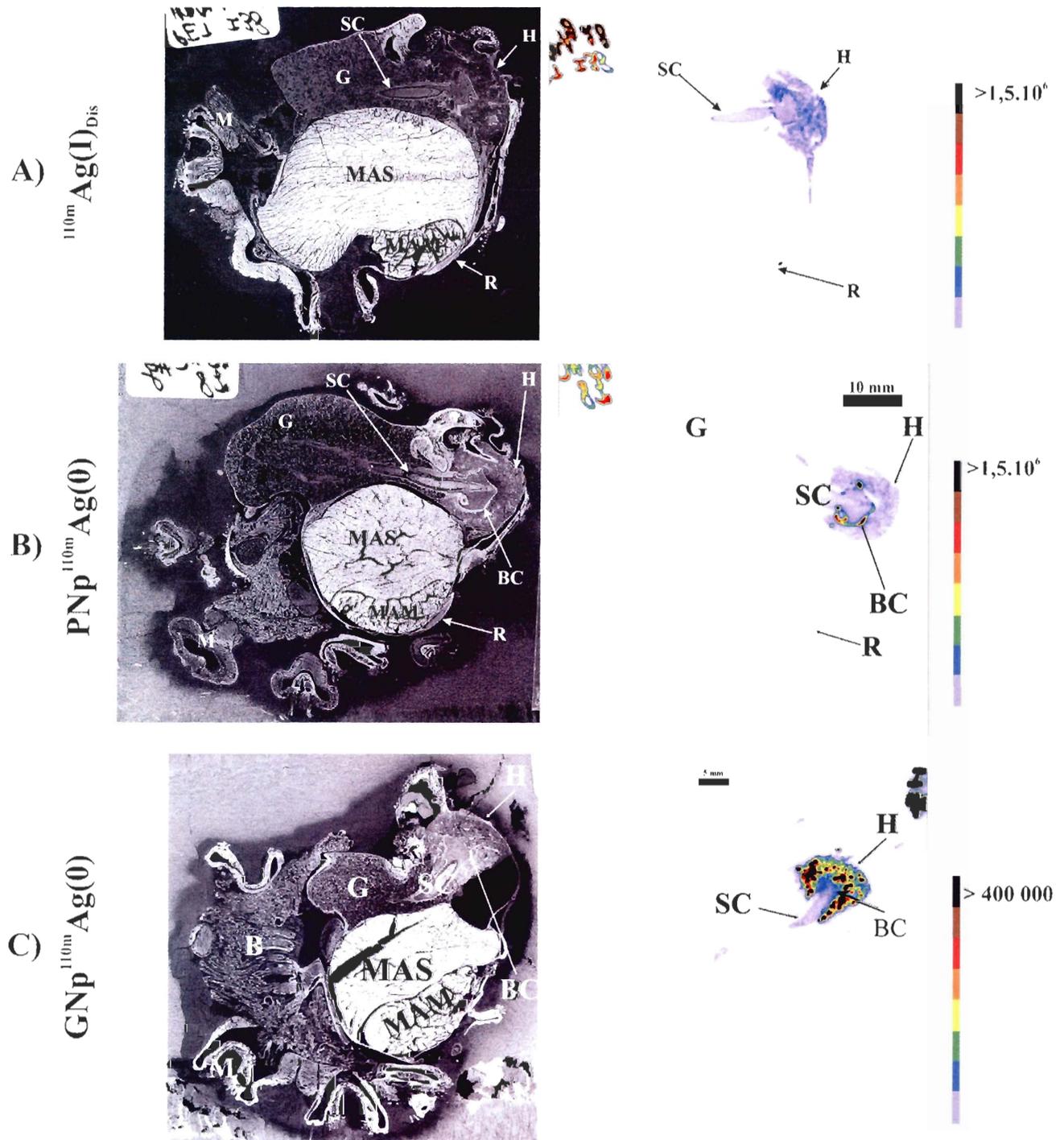


Figure 25 : Courbes d'élimination des trois formes de l'argent.

D'autre part, le k_{el} des $GNp^{110m}Ag(0)$ est significativement différent des vitesses d'élimination de l'ion $^{110m}Ag(I)_{Dis}$ et des $PNp^{110m}Ag(0)$ ($p = 0,028$ et $p = 0,002$, respectivement), tandis que les k_{el} de ces derniers ne montrent aucune différence significative. Pour la seconde étape d'élimination, la constante de vitesse d'élimination (K_{e2}) des $PNp^{110m}Ag(0)$ est significativement différente de celle de $GNp^{110m}Ag(0)$ ($p = 0,002$), tandis que l'ion $^{110m}Ag(I)_{Dis}$ ne montre pas de différence significative, ni par rapport aux $PNp^{110m}Ag(0)$, ni avec les $GNp^{110m}Ag(0)$. Il apparaît donc que l'élimination est différente pour les $GNp^{110m}Ag(0)$. À la lumière de ces résultats, on peut se demander quels sont les phénomènes qui interviennent lors de l'élimination ou quels sont les mécanismes de séquestration. L'étude de la distribution tissulaire, qui permet d'évaluer le comportement des trois formes de l'argent dans l'organisme, répond à ce questionnement.

✓ **Distribution tissulaire après une semaine d'élimination**

La figure 26 présente les autoradiogrammes de pétoncles après une semaine d'élimination. On observe sur eux beaucoup moins d'organes. L'hépatopancréas et le stylet cristallin sont présents pour toutes les formes de l'argent. Le rectum est présent pour l'élimination de l'ion $^{110m}Ag(I)$ et des $PNp^{110m}Ag(0)$. Cela témoigne d'une élimination par excrétion des contaminants relativement rapide. En effet, on observe que les $Np^{110m}Ag(0)$ et l'ion $^{110m}Ag(I)_{Dis}$ ont été rapidement éliminés par tout l'organisme, à l'exception de l'hépatopancréas. Comme lors de l'accumulation, les $Np^{110m}Ag(0)$ sont restées principalement localisées sur le bouclier gastrique, tandis que l'ion $^{110m}Ag(I)_{Dis}$ a été absorbé de façon plus homogène dans l'hépatopancréas et sur le bouclier gastrique. La distribution des $GNp^{110m}Ag(0)$ dans l'hépatopancréas a été similaire à celle des $PNp^{110m}Ag(0)$. D'autre part, les intensités maximales ont été beaucoup plus importantes pour l'argent dissous et les petites Np , avec un $I_{max} > 1,5 \times 10^6$, tandis que celui pour l'exposition au $GNp^{110m}Ag$ a été $I_{max} > 400,000$. Cette observation est similaire à celle des autoradiogrammes à la fin de l'accumulation.



Abréviations : B, branchies; BG, bouclier gastrique; G, gonade; H, hépatopancréas; I, intestin; L, lèvres; M, manteau; MAS, muscle adducteur strié; MAM, muscle adducteur moelleux; R, rectum; Re, reins; SC, stylet cristallin

Figure 26 : Autoradiogrammes après une semaine d'élimination. Les images de la colonne gauche sont les photos des sections pour les autoradiogrammes de la colonne de droite. A) exposition au $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$; B) exposition aux $\text{PNp } ^{110m}\text{Ag(0)}$; C) exposition au $\text{GNp } ^{110m}\text{Ag(0)}$.

La figure 27 présente les indices de concentration (Ic) du radio-isotope pour chaque organe des pétoncles après une semaine d'élimination. L'Ic n'a pas de dimension. L'histogramme en noir représente l'Ic pour l'exposition à l'argent dissous, le gris foncé représente l'exposition aux $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ et le gris clair représente l'exposition aux $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$. Pour les trois formes de l'argent, l'Ic de l'hépatopancréas est important. De plus, le bouclier présente un important Ic pour les $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$, qui est légèrement présent pour l'argent dissous et complètement absent pour les $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$. Ainsi, pour toutes ses formes, l'activité de l'argent est principalement localisée dans l'hépatopancréas et l'intestin. La concentration de l'ion $^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{I})$ s'effectue majoritairement dans l'hépatopancréas, avec de légères concentrations dans le bouclier gastrique, le stylet cristallin et l'anus. Pour les deux formes de l'argent nanoparticulaire, la distribution de l'Ic est légèrement différente de celle observée pour les Ic de l'ion $^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{I})$. Comme pour ce dernier, les $\text{Np}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ sont, pour les deux formes, principalement concentrées dans l'hépatopancréas, le bouclier gastrique et l'intestin. Toutefois, on observe la présence des $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ dans le cœur et les lèvres, ainsi qu'une légère présence des $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ dans le muscle.

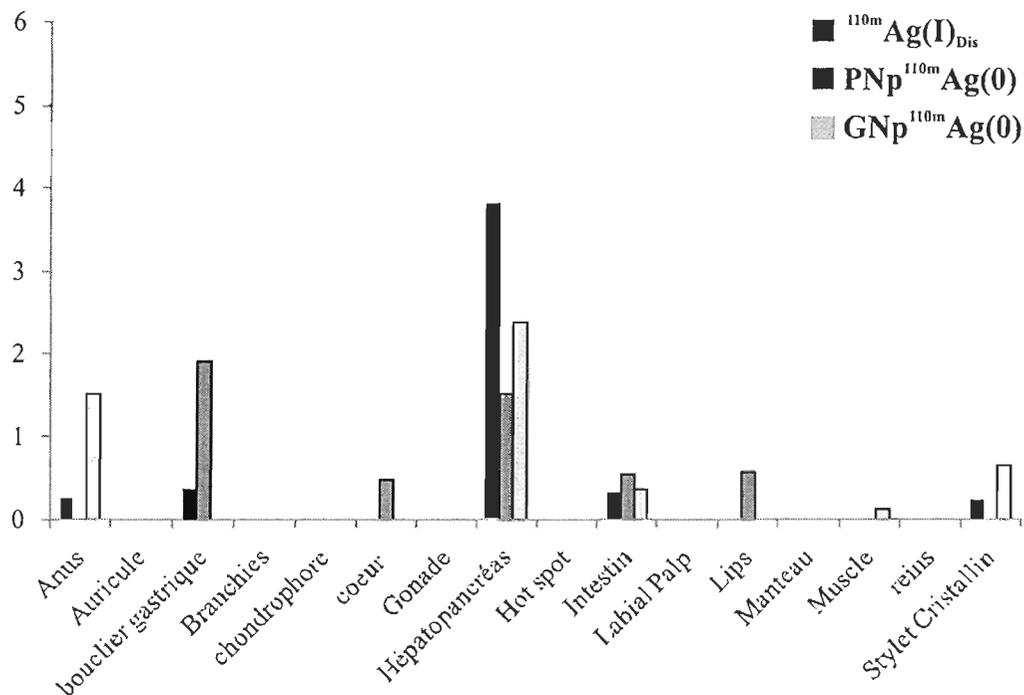
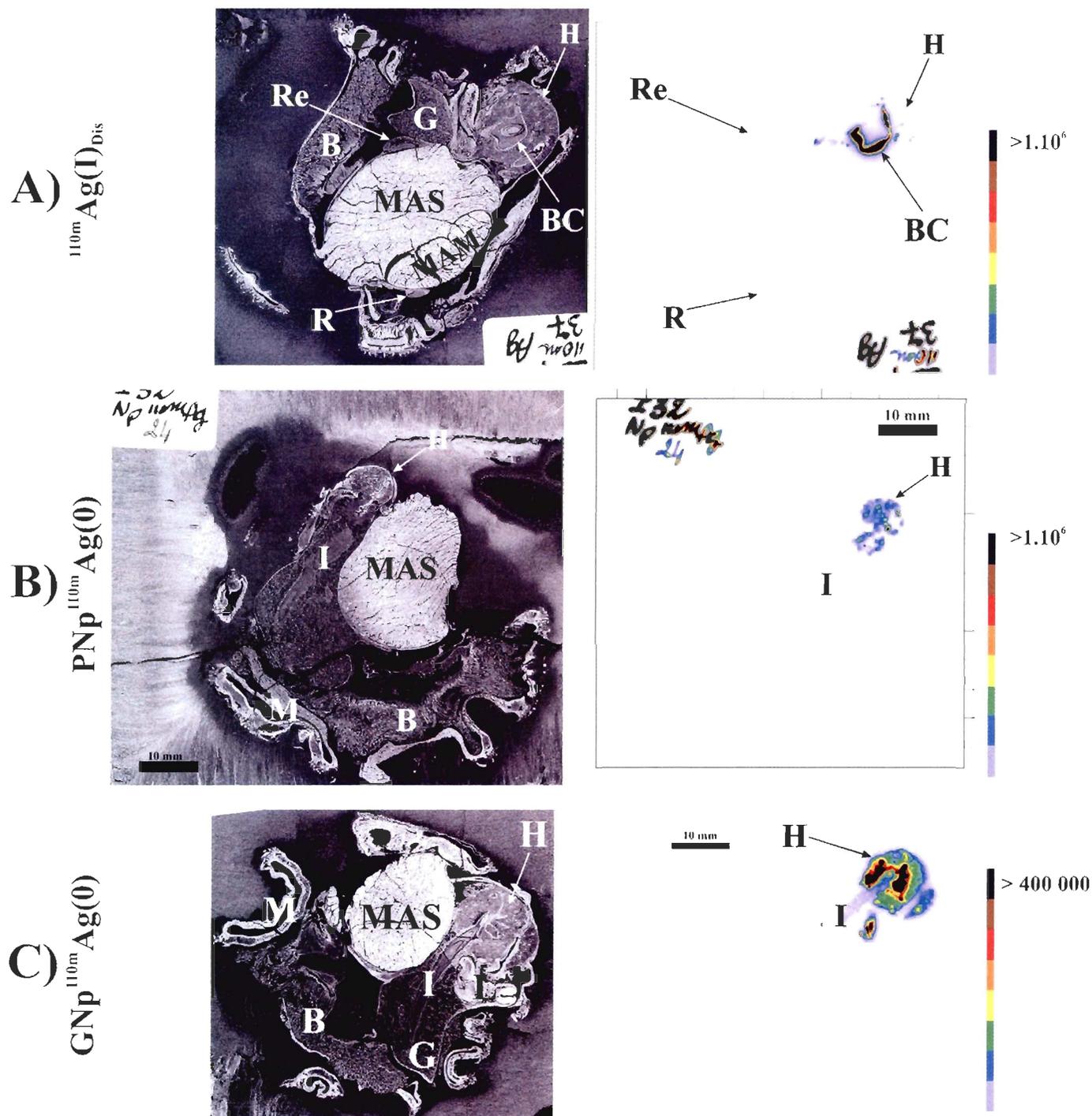


Figure 27 : Indice de concentration (Ic) de chaque organe après une semaine d'élimination.

✓ **Distribution tissulaire à la fin de l'élimination**

Comme indiqué précédemment, les temps d'élimination ont été différents en fonction de la taille des Np. En effet, les $\text{PNp } ^{110m}\text{Ag(0)}$ avaient un comportement similaire à l'ion $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$ et leur temps d'élimination a été de 8 semaines, tandis que le temps d'élimination pour les $\text{GNp } ^{110m}\text{Ag(0)}$ a été plus court, la quasi-totalité du métal ayant été éliminée en 6 semaines. De ce fait, on peut se demander quelle est la différence de distribution tissulaire qui explique qu'un tel phénomène se produise.



Abbreviations : B, branchies; BG, bouclier gastrique; G, gonade; H, hépatopancréas; I, intestin; L, lèvres; M, manteau; MAS, muscle adducteur strié; MAM, muscle adducteur moelleux; R, rectum; Re, reins

Figure 28 : Autoradiogrammes à la fin de l'élimination. Les images de la colonne gauche sont les photos des sections pour les autoradiogrammes de la colonne de droite. A) exposition au $^{110m}\text{Ag(I)}_{\text{Dis}}$; B) exposition aux $\text{PNp } ^{110m}\text{Ag(0)}$; C) exposition au $\text{GNp } ^{110m}\text{Ag(0)}$.

Les autoradiogrammes montrent l'activité encore présente dans les organes. L'hépatopancréas est présent pour toutes les expositions. L'intestin montre également de l'activité pour les deux sections où il se trouve. La section qui a été exposée à l'argent dissous montre une concentration de l'activité au niveau du bouclier gastrique. Dans la même section, il peut être observé une très légère présence d'argent dans le rein et le rectum. L'autoradiogramme pour les $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ présente une répartition de l'argent relativement homogène, contrairement à l'autoradiogramme pour les $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$.

Les sections présentées dans la figure 28 sont les résultats pour une section donnée à un niveau donné de l'organisme. Ce niveau ne peut pas représenter la totalité des sections de l'organisme, bien qu'il ait été choisi avec soin pour être le plus représentatif de ce qui peut être observé à travers l'organisme. C'est pourquoi l'indice de concentration devient important dans la comparaison des organes pour les différentes éliminations. La figure 29 présente les résultats des I_c mesurés pour la fin de l'élimination. Comme pour les autres étapes de la bioaccumulation, l' I_c est le plus important dans l'hépatopancréas, et ce pour toutes les formes de l'argent. L'intestin est présent également pour les trois formes, avec une intensité décroissante à partir des GNpAg jusqu'à la forme dissoute. Les I_c du stylet cristallin sont presque similaires pour les trois formes de l'argent. Dans la figure 29, les I_c indiquent que les organes présents sont l'hépatopancréas, le bouclier gastrique, les intestins, le stylet cristallin et l'anus. Les $\text{GNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ sont plus dispersées en agrégats sur le bouclier gastrique et elles sont plus rapidement éliminées que les $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$. Il est mis en évidence, dans les figures 28 et 29, que les $\text{PNp}^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ ont une présence non-négligeable sur le bouclier gastrique.

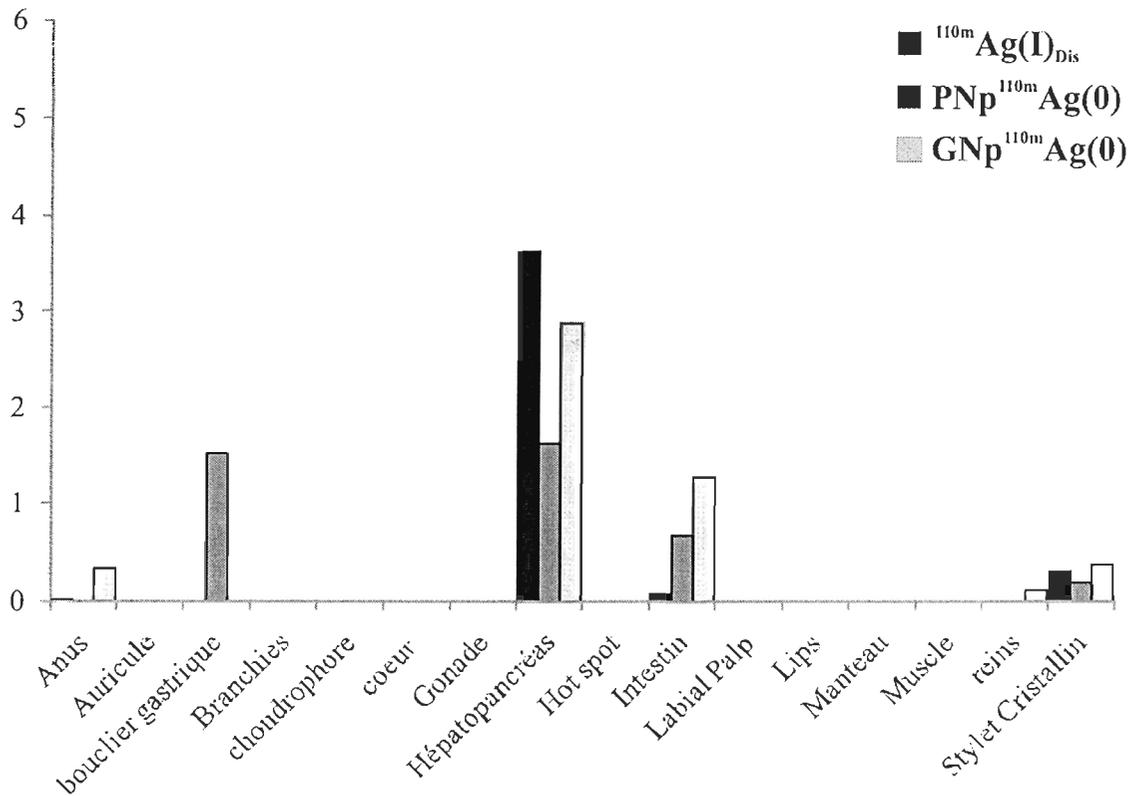


Figure 29 : Indice de concentration (Ic) de chaque organe à la fin de l'élimination.

3.4.2. LES MÉCANISMES D'ACTION DE L'HÉPATOPANCRÉAS SUR LES NPAG

Certains auteurs ont supposé pendant longtemps que la fonction principale du stylet cristallin consistait à faciliter le transit des filaments de mucus dans l'estomac (Purchon, 1977; Beninger et Le Penneec, 2006). Toutefois, la rotation du stylet, effectuée en coordination avec les battements ciliaires de l'estomac et de l'épithélium intestinal, accomplit deux fonctions importantes : (1) écraser les particules contre le bouclier gastrique situé à la tête du stylet cristallin, et (2) remanier le contenu de l'estomac pour le mettre en contact avec la zone de tri située sur la paroi interne de l'estomac (Purchon, 1977). D'autre part, le stylet cristallin libère périodiquement des enzymes qui font subir une dissolution partielle au contenu de l'estomac, et ainsi participe à la digestion extracellulaire (Beninger

et Le Pennec, 2006). Ainsi, les résultats de la distribution de l'argent chez le pétoncle d'Islande laissent croire que l'action mécanique du stylet cristallin contre le bouclier gastrique entraîne un écrasement des Np sur ce bouclier et correspond à la zone de tri du contenu de l'estomac. L'action mécanique permettrait d'enlever partiellement le polymère recouvrant les Np, et ainsi une liaison entre le bouclier gastrique et les Np pourrait se produire. Il serait possible que les Np ou le polymère se lient aux cellules gastriques par l'intermédiaire de leurs lipides, leurs sucres ou encore leurs protéines de surface. Comme l'ont démontré Lynch *et al.* (2006), il est aussi possible que les protéines s'adsorbent à la surface des Np par changement de conformation.

D'autre part, le polymère recouvrant les Np peut être digéré par les enzymes du stylet cristallin (Purchon, 1977). La digestion animale s'effectue grâce aux lysosomes, qui contiennent des enzymes digestives (hydrolases acides) et dégradent les molécules les plus complexes, comme les polymères (Lodish *et al.*, 2005). Ainsi, le polyallylamine recouvrant les Np peut être digéré par l'hydrolyse de la molécule. Lors de la digestion, les peroxysomes peuvent également être présents et ils ont pour rôle de dégrader les acides gras et les composés toxiques (Lodish *et al.*, 2005). Les peroxysomes contiennent des enzymes oxydantes qui permettent d'attaquer la molécule et de la détoxifier (Lodish *et al.*, 2005). En conséquence, l'action des enzymes peut engendrer une action de dissolution du polymère et/ou de la NpAg elle-même, ce qui permettrait d'avoir une dissolution partielle des Np et donc une remobilisation de l'argent ionique. D'ailleurs, Takenaka *et al.* (2001) ont démontré que les NpAg peuvent se retrouver dans le système cardiovasculaire du rat. Lors d'une exposition par inhalation, les travaux ont montré que les principaux organes accumulateurs chez lui sont les poumons. De plus, ils en ont trouvées une quantité significative dans le sang, le foie, les reins, la rate, le cerveau et le cœur des rats. Ainsi, il semble qu'aussitôt que les NpAg sont accumulées dans les organes filtreurs comme les poumons, elles puissent se retrouver dans le système cardio-vasculaire. Le cheminement des NpAg au travers le pétoncle d'Islande semble s'apparenter à ce processus, car l'essentiel des Np se retrouvent dans l'hépatopancréas. D'autre part, les *hots spots* peuvent être expliqués par une agrégation des Np $^{110m}\text{Ag}(0)$ dans le système digestif ou une

adsorption spécifique des Np 110m Ag(0) sur le bouclier gastrique et le stilet cristallin. Aucune observation directe de ces agrégats n'a été tentée dans les organes mentionnés.

D'après nos résultats, lors de l'exposition aux GNpAg, il semble se former de gros agrégats de Np dans l'hépatopancréas et un stockage sur le bouclier gastrique. Le temps de résidence du métal y est relativement long (6 à 8 semaines), et il laisse place à une longue digestion des contaminants.

Gagnon et Fisher (1997) ont démontré que les métaux associés aux particules enrobées de matière organique (MO) ont été généralement plus absorbés par les moules que ceux associés aux particules non-enrobées. Ainsi, ces auteurs suggèrent que les particules enrobées de MO subissent une digestion intracellulaire (relativement lente et intense), tandis que les particules inorganiques subissent une digestion extracellulaire. D'autres études ont rapporté des comportements similaires pour l'ingestion du Cd, Zn et Ag par des palourdes, où les particules ingérées ont été enrobées de substances organiques telles que des exopolymères bactériens et ont été traitées par la digestion glandulaire (Harvey et Luoma, 1985; Decho et Luoma, 1991, 1994). De ce fait, on peut suggérer qu'un même phénomène se produit avec l'absorption des NpAg enrobées du polymère PAAm par les pétoncles. Toutefois, aucune donnée ne permet de le confirmer actuellement.

En plus de ceux décrits précédemment, d'autres mécanismes, comme l'exocytose et l'apoptose, peuvent intervenir dans l'élimination des contaminants. L'exocytose est le mécanisme par lequel la cellule libère des biomolécules à travers sa membrane, et elle peut servir à éliminer les déchets. L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui peut se produire dans les cellules contaminées. Elle est caractérisée par une séquence bien définie de changements morphologiques. Les cellules agonisantes se rétractent, se condensent puis se fragmentent, libérant des corpuscules entourés d'une membrane. Ces corps apoptotiques finissent généralement par être intégrés par d'autres cellules spécialisées dans la détoxification (Lodish *et al*, 2005). Cette déformation de la cellule est observable au microscope. Les gènes impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire codent des protéines qui exercent trois fonctions différentes (Lodish *et al*, 2005):

- Les protéines tueuses sont nécessaires au déclenchement, par la cellule, du processus apoptotique.
- Les protéines destructives effectuent des tâches comme celle de digérer l'ADN de la cellule en train de mourir.
- Les protéines d'ingestion sont requises pour la phagocytose de la cellule morte par une autre cellule.

Ce mécanisme de mort cellulaire, qui peut être rapide, est un processus normal de remplacement des cellules, et il est tout à fait probable qu'il prenne place dans les cellules gastriques contaminées. Avec les résultats présentés, toutefois, nous ne pouvons pas affirmer qu'il ait lieu avec les NpAg. Pour valider cette hypothèse, il faudrait démontrer la présence de protéines apoptotiques, ce qui serait possible par l'observation des cellules au microscope optique et par la quantification des ARNm de ces protéines.

Les autoradiogrammes montrent la formation de points plus ou moins gros en fonction de la taille des Np. Est-ce que le pédoncle peut stocker lui-même les Np afin de mieux les éliminer ? Si c'était le cas, il s'ajouterait au mécanisme décrit précédemment un second mécanisme, appelé mécanisme d'encapsulation. Celui-ci serait similaire au mécanisme d'encapsulation cellulaire, qui consiste à enfermer un composé actif dans un édifice macromoléculaire (un objet colloïdal = Np nommé vecteur) qui le concentre et le protège. L'encapsulation dans ces structures moléculaires peut suffire à obtenir des effets thérapeutiques intéressants. Par exemple, des études cliniques ont montré que la toxicité cardiaque de la doxorubicine (un anticancéreux) est réduite après son encapsulation dans des liposomes (Batist *et al.*, 2001; Lyass *et al.*, 2001). Ainsi, si l'encapsulation intervenait pour enfermer les Np et réduire leur toxicité, elle serait un moyen de défense de l'organisme contre ce corps étranger difficile à assimiler dans les tissus.

3.4.3. MÉCANISME DE DISSOLUTION DES NP ET COMPOSITION DE LA SOLUTION DE NPAG

Liu et Hurt (2010) ont mesuré la cinétique de libération d'ions Ag^+ issus de NpAg et ont observé que les NpAg libéraient des ions Ag^+ dans l'eau déionisée. Les auteurs

expliquent ce mécanisme de dissolution par une oxydation des Np. Celui-ci est plus complexe qu'une simple oxydation par oxygène dissous (O_{2Dis}). Le processus de réduction directement par O_{2Dis} est une réaction lente qui produit des peroxydes intermédiaires pouvant réagir avec les NpAg(0) pour libérer des ions Ag^+ (Liu et Hurt, 2010). Toutefois, ce mécanisme de réaction est beaucoup plus lent dans l'eau de mer que dans l'eau déionisée. Les auteurs considèrent que le mécanisme d'oxydation dans l'eau de mer est inhibé par : (1) la force ionique qui mène les NpAg à l'agrégation; (2) le pH de l'eau de mer qui est d'environ 8, ce qui diffère nettement de l'eau déionisée qui est plus acide (pH ~ 5-6); (3) les acides humiques et fulviques de l'eau de mer. Tous ces résultats ont été établis à partir de NpAg stabilisées par le citrate, ce qui est différent de notre type de NpAg. En effet, nos NpAg sont stabilisées par un polymère. Comme la composition des Np est un facteur important dans leur comportement, les résultats de Liu et Hurt sont à prendre avec précaution dans notre étude, mais ils démontrent tout de même la possibilité d'oxydation des NpAg simplement dans l'eau. Ce mécanisme est plausible avec nos NpAg, mais nos données actuelles ne permettent pas de conclure qu'il ait lieu.

Il faut aussi considérer que les rendements des synthèses de formation de NpAg ont été élevés avec une perte d'argent de 24,1 % et 16,8 % pour les PNpAg et les GNpAg, respectivement. Cette perte d'argent peut s'expliquer par une adsorption des NpAg sur la verrerie ou par de l'argent dissous non-réagit.

3.5. CONCLUSION

Le radiomarquage des NpAg a permis leur suivi spatio-temporel dans un organisme entier. Les autoradiogrammes nous ont permis d'observer un comportement différent entre la forme nanoparticulaire et la forme dissoute. Cette technique ne permet pas de voir les particules individuellement, mais elle permet de supposer la formation d'agrégats dans différents organes du bivalve étudié. Le temps de résidence des trois formes de l'argent est relativement long. Nous avons posé l'hypothèse d'une métabolisation du polymère recouvrant les Np puis d'une oxydation partielle de celles-ci. Il serait intéressant à l'avenir de comprendre l'interaction entre les lipides et les Np, afin de connaître l'importance du stockage de ces dernières. D'autre part, il serait également important de mieux comprendre leur devenir après leur élimination par l'organisme. Le polymère recouvrant la Np semble être en partie digéré, ce qui induit l'excrétion de NpAg nues ou à tout le moins fort différentes des NpAg ingérées par le pétoncle. Cette modification biologique des NpAg risque de changer leur comportement dans le milieu aquatique.

Enfin, nos résultats démontrent qu'il est important de mieux étudier les PNpAg, car leur comportement dans l'organisme semble similaire à celui de la forme dissoute. Cependant, nos données ne nous renseignent pas sur leur toxicité après ingestion et en cours d'élimination. Il est possible que le comportement quasi-identique des formes dissoutes et des petites nanoparticules indique aussi des toxicités similaires, mais la toxicité particulière des NpAg composites comme celles que nous avons utilisées dans ces travaux reste à démontrer.

Chapitre 4

Conclusion

Le comportement des nanoparticules dans l'environnement est particulier et doit faire l'objet d'études plus poussées. Leur dimension leur confère de nouvelles propriétés physico-chimiques. La surface des Np entraîne une forte capacité d'interaction avec les éléments les entourant, et la variation de leur composition, c'est-à-dire de leur taille ou de leur composition de surface, peut modifier ces propriétés physiques et chimiques (Borm *et al.*, 2006). Si leurs propriétés de surface ne peuvent être respectées, les nanoparticules se transforment rapidement en agglomérat (Borm *et al.*, 2006). Ces propriétés de surface sont les facteurs les plus importants qui régissent leur stabilité et leur mobilité, par exemple leur suspension, leur agrégation en plus grosses particules ou leur dépôt dans le système aquatique (Navarro *et al.*, 2008a). Des Np stables sont un préalable pour une interaction efficace avec un organisme, qui peut conduire à une accumulation ou à des effets toxiques (Navarro *et al.*, 2008a).

Afin de prédire leurs interactions dans l'environnement et d'évaluer le risque qu'elles représentent, il est important de connaître le comportement des Np. Les NpAg sont maintenant reconnues comme étant des antibactériens puissants. Pour évaluer les risques des Np dans l'environnement, il est important de comprendre leur mobilité, leur biodisponibilité et leur toxicité. De ce fait, il est nécessaire de dépister les voies de transfert qu'elles y ont. Les données écotoxicologiques actuelles portent principalement sur les espèces classiquement utilisées dans les tests et les organismes d'eau douce (Handy *et al.*, 2008). Les données sur les espèces terrestres, les espèces marines et les plantes manquent particulièrement. De plus, les techniques d'analyse pour la bioaccumulation des Np sont très limitées. Il en résulte que les données d'accumulation et d'élimination des Np sont

fragmentaires. C'est pourquoi notre projet s'est intéressé à déterminer la cinétique d'accumulation / élimination et la distribution tissulaire des NpAg dans une espèce de bivalve, *Chlamys islandica*, par radiomarquage des Np^{110m}Ag.

Le premier objectif de ces travaux a été de développer la synthèse de nanoparticules d'argent de diamètres moyens de ~ 10 nm et de ~ 80 nm, les plus monodispersées possibles. Elles ont été élaborées par voie de synthèse humide. Comme nous l'avons vu, les Np métalliques sont généralement enrobées par des composés inorganiques ou organiques. Ici, la NpAg étudiée était un véritable nanocomposite, constitué d'un enrobage de polymère, le polyallylamine (PAAm). Cette NpAg a été choisie pour sa capacité à être stable dans le milieu aquatique et à ne pas s'agglomérer. Nous avons modifié la synthèse initiale de Sardar *et al.*, (2007) afin de faire varier la taille des Np. Cette synthèse est une réduction du sel d'argent (AgNO₃) par le PAAm, qui joue un rôle de réducteur et de stabilisateur en milieu aqueux. Une optimisation des paramètres de synthèse a été faite en variant la concentration du réducteur / stabilisateur. Cette variation du PAAm a permis d'obtenir deux lots de NpAg avec une taille moyenne d'environ 10 nm pour l'un et 80 nm pour l'autre, appelés respectivement PNpAg et GNpAg. Les PNpAg et les GNpAg ont été caractérisées par spectre UV/Vis, par microscopie de force atomique (AFM) et par microscopie électronique à transmission (TEM). Pour les GNpAg, la taille a également été analysée par diffraction laser. Les NpAg synthétisées ont été dispersées et stabilisées dans de l'eau nanopure pour des mois. Le rendement des synthèses des NpAg radiomarquées était bon. La perte d'argent n'était respectivement que de 24,1 % et de 16,8 % pour les PNpAg et les GNpAg.

Dans la seconde partie de ce mémoire, des pétoncles d'Islande ont été exposés à différentes formes de l'argent radiomarquées avec le ^{110m}Ag(I) dissous, les PNp^{110m}Ag et les GNp^{110m}Ag. Deux comportements distincts sont apparus en fonction de la taille des Np. En effet, les PNpAg se comportent généralement comme l'Ag(I) dissous, avec des *hots spots* très visibles dans la distribution tissulaire des PNpAg, alors que les GNpAg, quant à elles, s'éliminent 5 fois plus vite et ont une distribution tissulaire plus localisée sous la forme apparente d'agrégats. De plus, deux mécanismes possibles ont été identifiés : (1) Le

polymère enrobant les Np subirait une digestion intracellulaire relativement lente et intense, tandis que les particules subiraient une digestion extracellulaire; (2) Un mécanisme d'encapsulation des Np semblable au mécanisme d'encapsulation cellulaire pourrait prendre place. Il permettrait une certaine forme de défense de l'organisme contre ce corps étranger difficile à assimiler dans les tissus.

La différence de comportement entre les petites et les grosses Np est significative. On peut observer que les PNpAg sont plus réactives que les GNpAg par leur comportement quasi-similaire au comportement du métal dissous. Étant donné que nous connaissons peu de choses sur la toxicité des Np, sinon que leur taille, leur surface et leur composition jouent un rôle primordial dans celle-ci, cette différence est intéressante. De ce fait, il sera important de s'orienter vers l'étude des PNpAg.

Perspectives

Pour les trois formes d'argent, les résultats de bioaccumulation sont différents. Plusieurs hypothèses ont été émises sur la digestion des NpAg par le pétoncle. Pour valider celles-ci, il faut maintenant faire des analyses en toxicologie et observer la réponse du pétoncle par le suivi de biomarqueurs.

Plusieurs questions se posent. Quel est le comportement réel des NpAg dans l'organisme ? Est-ce que les NpAg s'accumulent dans les tissus et se complexent avec les lipides ? Est-ce qu'elles passent les parois cellulaires ? S'accumulent-elles dans les cellules ? Est-ce que leur seul moyen de voyager dans l'organisme est la digestion où peuvent-elles voyager sans aucune digestion ? Quelle est la spéciation de l'argent dans les tissus de l'organisme ? Existe-t-il réellement un mécanisme de dissolution des NpAg en ion Ag^+ ? Si le polymère stabilisant les Np est digéré alors que les NpAg sont expulsées dans l'environnement, quel sera le comportement de ces NpAg transformées par la digestion de cet organisme ?

Dans l'environnement aquatique naturel, les Np peuvent interagir avec les colloïdes organiques ou les Np naturelles pour former des agrégats. Afin de quantifier le

compartiment des Np dans l'environnement, il faut prévoir leur stabilité en suspension et leur tendance à s'agréger ou à interagir avec d'autres particules (Mackay *et al.*, 2006). L'agrégation et la sédimentation des particules sont des phénomènes étroitement liés (Wiesner *et al.* 2006). Le comportement des Np dans l'environnement est aussi gouverné par la modification de leur nature même lors du processus d'adsorption (Fukushi et Sato, 2005), et plus spécifiquement par la charge à la surface des Np, qui joue un rôle dominant (Kallay et Zalac, 2001, 2002). Les facteurs environnementaux tels que la lumière, les oxydants et les microorganismes affectent également le comportement des Np dans les eaux naturelles (Nowack et Bucheli, 2007). Ce domaine est encore très peu connu. Il est pourtant important de mieux comprendre ces interactions, car elles jouent un rôle important dans la bioaccumulation des Np par les organismes aquatiques. Pour mieux comprendre celle-ci, il faut répondre aux questions suivantes : quelle est l'interaction de chaque Np avec la matière organique (MO) ? Quelle sera la composition de surface de la Np après cette interaction ? Quel sera l'impact des divers facteurs environnementaux sur la Np avant la bioaccumulation ? Le complexe NpAg(0)-MO inhibe-t-il les mécanismes de dissolution des NpAg(0) ?

Les Np peuvent également être la clé des espèces chimiques interagissant avec les polluants et les pathogènes dans l'eau naturelle, car les Np anthropiques auront la capacité de se lier à une large quantité de polluants et d'interagir fortement avec les virus pathogènes et les bactéries. Il s'agira donc, dans ce cas-là, d'étudier l'interaction Np-polluant afin de savoir si la toxicité qui en résulte est une somme de la toxicité des Np et de celle des polluants, ou si elle est plutôt une synergie des deux toxicités donnant une nouvelle toxicité encore inconnue. Quel sera l'impact du complexe Np-polluant sur la bioaccumulation et les organismes aquatiques ? Cette question et bien d'autres méritent toute l'attention de la communauté scientifique et devront être abordées au cours des prochaines années.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, K., I. Cydzik, R. Del Torchio, M. Farina, E. Forti, N. Gibson, U. Holzwarth, F. Simonelli et W. Kreyling (2010). Radiolabelling of TiO₂ nanoparticles for radiotracer studies. *Journal of Nanoparticle Research*. 12 (7): 2435-2443
- Ahmad, A., P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, M. I. Khan, R. Kumar et M. Sastry (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28(4): 313-318.
- Alivisatos, A. P., W. Gu et C. Larabell (2005). Quantum dots as cellular probes. *Annual Review of Biomedical Engineering* 7: 55-76.
- Ata, M. (2007). From responsible research et development to innovation in nanotechnology. *AIST Today (International Edition)* 23: 26-27.
- Baik, M. H., J. I. Yun, M. Bouby, P. S. Hahn et J. I. Kim (2007). Characterization of aquatic groundwater colloids by a laser-induced breakdown detection and ICP-MS combined with an asymmetric flow field-flow fractionation. *Korean Journal of Chemical Engineering* 24(5): 723-729.
- Bailey, R. E., A. M. Smith et S. Nie (2004). Quantum dots in biology and medicine. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 25(1): 1-12.
- Ballou, B., B. C. Lagerholm, L. A. Ernst, M. P. Bruchez and A. S. Waggoner (2004). Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chemistry* 15(1): 79-86.
- Batist, G., G. Ramakrishnan, C. S. Rao, A. Chandrasekharan, J. Gutheil, T. Guthrie, P. Shah, A. Khojasteh, M. K. Nair, K. Hoelzer, K. Tkaczuk, Y. C. Park et L. W. Lee (2001). Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared With Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 19(5): 1444-1454.
- Barka, S. (2007). Insoluble detoxification of trace metals in a marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to copper, zinc, nickel, cadmium, silver and mercury. *Ecotoxicology* 16(7): 491-502.
- Beninger, P. G. et M. Le Pennec (2006). Structure and fonction in scallops. *Scallops : biology, ecology and aquaculture* S. E. Shumway et G. Parsons, Elsevier. 35: 123-211.
- Billaud, P. (2006). Propriétés optiques de nanoparticules uniques de métaux nobles. *Physique*. Lyon, Université de Lyon. Doctorat: 242.
- Biswas, P. et C. Y. Wu (2005). Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air and Waste Management Association* 55(6): 708-746.

- Blaser, S. A., M. Scheringer, M. MacLeod and K. Hungerbühler (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the total environment* 390(2-3): 396-409.
- Borm, P., D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit et E. Oberdorster (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 3(1): 11.
- Borm, P., F. Klaessig, T. Landry, B. Moudgil, J. Pauluhn, K. Thomas, R. Trottier et S. Wood (2006b). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicology Sciences* 90(1): 23-32.
- Borretzen, P. et B. Salbu (2009). Bioavailability of sediment-associated and low-molecular-mass species of radionuclides/trace metals to the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Environmental Radioactivity* 100(4): 333-341.
- BSI (2005). Vocabulary — Nanoparticles. British Standard PAS 71:2005: 1-32.
- Buffle, J. (2006). The key role of environmental colloids/nanoparticles for the sustainability of life. *Environmental Chemistry* 3 (3): 155-158.
- Buffle, J., K. J. Wilkinson, S. Stoll, M. Filella et J. Zhang (1998). A generalized description of aquatic colloidal Interactions: The three-colloidal component approach. *Environmental Science & Technology* 32(19): 2887-2899.
- Bura-Nakic, E., D. Krznaric, D. Jurasin, G. R. Helz et I. Ciglenceki (2007). Voltammetric characterization of metal sulfide particles and nanoparticles in model solutions and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 594 (1): 44-51.
- Burleson, D. J., M. D. Driessen et R. L. Penn (2004). On the characterization of environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 39(10): 2707-2753.
- Buzea, C., I. I. Pacheco et K. Robbie (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4): MR17-MR71.
- Bystrzejewska-Piotrowska, G., J. Golimowski et P. L. Urban (2009). Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management* 29(9): 2587-2595.
- Chithrani, B. D., A. A. Ghazani et W. C. W. Chan (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* 6(4): 662-668.

- Cho, S. J., D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth et F. o. M. Winnik (2007). Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells. *Langmuir* 23(4): 1974-1980.
- Choi, O., K. K. Deng, N. J. Kim, L. Ross Jr, R. Y. Surampalli et Z. Hu (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42(12): 3066-3074.
- Chou, K. S. et C. Y. Ren (2000). Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. *Materials Chemistry and Physics* 64(3): 241-246.
- Colvin, V. L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology* 21(10): 1166-1170.
- Colvin, V. L. et C. M. Sayes (2004). Environmental chemistry and effects of engineered nanostructures.
- Costerton, B., C. Cook, M. Shirtliff, P. Stoodley and M. Pasmore (2004). Biofilms, Biomaterials and Device Related Infections, *Biomaterial Science. An Introduction to Materials*. A. S. H. B. D. Ratner, F. J. Schoen, and J. E. Lemmon. San Diego, USA, Elsevier. 2nd edn: 345-354.
- Derfus, A., W. Chan et S. Bhatia (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters* 4: 11 - 18.
- Doucet, F. J., L. Maguire et J. R. Lead (2004). Size fractionation of aquatic colloids and particles by cross-flow filtration: Analysis by scanning electron and atomic force microscopy. *Analytica Chimica Acta* 522(1): 59-71.
- Domingos, F. R., A. M. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufkenkji, R. J. Lead, G. G. Leppard and K. J. Wilkinson (2009). Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Sciences Technology*. 43(19):7277-7284.
- Ducamp-Sanguesa, C., R. Herrera-Urbina et M. Figlarz (1992). Synthesis and characterization of fine and monodisperse silver particles of uniform shape. *Journal of Solid State Chemistry* 100 (2): 272-280.
- Dunphy Guzman, K. A., M. R. Taylor et J. F. Banfield (2006). Environmental Risks of Nanotechnology: National Nanotechnology Initiative Funding, 2000-2004. *Environmental Science & Technology* 40(5): 1401-1407.
- Elimelech, M. et C. R. O'Melia (1990). Effect of particle size on collision efficiency in the deposition of Brownian particles with electrostatic energy barriers. *Langmuir* 6(6): 1153-1163.
- EPA (2007). Nanotechnology White Paper. Report EPA U. S. E. P. Agency. Washington DC 20460, USA, EPA. 100/B-07/001.
- Erickson, B. (2009). Nanosilver Pesticides. *Chemical & Engineering News* 87(48): 25-26.

- Farré, M., K. Gajda-Schranz, L. Kantiani et D. Barceló (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(1): 81-95.
- Feynman, R. P. (1960). There's Plenty of Room at the Bottom. The annual meeting of the American physical society: Engineering and Science. The California Institute of Technology (Caltech) Caltech's Engineering and Science: <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html> .
- Fievet, F., J. P. Lagier, B. Blin, B. Beaudoin et M. Figlarz (1989). Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. *Solid State Ionics* 32-33 (PART 1): 198-205.
- Flomenbom, O., R. J. Amir, D. Shabat et J. Klafter (2005). Some new aspects of dendrimer applications. *Journal of Luminescence* 111(4): 315-325.
- Fukushi, K. et T. Sato (2005). Using a surface complexation model to predict the nature and stability of nanoparticles. *Environmental Science and Technology* 39(5): 1250-1256.
- Gagnon, C. et N. S. Fisher (1997). The bioavailability of sediment-bound Cd, Co, and Ag to the mussel *Mytilus edulis*. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 54(1): 147-156.
- Gehr, R. J. et R. W. Boyd (1996). Optical properties of nanostructured optical materials. *Chemistry of Materials* 8(8): 1807-1819.
- Griffitt, R. J., J. Luo, J. Gao, J. C. Bonzongo et D. S. Barber (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1972-1978.
- Handy, R. D. et B. J. Shaw (2007). Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk and Society* 9(2): 125-144.
- Handy, R., R. Owen et E. Valsami-Jones (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17(5): 315-325.
- Hannah, W. et P. B. Thompson (2008). Nanotechnology, risk and the environment: A review. *Journal of Environmental Monitoring* 10(3): 291-300.
- Hardman, R. (2006). A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives* 114 (2): 165-172.
- Harvey, R. W. et S. N. Luoma (1985). Effects of adherent bacteria and bacterial extracellular polymers upon assimilation by *Macoma balthica* of sediment-bound Cd, Zn and Ag. *Marine ecology progress series* (22): 281-289.

- Helland, A., H. Kastenholz, A. Thidell, P. Arnfalk et K. Deppert (2006). Nanoparticulate materials and regulatory policy in Europe: An analysis of stakeholder perspectives. *Journal of Nanoparticle Research* 8(5): 709-719.
- Hirai, H., Y. Nakao, N. Toshima, H. Hirai, Y. Nakao, N. Toshima, K. Adachi et T. Yonezawa (1979). Preparation of colloidal transition metals in polymers by reduction with alcohols or ethers. *Journal of macromolecular science Chemistry* A13(6): 727-750.
- Hunt, J. W. H. (2004). Nanomaterials: Nomenclature, novelty, and necessity. *The Minerals, Metals & Materials Society : JOM* 56(10): 13-18.
- Jana, N. R., T. K. Sau et T. Pal (1999). Growing small silver particle as redox catalyst. *Journal of Physical Chemistry B* 103(1): 115-121.
- Kallay, N. et S. Zalac (2001). Introduction of the surface complexation model into the theory of colloid stability. *Croatica Chemica Acta* 74(3): 479-497.
- Kallay, N. et S. Zalac (2002). Stability of nanodispersions: A model for kinetics of aggregation of nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 253(1): 70-76.
- Kashiwada, S. (2006). Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives* 114(11): 1697-1702.
- Kellogg, C. A. et D. W. Griffin (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology & Evolution* 21(11): 638-644.
- Kilin, D. S., O. V. Prezhdo et Y. Xia (2008). Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles: Ab initio study of preferential surface coordination with citric acid. *Chemical Physics Letters* 458(1-3): 113-116.
- Klaine, S. J., P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin et J. R. Lead (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1825-1851.
- Klasen, H. J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26(2): 117-130.
- Klaus, T., R. Joerger, E. Olsson et C. G. Granqvist (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(24): 13611-13614.
- Kreyling, W., M. Semmler-Behnke et W. Möller (2006). Health implications of nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 8(5): 543-562.
- Kurihara, L. K., G. M. Chow et P. E. Schoen (1995). Nanocrystalline metallic powders and films produced by the polyol method. *Nanostructured Materials* 5(6): 607-613.

- Lam, C. W., J. T. James, R. McCluskey, S. Arepalli et R. L. Hunter (2006). A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Critical Reviews in Toxicology* 36(3): 189-217.
- Lead, J. et K. Wilkinson (2006). Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry* 3: 159-171.
- Li, L. et Y.-J. Zhu (2006). High chemical reactivity of silver nanoparticles toward hydrochloric acid. *Journal of Colloid and Interface Science* 303 (2): 415-418.
- Liau, S. Y., D. C. Read, W. J. Pugh, J. R. Furr et A. D. Russell (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: Relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology* 25(4): 279-283.
- Limbach, L. K., Y. Li, R. N. Grass, T. J. Brunner, M. A. Hintermann, M. Muller, D. Gunther et W. J. Stark (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science and Technology* 39(23): 9370-9376.
- Liu, F. K., Y. C. Hsu, M. H. Tsai et T. C. Chu (2007). Using I^{131} -irradiation to synthesize Ag nanoparticles. *Materials Letters* 61(11-12): 2402-2405.
- Liu, J. et R. H. Hurt (2010). Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology* 44(6): 2169-2175.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky et J. Darnell (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*. Bruxelles, De boeck & Larcier s.a: 1096.
- Lok, C. N., C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu et C. M. Che (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5(4): 916-924.
- Lovrić, J., S. J. Cho, F. M. Winnik et D. Maysinger (2005). Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry and Biology* 12(11): 1227-1234.
- Lyass, O., A. Hubert et A. A. Gabizon (2001). Phase I Study of Doxil-Cisplatin Combination Chemotherapy in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research* 7(10): 3040-3046.
- Lyon, D. Y., L. K. Adams, J. C. Falkner et P. J. J. Alvarez (2006). Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. *Environmental Science and Technology* 40(14): 4360-4366.
- Lynch, I., K. A. Dawson et S. Linse (2006). Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2006(327).
- Lyvén, B., M. Hassellöv, D. R. Turner, C. Haraldsson et K. Andersson (2003). Competition between iron- and carbon-based colloidal carriers for trace metals in a freshwater

- assessed using flow field-flow fractionation coupled to ICPMS. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67(20): 3791-3802.
- Mackay, C. E., M. Johns, J. H. Salatas, B. Bessinger et M. Perri (2006). Stochastic probability modeling to predict the environmental stability of nanoparticles in aqueous suspension. *Integrated environmental assessment and management* 2(3): 293-298.
- Mafune, F., J.-y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow et H. Sawabe (2000). Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation. *The Journal of Physical Chemistry B* 104(35): 8333-8337.
- Mann, R. M., M. J. Ernste, R. A. Bell, J. R. Kramer et C. M. Wood (2004). Evaluation of the protective effects of reactive sulfide on the acute toxicity of silver to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(5): 1204-1210.
- Manna, A., T. Imae, K. Aoi, M. Okada et T. Yogo (2001). Synthesis of dendrimer-passivated noble metal nanoparticles in a polar medium: Comparison of size between silver and gold particles. *Chemistry of Materials* 13(5): 1674-1681.
- Martinez-Castanon, G. A., N. Nino-Martinez, F. Martinez-Gutierrez, J. R. Martinez-Mendoza et F. Ruiz (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* 10(8): 1343-1348.
- Matthews, R. W. (1992). Photocatalytic oxidation of organic contaminants in water: An aid to environmental preservation. *Pure & Application Chemistry* 64(9): 1285-1290.
- Maynard, A. D. (2006). *Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk*. Washington, DC.
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32(8): 967-976.
- Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez et M. J. Yacaman (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10): 2346-2353.
- Mukherjee, P., A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Parishcha, P. V. Ajaykumar, M. Alam, R. Kumar et M. Sastry (2001). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Letters* 1(10): 515-519.
- Murr, L. E., E. V. Esquivel, J. J. Bang, G. de la Rosa et J. L. Gardea-Torresdey (2004). Chemistry and nanoparticulate compositions of a 10,000 year-old ice core melt water. *Water Research* 38(19): 4282-4296.

- Myklestad, S. M. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of The Total Environment* 165(1-3): 155-164.
- Nair, L. S. et C. T. Laurencin (2007). Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3(4): 301-316.
- Navarro, E., A. Baun, R. Behra, N. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. Santschi et L. Sigg (2008a). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17(5): 372-386.
- Navarro, E., F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra (2008b). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42(23): 8959-8964.
- Nel, A., T. Xia, L. Mädler et N. Li (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761): 622-627.
- Nowack, B. et T. D. Bucheli (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1): 5-22.
- Oberdörster, E., McClellan-Green, P., Haasch, M.L. (2006). *Ecotoxicity of engineered nanomaterials*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Oberdörster, G. (2007). Biokinetics and effects of nanoparticles. *NATO Security through Science Series C: Environmental Security*. P. P. Simeonova, N. Opopol and M. I. Luster: 15-51.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster et J. Oberdorster (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113: 823 - 839.
- Ojamae, L., C. Aulin, H. Pedersen et P. Kall (2006). IR and quantum-chemical studies of carboxylic acid and glycine adsorption on rutile TiO₂ nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 296(1): 71-78.
- Oliver, J. et A. Crull (2009). *Nanoparticle News Review, 2008* Wellesley: 218.
- Oughton, D. H., T. Hertel-Aas, E. Pellicer, E. Mendoza et E. J. Joner (2008). Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1883-1887.
- Pal, S., Y. K. Tak et J. M. Song (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(6): 1712-1720.
- Panáček, A., L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, N. Tat'jana et R. Zboril (2006). Silver colloid nanoparticles: Synthesis,

- characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* 110(33): 16248-16253.
- Panigrahi, S., S. Kundu, S. K. Ghosh, S. Nath et T. Pal (2004). General method of synthesis for metal nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 6(4): 411-414.
- Parak, W. J., D. Gerion, T. Pellegrino, D. Zanchet, C. Micheel, S. C. Williams, R. Boudreau, M. A. Le Gros, C. A. Larabell and A. P. Alivisatos (2003). Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology* 14 (7): R15-R27.
- Park, B. (2007). Current and Future Applications of Nanotechnology. *Nanotechnology: Consequences for Human Health and the Environment*. E. S. a. Technology, The Royal Society of Chemistry. 24.
- Pastoriza-Santos, I. et L. M. Liz-Marzán (2000). Reduction of silver nanoparticles in DMF. Formation of monolayers and stable colloids. *Pure and Applied Chemistry* 72 (1-2): 83-90.
- Patakfalvi, R., Z. Virányi and I. Dékány (2004). Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. *Colloid and Polymer Science* 283(3): 299-305.
- Petersen, E. J., J. Akkanen, J. V. K. Kukkonen et W. J. Weber (2009). Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 43(8): 2969-2975.
- Petersen, E. J., Q. Huang et J. W. J. Weber (2008a). Bioaccumulation of Radio-Labeled Carbon Nanotubes by *Eisenia foetida*. *Environmental Science & Technology* 42(8): 3090-3095.
- Petersen, E. J., Q. Huang et W. J. J. Weber (2008). Ecological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Health Perspectives* 116 (4): 496-500.
- Purchon, R. D. (1977). *The biology of the mollusca* (2nd edition). Oxford, Pergammon Press: 225-243.
- Raveendran, P., J. Fu et S. L. Wallen (2003). Completely Green Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 125(46): 13940-13941.
- Richards, R. M. E., H. A. Odelola et B. Anderson (1984). Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* 39(157-158): 151-158.
- Robichaud, C. O., D. Tanzie, U. Weilenmann et M. R. Wiesner (2005). Relative risk analysis of several manufactured nanomaterials: An insurance industry context. *Environmental Science and Technology* 39(22): 8985-8994.
- Roco, M. C. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): 337-346.

- Rothen-Rutishauser, B. M., S. Schürch, B. Haenni, N. Kapp et P. Gehr (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental Science and Technology* 40(14): 4353-4359.
- Rouleau C., C. Gobeil, H. Tjälve (2000) Accumulation of silver from the diet in two marine benthic predators: the snow crab (*Chionoecetes opilio*) and the American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Environmental toxicology and chemistry Environ* 19: 631–637.
- Rouleau, C., C. Gobeil et H. Tjälve (2001). Cadmium accumulation in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Marine Ecology Progress Series* 224: 207-217.
- Rouleau, C., C. Gobeil et H. Tjälve (1998). Pharmacokinetics and distribution of dietary tributyltin compared to those of methylmercury in the American plaice *Hippoglossoides platessoides*. *Marine Ecology Progress Series* 171: 275-284.
- Rouleau, C., Z. H. Xiong, G. Pacepavicius et G. L. Huang (2003). Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish: Axonal transport as a proposed mechanism. *Environmental Science and Technology* 37(15): 3298-3302.
- Sang, H. I., T. L. Yun, B. Wiley et Y. Xia (2005). Large-scale synthesis of silver nanocubes: The role of HCl in promoting cube perfection and monodispersity. *Angewandte Chemie - International Edition* 44(14): 2154-2157.
- Sardar, R., J. W. Park et J. S. Shumaker-Parry (2007). Polymer-induced synthesis of stable gold and silver nanoparticles and subsequent ligand exchange in water. *Langmuir* 23(23): 11883-11889.
- Scenihhr (2006). The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Scientific committee on emerging and newly identified health risks (SCENIHR), European Commission.
- Schauer, C. L., M.-S. Chen, M. Chatterley, K. Eisemann, E. R. Welsh, R. R. Price, P. E. Schoen et F. S. Ligler (2003). Color changes in chitosan and poly(allyl amine) films upon metal binding. *Thin Solid Films* 434(1-2): 250-257.
- Schmid, K. et M. Riediker (2008). Use of nanoparticles in swiss industry: A targeted survey. *Environmental Science and Technology* 42(7): 2253-2260.
- Sellers, K. (2009). *Nanotechnology and the environment*. Boca Raton CRC Press/Taylor & Francis.
- Shahverdi, A. R., A. Fakhimi, H. R. Shahverdi et S. Minaian (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3(2): 168-171.

- Shumway, S. E., G. Parsons et A. Abarca (2006). *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Collections : Developments in aquaculture and fisheries science, 35 Elsevier. Amsterdam: 1460 p.
- Skrabalak, S. E., B. J. Wiley, M. Kim, E. V. Formo et Y. Xia (2008). On the polyol synthesis of silver nanostructures: glycolaldehyde as a reducing agent. *Nano letters* 8(7): 2077-2081.
- Smart, S. K., A. I. Cassady, G. Q. Lu et D. J. Martin (2006). The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 44(6): 1034-1047.
- Soldo, D. and R. Behra (2000). Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47: 181-189.
- Sondi, I. et B. Salopek-Sondi (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275(1): 177-182.
- Sönnichsen, C., T. Franzl, T. Wilk, G. Von Plessen et J. Feldmann (2002). Plasmon resonances in large noble-metal clusters. *New Journal of Physics* 4: 93.
- Stolpe, B., M. Hassellöv, K. Andersson et D. R. Turner (2005). High resolution ICPMS as an on-line detector for flow field-flow fractionation; multi-element determination of colloidal size distributions in a natural water sample. *Analytica Chimica Acta* 535(1-2): 109-121.
- Sun, R. W. Y., R. Chen, N. P. Y. Chung, C. M. Ho, C. L. S. Lin et C. M. Che (2005). Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chemical Communications*(40): 5059-5061.
- Takenaka, S., E. Karg, C. Roth, H. Schulz, A. Ziesenis, U. Heinzmann, P. Schramel et J. Heyder (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental Health Perspectives* 109 (4): 547-551.
- Taniguchi, N., Ed. (1974). "On the Basic Concept of 'Nano Technology,'" Tokyo, Japan Society of Precision Engineering.
- The Royal Society. (2004). *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 127.
- Van Hoonacker, A. et P. Englebienne (2006). Revisiting silver nanoparticle chemical synthesis and stability by optical spectroscopy. *Current Nanoscience* 2(4): 359-371.
- Velikov, K. P., G. E. Zegers et A. Van Blaaderen (2003). Synthesis and characterization of large colloidal silver particles. *Langmuir* 19(4): 1384-1389.
- Verma, H., C. Upadhyay, A. Tripathi, R. Tripathi et N. Bhandari (2002). Thermal decomposition pattern and particle size estimation of iron minerals associated with

- the cretaceous-tertiary boundary at Gubbio. *Meteoritics & Planetary Science* 37: 901-909.
- Wakefield, G., J. Stott and J. Hock (2004). Sunscreen products and cosmetics with manganese doped titane oxide nanoparticles. *SÖFW-journal* 131(1-2): 60-64.
- Wang, W. X., N. S. Fisher et S. N. Luoma (1996). Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 140: 91-113.
- Wang, Y. et N. Toshima (1997). Preparation of Pd-Pt bimetallic colloids with controllable core/shell structures. *Journal of Physical Chemistry B* 101 (27): 5301-5306.
- Weir, E., A. Lawlor, A. Whelan et F. Regan (2008). The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. *Analyst* 133(7): 835-845.
- Wiesner, M. R., G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou et P. Biswas (2006). Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science and Technology* 40(14): 4336-4345.
- Wiley, B., T. Herricks, Y. Sun et Y. Xia (2004). Polyol synthesis of silver nanoparticles: Use of chloride and oxygen to promote the formation of single-crystal, truncated cubes et tetrahedrons. *Nano Letters* 4(9): 1733-1739.
- Wiley, B., Y. Sun et Y. Xia (2007). Synthesis of silver nanostructures with controlled shapes et properties. *Accounts of chemical research* 40(10): 1067-1076.
- Wiley, B., Y. Sun, B. Mayers et Y. Xia (2005). Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chemistry - An European Journal* 11(2): 454-463.
- Xiong, Y. et Y. Xia (2007). Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of palladium. *Advanced Materials* 19(20): 3385-3391.
- Yoon, K. Y., J. Hoon Byeon, J. H. Park et J. Hwang (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* to silver et copper nanoparticles. *Science of The Total Environment* 373(2-3): 572-575.
- Zielinska, A., E. Skwarek, A. Zaleska, M. Gazda et J. Hupka (2009). Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry* 1(2): 1560-1566.
- Zhang, L., J. C. Yu, H. Y. Yip, Q. Li, K. W. Kwong, A. W. Xu et P. K. Wong (2003). Ambient Light Reduction Strategy to Synthesize Silver Nanoparticles et Silver-Coated TiO₂ with Enhanced Photocatalytic et Bactericidal Activities. *Langmuir* 19(24): 10372-10380.
- Zhang, X. V., S. P. Ellery, C. M. Friend, H. D. Holland, F. M. Michel, M. A. A. Schoonen et S. T. Martin (2007). Photodriven reduction and oxidation reactions on colloidal semiconductor particles: Implications for prebiotic synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 185(2-3): 301-311.

