HAL
archives-ouvertes.fr

Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées : localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire

Quentin Le Trequesser

▶ **To cite this version:**

Quentin Le Trequesser. Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées : localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire. Matériaux. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0047>. <tel-01120012>

HAL Id: tel-01120012

https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01120012

Submitted on 24 Feb 2015

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : PHYSICO-CHIMIE DE LA MATIÈRE CONDENSÉE

Par Quentin LE TREQUESSER

Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées : localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire

Directeur de recherche : Marie-Hélène DELVILLE
Co-directeur : Hervé SEZNEC

Soutenue prévue le : 2 Juin 2014

Devant la commission d'examen formée de :

M. MAGLIONE, Mario, Directeur de recherche	Président
Mme MILLOT, Nadine, Professeur	Rapporteur
Mme LACOMBE, Sandrine, Maitre de conférences (HDR)	Rapporteur
Mme AUFFAN, Mélanie, Chargé de recherche	Examinateur
Mme DELVILLE, Marie-Hélène, Directeur de recherche	Directeur de thèse
M. SEZNEC, Hervé, Chargé de recherche (HDR)	Co-directeur de thèse

Remerciements

Le chemin jusqu'à la rédaction de ce manuscrit fut long et semé d'embuches. J'ai heureusement pu compter sur des soutiens solides tout au long de ma thèse. Je tiens donc à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes qui ont pu m'aider à aller jusqu'au bout, que ce soit par une aide scientifique ou morale.

Je voudrais tout d'abord remercier Mario MAGLIONE et Philippe MORETTO, directeurs respectifs de l'ICMCB et du CENBG pour m'avoir accueilli dans ces laboratoires et donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements sincères aux rapporteurs de ce travail, Nadine MILLOT et Sandrine LACOMBE qui ont accepté de juger ce travail et bien voulu se plonger dans mon univers scientifique. Je voudrais également exprimer ma gratitude par rapport aux commentaires constructifs qui m'ont été adressés notamment par Mélanie AUFFAN et Mario MAGLIONE.

Je souhaite également adresser des remerciements particuliers à Marie-Hélène DELVILLE et Hervé SEZNEC, mes deux directeurs de thèse qui ont su me guider tout au long de ces trois années notamment grâce à des qualités humaines exceptionnelles ; un grand merci à vous deux. Je voudrais ensuite remercier les principaux acteurs du projet TITANIUMS, Gladys SAEZ, Philippe BARBERET et Guillaume DEVES sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. Je pense également à Claire MICHELET et Denis DUPUY qui ont participé aux résultats présentés.

Je voudrais ensuite remercier l'équipe du Bordeaux Imaging Center et notamment Etienne GONTIER et Mélina PETREL, les services collectifs de l'ICMCB et enfin le personnel de la plateforme AIFIRA qui fournissent un travail essentiel et qui ont largement contribué à l'obtention de ces résultats.

Plus généralement, je tiens à remercier le groupe ICPV du CENBG ainsi que le groupe V de l'ICMCB pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur au quotidien qui ont grandement facilité mon intégration et rendu ces trois années inoubliables.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, mes amis et plus particulièrement mon amoureuse Lucie pour leur soutien moral et bien plus encore.

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
BET	Brunauer, Emmett et Teller
BOW	Bag Of Worms
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
CENBG	Centre d'Etude Nucléaire de Bordeaux-Gradignan
CGC	*Caenorhabditis genetic center*
CM	Microscopie Correlative
DH	Diamètre Hydrodynamique
DLS	Dynamic Light Scattering
DRIFT	Diffuse Reflectance Infrared Fourrier Transform Spectroscopy
DRX	Diffraction des rayons X
E. coli	*Escherichia coli*
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
ERO	Espèce réactive oxydante
FITC	Fluorescéine
GFP	Green Fluorescent Protein
HR	Haute Résolution
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IBA	Microanalyse par faisceau d'ions
ICMCB	Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MC	Microscopie confocale
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
MO	Microscopie optique
NA	Nano-aiguille
NF	Nano-feuillet enroulé
NM	Nanomatériau
NP	Nanoparticule
P 25	Degussa / Evonik P 25 AEROXIDE®
PC	Polycarbonate
PCN	Point de Charge Nulle
PEEK	Polyétheréthercétone
PHFK	Primary human foreskin keratinocyte
PIXE	Particle-Induced X-ray Emission
QD	Quantum Dots
RBS	Rutherford Backscattering Retrodiffusion
STIM	Scanning Transmission Ion Microscopy

TF	Transformée de Fourrier
TiO_2	Dioxyde de titane
TRITC	Rhodamine
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

Sommaire

Introduction……...1

Chapitre 1 : Etat de l'art……..7

1. Les nanoparticules : propriétés et méthodes de synthèse 9
1.1. Généralités sur les nanomatériaux 9
1.1.1. Définition 9
1.1.2. Origine des nanoparticules 10
1.1.3. Classification des nanoparticules 11
1.1.4. Propriétés remarquables des nanoparticules 14
1.2. Le dioxyde de titane (TiO_2) 16
1.2.1. Origine du TiO_2 16
1.2.2. Structures et propriétés du TiO_2 17
1.3. Principales voies de synthèse des nanoparticules de TiO_2 22
1.3.1. Approche descendante (top-down) 22
1.3.2. Approche ascendante (bottom-up) 22
1.4. Phénomènes d'agrégation et d'agglomération 31
2. Interactions des nanoparticules de TiO_2 avec le vivant 33
2.1. Les nanoparticules de TiO_2 dans l'environnement 33
2.1.1. Production des NPs de TiO_2 33
2.1.2. Voies de libération des NPs de TiO_2 actuelles et futures 34
2.1.3. Le destin des NPs dans l'environnement 34
2.2. Inquiétudes liées à la présence de NPs de TiO_2 dans l'environnement 36
2.2.1. Antécédent analogue : Le cas de l'amiante 36
2.2.2. Nanoparticules et structures biologiques 37
2.2.3. Formation d'espèces réactives oxydantes 38
2.2.4. Réglementation sur les nanomatériaux 38
2.3. Les nanoparticules de TiO_2 : études *in vivo* 39
2.3.1. Exposition par voie respiratoire 39
2.3.2. Exposition par les muqueuses nasales 41
2.3.3. Exposition par ingestion 41
2.3.4. Exposition par la peau 42
2.3.5. Syndromes humains associés au NPs de TiO_2 43
2.4. Les nanoparticules de TiO_2 : étude *in vitro* 44
2.4.1. La cellule 44
2.4.2. Mécanismes cellulaires d'intérêt 45
2.4.3. Toxicité à l'échelle cellulaire 46
2.4.4. Les cellules en culture comme modèles d'étude 47
2.5. Les nanoparticules à l'échelle d'un organisme pluricellulaire 52
2.5.1. Généralités 52
2.5.2. *C. elegans* un modèle de choix pour les études toxicologiques 55
2.5.3. *C. elegans* et nanoparticules 55
3. Problématique de l'étude 58
Références 59

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules de dioxyde de titane……..69

1. Synthèse des nanoparticules de morphologies contrôlées 71
1.1. Le dioxyde de titane sous forme commerciale AEROXIDE® P 25 71
1.1.1. Caractérisation morphologique et dispersion en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission 72
1.1.2. Caractérisation structurale par diffraction aux rayons X 73
1.1.3. Etude des faces exposées 75
1.2. Les nano-feuillets enroulés 76
1.2.1. Synthèse et mécanisme réactionnel 76
1.2.2. Caractérisation morphologique et dispersions en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission 79
1.2.3. Caractérisation structurale par diffraction aux rayons X 80
1.3. Les nano-aiguilles 82
1.3.1. Synthèse et mécanisme réactionnel 82
1.3.2. Caractérisation morphologique des nanoparticules par microscopie électronique en transmission 83
1.3.3. Caractérisation structurale par diffraction aux rayons X 84
1.3.4. Etude des faces exposées 86
2. Caractérisation surfacique des nanoparticules 87
2.1. Analyse de surface spécifique (BET) 87
2.2. Surfaces exposées, propriétés photo-catalytiques et réactivité 88
2.2.1. Energies libres des faces cristallines du TiO_2 88
2.2.2. Propriétés photo-catalytiques des faces cristallines du TiO_2 88
2.3. Récapitulatif général des propriétés des particules et discussion intermédiaire 90
3. Comportement des nanoparticules en solution 91
3.1. Charges de surface, stabilité colloïdale et comportement en solution 91
3.1.1. Détermination du potentiel Zêta 94
3.1.2. Etude du potentiel Zêta en fonction du pH 94
3.1.3. Conséquence sur les dispersions 96
3.2. Etude de l'évolution du diamètre hydrodynamique des particules en fonction du temps 96
3.2.1. Principe de la diffusion dynamique de la lumière 96
3.2.2. Mesures de diamètre hydrodynamique 98
3.3. Comportement des NPs dans les milieux de culture cellulaire 99
3.3.1. Phénomènes d'agrégations en milieux biologiques 99
3.3.2. Mesures de diamètre hydrodynamique et potentiel Zêta en milieux biologiques 100
4. Fonctionnalisation des NPs de TiO_2 avec un agent fluorescent 101
4.1. Méthode de fonctionnalisation 102
4.1.1. Greffage de l'aminosilane 102
4.1.2. Greffage du fluorophore 102
4.2. Caractérisation des NPs fonctionnalisées 103
4.2.1. Caractérisation physico-chimique 103
4.2.2. Mise en évidence de la fonctionnalisation avec un agent fluorescent 104

4.2.3. Comportement en solution 109
4.3. Récapitulatif des potentiels Zêta des NPs natives et fonctionnalisées 111
5. Conclusion 113
6. Partie expérimentale 114
Références 118

Chapitre 3 : Challenges techniques liés à l'observation des nanomatériaux dans le vivant 125

1. Description des méthodes d'analyse 128
1.1. L'analyse *in vivo* / *in vitro* par microscopie optique et épi-fluorescence 128
1.1.1. Généralités 128
1.1.2. Microscopie à épi-fluorescence 129
1.2. L'analyse *ex vivo* et *in situ* 135
1.2.1. La fixation des échantillons 135
1.2.2. L'inclusion en résine et la microtomie 136
1.3. Analyse par microscopie électronique 137
1.3.1. Microscopie électronique en transmission (MET) 137
1.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) 137
1.4. Analyse par faisceau d'ions 138
1.4.1. Principe de la méthode 138
1.4.2. Les principales méthodes d'analyse 140
1.4.3. Spectroscopie de rétrodiffusion Rutherford (RBS) 144
1.4.4. Emission d'électrons secondaires 145
1.4.5. Quantification des éléments chimiques 145
2. Microscopie corrélative 145
2.1. Principe et intérêt de la microscopie corrélative 145
2.2. Challenges techniques pour l'observation multimodale 146
3. Conclusion 147
Références 148

Chapitre 4 : Interactions entre les nanoparticules de TiO_2 et les cellules *in vitro* 151

1. Détection, localisation et quantification des nanoparticules 153
1.1. Exposition des cellules en culture aux NPs de TiO_2 153
1.1.1. Les cellules en culture 153
1.1.2. Expression de la dose d'exposition 154
1.1.3. Préparation des dispersions de nanoparticules 155
1.2. Détection des nanoparticules par microscopie à épi-fluorescence 156
1.2.1. Détection et localisation des nanoparticules fluorescentes en fonction du temps 156

1.2.2. Localisation intracellulaire des NPs et marquages d'organites 158
1.3. Localisation des NPs de TiO_2 dans les cellules : observation par microscopie électronique en transmission 161
1.4. Détection, localisation et quantification des NPs de TiO_2 par IBA 163
1.4.1. Localisation dans les cellules 163
1.4.2. Quantification des NPs de TiO_2 à l'échelle de la cellule 165
1.4.3. Quantification des NPs sur une population de cellules 167
1.5. Microscopie corrélative à l'échelle de la cellule unique 169
2. Premiers résultats sur la toxicité des nanoparticules 174
3. Discussion 177
4. Partie expérimentale 180
Références 184

Chapitre 5 : Internalisation et écotoxicologie *in vivo* des nanoparticules de TiO_2 sur un organisme pluricellulaire : *Caenorhabditis elegans* 187

1. Détection et localisation des nanoparticules de TiO_2 189
1.1. Exposition des *C. elegans* aux nanoparticules 189
1.2. Localisation des nanoparticules par microscopie à épi-fluorescence 190
1.2.1. Ingestion des nanoparticules 190
1.2.2. Dilatation de l'intestin 192
1.2.3. Récapitulatif des observations en microscopie optique 193
1.3. Imagerie confocale 193
1.4. Etude de l'internalisation des nanoparticules par microscopie électronique en transmission 195
2. Caractérisation de *C. elegans* par microanalyse par faisceau d'ions 197
2.1. Morphologie externe des *C. elegans* 198
2.2. Microanalyse par faisceau d'ions 199
2.2.1. Microanalyse par faisceau d'ions sur un *C. elegans* exposé aux nanoparticules 199
2.2.2. Caractérisation du phénotype BOW 200
2.2.3. Tomographie par faisceau d'ions 201
3. Etude écotoxicologique 205
3.1. Influence de la présence de nanoparticules sur la mortalité des *C. elegans* 205
3.2. Influence de la présence de NPs sur la longueur des *C. elegans* 207
(i) Longueur des L1 208
(ii) Longueur des L4 208
3.3. Données sur la dilatation de l'intestin 209
3.4. Récapitulatif des résultats écotoxicologiques 210
4. Discussion 212
5. Partie expérimentale 215

Références **219**

Conclusions et perspectives……..**221**

Introduction

Les nanosciences et les nanotechnologies regroupent l'ensemble des activités scientifiques et technologiques menées à l'échelle nanométrique. Les nanotechnologies attirent l'attention car à l'échelle nanométrique, les comportements des objets sont totalement bousculés et de nouvelles propriétés apparaissent qui permettent de créer des matériaux plus performants. Le développement des techniques de synthèse permet aujourd'hui leur production rapide à grande échelle [1, 2]. Les nanomatériaux se distinguent par un rapport surface/volume très élevé, ce qui fait que les propriétés de surface et donc l'interaction avec le milieu environnant prennent une importance considérable. De nos jours, ces objets occupent une place de plus en plus grande avec des applications diverses allant de l'industrie de pointe avec des matériaux pour l'électronique, la catalyse ou l'énergie mais aussi dans notre quotidien avec la cosmétologie et l'alimentaire. Le dioxyde de titane (TiO_2) fait partie des matériaux les plus utilisés. Il sert notamment pour des applications à fort potentiel technologique telles que la dépollution des eaux ou la photo-catalyse mais également pour des applications plus modestes comme la pigmentation ou la protection solaire [3-5]. Le TiO_2 est reconnu de manière générale comme inerte et sans danger. Cependant, l'échelle nanométrique lui confère une réactivité surfacique accrue. La libération de nanoparticules (NPs) de TiO_2 dans l'environnement est donc inquiétante car ces modifications de propriétés pourraient engendrer une toxicité.

Bien qu'il n'existe à ce jour, aucun syndrome relié directement à la présence de TiO_2 chez l'homme, l'agence internationale de la recherche contre le cancer (IARC) l'a classifié comme potentiellement carcinogène [6]. Les études *in vivo* sur des sujets humains sont très limitées pour des questions de faisabilité, les effets pouvant être masqués par d'autres facteurs (pollution, tabagisme…). La recherche toxicologique se tourne en conséquence vers des modèles comme les cellules humaines en culture. Ce type de modèle permet également de disséquer les mécanismes métaboliques intervenant après introduction de NPs dans leur milieu. Les études visant à comprendre et à définir la toxicité des NPs de TiO_2 sont nombreuses [7, 8]. Il subsiste pourtant des zones d'ombre sur les facteurs influant sur leur toxicité potentielle et notamment leur propriétés physico-chimiques : morphologie, taille, structure et surface spécifique.

Le projet TITANIUMS financé par l'Agence Nationale pour la Recherche a pour but de (i) détecter, localiser et quantifier les NPs dans les organismes biologiques et (ii) comprendre les interactions pouvant induire une toxicité. Le projet regroupe un consortium de chimistes, de biologistes et de physiciens. Ma thèse s'inscrit dans ce projet et a été réalisée

entre l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB) et le Centre d'Etude Nucléaire de Bordeaux-Gradignan (CENBG). L'objectif premier de cette thèse était de synthétiser et caractériser des NPs de TiO_2 de tailles et morphologies contrôlées afin d'étudier les paramètres pouvant influer sur leur toxicité.

Dans un premier chapitre, le nano-monde et ses particularités seront décrits. Les voies de synthèse et les propriétés remarquables des NPs de TiO_2 seront également détaillées. Ensuite, les raisons de l'inquiétude liée à la présence de NPs seront données avec notamment les aspects liés à l'environnement. Enfin, les principaux résultats toxicologiques de la littérature seront présentés.

Dans cette étude, nous avons donc utilisé trois morphologies : des particules pseudo-sphériques (P 25), des particules tubulaires (nano-feuillets enroulés) et des particules sous forme de bâtonnets (nano-aiguilles). La synthèse et la caractérisation des nanoparticules ont été effectuées à l'ICMCB et seront développées dans le chapitre 2. Ensuite, mon rôle s'est étendu à l'interface de la chimie et de la biologie vers la compréhension des phénomènes observés après introduction des NPs dans les milieux de culture des modèles biologiques. Pour cela, j'ai appréhendé les techniques utilisées pour observer et comprendre la matière biologique. J'ai de plus utilisé un outil peu commun qui est l'analyse par faisceau d'ions de la plateforme AIFIRA (Application Interdisciplinaire de Faisceaux d'ions en Région Aquitaine) du CENBG. Ces aspects utilisant des notions de chimie, biologie et physique seront détaillés dans le chapitre 3.

L'évaluation de la toxicité des NPs de TiO_2 a été effectuée sur plusieurs modèles biologiques. Trois lignées de cellules humaines en culture ont tout d'abord été sélectionnées : des cellules ayant une fonction barrière (peau) et des cellules au contraire impliquées dans les échanges de matières dans le corps humain (cellules endothéliales) et enfin une lignée cancéreuse. Les expériences détaillées dans le chapitre 4 ont visé tout d'abord à localiser les NPs dans les cellules et à mieux comprendre leur devenir après introduction dans le milieu. Ensuite, les études se sont focalisées sur les caractéristiques physico-chimiques pouvant influer sur la toxicité des NPs. Un modèle pluricellulaire a également été étudié pour étendre l'étude à l'*in vivo*. *Caenorhabditis elegans*, un nématode terrestre très utilisé dans les études toxicologiques a été choisi [9, 10]. Les expériences d'introduction des NPs dans son milieu et les premiers résultats toxicologiques seront détaillées dans le chapitre 5.

Références

1. Krug, H.F. and P. Wick, *Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge.* Angew. Chem., Int. Ed., 2011. **50**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1260-1278.
2. Buzea, C., I. Pacheco, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity.* Biointerphases, 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
3. Lan, Y., Y. Lu, and Z. Ren, *Mini review on photocatalysis of titanium dioxide nanoparticles and their solar applications.* Nano Energy, 2013. **2**(5): p. 1031-1045.
4. Braun, J.H., A. Baidins, and R.E. Marganski, *TiO_2 pigment technology: a review.* Progress in Organic Coatings, 1992. **20**(2): p. 105-138.
5. Chen, X. and S.S. Mao, *Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications.* ChemInform, 2007. **38**(41): p. 2891-2959.
6. IARC, *Titanium dioxide.* IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 47, 1989: p. 307 - 328.
7. Ivo Iavicoli, V.L., and Antonio Bergamaschi, *Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of In Vivo Studies.* Journal of Nanomaterials, 2012. **2012**: p. 36.
8. Iavicoli, I., et al., *Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies.* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011. **15**(5): p. 481-508.
9. Leung, M.C.K., et al., *Caenorhabditis elegans: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology.* Toxicological Sciences, 2008. **106**(1): p. 5-28.
10. Hulme, S.E. and G.M. Whitesides, *Chemistry and the Worm: Caenorhabditis elegans as a Platform for Integrating Chemical and Biological Research.* Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(21): p. 4774-4807.

Chapitre 1 : Etat de l’art

1. Les nanoparticules : propriétés et méthodes de synthèse

1.1. Généralités sur les nanomatériaux

1.1.1. Définition

Le préfixe « nano », dérivé du mot grec « nanos » signifiant « nain » représente dans le système international un milliardième (10^{-9}) d'une unité de base [1]. Les nanotechnologies regroupent toutes les recherches et applications associées de près au design, à la production et à l'utilisation de nano-objets. D'après la norme en vigueur, un objet possédant au moins une dimension sur trois inférieure à 100 nm est appelé nanoparticule (NPs) [2]. La Figure 1 permet d'apprécier l'échelle de taille des nano-objets.



Figure 1 : Echelle de taille des nano-objets par rapport aux objets qui nous entourent.

Les nanotechnologies peuvent être considérées comme une exploration de la miniaturisation où de nouvelles règles s'appliquent (voir partie 1.1.4.). Plus spécifiquement, lorsque la dimension nanométrique est atteinte, les propriétés physiques et chimiques peuvent devenir très différentes par rapport au même matériau dans sa forme massive (Figure 2) [3].

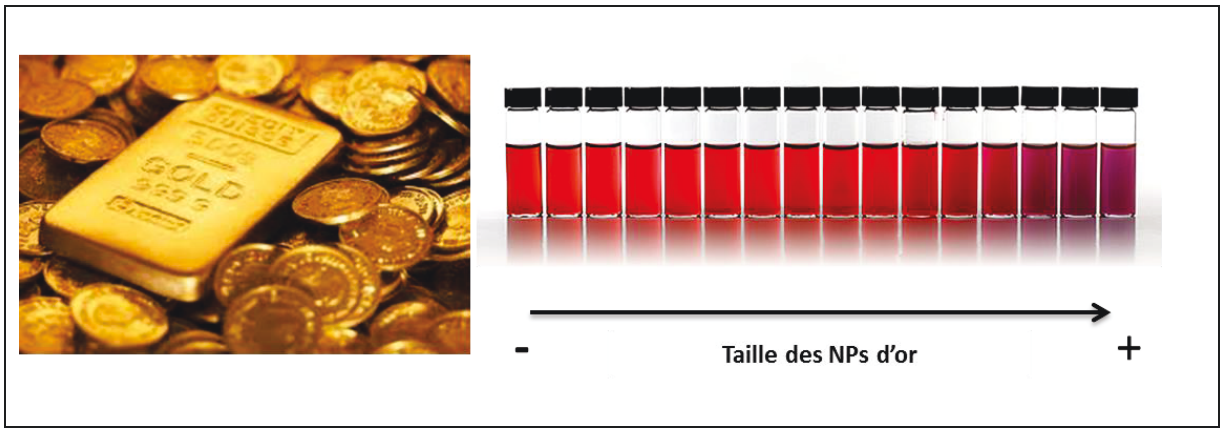


Figure 2 : Propriétés optiques de l'or à l'état massif et à l'état nanométrique en solution [4].

La découverte de l'intérêt de ces objets associée à l'évolution des techniques de synthèse a permis un essor rapide des NPs qui sont aujourd'hui retrouvées dans bien des domaines tels que la cosmétologie, l'industrie alimentaire ou encore l'industrie pharmaceutique. La production mondiale est estimée à plusieurs dizaines de milliers de tonnes chaque années et pourrait atteindre plusieurs centaines de milliers voire plusieurs millions de tonnes dans les années à venir [5]. Les NPs de dioxyde de titane sont parmi les plus utilisées et représentent aujourd'hui une part importante de la production globale [6].

1.1.2. Origine des nanoparticules

1.1.2.1. Origine naturelle

Les NPs sont abondantes dans la nature. Chaque année, les tempêtes de sables sahariennes propulsent entre 500 millions et 1 milliard de tonnes de particules de tailles allant de quelques nanomètres à plusieurs microns. D'autres particules sont produites par des procédés naturels tels que des éruptions volcaniques, des feux de forêts, ou simplement par l'érosion des sols. La proportion de ces particules naturelles avoisine 90 % ce qui fait de la Terre la principale productrice mondiale [7, 8].

1.1.2.2. Production humaine

La présence de NPs dans l'environnement est également imputée à l'homme qui en produit des milliards avec notamment les rejets industriels. Les moteurs des automobiles, en particulier diesel, sont par ailleurs la première source de particules atmosphériques en milieux urbains. Les moteurs d'avion, les pneus, les cigarettes, la destruction des bâtiments sont

également des générateurs de NPs. L'homme crée enfin de manière délibérée ses nano-objets pour des applications diverses détaillées ci-dessous (Figure 3) [1].

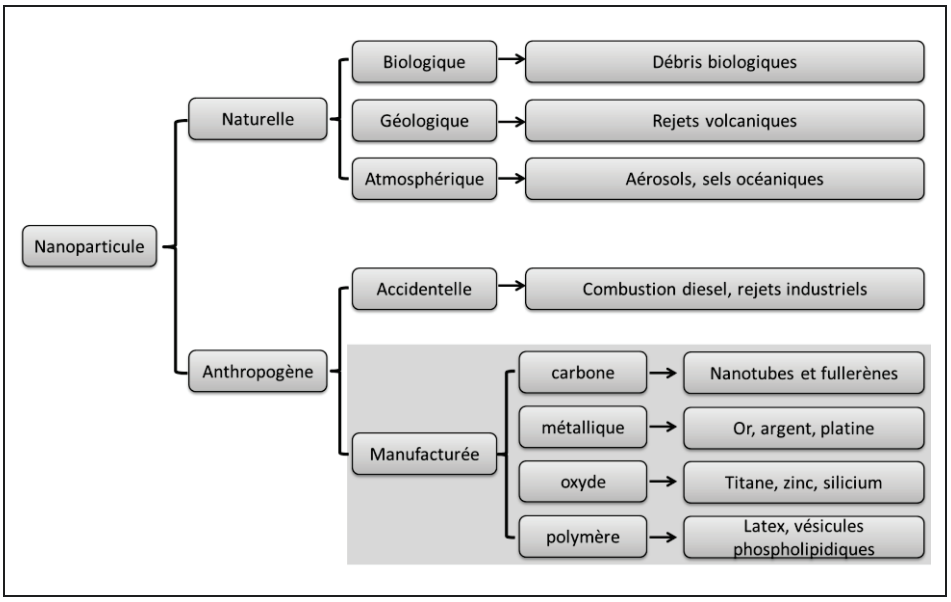


Figure 3 : Récapitulatif des différentes nanoparticules existantes classées selon leur nature et leur provenance (adapté de la référence [9]).

1.1.3. Classification des nanoparticules

1.1.3.1. Nature chimique des nanoparticules

Les nanomatériaux regroupent un grand nombre d'objets pouvant être d'origine minérale ou organique. Ils sont classés selon leur nature chimique.

1.1.3.1.1. Origine minérale

1.1.3.1.1.1. Les métaux

Les NPs métalliques sont comme leur nom l'indique constituées d'un métal ou d'un alliage métallique. Leur fabrication nécessite le plus souvent l'utilisation d'un métal noble résistant à l'oxydation. Les métaux les plus étudiées sont à base d'or, d'argent, de cuivre ou encore de platine. Les NPs métalliques présentent souvent des propriétés optiques originales dues à une oscillation collective des électrons de la bande de conduction (Figure 2) [10]. Les propriétés de conduction électrique des métaux peuvent également présenter un intérêt pour la fabrication de dispositifs nanométriques tels que des capteurs, des microprocesseurs ou encore des nano-antennes [11].

1.1.3.1.1.2. Les oxydes et sulfures

Les métaux peuvent aussi former des oxydes ou des sulfures métalliques avec des propriétés modifiées. Ces matériaux sont généralement des semi-conducteurs formés d'un réseau métal-oxygène ou métal-soufre. Les semi-conducteurs sont très utilisés comme composants de dispositifs électroniques tels que des transistors, des capteurs ou encore des diodes. Les oxydes métalliques les plus rencontrés sont le dioxyde de titane (TiO_2), l'oxyde de zinc (ZnO) et la silice (SiO_2) [12, 13]. Les principaux sulfures métalliques regroupent le sulfure de zinc (ZnS) et le sulfure de cuivre (CuS_x) [14].

1.1.3.1.1.3. Les NPs à base de carbone

Les NPs à base de carbone peuvent être retrouvées sous différents états telles que les nanotubes, les fullerènes (C_{60}) les nano-diamants et le graphène, qui sont quatre formes cristallines du carbone pur (Figure 4). Les nanotubes sont des structures cylindriques constituées de feuillets de graphite enroulés en une ou plusieurs couches. Les atomes de carbone peuvent également cristalliser en structures sphériques vides : les fullerènes. Enfin le graphène est un matériau bidimensionnel composé d'un feuillet unique de graphite. Ces NPs à base de carbone sont largement étudiées pour leurs propriétés thermiques, électroniques et mécaniques [15]. Les nano-diamants sont une version miniaturisée de la structure la plus dure connue. Ces objets sont particulièrement étudiés pour leur inertie chimique ainsi que pour leurs propriétés mécaniques et photoluminescentes [16].

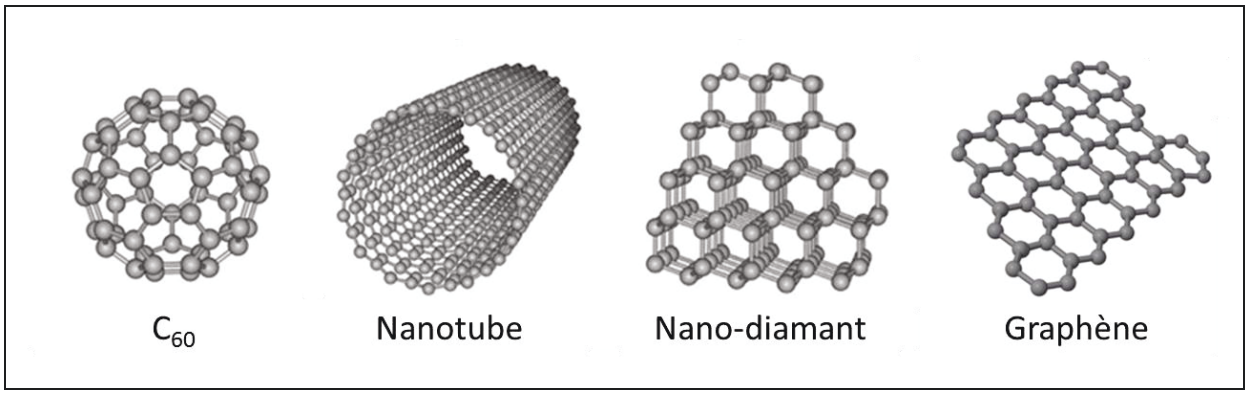


Figure 4 : Différentes structures adoptées par le carbone pur à la dimension nanométrique (figure adaptée des références [17, 18]).

1.1.3.1.2. Origine organique

1.1.3.1.2.1. Polymersomes

Les polymersomes sont des petites sphères vides constituées d'un polymère pouvant contenir une solution ou un principe actif. Ces objets s'apparentent à des vésicules artificielles et servent de barrières physiques avec le milieu extérieur. Ils sont en particulier étudiés pour la délivrance contrôlée de médicament. Leur surface peut en effet être modifiée avec un anticorps par exemple pour reconnaitre un organe ou un type cellulaire précis permettant un relargage ciblé. Les plus utilisés sont le poly(lactide), l'alginate ou encore le chitosan [19].

1.1.3.1.2.1. Les micelles et les vésicules

Les micelles sont des agrégats sphéroïdaux de molécules biphasées, les phospholipides. Ces molécules sont composées d'une tête polaire hydrophile et d'une queue apolaire hydrophobe. Dans un solvant polaire comme l'eau, la tête hydrophile constitue l'extérieur de la sphère et la queue se trouve au milieu. Les phospholipides peuvent également regrouper en bicouches concentriques pour former de petites vésicules artificielles aussi connues sous le nom de liposomes (Figure 5) [20, 21].

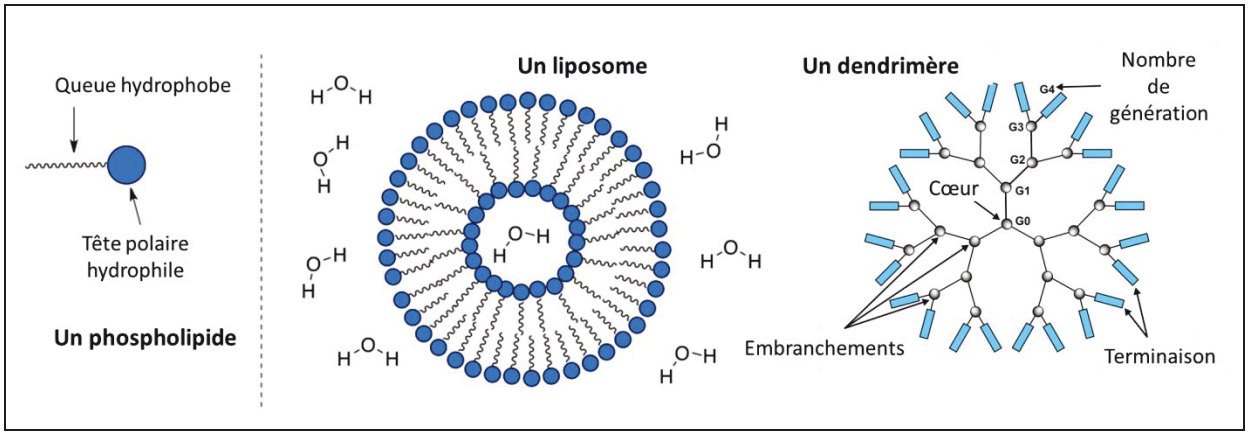


Figure 5 : Schémas d'un phospholipide, d'un liposome formé en solution aqueuse et d'un dendrimère [22].

1.1.3.1.2.1. Dendrimères

Enfin, les dendrimères sont des polymères structurés sous forme de branches. Cette structure, visible sur la Figure 5, leur confère une certaine rigidité tout en permettant la flexibilité des branches. Ce type d'arrangement peut notamment permettre le transport d'espèces chimiques. Les propriétés des dendrimères sont par ailleurs liées aux structures

moléculaires présentes à leur surface leur conférant des affinités ou non avec le solvant. Le poly(amidoamine) et le poly(propylène imine) sont les exemples les plus connus [23, 24].

1.1.3.2. Morphologie des nanoparticules

Les différentes morphologies des nanomatériaux, classés selon leur dimensionnalité, sont montrées sur la Figure 6. Les matériaux possédant une seule dimension nanométrique sont typiquement les films minces. Les revêtements d'épaisseur nanométriques présentent l'avantage d'être transparents et peuvent ainsi être appliqués sur des optiques pour en modifier les propriétés [1]. Le rapport de forme, défini par la taille de l'axe majeur sur l'axe mineur, permet de caractériser le paramètre d'élongation des NPs. Les objets à haut rapport de forme possèdent deux dimensions nanométriques. Nous retrouvons dans cette catégorie les nano-fils et les nanotubes. Enfin, les NPs à bas rapport de forme possèdent les trois dimensions nanométriques. Les formes sont dans ce cas nombreuses avec par exemple des cubes, des sphères, des étoiles, des octaèdres, etc...

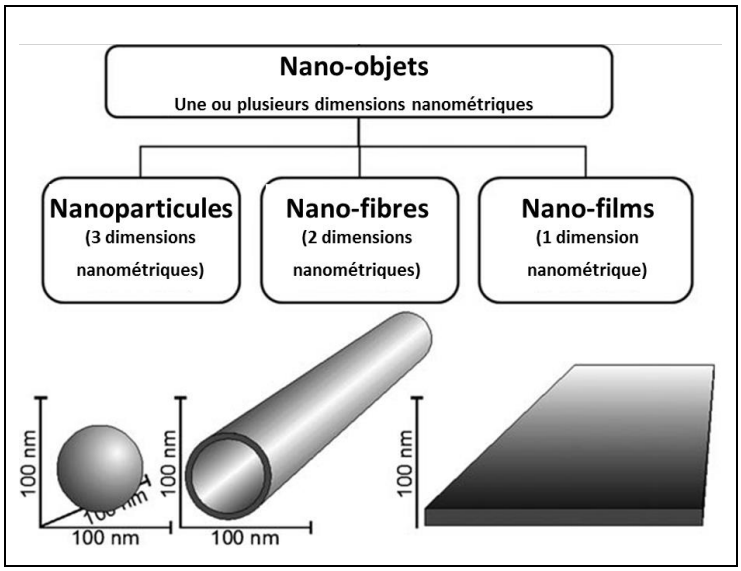


Figure 6 : Différents types de nanomatériaux selon le nombre de dimensions à l'échelle nanométrique (figure adaptée de la référence [2]).

1.1.4. Propriétés remarquables des nanoparticules

Trois facteurs principaux participent au comportement différent des nano-objets par rapport aux matériaux massifs : (i) les effets de taille, (ii) les effets de surface et enfin (iii) les effets quantiques. Ces facteurs influent sur la réactivité chimique ainsi que sur les propriétés mécaniques, optiques, électriques et magnétiques des nano-objets [1, 2, 25-27].

1.1.4.1. Les effets de taille

La plupart des propriétés des NPs sont directement liées à leur taille. Les NPs ont, par définition, des tailles inférieures aux longueurs d'onde du domaine visible (400 - 800 nm). La diffusion de la lumière et donc la visibilité des particules sont en conséquence minimisées. Les NPs peuvent, par exemple, être déposées en revêtements ultrafins présentant des propriétés diverses mais gardant leur transparence à la lumière visible. D'autre part, la petite taille des NPs leur permet d'accéder aux endroits les plus confinés. Les nano-objets suscitent par exemple beaucoup d'intérêt pour des applications médicales [28]. La taille des plus petits vaisseaux sanguins du corps humain mesure environ un micron de diamètre, ce qui permet *a priori* à toute NP d'y circuler librement même si les interactions avec le vivants sont en réalité plus compliquées. Enfin, la masse réduite des NPs modifie leur comportement dans les fluides (gazeux et liquide) en minimisant l'effet de la gravité. Les NPs ont ainsi plus tendance à persister en suspension dans l'air et dans les eaux.

1.1.4.2. Les effets de surface

L'augmentation de réactivité des nanomatériaux est principalement liée à leur importante surface qu'ils exposent. La Figure 7 (a) décrit l'évolution du pourcentage d'atomes de surface en fonction de la taille moyenne des particules. La fraction d'atomes situés en surface des matériaux et donc la densité surfacique apparaissent grandement augmentées par rapport aux matériaux micrométriques ou massifs. A titre d'exemple, le ratio surface sur volume ou masse d'une particule de 60 nm est 1000 fois supérieur à celui d'une particule de 60 µm. Les NPs présentent donc une surface exacerbée ce qui a pour conséquence une modification de leurs propriétés et une augmentation de la réactivité. Une large surface peut en effet favoriser la création de paires électron/trou, aussi appelées excitons, améliorer les propriétés photo-catalytiques et augmenter la quantité de défauts. Les atomes de surface possèdent par ailleurs moins de voisins et voient en conséquence leur énergie de liaison abaissée. Ainsi, certaines NPs métalliques ont des propriétés physiques modifiées comme l'or dont le point de fusion est drastiquement abaissé aux dimensions nanométriques comme le montre la Figure 7 (b).

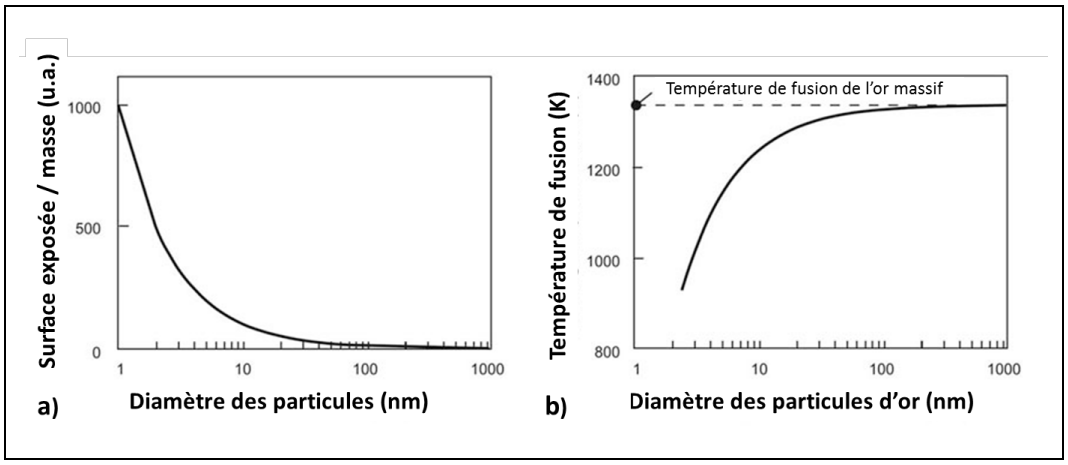


Figure 7 : (a) Ratio surface exposée sur masse et (b) point de fusion des particules d'or en fonction de la taille des particules (graphiques adaptés de la référence [1]).

1.1.4.3. Les effets quantiques

Le confinement quantique est un terme souvent employé dans les études des nano-cristaux. Dans le cas des matériaux massifs, les propriétés ne dépendent pas de la taille mais uniquement de la composition chimique. Dans le cas des nanomatériaux, de nouvelles lois physiques entrent en jeu influant sur les structures électroniques des atomes ce qui a pour effet de modifier certaines propriétés. Par exemple, la dispersion de NPs d'or colore les solutions aqueuses donnant une intense couleur rouge (Figure 2). Ce phénomène est dû à une oscillation collective des électrons, aussi appelée « résonnance plasmonique », qui interagit avec la lumière en absorbant dans le domaine visible. Un autre exemple d'effet quantique est la luminescence de certains semi-conducteurs. Les « quantum-dots » CdS et CdSe font partie des plus étudiés et constituent des particules de choix pour diverses applications notamment médicales [2, 25, 29, 30].

1.2. Le dioxyde de titane (TiO_2)

1.2.1. Origine du TiO_2

Le titane est le neuvième élément le plus abondant dans la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium. Le titane y est majoritairement retrouvé sous sa forme oxydée dans des minerais mixtes tels que l'ilménite ($FeTiO_3$), la pérovskite ($CaTiO_3$) ou bien la titanite ($CaTiSiO_5$). Le TiO_2 pur existe également dans la nature sous les formes décrites ci-après. Le titane peut être obtenu par un procédé d'extraction utilisant des chlorures. Cette technique optimisée par le chimiste français Henri Sainte-Claire Deville permet d'obtenir le tétrachlorure de titane ($TiCl_4$) qui peut ensuite être réduit *via* le « procédé Kroll » pour obtenir

du titane solide pur. Le TiO_2 peut également être extrait des différents minerais par des traitements à l'acide sulfurique produisant le sulfate de titanyle ($TiOSO_4$). Ce composé peut ensuite être hydrolysé et déshydraté pour donner du TiO_2 [31-33].

1.2.2. Structures et propriétés du TiO_2

1.2.2.1. Structure du TiO_2

Le TiO_2 est un composé chimiquement inerte à haut indice de réfraction (2,61) qui présente une activité photo-catalytique [34]. Il existe sous trois formes cristallines : anatase, rutile et brookite. Les propriétés structurales de chacun de ces polymorphes sont présentées dans le Tableau 1.

Phase	Rutile	Anatase	Brookite
Système Symétrie	quadratique P D_{4h}^{14}	quadratique I D_{4h}^{19}	orthorhombique P_{bca} D_{2h}^{15}
Nombre de TiO_2 par maille	2	4	8
Paramètres de maille (Å)	a = 4,594 b = 2,958	a = 3,785 b = 9,514	a = 9,184 b = 5,447 c = 5,145
Rayons atomique (Å)	$r(Ti^{4+}) = 0,605$ $r(O_2^-) = 1,36$	$r(Ti^{4+}) = 0,605$ $r(O_2^-) = 1,36$	$r(Ti^{4+}) = 0,605$ $r(O_2^-) = 1,36$
d (Ti^{4+} - O_2^-) (Å)	1,95 – 1,99	1,93 – 1,98	1,86 – 2,04
Coordinence	$[Ti^{4+}] = 6$ $[O_2^-] = 3$	$[Ti^{4+}] = 6$ $[O_2^-] = 3$	$[Ti^{4+}] = 6$ $[O_2^-] = 3$
Compacité	0,705	0,645	0,655
Masse volumique ($g.cm^{-3}$)	4,24	3,89	4,12
Dureté (Mohs)	6 – 6,5	5,5 – 6,0	5,5 – 6,0
Indice de réfraction	2,61-2,89	2,48-2,56	2.58-2,70
Enthalpie de formation $\Delta_f H°(298,15K)$ ($kJ.mol^{-1}$)	-944,50±0,96	-939,27±1,26	-941,00
Entropies de formation $\Delta_f S°(298,15K)$ ($kJ.mol^{-1}.K^{-1}$)	50,37±0,21	49,95±0,42	-

Tableau 1 : Propriétés structurales des structures cristallines possibles du TiO_2 [35, 36].

Le rutile est une forme (macroscopique) thermodynamiquement stable tandis que l'anatase et la brookite sont des formes métastables qui tendent à se transformer en rutile de manière irréversible à température élevée (750-915°C) [37, 38]. Elles sont majoritairement obtenues lors des synthèses par « chimie douce » comme nous le verrons plus loin. Les trois structures, présentées sur la Figure 8, sont constituées d'octaèdres TiO_6 déformés reliés de manières différentes. La brookite adopte une structure orthorhombique où les octaèdres partagent trois arêtes et les coins. Le rutile possède une structure dans laquelle deux arêtes

opposées de chaque octaèdre sont partagées pour former une chaine linéaire le long de l'axe [001]. Enfin, l'anatase cristallise en un réseau quadratique dans lequel les octaèdres sont assemblés en zig-zag en partageant quatre arêtes [39, 40]. De manière générale, la structure rutile est la plus communément retrouvée dans la nature. Cependant, en dessous d'une certaine taille (quelques dizaines de nanomètres), c'est la phase anatase qui est thermodynamiquement la plus stable [6, 41, 42].

Le TiO_2 est par ailleurs un composé très inerte. Il est en effet insoluble dans tous les liquides à l'exception de l'acide sulfurique et l'acide fluorhydrique [38].

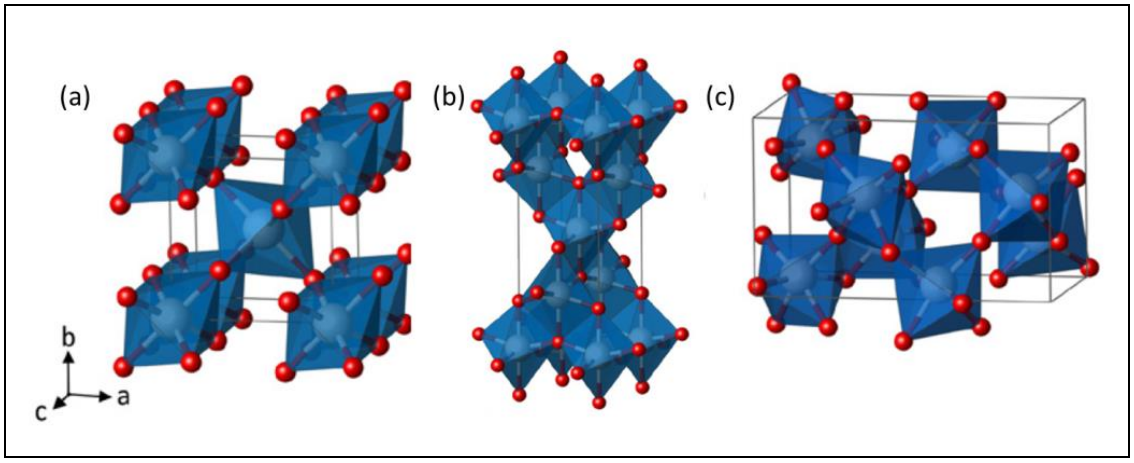


Figure 8 : Représentation 3D des structures (a) rutile, (b) anatase et (c) brookite (figure adaptée de la référence [43]).

1.2.2.2. Propriétés optiques

Selon les phases cristallines, l'indice de réfraction du TiO_2 varie mais reste élevé (Tableau 2). Ainsi, 96% de la lumière est réfléchie ce qui donne à l'œil humain une impression de couleur blanche. Cette propriété optique et son grand pouvoir couvrant, font du TiO_2 un pigment de choix, massivement utilisé dans l'industrie des peintures.

Phase	**Rutile**	**Anatase**	**Brookite**
Indice de réfraction	2,61 – 2,89	2,48 – 2.56	2,58 – 2,70
Band gap	3,02 eV (411 nm)	3,23 eV (384 nm)	3,14 eV (395 nm)

Tableau 2 : Indice de réfraction et valeur du gap énergétique des phases du TiO_2 [44, 45].

1.2.2.3. Propriétés électroniques

Le dioxyde de titane est un matériau semi-conducteur (Tableau 2). Son comportement est généralement décrit *via* la théorie des bandes dont les représentations sont exposées sur la Figure 9. En physique du solide, la théorie des bandes est une modélisation des valeurs d'énergie que peuvent prendre les électrons d'un solide à l'intérieur de celui-ci. De façon générale, ces électrons n'ont la possibilité de prendre que des valeurs d'énergie comprises dans certains intervalles, lesquels sont séparés par des « bandes » d'énergie interdites. Cette modélisation conduit à parler de bandes d'énergie ou de structure de bandes. Dans le cas des semi-conducteurs, la bande de valence est la dernière couche occupée par les électrons et la bande de conduction est non peuplée. Le « gap » énergétique de la bande interdite y est suffisamment petit pour que des électrons puissent être promus vers la bande de conduction. Lors de la promotion d'un électron vers la bande de conduction, une paire électron/trou est créée. La charge créée migre alors à la surface du matériau et peut réagir avec une espèce adsorbée. Ce processus de photo-décomposition implique généralement un ou plusieurs radicaux ou espèces intermédiaires telles que $^{\bullet}OH$, O^{2-}, H_2O_2 ou O_2 qui jouent un rôle important dans les mécanismes réactionnels photo-catalytiques [6].

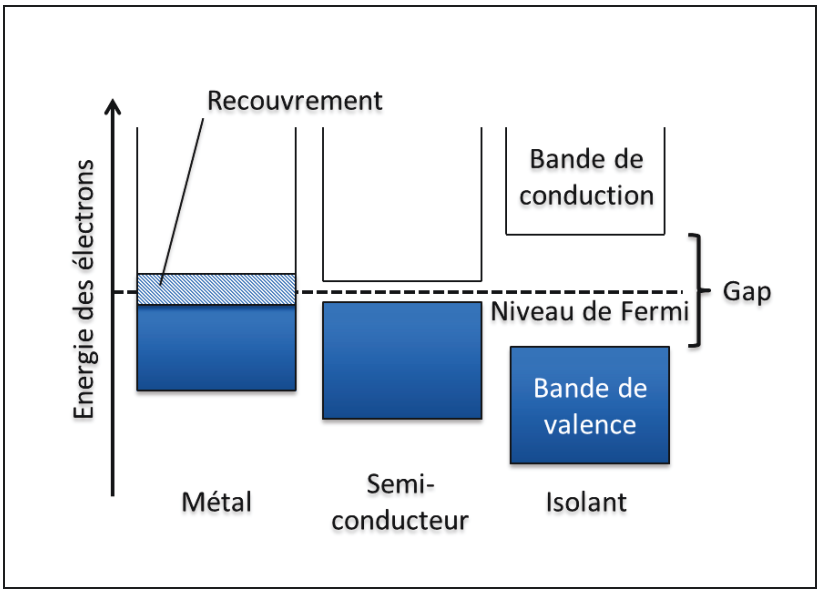


Figure 9 : Représentation schématique des différences de hauteur de gap pour un métal, un semi-conducteur et un isolant.

L'énergie de gap du TiO_2 est de l'ordre de 3 eV (Tableau 2) activable par l'énergie d'un rayonnement électromagnétique ultra-violet.

1.2.2.4. La photo-catalyse

1.2.2.4.1. Principe de la photo-catalyse

La photo-catalyse est une discipline regroupant une large variété de réactions incluant des processus de décomposition d'espèces chimiques. Le principe de la photo-catalyse est schématisé sur la Figure 10. Lorsque le TiO_2 est exposé à un rayonnement UV, les photons sont absorbés et un électron est promu vers la bande de conduction laissant un trou dans la bande de valence. Le processus fondamental est décrit par l'équation suivante où $h\nu$ symbolise le photon incident, e^- l'électron et h^+ le trou :

$$TiO_2 + h\nu \rightarrow e^- + h^+$$

L'électron peut alors directement créer un courant électrique dans une cellule photovoltaïque ou bien réagir avec une espèce environnante lors d'un processus de photo-catalyse. Une espèce chimique peut ainsi être réduite au contact d'un électron ou bien oxydée en contact d'un trou.

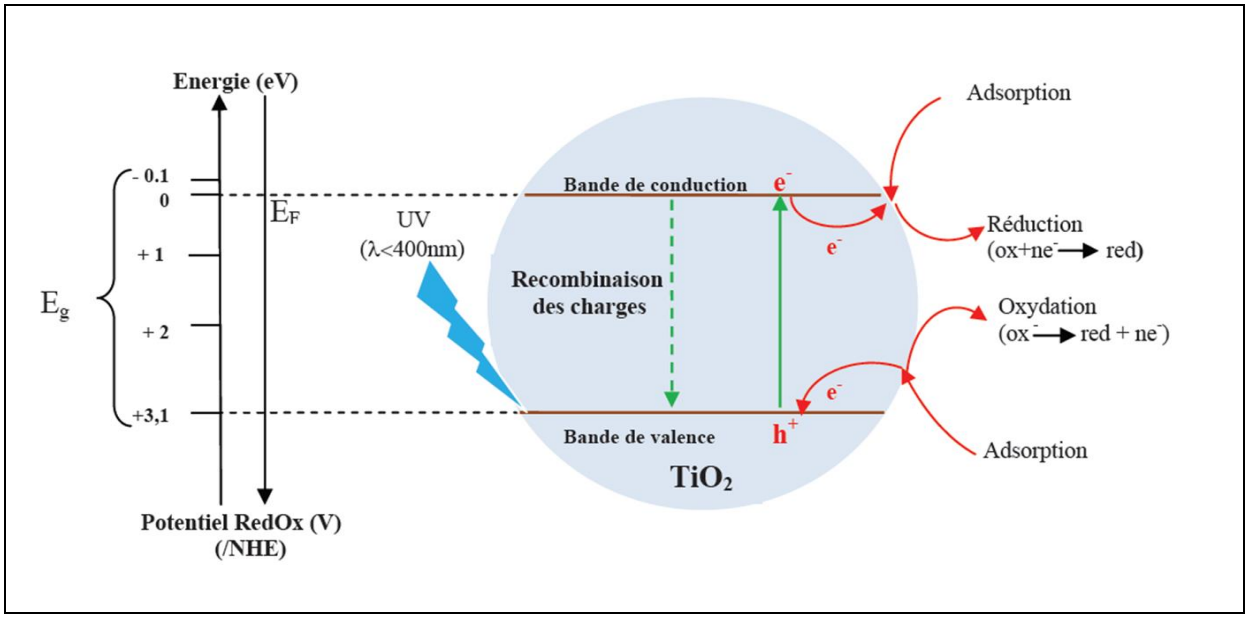


Figure 10 : Schéma de la photo-catalyse à la surface d'une NPs de TiO_2 [36, 46].

1.2.2.4.1. Applications utilisant le principe de la photo-catalyse

Le principe de la photo-catalyse est utilisé pour diverses applications comme la dépollution de l'air, le traitement des eaux usées et la décontamination. Les NPs de TiO_2 peuvent en effet catalyser la dégradation des dérivés d'arsenic contenu dans les eaux usées [47], désinfecter en détruisant des agents pathogènes [48] ou encore dégrader des espèces

organiques [32, 49, 50]. Le TiO_2 peut également être utilisé pour la fabrication de revêtements auto-nettoyants. La dimension nanométrique permet en outre d'allier la transparence des fenêtres avec les propriétés de photo-dégradation des saletés déposées [51, 52]. Les propriétés photo-catalytiques peuvent enfin permettre de réaliser le craquage de l'eau en H_2 et O_2 pour des applications énergétiques [53].

1.2.2.5. Autres utilisations du TiO_2

1.2.2.5.1. Utilisation pour les pigments

A l'état micrométrique, le TiO_2 est principalement utilisé en tant que pigment car il propose un blanc éclatant et une forte résistance à la décoloration (cf. propriétés optiques). On estime que 70 % du TiO_2 produit est utilisé en tant que pigment pour les peintures, les plastiques, les papiers et les produits cosmétiques. Le reste de la production regroupe les applications antimicrobiennes, catalytiques ou encore médicales [54]. L'émergence des nanotechnologies a récemment permis une production importante de TiO_2 nanométrique ouvrant la voie à de nouvelles applications. Les NPs de TiO_2 (TiO_2-NPs) restent d'apparence blanche et constituent également des pigments de choix notamment pour des peintures nacrées [55, 56].

1.2.2.5.2. Utilisation pour les cosmétiques et crèmes solaires

Le TiO_2 est aussi largement utilisé comme principe actif dans les crèmes solaires. En effet, il peut bloquer les rayons UV du spectre solaire grâce à son gap énergétique à forte absorption de la lumière ultra-violette. La dimension nanométrique rend par ailleurs les crèmes plus transparentes, moins visqueuses et plus adhérentes à la peau [32, 57]. Les NPs de TiO_2 utilisées par les industriels sont cependant parfois recouvertes d'un revêtement d'alumine ou de silice afin de passiver leur surface [58].

1.2.2.5.3. Utilisation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique

Le TiO_2 micro- et nanométrique est également utilisé comme colorant alimentaire sous le nom de E171 [2, 32]. On le retrouve enfin dans certains dentifrices et médicaments principalement en tant qu'excipient ou fluidifiant [54, 59].

1.3. Principales voies de synthèse des nanoparticules de TiO_2

La miniaturisation des objets jusqu'à l'échelle nanométrique constitue un enjeu qui, aujourd'hui encore, concentre l'attention d'une large communauté de scientifiques. Il existe un grand nombre possible de voies de synthèse des NPs que l'on peut regrouper en deux grandes catégories : les approches descendantes (top-down) et ascendantes (bottom-up).

1.3.1. Approche descendante (top-down)

Le principe de cette approche est de partir d'un matériau massif de nature souhaitée puis de le casser de manière graduelle en objets de taille de plus en plus petite. La technique la plus répandue est le broyage planétaire. Ce procédé utilise des billes d'acier mises en rotation dans une chambre fermée en présence d'une ou plusieurs poudres micrométriques à réduire. La taille finale des objets dépend généralement de la taille des billes, de la vitesse de rotation, de la température et du temps de broyage. Pour une large production, cette méthode est économique. Ce procédé n'est cependant pas adapté à la synthèse de NPs de morphologie contrôlée et il est préférable d'utiliser une approche dite bottom-up [60].

1.3.2. Approche ascendante (bottom-up)

Le but de l'approche bottom-up est de construire un nanomatériau atome par atome ou molécule par molécule. L'intérêt majeur de cette approche est qu'il est possible, en modulant l'ensemble des paramètres, de contrôler la taille, la morphologie et la structure des NPs. Il existe plusieurs méthodes de synthèse possibles. Voici la description de certaines d'entre-elles.

1.3.2.1. Synthèses en milieu liquide

1.3.2.1.1. La voie « sol-gel »

La synthèse de nanoparticules par voie dite sol-gel est une succession de réaction d'hydrolyse-condensation des précurseurs qui sont principalement des alcoxydes métalliques de type $M(OR)_4$ constitués d'un atome métallique entouré de groupements alkyles simples (méthoxy, éthoxy). Ces réactions sont des polymérisations minérales qui forment chronologiquement des particules colloïdales, le sol, puis des gels [36, 61, 62]. Ce procédé peut également être considéré comme une méthode de production de matériaux dispersés par croissance d'oxopolymères dans une solution [63]. La réactivité des précurseurs est liée aux

groupements alcoxy électroattracteurs qui renforcent le caractère électrophile du métal. Dans le cas des métaux de transition comme le titane, la réactivité est aussi due aux insaturations de coordinence. Le mécanisme chimique de transformation se décompose en deux étapes : (i) l'hydrolyse correspondant à la réaction d'activation du précurseur et (ii) la polymérisation qui équivaut à la croissance des chaines.

1.3.2.1.1.1. L'hydrolyse des précurseurs

L'étape d'hydrolyse est définie par la réaction suivante :

$$M(OR)_n + xH_2O \rightarrow M(OR)_{n-x}(OH)_x + xROH$$

Cette réaction est initiée par l'ajout d'eau ou d'un mélange eau/éthanol sur un alcoxyde métallique. Le mécanisme réactionnel est une substitution nucléophile du type SN_2 (1) qui commence par la fixation d'une molécule d'eau sur le métal avec un transfert de proton (2) qui se conclut par un départ d'un groupe ROH (3), comme indiqué sur la Figure 11.

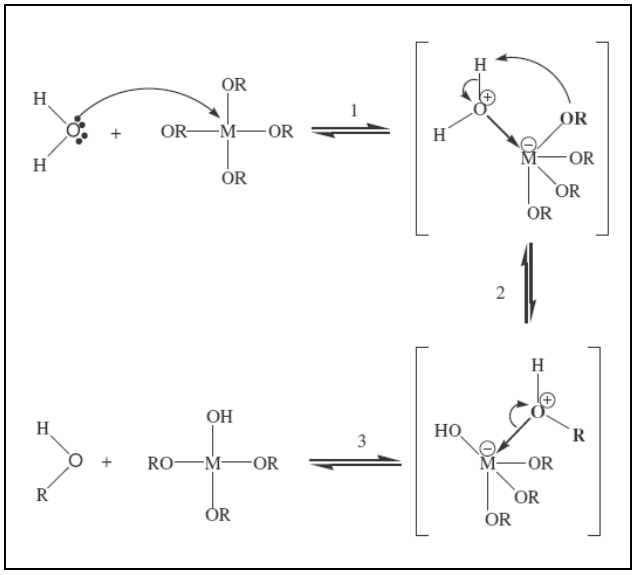


Figure 11 : Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse d'un précurseur de type alcoxyde métallique [36].

La vitesse d'hydrolyse dépend de plusieurs paramètres comme la quantité d'eau et de précurseur et la température du milieu réactionnel. La vitesse de réaction peut également être fortement accélérée par l'utilisation de catalyseurs (acide ou basique).

1.3.2.1.1.2. La condensation inorganique

La condensation commence bien souvent avant la fin de l'hydrolyse du précurseur. Lors de cette étape, quatre mécanismes sont en concurrence : l'alcoxolation, l'oxolation, l'alcoolation et l'olation (Figure 12).

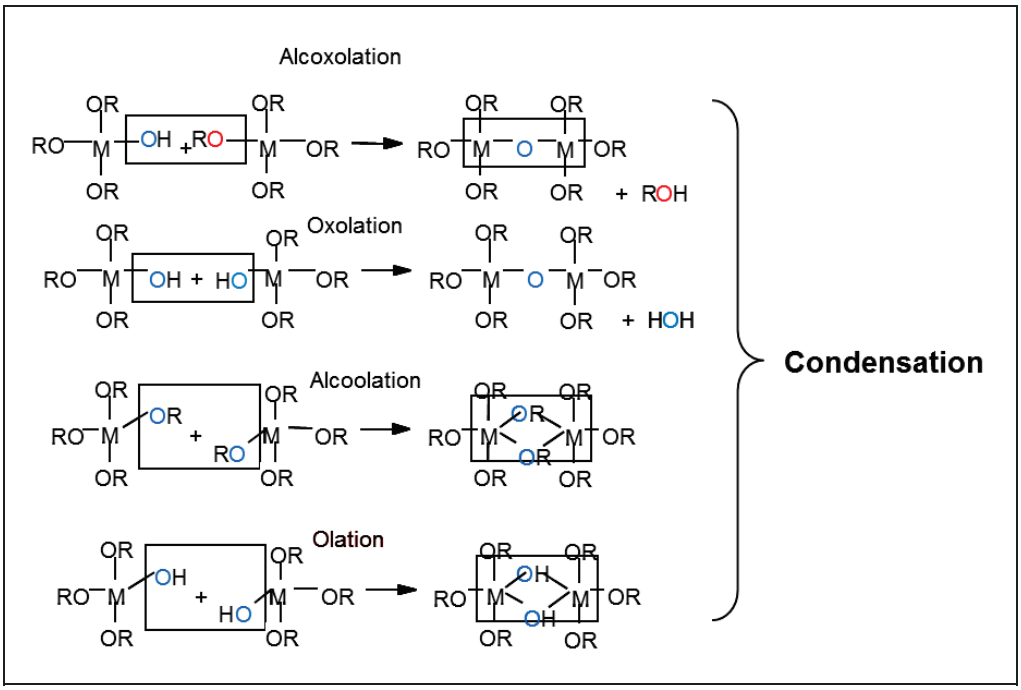


Figure 12 : Mécanismes de condensation en concurrence des alcoxydes métalliques.

Le groupement hydroxyle formé lors de l'hydrolyse est bien meilleur nucléophile que le groupement alcoxyde. Il réagit par substitution nucléophile avec un mécanisme analogue à l'hydrolyse pour former un pont M-O-M avec une augmentation provisoire de la coordinence du métal. Deux mécanismes entrent alors en concurrence : l'alcoxolation et l'oxolation [62]. Dans le cas de l'alcoxolation, la réaction se produit entre deux alcoxydes métalliques dont l'un seulement a été partiellement hydrolysé. Le mécanisme réactionnel est alors semblable à celui de l'hydrolyse. La réaction se produit entre deux alcoxydes partiellement hydrolysés avec départ d'une molécule d'eau.

Une polymérisation dite « par coordination » peut aussi prendre place. Ces mécanismes ont lieu quand la coordination du métal n'est pas satisfaite sous sa forme alcoxyde comme pour le titane. Dans ce cas et à condition que l'encombrement stérique dû aux ligands le permette, un pont M-OX-M peut être formé (X= H ou R) et on parlera d'olation ou d'alcoolation. Il s'agit en effet d'une simple addition nucléophile entre un groupement OR

(alcoolation) ou OH (olation) chargé négativement et un centre métallique chargé positivement.

Lors de l'étape de condensation, la quantité de germes dépend de nombreux paramètres et en particulier de la concentration en monomères dans la solution de synthèse. Une phase de croissance est ensuite amorcée s'achevant avec la consommation de la totalité du précurseur. En conséquence, la taille des particules synthétisées dépend du nombre de germes créés ainsi que de la quantité de précurseur. La forme des particules peut être en revanche influencée par différents paramètres qui seront discutés ultérieurement. La voie sol-gel est la voie reine en ce qui concerne le contrôle de taille et de morphologie des NPs. Une des limites de cette voie est liée à l'utilisation des précurseurs parfois très couteux dans le cas d'alcoxydes par exemple [31, 64-66].

1.3.2.1.2. Synthèse par voie hydrothermale

Le terme hydrothermal fait référence à n'importe quelle réaction hétérogène réalisée en solvant aqueux dans des conditions de pressions et de températures élevées. Les synthèses par voie hydrothermale sont généralement conduites en autoclave en téflon renforcés par une coque en acier. Les conditions extrêmes qui y règnent permettent de dissoudre et de recristalliser des matériaux insolubles dans des conditions ordinaires. Comme pour la voie sol-gel, un alcoxyde métallique peut être utilisé comme précurseur. Les réactifs de départ sont introduits dans l'enceinte qui est ensuite scellée et chauffée. Les paramètres contrôlables (concentration en précurseurs, volume d'autoclave occupé et température) influent sur la pression interne autogène lors de la réaction. La température peut, dans ce type d'équipement, dépasser le point d'ébullition de l'eau qui peut atteindre sa pression de vapeur saturante. La pression interne influe sur la solubilité et sur les taux de croissance cristalline des NPs. L'ajustement des paramètres modulables est donc essentiel pour l'obtention d'objets de morphologies contrôlées. De la même manière que pour la voie sol-gel, d'autres paramètres entrent en jeu dans la formation des objets finaux et différentes stratégies peuvent être élaborées [6, 67-70].

1.3.2.1.3. Contrôle de morphologie des nanoparticules

Les aspects discutés dans cette partie sont communs aux voies sol-gel et hydrothermale. L'énergie de surface des particules est un aspect crucial dans le contrôle de leur morphologie. La forme d'un cristal peut être prédite en utilisant le théorème de Gibbs-

Curie-Wulff. Dans les conditions d'équilibre, la surface qui possède la plus grande énergie libre croît plus rapidement. L'énergie de surface ou tension superficielle est définie par l'énergie par unité de surface associée à la cohésion des molécules entre-elles. Par exemple, les différentes faces d'un cristal n'exposent pas les atomes constitutifs de la même manière et présentent donc différentes énergies libres de surface. Un atome cherchant à s'entourer d'un maximum de voisins pour minimiser son énergie, l'énergie de surface des différents plans cristallins sera d'autant plus faible qu'ils sont denses [71]. Dans un cristal, les surfaces les plus énergétiques sont donc naturellement minimisées. Dans le cas d'une synthèse en milieu liquide, cela se traduit par une croissance cristalline plus rapide des plans les plus énergétiques. La forme finale de la NPs est ainsi gouvernée par la compétition qui existe entre les cinétiques de croissance des différentes faces [72, 73].

Dans le cas du TiO_2, la forme thermodynamiquement stable est une bipyramide à base tronquée (Figure 13 (a)). Les énergies de surface évoluent en fonction de la présence d'atomes de titane en surface. Les surfaces (101) et (001) sont modélisées sur la Figure 13 (b) et (c). Les représentations montrent que les atomes de titane de la face (101) et ses équivalentes sont à coordinence (nombre d'atome voisins) de 5 ou 6. A l'opposé, la face (001) n'expose que des atomes de titane à coordinence de 5. Ainsi la face (001) est plus réactive que la face (101) et se voit en conséquence minimisée [42]. La croissance cristalline dépend fortement de ces aspects mais peut également être modulée par d'autres paramètres.

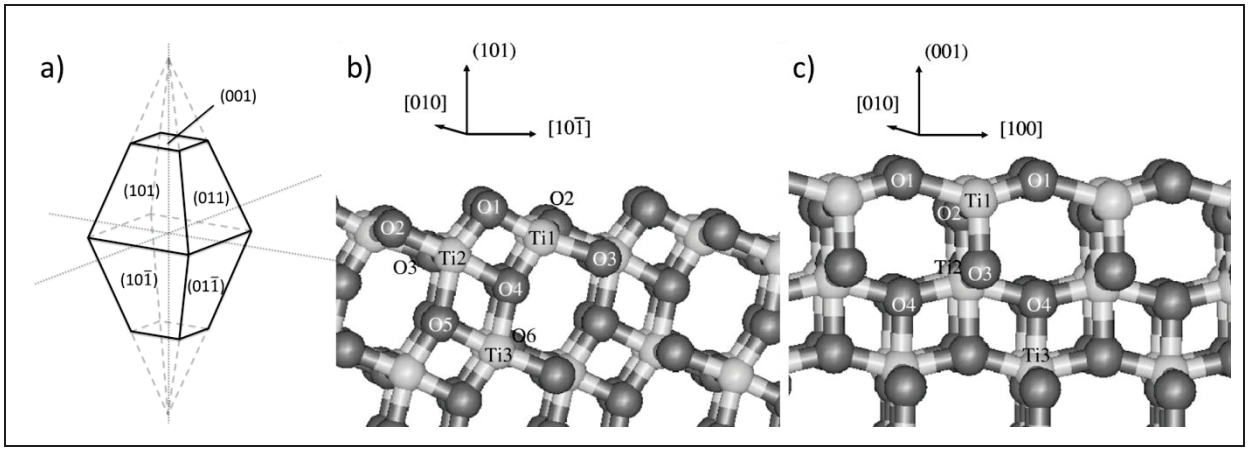


Figure 13 : a) Modélisation de la bipyramide tronquée, forme thermodynamiquement stable de l'anatase d'après le théorème de Wulff, b) modélisations de la face (101) et c) de la face (001) (figure adaptée de la référence [42]).

1.3.2.1.3.1. Contrôle de la morphologie par le pH

Le pH est un paramètre important lors de la croissance cristalline. Il peut modifier la réactivité des précurseurs, catalyser sélectivement une réaction ou même influer directement sur la chimie de surface. La Figure 14 décrit l'évolution calculée de la forme stable des nano-cristaux d'anatase en fonction du pH de synthèse [74]. Les nano-cristaux d'anatase connaissent une variation de forme allant de la bipyramide tronquée à pH acide à une forme plus allongée avec apparition de la face (100) à pH basique.

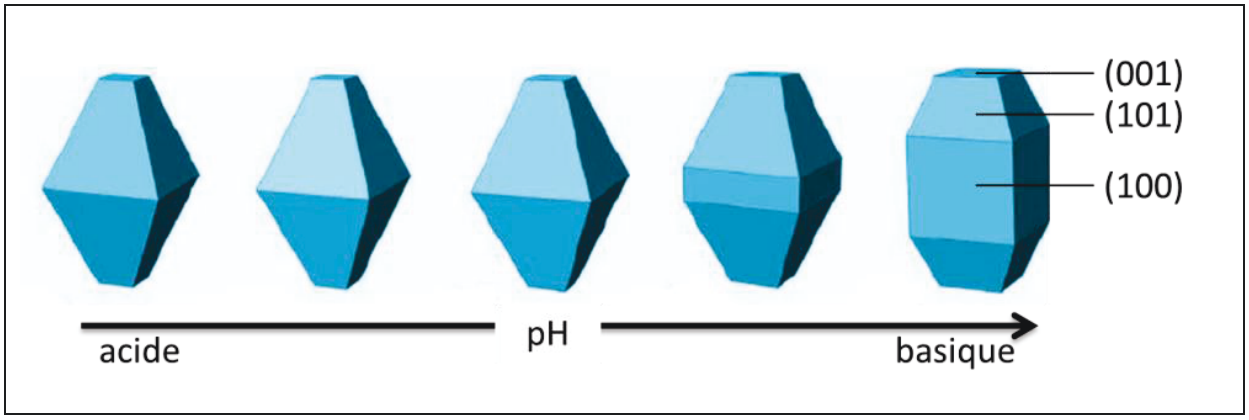


Figure 14 : Evolution de la forme des cristaux d'anatase en fonction du pH (figure adaptée de la référence [74])

L'énergie libre évolue donc en fonction de l'état de protonation, associé au pH, des surfaces en croissance [75]. Plus spécifiquement, lorsque le pH devient basique et que les faces sont peu protonées, la face (101) devient plus réactive que la face (100), et se voit donc minimisée. Les énergies libres de surface de l'anatase en fonction du pH sont affichées dans le Tableau 3 et l'inversion est surlignée. Cette modification entraine ainsi la formation d'objets allongés.

	Hydrogénée pH bas	Partiellement hydrogénée	Hydratée pH neutre	Partiellement oxygénée	Oxygénée pH élevé
(001)	1,88	2,28	1,55	1,89	2,55
(100)	1,41	1,67	1,113	1,58	1,53
(101)	1,14	1,41	1,04	1,50	2,07

Tableau 3 : Energie de surface (en J/m²) des faces cristallines de l'anatase en fonction de l'état de protonation et donc du pH du milieu réactionnel [74].

Cette évolution a pu être vérifiée plusieurs fois expérimentalement et un exemple est montré en Figure 15 [76-80]. Il est donc possible de contrôler la morphologie des NPs

simplement en modulant les paramètres de départ. Le contrôle de morphologie des NPs utilisant les aspects thermodynamiques présente l'avantage de ne nécessiter que quelques ajustements pour obtenir les objets de morphologies contrôlées purs. Cette méthode comporte cependant ses limites. En effet, le contrôle de morphologie se limite aux possibilités offertes par la thermodynamique et n'est donc pas total. L'utilisation d'agents structurants, contrôlant sélectivement la croissance cristalline, ouvre la voie à la synthèse d'objets à morphologies plus diverses.

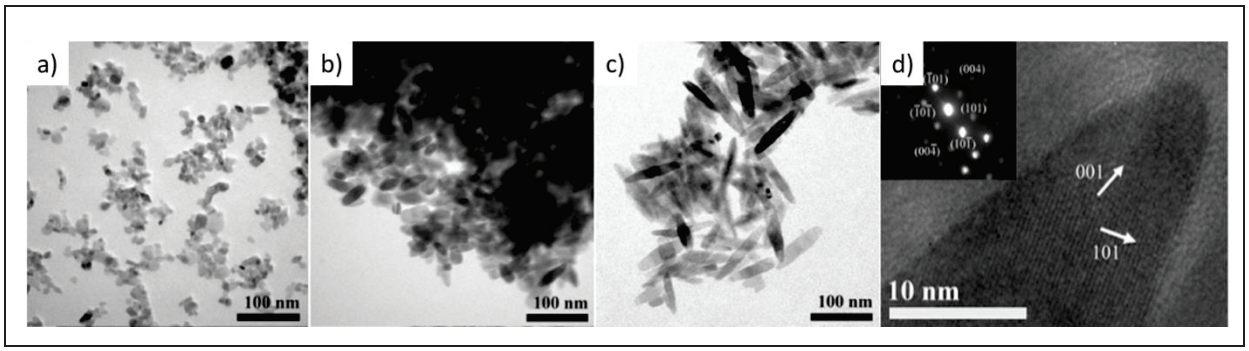


Figure 15: NPs de TiO_2 synthétisées par voie hydrothermale à différents pH a) 2,2, b) 4,0 et c) 5,6. (d) Image de MET haute résolution avec sa transformée de Fourrier confirmant que l'axe [001] est le plus allongé [81].

1.3.2.1.3.2. Contrôle de morphologie à l'aide d'agents structurants

Le principe du contrôle de morphologie des NPs à l'aide d'agents structurants consiste à brider la croissance cristalline dans une ou plusieurs directions lors de la synthèse. Les agents agissent en venant s'adsorber spécifiquement sur une ou plusieurs faces cristallines créant ainsi une gêne stérique. Le choix et la concentration des espèces chimiques sont en conséquence des paramètres essentiels à contrôler pour obtenir l'objet voulu. La Figure 16 montre un exemple de synthèses de NPs de TiO_2 assistées par l'utilisation d'agents fonctionnalisant. L'utilisation combinée de ces agents permet dans ce cas de réaliser diverses morphologies.

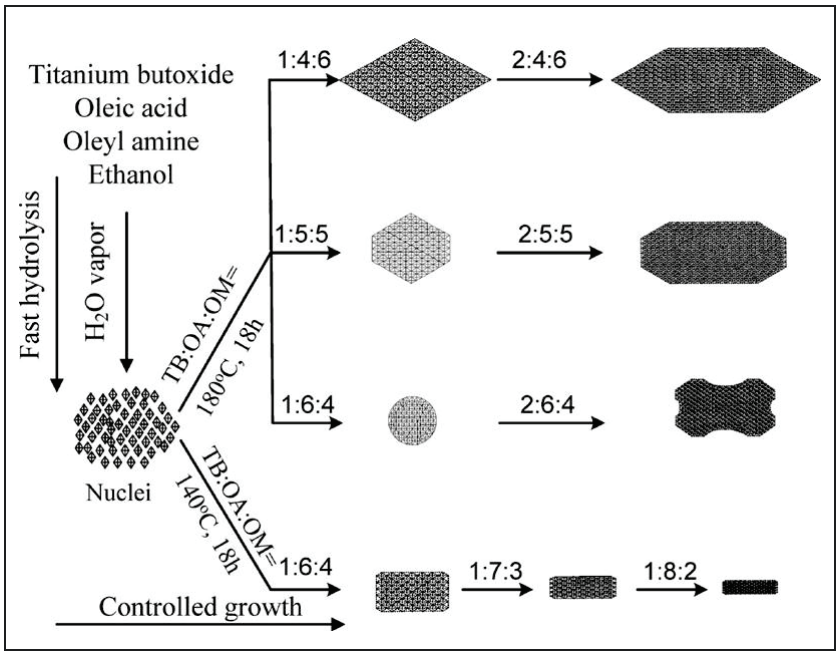


Figure 16 : Schématisation de la synthèse de NPs de TiO_2 à morphologies contrôlées à l'aide d'agents structurants [82].

Les agents structurants les plus couramment rencontrés sont des amines secondaires ou tertiaires et des acides carboxyliques. Il est ainsi possible de synthétiser des NPs de TiO_2 de formes diverses telles que des nano-sphères, des nano-fils, des nano-cubes (Figure 17 (a)), des nano-bâtonnets (Figure 17 (b)) ou encore des nano-aiguilles (Figure 17 (c)) [82-88].

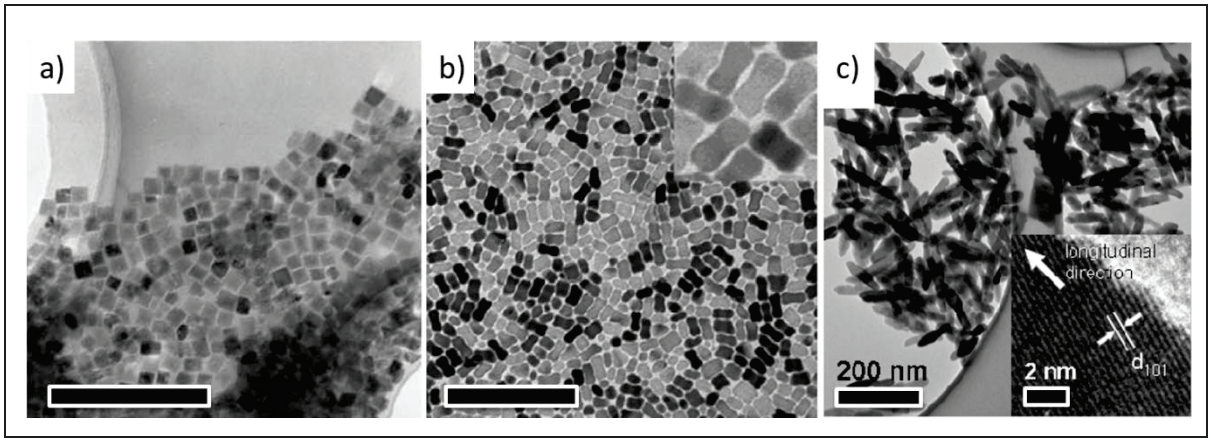


Figure 17 : NPs de TiO_2 synthétisées à l'aide d'un ou plusieurs agents structurants : a) nano-cubes synthétisés à l'aide de triéthanolamine et d'acide oléique (échelle 200 nm) [88], b) nano-bâtonnets synthétisés à l'aide d'acide oléique et d'oleylamine (échelle 100 nm) [82] et c) nano-aiguilles formées à l'aide de diéthylènetriamine [87].

La principale limite de ce type de chimie est qu'il est ensuite nécessaire d'éliminer l'agent structurant sans altérer les particules synthétisées. Des lavages à l'eau ou avec divers solvants peuvent suffire mais dans certains cas, la phase organique subsiste. Dans le cas d'une

étude toxicologique, cette problématique est très importante, les agents pouvant induire eux-mêmes une toxicité.

1.3.2.2. Synthèse industrielle par aérosol

Le principe de la synthèse par aérosol est de pulvériser un liquide contenant un précurseur inorganique à travers une flamme. L'élévation soudaine de température active la dégradation rapide du précurseur et initie la formation des NPs. Les particules créées coalescent entre-elles jusqu'à leur frittage. La méthode de pulvérisation crée une compétition entre la coagulation et le frittage des particules ce qui permet d'obtenir des objets de taille nanométrique. En effet, en régulant la concentration en précurseur, la température de flamme et le temps de passage des particules près de celle-ci, il est possible de contrôler la taille des objets finaux. Cette technique permet d'obtenir des NPs de très petites tailles avec une grande pureté puisqu'il n'est pas nécessaire d'ajouter des agents structurants. Le schéma et les équations de réaction de transformation du $TiCl_4$ en NPs de TiO_2 sont illustrés en Figure 18. C'est le principe de synthèse des NPs de TiO_2 de type P 25.

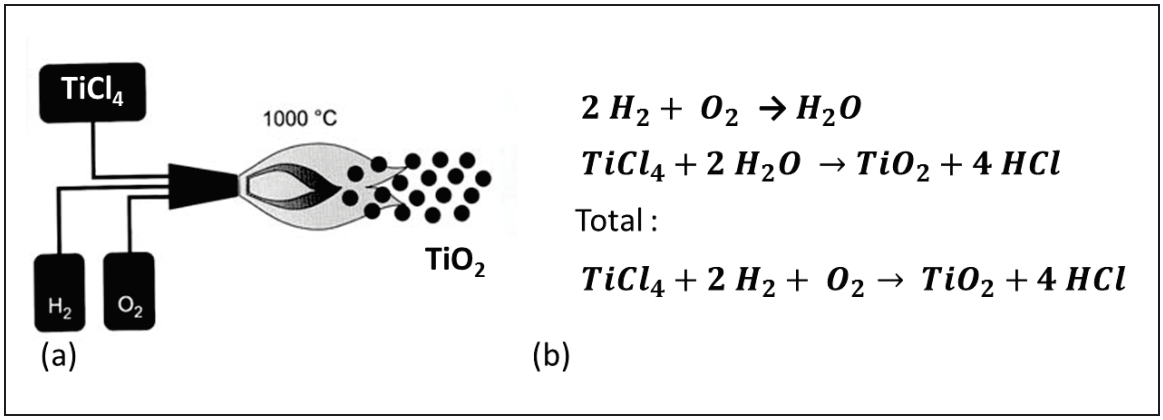


Figure 18 : a) schéma du procédé aérosol avec $TiCl_4$ en précurseur et b) équation de la réaction [89].

Le procédé aérosol permet de synthétiser très rapidement des NPs à l'échelle industrielle. Les températures de synthèse élevées permettent par ailleurs d'obtenir des particules bien cristallisées. En contrepartie, le frittage des NPs entre-elles entraine souvent la formation d'agrégats qu'il est difficile voire impossible de casser par la suite [89-93].

1.3.2.3. Récapitulatif et autres voies de synthèse des NPs de TiO_2

D'autres voies de synthèse de NPs de TiO_2 existent et ont été rassemblées de manière exhaustive [6, 94]. On y retrouve les synthèses en micelles et micelles inverses, les méthodes

d'oxydation directe, les dépositions physiques et chimiques en phase vapeur, la pyrolyse ou encore la synthèse assistée par micro-ondes. Les principales voies de synthèse sont regroupées dans le Tableau 4.

Méthode de synthèse	Voie	Température de synthèse	Taille et morphologie	Recuits nécessaire	références
Aérosol	Solide	Haute température	Contrôlée / agrégation	Non	[89-93, 95]
Sol-gel	Liquide	T° amb – 150°C	Contrôlée	Oui	[6, 31, 61-63, 66, 76, 86, 88, 96-101]
Micelle et micelle inverse	Liquide	T° amb	Contrôlée, à la forme de la micelle	Oui	[102, 103]
Hydrothermal	Liquide	100°C à 200°C	Contrôlée	Non	[67-70, 80, 81, 104-132]
Dépôt physique / chimique	gaz	200 – 700°C	Dépôt de films d'épaisseur contrôlée	Oui / non	[133, 134]
Pyrolyse laser	gaz	< 100°C	Contrôlée	Oui	[135]
Micro-ondes	Liquide	> 100°C	Contrôlée	Oui	[136, 137]

Tableau 4 : Récapitulatif des principales voies de synthèse des NPs de TiO_2.

1.4. Phénomènes d'agrégation et d'agglomération

Les matériaux à l'état nanométrique sont généralement plus réactifs que leur équivalent à l'état micrométrique. La conséquence de cette réactivité est un comportement relativement instable qui peut se traduire par un regroupement des particules : l'agrégation.

Le concept d'agrégation est souvent employé pour décrire ces regroupements mais il convient de faire la différence avec l'agglomération (Figure 19). L'agglomération décrit les phénomènes de regroupement par des interactions faibles de type van der Waals. Les agglomérats peuvent en général être détruits en suspension par sonification par exemple. A l'opposé, les agrégats sont des regroupements de particules par formation de liaisons fortes qui s'effectuent généralement lors de la synthèse des particules. A titre d'exemple, la synthèse aérosol, effectuée à l'aide d'une flamme, est fortement génératrice d'agrégats comme nous le verrons dans le chapitre 2 avec les P 25 AEROXYDE®.

Une fois libérées dans l'environnement, les NPs peuvent donc rester libres ou bien s'agglomérer pour donner des plus grosses particules. Par abus de langage, le terme « agrégation » est souvent employé pour décrire une « agglomération » de particules.

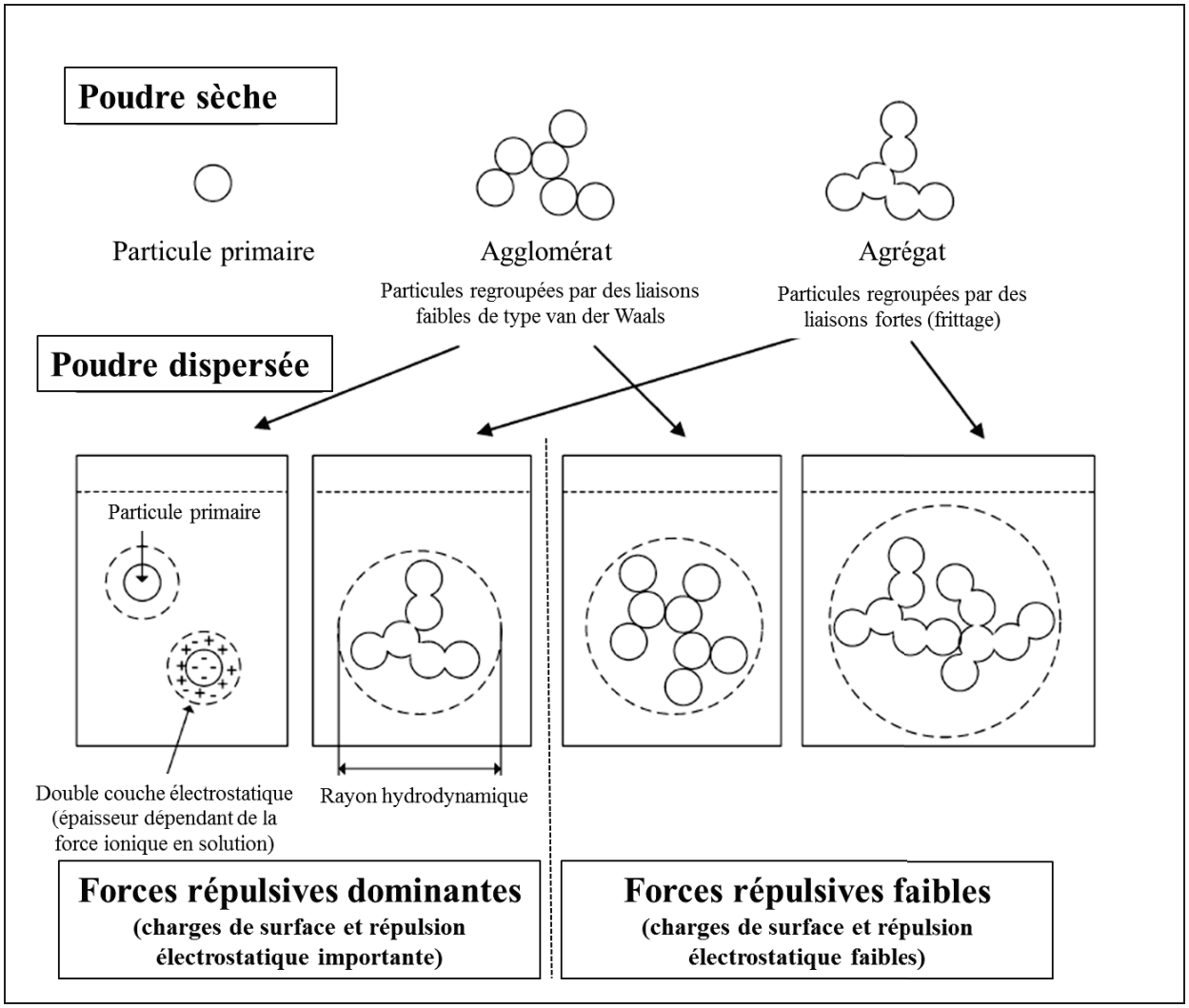


Figure 19 : Différents états et configurations des particules à l'état solide et dispersées en solution (figure adaptée de la référence [138]).

2. Interactions des nanoparticules de TiO_2 avec le vivant

2.1. Les nanoparticules de TiO_2 dans l'environnement

2.1.1. Production des NPs de TiO_2

Avec l'éclosion de nouvelles méthodes de synthèse, l'utilisation de NPs de TiO_2 pour des applications diverses a connu une augmentation importante. En 2005, la production annuelle a été estimée à 2 000 tonnes pour un marché correspondant à environ 70 millions de dollars (51 millions d'euros) [139]. La production a depuis fortement augmenté et continuera de croitre de manière exponentielle dans l'avenir. La Figure 20 présente l'évolution prévisionnelle de la production de NPs de TiO_2 de 2002 à 2024 par rapport au TiO_2 non nanométrique. L'étude prévoit une explosion de la production de TiO_2 nanométrique dans les prochaines années pour atteindre 100 % de la production dans une décennie soit près de 2 millions de tonnes [5]. L'omniprésence des nanoparticules dans les produits qui nous entourent soulève inévitablement la problématique de la libération de celles-ci et de leur devenir dans l'environnement. A ce stade, la question n'est même plus de savoir s'il y aura libération mais plutôt où et quand cela aura lieu. Or, les propriétés particulières des NPs suscitent beaucoup d'inquiétudes quant à leurs possibles effets néfastes sur l'environnement et sur la biosphère en général.

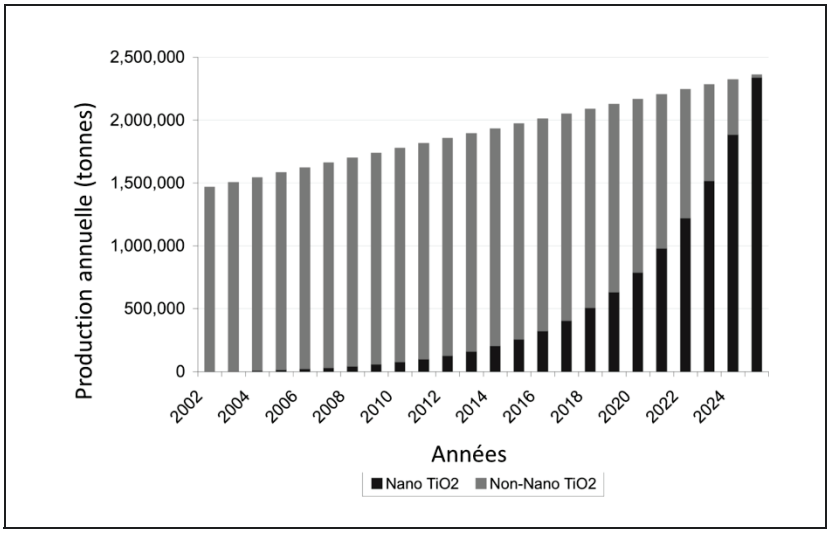


Figure 20 : Evolution prévisionnelle de la production mondiale de NPs de TiO_2 de 2002 à 2024 par rapport aux TiO_2 non nanométrique [5].

2.1.2. Voies de libération des NPs de TiO_2 actuelles et futures

Toutes les utilisations des NPs de TiO_2 sont autant de voies possibles de libération. La présence de NPs dans les crèmes solaires est une voie évidente de libération lors des bains d'eau de mer par exemple [140, 141]. Une récente publication évoque une libération de près de 1,8 g de NPs par application [142]. L'utilisation de NPs comme pigments pour les peintures est également un vecteur identifié de leur libération. En effet, l'érosion des peintures a fait l'objet de travaux en 2008 et le constat est clair : il y a bien transfert vers l'environnement aquatique [143]. Si l'érosion des surfaces contenant des NPs est bien un vecteur de libération, les applications de revêtements autonettoyants ou les cellules photovoltaïques pourront également, dans une moindre mesure, participer à cette pollution notamment avec leur recyclage.

Enfin, les NPs font l'objet d'études en vue d'une utilisation en tant que purificateur d'eaux usées. Cette utilisation impliquerait une libération intentionnelle et massive de NPs d'abord dans les stations de purification puis inexorablement dans l'environnement [49].

2.1.3. Le destin des NPs dans l'environnement

2.1.3.1. Localisation dans l'environnement

Une fois libérées dans l'environnement, les NPs peuvent connaître des destins différents. En milieu marin, les NPs peuvent aussi bien sédimenter, rester en suspension ou bien flotter à la surface. Selon leur localisation, les particules se rendent disponibles pour différents types d'organismes. Elles peuvent être par exemple retrouvées dans les algues marines, dans les invertébrés comme le plancton ou encore dans les poissons [144]. En milieu terrestre, les NPs peuvent être retrouvées dans les sols ou bien en suspension dans l'air et donc potentiellement dans n'importe-quel organisme vivant [142, 145-147]. Cette biodisponibilité est d'autant plus alarmante que le TiO_2 est un composé stable. Il ne se dissout en effet pas dans les eaux et persiste dans l'environnement. Le titane n'intervient de plus dans aucun processus métabolique animal [148]. Au mieux, les NPs s'agrégeront pour donner des particules plus grosses mais elles ne disparaîtront pas naturellement [149]. A terme, les NPs pourraient envahir l'ensemble de la chaine alimentaire pour devenir omniprésentes (Figure 21). La compréhension des interactions avec le vivant est donc en enjeu majeur pour la protection de l'environnement.

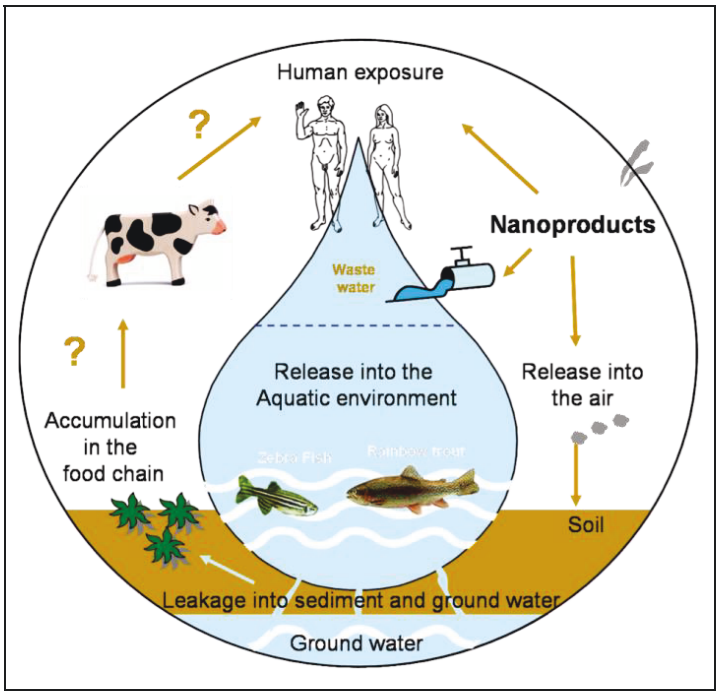


Figure 21 : Destin des nanoparticules une fois libérées dans l'environnement [150].

2.1.3.2. Prédiction de la concentration en TiO_2 dans l'environnement

Plusieurs études ont proposé des modèles pour prédire la quantité de NPs de TiO_2 présentes dans l'environnement en se basant sur des paramètres comme le volume de production mondiale, l'utilisation et la quantité de NPs libérées pour ces utilisations. Les études prennent également en compte un coefficient déterminé en fonction du compartiment environnemental dans lequel les particules sont libérées. Le comportement attendu des NPs diffère ainsi selon qu'elles soient libérées dans les eaux, dans l'air ou dans les sols. Les concentrations prédites sont résumées dans Tableau 5. Les prédictions affichent des valeurs d'ores et déjà alarmantes avec des concentrations de l'ordre du nanogramme par mètre cube dans l'air, du microgramme par litre dans les eaux et du microgramme par kilogramme dans les sols. Ces valeurs seront à revoir à la hausse avec l'augmentation croissante de la production mondiale. Ces données confirment l'omniprésence des NPs de TiO_2 dans l'environnement et donc la nécessité de mieux comprendre les interactions avec le vivant.

Compartiment environnemental	Concentration	Compartiment géographique	Référence
Air	1,5 – 42 ng/m^3	Global	[146]
	< 0,5 ng/m^3	Europe	
	< 0,5 ng/m^3	USA	[151]
	0,7 – 3 ng/m^3	Suisse	
Eau	0,7 – 16 µg/L	Global	[146]
	0,5 – 8,8 µg/L	Tamise (Angleterre)	[140]
Surface des eaux	0,012 – 0,057 µg/L	Europe	
	0,002 – 0,01 µg/L	USA	[151]
	0,016 – 0,085 µg/L	Suisse	
Reflux des stations d'épuration	2,5 – 10,8 µg/L	Europe	
	1,37 – 6,7 µg/L	USA	[151]
	3,5 – 16,3 µg/L	Suisse	
Boues de stations d'épuration	100 – 433 mg/kg	Europe	
	107 – 523 mg/kg	USA	[151]
	172 – 802 mg/kg	Suisse	
Sol	0,4 – 4,8 µg/kg	Global	[146]
Sédiment	273 – 1409 µg/kg/an	Europe	
	44 – 251 µg/kg/an	USA	[151]
	426 – 2382 µg/kg/an	Suisse	

Tableau 5 : Concentrations en NPs de TiO_2 prédites dans les compartiments environnementaux dans différentes régions géographiques ([152]).

2.2. Inquiétudes liées à la présence de NPs de TiO_2 dans l'environnement

2.2.1. Antécédent analogue : Le cas de l'amiante

Les matériaux utilisés dans les technologies ou les objets qui nous entourent se sont par le passé montrés particulièrement toxiques. C'est le cas de l'amiante qui, jusqu'en 1997, était utilisée massivement dans des milliers de produits à destination industrielle ou domestique pour ses propriétés isolantes. L'amiante est une fibre minérale composée de silicates magnésiens ou calciques. Les poussières d'amiante sont invisibles et peuvent être transportées dans l'air. Si elles sont inhalées, elles se déposent au fond des alvéoles pulmonaires, persistent et vont jusqu'à attendre la plèvre : l'espace situé entre les poumons et la paroi thoracique. En réaction, le corps humain recouvre ces fibres de tissu cicatriciel ce qui diminue l'élasticité des poumons. Il en résulte des difficultés respiratoires et, à long terme, les lésions pulmonaires peuvent provoquer des maladies respiratoires graves allant jusqu'aux cancers [153]. L'exploitation de l'amiante pendant de nombreuses années coûte aujourd'hui encore très chère en démantèlements et en soins et constitue l'un des scandales sanitaires majeurs des dernières décennies. Par analogie, l'utilisation massive des NPs de TiO_2 sans recul à long terme inquiète.

2.2.2. Nanoparticules et structures biologiques

Le TiO_2 est traditionnellement connu comme étant non toxique car inerte et très peu soluble [148]. Des traces de titane sont même parfois retrouvées dans les tissus animaux [154]. L'apparition de TiO_2 nanométrique soulève cependant de nouvelles questions principalement liées à la taille des particules et aux propriétés nouvelles qui leur sont conférées.

Pour mieux comprendre les effets néfastes que pourraient avoir les NPs de TiO_2, il faut d'abord identifier à quelle échelle de taille se situer. La Figure 22 permet de se rendre compte des différences de taille qu'il existe entre les structures biologiques et les NPs. D'une manière générale, la taille des nano-objets est comparable à celle des virus, de l'ADN et des grosses protéines. Les NPs sont par ailleurs significativement plus petites que les cellules humaines. Les cellules les moins volumineuses du corps humain sont en effet les spermatozoïdes avec un diamètre de quelques microns. Les nano-objets sont donc potentiellement capables de traverser les barrières biologiques et interagir avec les plus petites structures du vivant [1]. Leur présence dans ces organes / tissus pourrait ensuite, à long terme, avoir un effet néfaste.

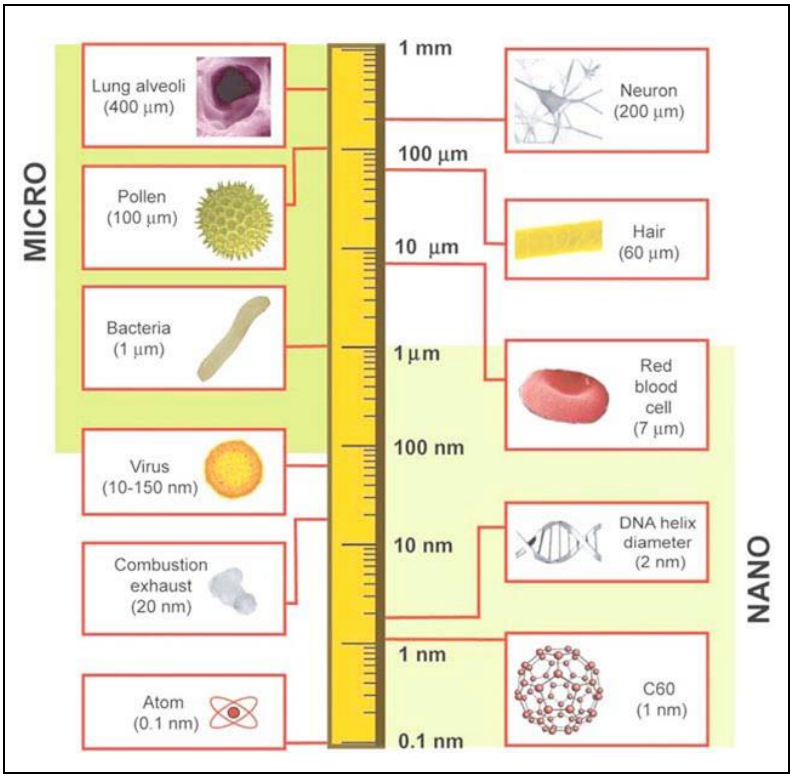


Figure 22 : Echelle de taille des nano-objets par rapport aux structures du vivant [1]

2.2.3. Formation d'espèces réactives oxydantes

Il faut aussi mentionner ici à nouveau les propriétés photo-catalytiques de ce matériau qui sont souvent à la base de l'intérêt que l'on porte aux NPs de TiO_2. La photo-catalyse permet en effet de dégrader la matière organique en créant des radicaux libres type $^{\bullet}O_2^-$ ou $^{\bullet}OH$ sous un rayonnement ultra-violet. Ces produits sont communément appelés espèces réactives oxydantes (EROs). Dans le corps humain, les EROs sont naturellement fabriquées lors des processus métaboliques. Cependant, leur présence en quantités anormalement élevées dans les cellules peut entrainer des dommages parfois irréversibles [155]. La Figure 23 schématise la formation d'EROs auprès d'une nanoparticule de TiO_2 activée avec un rayonnement UV ou par une autre source énergétique [156]. La large surface des NPs favorise à la fois l'adsorption de biomolécules et la transformation d'espèces en radicaux libres.

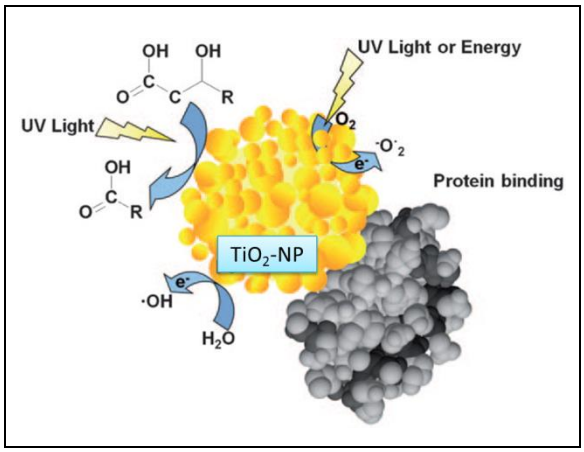


Figure 23 : Schéma de différents exemples d'interactions amenant à la formation d'EROs au contact d'une NP de TiO_2 (figure adaptée de la référence [2]).

2.2.4. Réglementation sur les nanomatériaux

Les nanomatériaux sont des agents chimiques. En France, ils sont à ce titre soumis à la réglementation en vigueur prévu par le code du travail à savoir des normes sur l'aération et l'assainissement des locaux, la présence d'équipement de sécurité, les limites d'exposition du personnel ou encore sur l'étiquetage des substances (articles R. 4412-1 et R. 4412-58). Depuis le 11 Janvier 2013, une norme européenne rend l'étiquetage des nanomatériaux présents dans les cosmétiques obligatoire (Règlement CE N°1223/2009). L'étiquetage sur les denrées alimentaires n'entrera en revanche en vigueur qu'en Décembre 2014. La mention « nano » apparaîtra entre crochet dans la liste des ingrédients (UE N°1169/2011). Enfin, la production, l'importation et la distribution de nanomatériaux en France doivent être déclarées à l'Etat

(décret n°2012-232) [38, 157]. En résumé, la loi oblige les exploitants à informer sur la présence de NPs dans les produits d'usage courant mais ne les interdit pas.

2.3. Les nanoparticules de TiO_2 : études *in vivo*

L'utilisation variée des NPs de TiO_2 multipliant les risques de contact avec les animaux et les êtres humains, il existe de nombreux travaux visant à comprendre les interactions entre les NPs de TiO_2 et les organismes biologiques. Les effets observés sont divers selon le modèle d'exposition utilisé et selon les caractéristiques physico-chimiques des NPs utilisées.

2.3.1. Exposition par voie respiratoire

Le poumon est l'interface majeure des échanges gazeux entre le corps et l'environnement. En comptant les 300 millions d'alvéoles qui les composent, les poumons ont une surface moyenne de 140 m² et constituent le principal portail d'entrée pour les nano-objets. Les particules de tailles nanométriques en suspension dans l'air peuvent en effet facilement entrer dans les poumons et accéder aux plus petites alvéoles. La Figure 24 (a) montre le chemin parcouru par les NPs jusqu'aux confins des poumons. La plupart des NPs est éliminée par transport muqueux mais une faible fraction (< 0.05 %) peut passer dans le sang par translocation (pénétration dans l'organisme). Une fois entrées dans l'organisme, les NPs peuvent ensuite migrer vers des organes internes comme le décrit la Figure 24 (b) [2, 158].

Les poumons sont en conséquence à la fois une porte d'entrée pour les NPs mais également un site d'accumulation. Le transport muqueux est la principale voie d'extraction des NPs par le corps humain. Le processus d'élimination implique le concours de macrophage venant collecter les NPs *via* le mucus. Ces mécanismes sont très efficaces chez l'homme mais peuvent s'avérer néfastes s'ils sont actifs de manière chronique. La présence de NPs dans les poumons peut en effet créer des inflammations chroniques avec diverses conséquences telles que des syndromes de type asthme, bronchite, pneumonie ou le développement de cancer dans les cas les plus graves [1, 159, 160]. Ces effets sont cependant communs à toute pollution particulaire dans l'atmosphère.

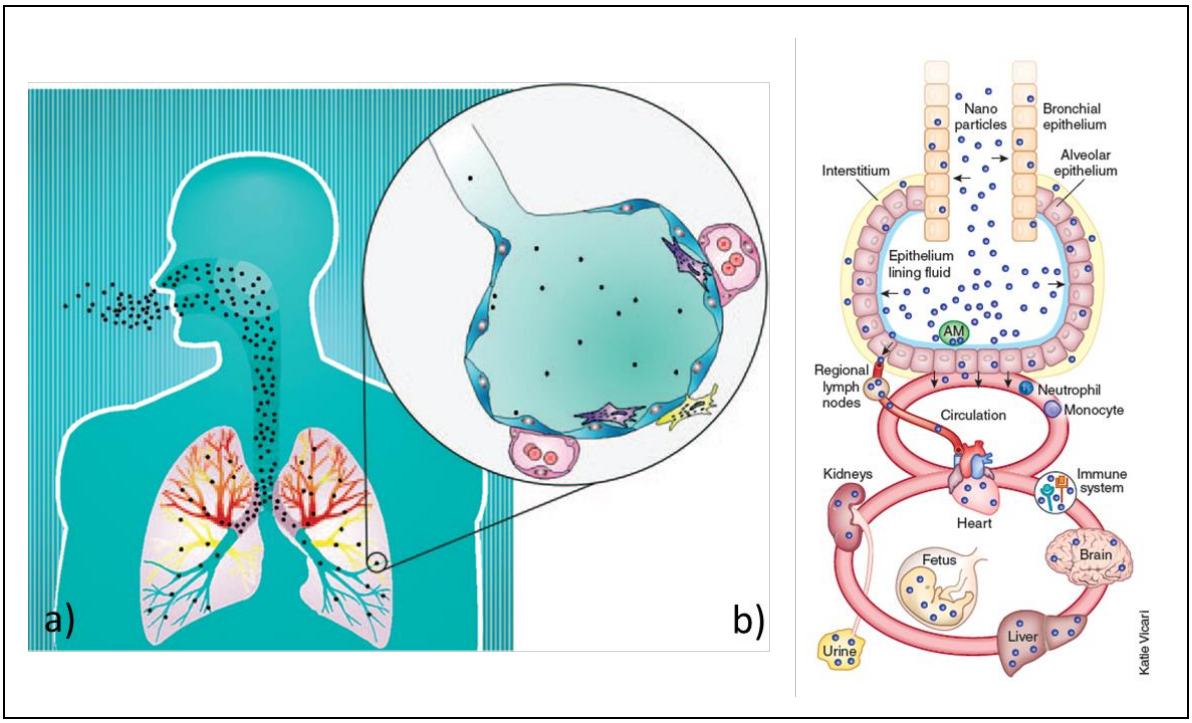


Figure 24 : a) Description du passage possible des NPs de taille inférieure à 2,5 µm en suspension dans l'air vers les alvéoles pulmonaires et b) schématisation de la translocation et du chemin parcouru par les NPs après inhalation jusque dans le système sanguin indiquant les organes cibles pour leur accumulation [2, 158].

L'exposition de NPs de TiO_2 a par ailleurs fait l'objet de nombreuses études avec des souris ou des rats comme cobayes. Les études *in vivo* ont été récemment rassemblées par Iavicoli et *al.* [159] et montrent notamment des différences importantes selon les caractéristiques physico-chimiques des NPs. Les observations vont de l'inflammation pulmonaire avec des lésions tissulaires à la production d'EROs. Les différentes études présentées ont tendance à montrer que la phase anatase a plus d'effets que le rutile ou la brookite sur la réponse inflammatoire. De même, une forme allongée (nanofibre) induit une réponse plus importante que des particules sphériques. Les études décrivant la réponse inflammatoire en fonction de la taille des NPs montrent que plus la taille des particules est petite, plus la réponse est importante. Cependant, la taille des NPs influant directement sur la surface exposée, la question de la dose d'exposition est à prendre en compte. En effet, si la dose en masse est la même, la quantité de NPs et la surface exposée varient de manière importante. En ce sens, des études avec des doses d'exposition normalisées à la surface exposées ont montré des réponses d'inflammation pulmonaire similaire pour des NPs de TiO_2 comparée à des particules micrométriques. La surface spécifique est donc un aspect très important à prendre en considération pour une interprétation correcte des données toxicologiques. Les auteurs rapportent enfin que l'internalisation dans les interstices des

poumons des rongeurs dépend de la taille et de la concentration des NPs. La translocation vers le système sanguin n'est cependant pas systématique et demeure mal comprise requérant « de nouvelles investigations ».

2.3.2. Exposition par les muqueuses nasales

Il existe une autre voie d'entrée pour les nano-objets en suspension dans l'air. Il s'agit des fibres nerveuses dans la zone de l'épithélium olfactif, une muqueuse de la cavité nasale. Cette zone présente une surface peu étendue mais également très fine puisqu'il s'agit d'une monocouche cellulaire chez l'homme. Des tests d'inhalation de différents types de NPs ont permis de démontrer qu'elles pouvaient traverser l'épithélium olfactif et entrer dans le système sanguin. Les quantités sont cependant très faibles mais peuvent, depuis ce point d'entrée, directement atteindre des organes clés à proximité tels que le cerveau [2, 161].

Les études *in vivo* sur les interactions entre les NPs de TiO_2, le système nerveux et le cerveau sont plus rares. Les études montrent que les NPs peuvent être retrouvés dans les tissus du système nerveux central et s'accumuler dans toutes les régions du cerveau. Les effets observés vont de l'inflammation des tissus avec production d'EROs à des altérations d'homéostasie ionique dans les neurotransmetteurs et les enzymes [159].

2.3.3. Exposition par ingestion

Le TiO_2 sous forme micro- et nanométrique est approuvé à la consommation sous le nom de E171 depuis plusieurs décennies [2]. Cet additif, déclaré sans danger, a depuis largement été introduit dans notre alimentation [54]. Les NPs de TiO_2 peuvent donc entrer facilement en contact avec le système digestif des êtres humains *via* la nourriture. Le transport muqueux conduit également les particules inhalées vers l'estomac. A titre indicatif, une récente étude a évalué la consommation normale moyenne de NPs de TiO_2 d'un adulte américain à 3 µg/Kg/jour [54].

Le système gastro-intestinal constitue une barrière complexe composée de nombreux tissus ayant une surface totale de l'ordre de 2 000 m² remplissant différentes fonctions. L'intestin digère la nourriture à un pH proche de 2. Les nutriments sont ensuite absorbés dans les intestins et distribués dans le système sanguin. Les parois des intestins sont assez épaisses (plusieurs couches cellulaires) pour retenir les macromolécules et les NPs et constituent ainsi une barrière efficace contre les agressions extérieures. Les NPs de TiO_2 ne pouvant être

dissoutes dans de telles conditions, elles sont donc généralement éliminées par les voies naturelles [2]. Le passage de NPs dans le système sanguin a cependant déjà été rapporté et est donc possible [162]. Des études *in vivo* sur des souris exposées par gavage ont par ailleurs montré des inflammations en réponse à des doses élevées avec de légères altérations (présence de nécroses) dans le foie et les reins [163]. Les propriétés physico-chimiques influentes et les mécanismes de toxicité sont cependant encore à déterminer.

2.3.4. Exposition par la peau

Les NPs de TiO_2 sont présentes dans de nombreux produits cosmétiques et notamment dans les crèmes solaires. Le contact avec la peau est donc direct et intentionnel alors que l'on sait que les NPs de TiO_2 présentent des propriétés photocatalytiques (propriétés susceptibles de générer des EROs après exposition aux rayonnements UV). La peau est un organe structuré en trois couches principales : l'épiderme qui est au contact du milieu extérieur, le derme et l'hypoderme (cf. Figure 25).

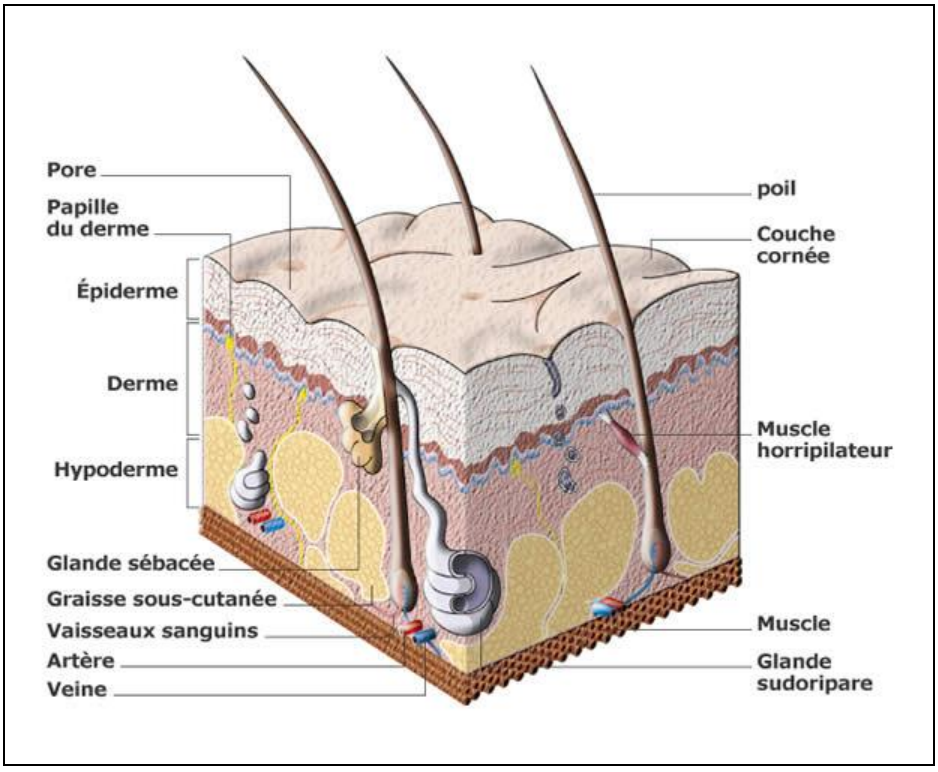


Figure 25 : Schéma descriptif des différentes couches de la peau [168]

Son épaisseur est peu importante (quelques millimètres) mais elle a cependant été identifiée comme étant une barrière efficace contre les NPs de TiO_2. Des précédentes recherches conduites au CENBG dans le cadre du projet *Nanoderm* sur des oreilles de porc

ont en effet montré que, lorsqu'il n'y avait pas de microlésions, la pénétration des NPs se limitait au *stratum corneum* (couche cornée), la couche supérieure de l'épiderme [164-166]. Ces observations ont par ailleurs été confirmées à plusieurs reprises [159, 167].

La peau n'est donc pas considérée comme une voie d'entrée pour les NPs. Leur présence à la surface de la peau génère cependant des inquiétudes quant à des altérations de celle-ci par la génération d'EROs par exemple. Malgré cela, l'application de NPs de TiO_2 protégeant des rayonnements UV est actuellement reconnue comme plus bénéfique que néfaste.

De plus, la surface des NPs de TiO_2 utilisées dans les crèmes solaires est généralement modifiée avec un autre oxyde (aluminium ou silice) servant de couche de passivation pour inhiber la photo-catalyse [142].

2.3.5. Syndromes humains associés aux NPs de TiO_2

Les NPs peuvent donc entrer en contact avec le corps humain et même traverser les membranes biologiques. Elles peuvent ainsi atteindre le système sanguin et donc potentiellement n'importe-quel organe [169]. Cependant, aucun syndrome n'a, à ce jour, été directement relié à la présence de NPs de TiO_2 dans le corps humain. Il existe cependant d'après l'IARC, l'agence internationale de la recherche contre le cancer, un doute lié au « nano ». En ce sens les NPs de TiO_2 ont été classées en 2006 comme potentiellement carcinogènes [170]. Les effets n'ont jamais été clairement identifiés car ils sont généralement « noyés » dans les syndromes respiratoires, cardiaques ou immunitaires attribués à d'autres causes comme la pollution ou le tabagisme. De plus, les études *in vivo* sur sujets humain sont limitées pour des questions évidentes d'éthique.

En ce sens, des méthodes alternatives ont été développées respectant le principe d'éthique des bonnes pratiques sur l'expérimentation animale qui dicte la règle des 3R énoncée en 1959 par Russel et Burch (USA) [163, 171]. Cette règle des 3R est la suivante :

- Reduce : réduire le nombre d'animaux au stricte nécessaire
- Refine : optimiser la méthodologie pour réduire les problèmes liés au transport, à l'élevage et à l'utilisation des animaux (gestion de la souffrance).
- Replace : remplacer les modèles animaux par des méthodes *in vitro* ou *in silico* (modélisation mathématique à l'aide de l'informatique).

Les recherches se tournent donc aujourd'hui vers la compréhension d'effets néfastes des NPs de TiO_2 avec des modèles d'étude *in vitro* à l'échelle cellulaire ou *in vivo* chez les petits animaux respectant les règles d'éthiques.

2.4. Les nanoparticules de TiO_2 : étude *in vitro*

2.4.1. La cellule

La cellule est l'unité de base constituant tous les êtres vivants (Figure 26). Il s'agit d'une entité biologique d'une grande complexité malgré des dimensions micrométriques. Les hommes et les animaux sont composés d'un très grand nombre d'entre elles mais beaucoup d'organismes vivants se limitent à une cellule unique. C'est en effet le cas des bactéries et de nombreux autres micro-organismes. La cellule est en conséquence la plus petite entité de vie autonome. La cellule est un espace clos, protégé par une membrane périphérique appelée membrane plasmique, qui contient toujours un bagage génétique contenu dans une molécule unique : l'ADN (acide désoxyribonucléique). L'ADN est le support universel de l'information génétique. Il est composé d'un double brin enroulé en hélice qui peut se condenser lors des cycles cellulaires en chromosomes.

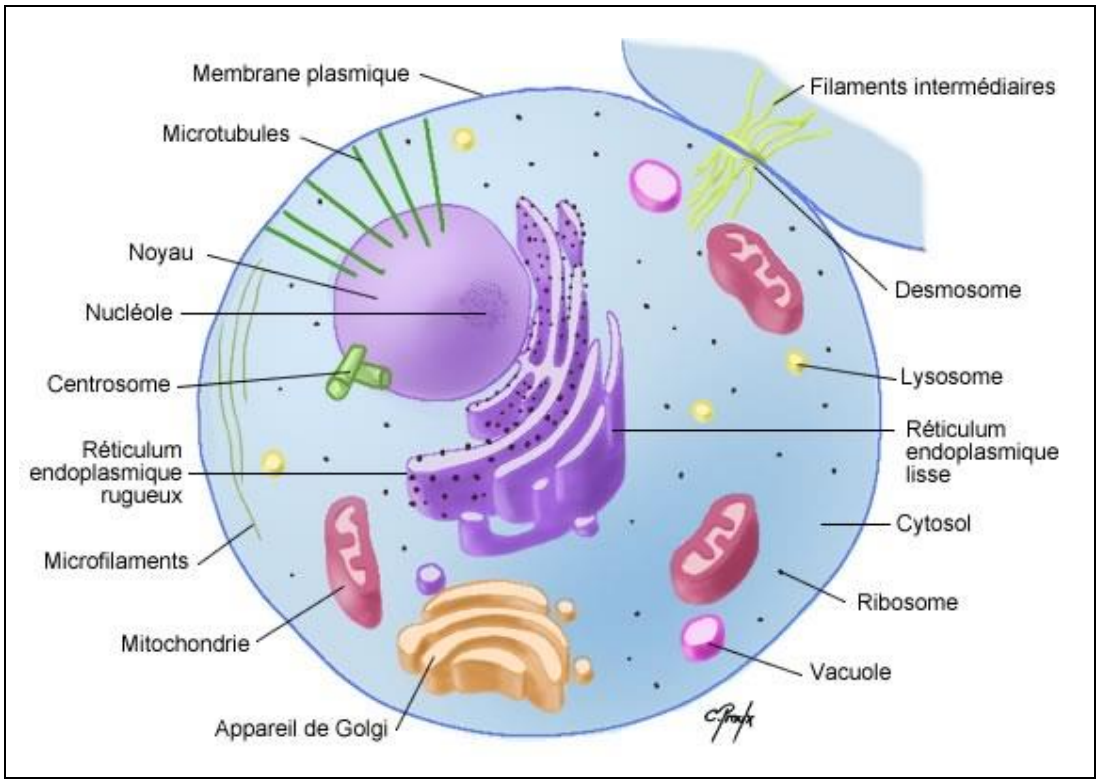


Figure 26 : Schéma d'une cellule eucaryote montrant les organites cellulaires, dont le noyau, baignant dans le cytosol [172].

L'ADN peut être contenu directement dans le cytosol (milieu cellulaire) ; c'est le cas dans les organismes dits procaryotes comme les bactéries. Il peut également être cloisonné dans un noyau dans le cas des cellules dites eucaryotes, qui composent la majorité des organismes vivants. Le reste de la cellule est composé d'organites de fonction tels que la mitochondrie qui assure la respiration et la production d'énergie, le réticulum endoplasmique responsable de la fabrication des matériaux cellulaires et l'appareil de Golgi qui permet la maturation des protéines. L'appareil de Golgi joue également un rôle important dans la régulation des échanges entre la cellule et le milieu extérieur notamment par le biais de vésicules [173]. La cellule comporte également des organites de transport. Les endosomes et lysosomes sont des vésicules qui entrent dans cette catégorie. Les endosomes, aussi appelées vésicules d'internalisations sont des compartiments qui participent au tri des molécules et particules internalisées. Les lysosomes sont produits par l'appareil de Golgi et ont pour fonction la dégradation des molécules.

2.4.2. Mécanismes cellulaires d'intérêt

La cellule est un espace dans lequel se produisent de nombreuses réactions chimiques participant à des mécanismes précis et très variés. Les études toxicologiques peuvent s'intéresser plus particulièrement à certains d'entre eux.

La prolifération est la multiplication rapide et en abondance des cellules par mitose c'est-à-dire par la division d'elles-mêmes en deux entités identiques. Dans certaines conditions, les cellules peuvent se différencier. La différenciation regroupe l'ensemble des mécanismes aboutissant à l'acquisition d'une structure et d'une fonction spécialisée pour une cellule donnée. Ce processus suit un cheminement progressif et conduit à la formation de tissus spécifiques. Cette différenciation peut modifier la taille et la forme des cellules, ainsi que l'activité métabolique ou encore la durée de vie. L'activation de la différenciation se fait en fonction de l'environnement ainsi que des signaux transmis par les cellules voisines. Dans certains cas, les cellules peuvent se transformer c'est-à-dire que leur code génétique va être modifié. La transformation est généralement à l'origine de la formation des cancers. Enfin, l'apoptose est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal.

2.4.3. Toxicité à l'échelle cellulaire

2.4.3.1. Mécanismes d'internalisation cellulaire

L'internalisation des NPs dans les cellules est la principale source d'inquiétude en nanotoxicologie. Il existe plusieurs mécanismes d'internalisation identifiés pour les molécules et les particules. La plupart des cellules animales sont capables de transporter de la matière par le biais de vésicules. Ce transport se fait par endocytose (entrée) ou bien par exocytose (sortie). La principale voie d'excrétion ou de destruction des microbes, molécules ou particules est la phagocytose. Ce processus est majoritairement conduit par les cellules immunitaires telles que les macrophages. Ces cellules sont en effet capables de se déformer pour entourer et emprisonner une particule dans des vésicules à l'intérieur de leur cytoplasme. Leur destin est ensuite placé entre les mains des lysosomes. La phagocytose nécessite cependant une reconnaissance spécifique à la surface des éléments exogènes par les macrophages.

La deuxième voie d'internalisation est la pinocytose qui peut être réalisée par la quasi-totalité des cellules animales. La pinocytose regroupe plusieurs mécanismes d'endocytose qui sont alternativement activés selon la taille et la nature de l'agent exogène. Les différentes voies d'entrée sont schématisées sur la Figure 27 [174-176].

Enfin, les cellules peuvent internaliser des molécules ou particules par diffusion passive. Ce mode d'internalisation n'implique aucun mécanisme particulier et s'effectue généralement par le biais de pores ou canaux, la membrane plasmique étant perméables [177].

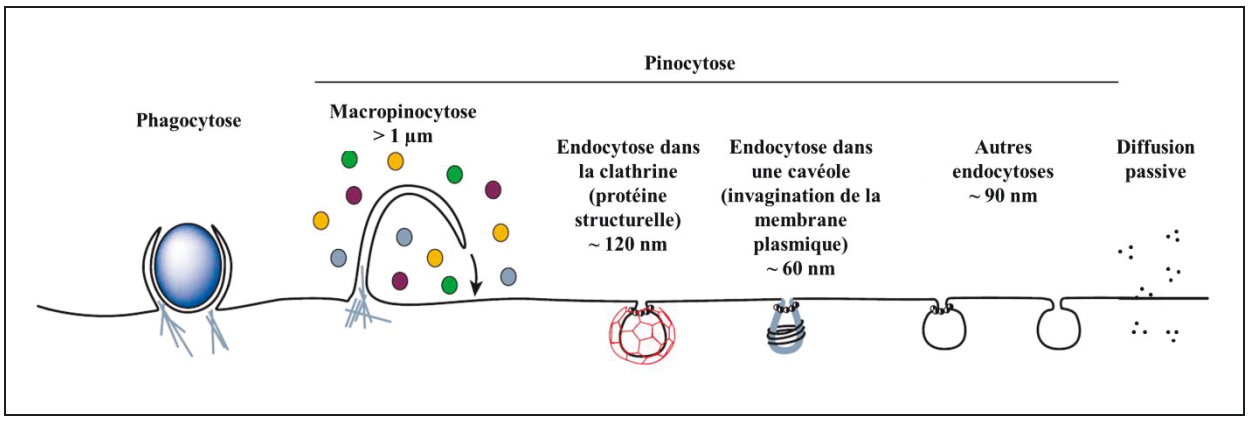


Figure 27 : Différents mécanismes d'endocytose (figure adaptée de la référence [174]).

2.4.3.2. Toxicité cellulaire

2.4.3.2.1. La cytotoxicité

La cytotoxicité regroupe toutes les atteintes possibles au fonctionnement ou à la régulation de la cellule. Les différentes conséquences d'une cytotoxicité peuvent être : (i) des nécroses ou des altérations des membranes plasmiques entrainant la lyse (destruction) de la cellule ; (ii) un ralentissement ou un arrêt de prolifération ; (iii) une activation des processus de mort cellulaire programmée aussi appelé apoptose ; (iv) la différenciation ou encore (v) la transformation (cancer).

2.4.3.2.2. La génotoxicité

Un gène est une séquence d'ADN qui peut être définie comme une unité d'information génétique. Les gènes encodent les protéines qui dictent le fonctionnement de la cellule. L'expression de milliers de gènes constitue un flux d'information pour la cellule ce qui permet sa formation, sa régulation interne ainsi que son fonctionnement. L'ensemble des gènes d'un être vivant est communément appelé le génome. La génotoxicité définit toute forme d'atteinte à l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome. Les substances ou rayonnements génotoxiques peuvent être à l'origine de cassures de brins d'ADN ou de mutations diverses. Les conséquences peuvent aller de la mort cellulaire à la formation de cancers [178].

2.4.4. Les cellules en culture comme modèles d'étude

Les études *in vitro* utilisent des cellules humaines ou animales mises en culture. Il est ainsi possible d'isoler un type de tissu quel qu'il soit et d'en étudier différents aspects. Ce type de technique permet d'étudier les effets directs de substances exogènes telles que les NPs de TiO_2. La culture cellulaire est très avantageuse sur plusieurs points : (i) la stabilité des paramètres atmosphérique donne un contrôle total sur l'environnement physiologique permettant l'obtention de conditions définies pour les études toxicologiques ; (ii) les lignées cellulaires disponibles dans le commerce sont homogènes et bien caractérisées ce qui renforce les interprétations expérimentales ; (iii) enfin, les cellules en culture sont peu coûteuses en entretien comparés aux modèles *in vivo* tels que les petits animaux. Les questions légales, morales et éthiques sur les expérimentations animales sont également évitées. Les cellules en culture permettent ainsi de disséquer les mécanismes de toxicité des NPs non observables *in*

vivo. Les effets observés ne reflètent néanmoins pas exactement les phénomènes observés chez les êtres vivant. Il manque en effet dans l'environnement de culture un bon nombre de composantes systémiques impliquées dans la régulation homéostatique issues des systèmes nerveux et endocriniens (sécrétion d'hormones). De plus, les cellules évoluent en général dans des milieux structurés en trois dimensions interagissant avec celui-ci.

Les cellules mises en culture représentent des modèles d'étude réalistes mais ne suffisent pas à décrire tous les phénomènes physiologiques. L'utilisation de modèles *in vitro* permet néanmoins d'analyser les comportements métaboliques de base et d'identifier les mécanismes impliqués dans la toxicité des particules [179, 180].

La diversité de cellules pouvant être cultivées est infinie. Le choix de la lignée cellulaire est effectué en fonction de plusieurs paramètres : (i) la lignée cellulaire détermine le type d'organe cible étudié. (ii) la possibilité d'extrapolation à l'homme (iii) la fréquence d'utilisation des modèles dans la littérature et enfin (iv) le critère économique et technique. Dans notre cas, le choix s'est porté sur le principal rempart de notre corps qui constitue une voie privilégiée d'exposition : la peau. Deux autres modèles ont également été étudiés, il s'agit des cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des cellules cancéreuses HeLa. Les trois types cellulaires sont montrés sur la Figure 28.

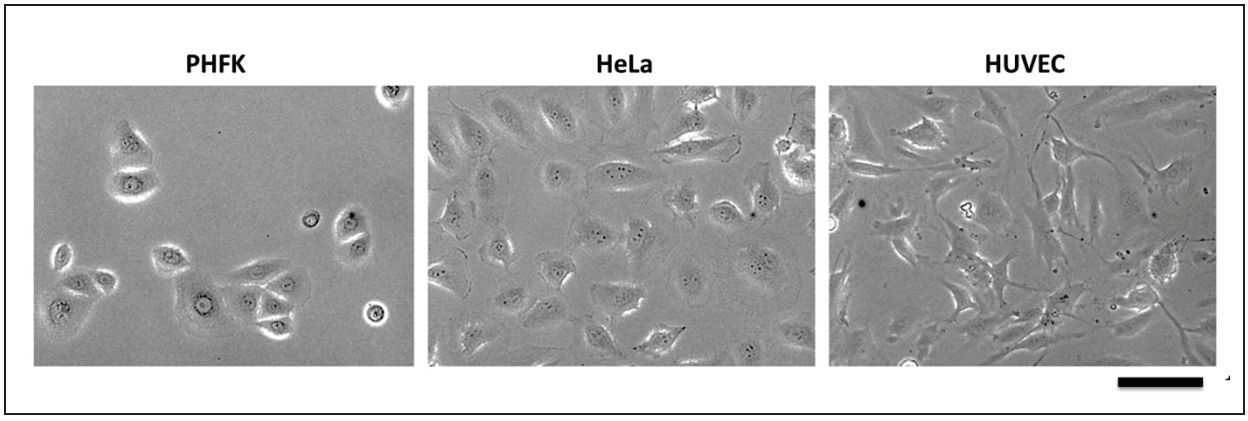


Figure 28 : Microscopie optique des différentes lignées cellulaires (images réalisées au CENBG, échelle 200 µm).

2.4.4.1. Les cellules de peau humaine

Les kératinocytes primaires sont des cellules épidermiques isolées de prépuces au stade néonatal (PHFK : Primary Humain Foreskin Keratinocytes). Ces cellules sont retrouvées dans les couches basales de la peau et ressemblent peu aux cellules de peau

terminale. En ce sens, ces cellules ont donc gardées leur caractère indifférencié et la différenciation fait partie des effets observables après exposition à un agent exogène.

Ces cellules sont des modèles pratiques à cultiver et représentent un bon candidat pour étudier les interactions entre les NPs de TiO_2 et la peau humaine. En effet, ces cellules restent très proches de l'état « *in vivo* » ce qui les rend plus intéressantes pour observer les effets biologiques. En revanche, ce qui fait que tout leur intérêt les rend également beaucoup plus "fragiles". En outre, toutes modifications de leur environnement aura une influence sur l'expression du génome et sur l'activation / répression de voies métaboliques (signalisation cellulaire, inflammation, réponse aux EROs, …).

Les kératinocytes primaires apparaissent et prolifèrent dans les couches basales de la peau. Les cellules se différencient ensuite pour constituer le tissu épidermique en migrant peu à peu vers la surface de la peau. Il existe un gradient de concentration des ions calcium de la couche basale de la peau à la surface. La présence de calcium agit comme un activateur de différenciation. Cette différenciation des kératinocytes entraine une modification du cytosquelette de la cellule accompagnée d'une dégénérescence du noyau. En d'autres termes, la cellule meurt et se durcit pour conférer son caractère résistant à la peau. L'organe peut alors remplir sa fonction de barrière protectrice pour l'organisme : c'est la kératinisation [166, 181, 182].

2.4.4.2. Les cellules endothéliales

Les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont des cellules dérivées de veines de cordons ombilicaux. Ces cellules sont plus précisément issues de la couche la plus interne des vaisseaux sanguins appelée endothélium. Les cellules endothéliales ont comme fonction primaire de retenir le sang dans les vaisseaux tout en autorisant l'échange de substances nutritives avec le milieu intérieur. Les HUVEC sont des cellules impliquées dans les mécanismes de transfert des nutriments entre le sang et les différents organes. Elles possèdent ainsi une capacité d'endocytose importante ce qui les rend particulièrement adaptées aux études liées à l'internalisation des NPs.

2.4.4.3. Les cellules cancéreuses

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire largement utilisées en biologie et en recherche médicale. Ces cellules proviennent d'une biopsie effectuée sur une patiente

(Henrietta Lacks) décédée en 1951 d'un cancer du col de l'utérus. Cette lignée a été immortalisée c'est-à-dire qu'elle a subi des modifications génétiques majeures visant à rendre la division cellulaire infinie. Ces cellules sont aujourd'hui la lignée la plus utilisé pour étudier les phénomènes moléculaires et cellulaires en biologie [183].

2.4.4.4. Données toxicologiques

2.4.4.4.1. Travaux préliminaires

Les travaux de thèse de M. Simon conduits au CENBG ont permis de développer une grande partie des protocoles d'exposition aux NPs et d'analyse des cellules. Ces travaux font également office de travaux préliminaires pour cette thèse. Les résultats obtenus sur des kératinocytes avaient alors permis de : (i) montrer une toxicité dose-dépendante des NPs de TiO_2 ; (ii) valider l'internalisation des NPs dans ces cellules et ce de manière indépendante de la fonctionnalisation des NPs ; (iii) caractériser des altérations de l'homéostasie ionique : la quantification des éléments diffusibles des cellules a été réalisée par microanalyse par faisceau d'ions (voir chapitre 3) montrant une augmentation significative de la concentration en calcium (Figure 29) ; (iv) observer la localisation subcellulaire : les NPs ont pu être localisées libres dans le cytoplasme des cellules ou bien vacuolisées ; (v) étudier l'influence de la présence de NPs sur la prolifération et la mortalité des cellules : les analyses ont montré un ralentissement significatif de la prolifération par ailleurs influencé par la fonctionnalisation.

Il reste cependant plusieurs zones d'ombre sur les mécanismes conduisant à ces phénomènes. La présente étude soutenue par l'ANR-TITANIUMS s'inscrit dans la continuité de ce travail en se focalisant plus particulièrement sur les propriétés des NPs de TiO_2 pouvant avoir un impact sur leur toxicité. L'étude a également été étendue à d'autres modèles cellulaires.

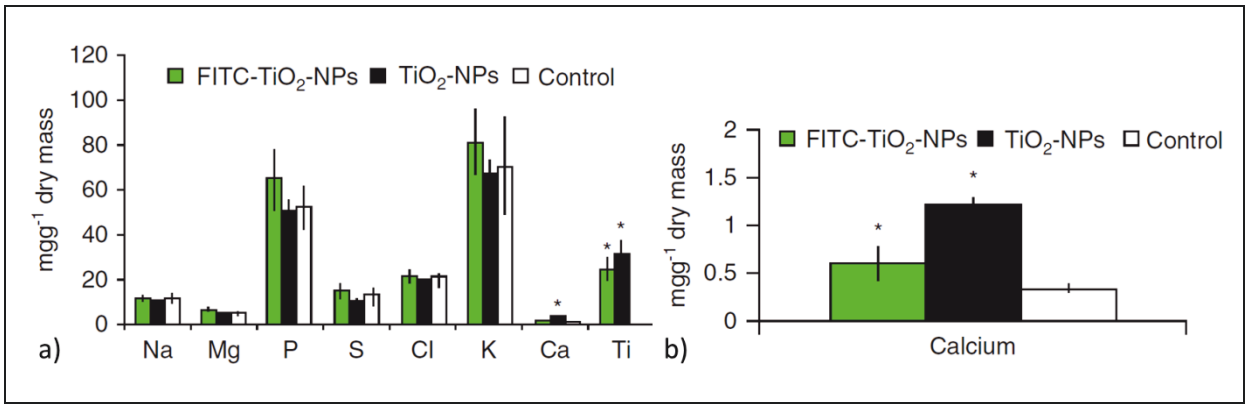


Figure 29 : a) Concentrations des éléments chimiques du sodium au titane obtenus par analyse par faisceau d'ions sur kératinocytes primaires après exposition aux NPs de TiO_2 et b) montre l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium [166, 184].

2.4.4.4.2. Autres données sur la toxicité des NPs de TiO_2 sur les cellules en culture

L'étude de la toxicité de NP de TiO_2 sur diverses lignées cellulaires a fait l'objet de nombreuses publications. Les effets observés sont très divers et peuvent s'avérer contradictoires : (i) la production d'EROs dans les cellules est souvent rapportée avec ou sans photo-activation. Le TiO_2 possédant une forte activité photo-catalytique, il peut catalyser la formation de superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) ou de radicaux libres ($^{\bullet}OH$) à la surface des particules [185-189]. (ii) Les NPs sont également capables de générer des dérèglements métaboliques associés à la mitochondrie [190] et (iii) d'induire une peroxydation des membranes phospholipidiques [187]. (iv) La présence de NPs dans les cellules peut également causer des inflammations et des dommages de l'ADN altérant les fonctions cellulaires et pouvant causer des mutations génétiques [191, 192]. Les conséquences rapportées sont diverses avec de la mort cellulaire, des ralentissements de prolifération et également des modifications dans les cycles cellulaires. Les effets seraient par ailleurs directement reliés aux capacités photo-catalytiques des NPs et l'anatase serait la seule structure cristalline capable de générer des EROs sans photo-activation [188, 193].

En résumé, les effets observés sont si variés et contradictoires qu'il est difficile de mesurer l'impact réel de la présence des NPs de TiO_2. L'influence des caractéristiques physico-chimiques des NPs n'est également pas clairement établie. Il subsiste donc encore beaucoup de zones d'ombre dans la compréhension de la toxicité des NPs de TiO_2. Une revue récente regroupant les études de toxicité *in vitro* des NPs de TiO_2 a réalisé le même constat et soulevé différents problèmes inhérents à ce type d'analyse [160] : (i) tout d'abord, l'analyse *in*

vitro pose des problèmes par rapport aux doses d'exposition. Les doses permettant l'observation d'effets dans les cellules en culture sont généralement irréalistes ce qui rend les extrapolations directes encore plus incertaines. Les expositions étant réalisées directement dans les milieux de culture, la question de la stabilité des solutions colloïdales de particules est également un point clé influant sur la dose réelle d'exposition. (ii) Le deuxième problème majeur évoqué et que les NPs utilisées possèdent, selon les différentes études, des propriétés physico-chimiques différentes ce qui rend les comparaisons entre travaux très difficiles. Les propriétés des NPs évoluent en effet en fonction de leur morphologie, taille, charge de surface, cristallinité, solubilité, modification de surface ou encore des impuretés. La conséquence de ces problèmes est que les résultats ne concordent pas d'une étude à l'autre. On retrouve ainsi des résultats alarmants avec des effets carcinogènes ou des effets cytotoxiques comme des conclusions rassurantes ne décelant aucune toxicité. Il existe donc un réel besoin de normaliser les études en catégorisant systématiquement les NPs utilisées. Les caractérisations physico-chimiques des NPs ainsi que leur comportement en solution doivent donc être étudiés de manière très précise. Enfin, le contrôle de la dose doit absolument être maitrisé, les réponses biologiques étant fortement dose-dépendantes. Il existe donc également un réel besoin en métrologie pour caractériser les expositions aux NPs.

Il est donc clair que les modèles cellulaires *in vitro* ne reflètent que partiellement les effets réels observés chez l'homme ou chez l'animal. L'utilisation de modèles complémentaires comme les organismes pluricellulaires est une étape nécessaire dans l'étude toxicologique [194]. La volonté d'obtenir une vue d'ensemble de la toxicité des NPs de TiO_2 a motivé l'équipe pour étendre l'étude toxicologique à un modèle pluricellulaire bien connu dans la littérature : *Caenorhabditis elegans (C. elegans).*

2.5. Les nanoparticules à l'échelle d'un organisme pluricellulaire

2.5.1. Généralités

2.5.1.1. Présentation de *C. elegans*

Caenorhabditis elegans est un nématode terrestre vivant dans la plupart des régions tempérées du globe. Un schéma descriptif est visible sur la Figure 30. Ses conditions de vie se limitent à un environnement humide à température ambiante, contenant de l'oxygène atmosphérique et des bactéries comme nourriture [195]. Ce ver de terre mesurant à peine un millimètre de long peut aussi bien vivre à l'air libre que dans d'autres organismes comme

parasite [196]. Depuis plus de trente ans, *C. elegans* a été intensivement étudié amenant de nombreuses découvertes dans les domaines de la neuroscience, du développement, de la transduction des signaux ou encore de la mort cellulaire [197]. Le succès de *C. elegans* en tant que modèle s'est alors étendu aux domaines du biomédical et de la toxicologie environnementale [198]. En effet, beaucoup de mécanismes physiologiques basiques et de réponses au stress observables chez des organismes supérieurs (ex : l'être humain) sont conservés chez *C. elegans*. Il possède de plus, 60 à 80 % de gènes homologues à l'homme [199].

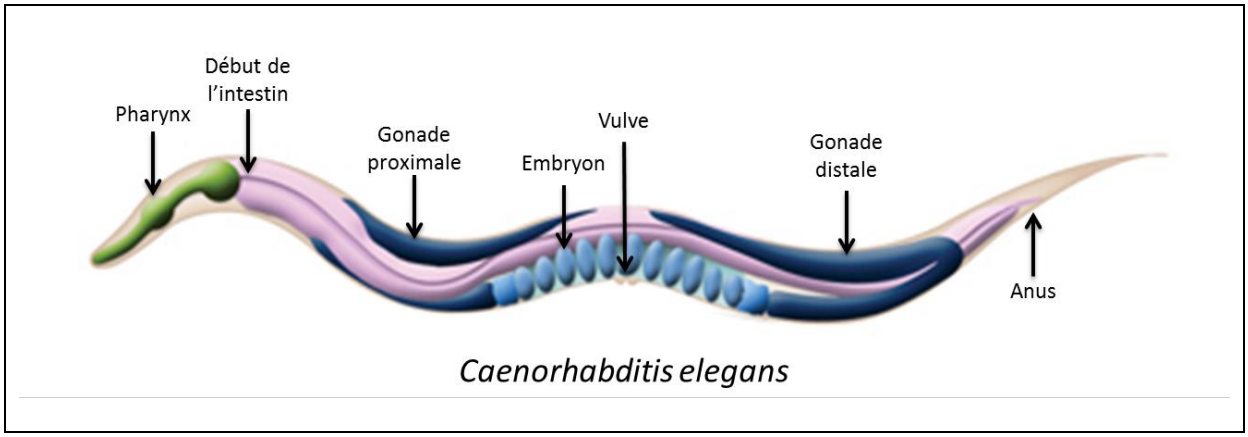


Figure 30 : Schéma descriptif de *C. elegans* [200]

Caenorhabditis elegans possède bien des qualités qui font de lui un outil puissant pour l'étude des phénomènes biologiques et toxicologiques. Il est en effet facile à entretenir et à cultiver avec un régime diététique à base d'*Escherichia coli* (*E. coli*) [195]. Son cycle de vie hermaphrodite est court (3 jours environ) permettant la production rapide de larges populations. Son corps transparent permet de plus l'observation de ses 959 cellules somatiques ainsi que de ses organes et tissus internes tels que les muscles, l'intestin ou les gonades [199].

Il existe deux sexes de *C. elegans* : le plus commun est l'hermaphrodite capable de s'autoféconder et le mâle capable d'inséminer un ver hermaphrodite. La fréquence d'apparition des mâles est cependant très faible (0.1 %) [200].

2.5.1.2. Anatomie

L'anatomie générale de *C. elegans* est facilement observable sur une coupe transversale (cf. Figure 31). Le ver est recouvert d'une peau, appelée cuticule, constituée de trois couches collagéniques. A la surface de la cuticule se trouvent des structures différenciées

(les alae) qui participent au déplacement du ver adulte sur milieu solide par adhérence avec le substrat. La cuticule recouvre un tissu sous-jacent de cellules épithéliales (hypoderme) sur lequel sont rattachés les nerfs ventraux et dorsaux ainsi que les quatre muscles responsables de la locomotion. Cette structure est retrouvée sur l'ensemble de l'animal.

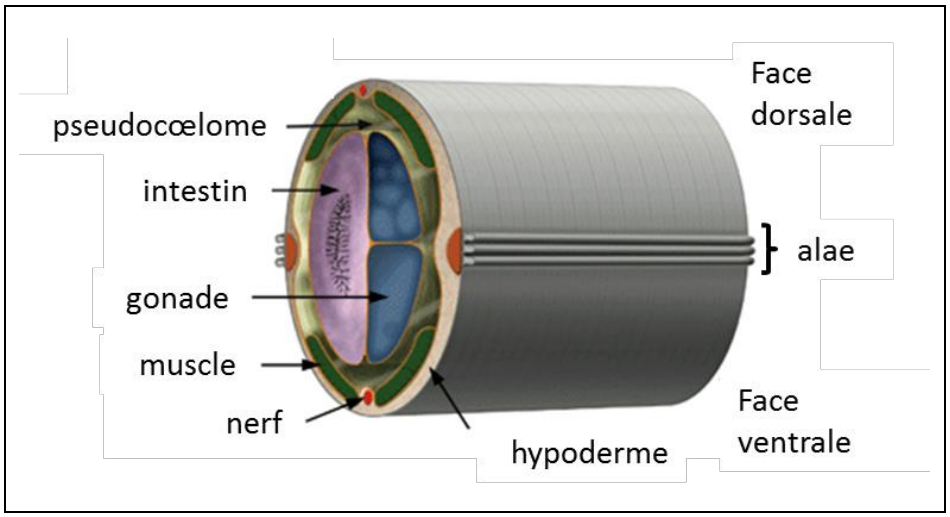


Figure 31 : Coupe transversale d'un *C. elegans*

A l'intérieur de la cavité pseudocœlomique se trouvent les tractus digestif et génital. Le tractus digestif est composé d'un pharynx bilobé qui absorbe la nourriture, d'un intestin et d'un rectum situé dans la partie postérieure de l'animal. Le tractus génital d'un individu hermaphrodite est composé de deux gonades, l'une s'étendant vers l'avant de l'animal et l'autre vers l'arrière. Chaque lobe a une forme de « U » et comprend un ovaire, un oviducte et une spermathèque. Les deux organes jumeaux convergent vers la vulve qui permet l'expulsion des embryons. Chez le mâle, la gonade comprend un testicule relié à un organe reproducteur (cloaque) situé à l'extrémité de la queue de l'animal [200, 201].

2.5.1.3. Cycle de vie

Lorsqu'un adulte hermaphrodite pond un embryon, celui-ci met une quinzaine d'heures à éclore puis près de deux jours à atteindre le stade adulte. Lors de son développement, les vers passent par 4 stades larvaires au cours desquels le système digestif puis les gonades sont formés. Il existe un stade particulier observé lorsque les larves sont privées de nourriture. Ces larves, appelées « Dauer », possèdent un système digestif atrophié et peuvent survivre plusieurs mois sans nourriture. Remises en présence de nourriture, elles peuvent reprendre leur développement normalement [195, 200].

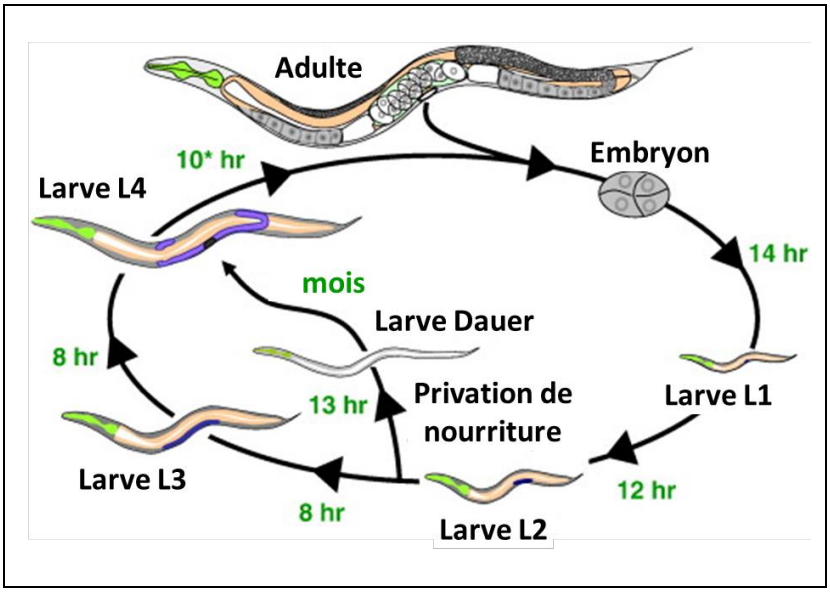


Figure 32 : cycle de vie de *C. elegans* à 22 °C [202].

L'intérêt de maitriser le cycle de vie des vers est qu'il est possible de « synchroniser les populations ». En pratique, cela signifie qu'il est possible d'isoler les embryons et ainsi d'obtenir une population de vers ou de larves ayant exactement le même âge. Cette possibilité est un point clé pour les études toxicologiques car cela permet de caractériser l'impact d'espèces exogènes sur des paramètres tels que le développement ou bien la reproduction.

2.5.2. *C. elegans* un modèle de choix pour les études toxicologiques

Les études éco-toxicologiques utilisant *C. elegans* sont principalement rendues possible par l'existence d'un *Caenohabditis genetic center* (CGC), basé à l'Université de Minnesota (USA), qui pourvoit à tout scientifique intéressé, les animaux ainsi que toutes les informations nécessaires à la mise en culture. Le CGC maintient également à jour une base de données regroupant tous les articles, revues et ouvrages sur *C. elegans*. Le CGC distribue gratuitement à toute institution académique la lignée naturelle ou bien une des 3000 lignées transgéniques de *C. elegans*. Une fois obtenus, les *C. elegans* peuvent être cultivés en milieu liquide ou bien sur des gels d'agar en boîtes de pétri en présence de bactéries *E. coli* comme nourriture.

2.5.3. *C. elegans* et nanoparticules

2.5.3.1. Toxicité des nanoparticules de TiO_2

C. elegans a fait l'objet d'études toxicologiques avec des nanoparticules variées à base d'argent [203], d'oxydes métalliques (TiO_2, CeO_2, Al_2O_3, ZnO, SiO_2) [204-208], de fullerènes

[209] et de quantum dots [210]. Les études sur la toxicité des NPs de TiO_2 sont peu nombreuses et ne s'accordent que très peu sur leurs effets néfastes.

Zhang et *al.* [208] ont exposé des NPs de TiO_2 de 5 et 40 nm de diamètre à des *C. elegans* cultivés en solution. Les auteurs ont tout d'abord observé l'apparition de mort cellulaire dans les gonades à partir de 10 µg/mL puis une diminution de la progéniture entre 100 et 200 µg/mL pour des particules de 5 nm de diamètre. Les NPs de 40 nm n'ont pas induit de modification significative ($p < 0,05$) par rapport aux vers contrôles. Wu et *al.* [206] ont comparé la toxicité de NPs de ZnO, TiO_2 et SiO_2 de 30 nm de diamètre, suspendues dans le milieu de culture. Les auteurs ont relevé des modifications sensibles dans le taux de survie et la longueur des vers (à $p < 0,01$) à partir d'une concentration de 50 µg/mL. Le nombre d'embryons par ver (progéniture) a également été modifié avec une baisse significative à partir de 0,5 µg/mL. Enfin, les auteurs ont identifié des modifications de comportement affectant la locomotion et une production anormale d'EROs à partir de 5 µg/mL. A l'issu de cette étude, les auteurs ont réalisé un classement des différents NPs en fonction des résultats toxicologiques : ZnO–NPs > TiO_2–NPs > SiO_2–NPs. Ces résultats suggèrent que le TiO_2 a bien une interaction complexe avec les organismes vivants et n'a pas seulement un effet mécanique. Wang et *al.* [207] ont comparé les effets de particules micro- et nanométriques (50 et 285 nm) de ZnO, Al_2O_3 et TiO_2 en milieu liquide. Les particules de TiO_2 ont eu un effet létal à partir de 100 µg/mL. Les auteurs rapportent également une diminution de la taille des vers et du nombre d'embryons à partir de 50 µg/mL. Dans cet article, les auteurs expliquent que la toxicité des NPs de ZnO et Al_2O_3 provient majoritairement de la dissolution des NPs dans les milieux de culture et donc de la présence d'ions Zn^{2+} et Al^{3+}. Ils réaffirment par ailleurs l'insolubilité du TiO_2. Roh et al. [204] ont quant à eux réalisé des tests avec des NPs de TiO_2 de 7 et 20 nm en milieu liquide. A 1 µg/mL, les populations subissent une mortalité de 30 % pour les NPs de 7 nm et 10 % pour celles de 20 nm. Il a été observé une hausse significative de l'expression du gène cyp35a2 responsable de la synthèse d'une enzyme du métabolisme des xénobiotiques qui a un rôle clé dans la protection de l'organisme. Enfin Zhao *et al.* [211] ont montré que la barrière intestinale pouvait être altérée lors d'exposition prolongée des *C. elegans* aux NPs de TiO_2.

D'une manière globale, la présence de TiO_2-NPs, n'engendre pas de réaction immédiate mais influe plutôt sur le développement des vers et sur la production d'espèces réactives oxydantes. Dans tous les cas, les faibles doses ne suffisent pas à provoquer la mort. Les effets sont donc discrets et encore mal compris.

2.5.3.2. Internalisation des nanoparticules dans *C. elegans*

Qu et al. [210] ont investigué l'internalisation de quantum dots (CdSe@ZnS) dans les *C. elegans*. Les auteurs rapportent une translocation des QDs dans les cellules adjacentes au système digestif (pharynx, intestin). Les QDs sont également retrouvées dans les gonades et les embryons des vers. De la même manière, Meyer *et al.* [212] ont observé l'internalisation de NPs d'argent dont la surface a été modifiée (citrate ou polyvinylpyrrolidone) avec un passage transgénérationnel. La translocation de NPs est donc possible mais n'a à ce jour jamais été rapportée pour des NPs de TiO_2 chez *C. elegans*.

2.5.3.3. Les nanoparticules et le phénotype « bag of worms »

Pluskota et al. [213] ont étudié l'impact de la présence de NPs de SiO_2 sur des *C. elegans* cultivés en solution. Les auteurs ont observé une légère baisse de la progéniture des vers et un phénomène particulier : une augmentation significative du nombre de vers présentant le phénotype « bag of worm » (BOW). 39 à 55 % des vers présentaient en effet ce phénotype contre 6 % chez les vers contrôles. Le phénotype BOW, montré sur la Figure 33, se traduit par une augmentation du nombre d'embryon dans les vers consécutive à une déficience entrainant un arrêt de ponte. L'arrêt de ponte est régi par des phénomènes encore méconnus mais très probablement liés à un stress [214]. Les embryons éclosent ensuite à l'intérieur du parent et continuent de se développer jusqu'au stade Dauer. Ce type de phénomène apparait généralement lorsque les vers sont privés de nourriture ou avec le vieillissement. Cependant, les véritables raisons entrainant l'apparition de ce phénotype demeurent encore un mystère.

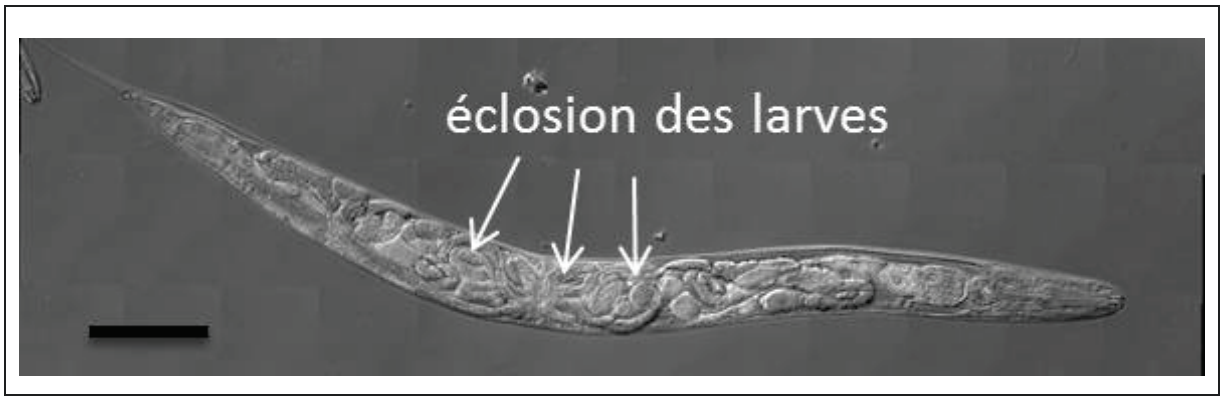


Figure 33 : Phénotype « BOW » d'un *C. elegans* avec le développement intra-utérin de la progéniture (cliché de microscopie à contraste interférentiel réalisé au laboratoire, échelle 100 µm).

3. Problématique de l'étude

Les nanomatériaux font aujourd'hui partie de notre vie avec une utilisation de plus en plus courante dans les objets qui nous entourent. Le TiO_2 est l'un des matériaux les plus utilisés notamment dans des produits venant directement en contact avec notre corps comme les crèmes solaires. Enrichis de l'expérience des grands scandales sanitaires comme le cas de l'amiante, les autorités s'inquiètent de cette omniprésence et incitent les chercheurs à mieux comprendre les interactions entre les NPs et les êtres vivants.

La toxicité des NPs a été étudiée de manière assez large notamment à l'échelle macroscopique avec l'étude de l'impact sur les poumons, la peau ou l'intestin. Cependant, aujourd'hui encore, aucun syndrome n'a clairement été identifié comme directement relié à la présence de NPs dans l'environnement. Les suspicions s'orientent ainsi plus précisément sur une toxicité sur le long terme. Ce type d'effet est très délicat à mettre en évidence chez l'homme notamment pour des raisons d'éthique et de faisabilité. Les chercheurs ont donc recours à des modèles alternatifs tels que les cellules en culture et les petits animaux.

Les premières études dans le domaine mettent en relief certains aspects encore peu discutés dans la littérature notamment l'influence de la taille, de la forme et de la réactivité de surface des NPs sur leur toxicité. Les études présentées illustrent bien ce problème avec des résultats hétérogènes et des conclusions opposées. Cette nouvelle problématique souligne l'importance de normaliser les études en proposant des analyses complètes et fines des NPs étudiées. Ce point justifie la nécessité de lier les compétences des chimistes et des biologistes dans le but commun de comprendre les mécanismes de bases de la toxicité de ces particules.

Ainsi, dans ce manuscrit seront présentés la méthodologie et les premiers résultats d'une collaboration entre l'ICMCB et le CENBG visant à comprendre les interactions entre des NPs de TiO_2 de tailles et de morphologies différentes et des modèles toxicologiques. La synthèse et la caractérisation complète des NPs sélectionnées pour l'étude seront tout d'abord détaillées. La problématique de l'analyse nanotoxicologique sera ensuite décrite dans un chapitre dédié à la méthodologie. La microanalyse par faisceau d'ions qui fut un élément central lors de la thèse sera également expliquée dans cette partie. Enfin les premières données toxicologiques et leur interprétation du point de vue du chimiste seront développées pour les modèles cellulaires et pour *C. elegans.*

Références

1. Buzea, C., I. Pacheco, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity.* Biointerphases, 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
2. Krug, H.F. and P. Wick, *Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge.* Angew. Chem., Int. Ed., 2011. **50**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1260-1278.
3. Borm, P., et al., *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.* Particle and Fibre Toxicology, 2006. **3**(1): p. 11.
4. NanoComposix. *Gold Colloid*. Available from: http://www.nanocomposix.eu/.
5. Robichaud, C.O., et al., *Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO2 Production As a Basis for Exposure Assessment.* Environmental Science & Technology, 2009. **43**(12): p. 4227-4233.
6. Chen, X. and S.S. Mao, *Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications.* ChemInform, 2007. **38**(41): p. 2891-2959.
7. Taylor, D.A., *Dust in the wind.* Environ Health Perspect, 2002. **110**(2): p. A80-7.
8. Buseck, P.R. and M. Pósfai, *Airborne minerals and related aerosol particles: Effects on climate and the environment.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(7): p. 3372-3379.
9. Pan, B. and B. Xing, *Chapter Three - Manufactured Nanoparticles and their Sorption of Organic Chemicals*, in *Advances in Agronomy*, L.S. Donald, Editor. 2010, Academic Press. p. 137-181.
10. Garcia, M.A., *Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications.* Journal of Physics D: Applied Physics, 2011. **44**(28): p. 283001.
11. Guillot, N., *Propriétés optiques de nanoparticules métalliques et application aux nanocapteurs par exaltation de surface*, 2012, Université Paris 13.
12. Brayner, R., et al., *ZnO Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Ecotoxicological Studies.* Langmuir, 2010. **26**(9): p. 6522-6528.
13. Patzke, G.R., et al., *Oxide Nanomaterials: Synthetic Developments, Mechanistic Studies, and Technological Innovations.* Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(4): p. 826-859.
14. Lewis, A.E., *Review of metal sulphide precipitation.* Hydrometallurgy, 2010. **104**(2): p. 222-234.
15. Smalley, R.E., *Discovering the Fullerenes (Nobel Lecture).* Angewandte Chemie International Edition in English, 1997. **36**(15): p. 1594-1601.
16. Mochalin, V.N., et al., *The properties and applications of nanodiamonds.* Nat Nano, 2012. **7**(1): p. 11-23.
17. Ehrenfreund, P. and B.H. Foing, *Fullerenes and Cosmic Carbon.* Science, 2010. **329**(5996): p. 1159-1160.
18. Institut-NEEL. *Graphène*. 2006; Available from: http://neel.cnrs.fr/.
19. Allouche, J., *Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles: An Overview of the Preparation Methods*, in *Nanomaterials: A Danger or a Promise?*, R. Brayner, F. Fiévet, and T. Coradin, Editors. 2013, Springer London. p. 27-74.
20. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters.* Progress in Polymer Science, 2011. **36**(7): p. 887-913.
21. Mehnert, W. and K. Mäder, *Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**: p. 83-101.
22. Neufeldt, S. *Blinged-out fat blob nanotrucks for targeted drug delivery*. 2011; Available from: http://icanhasscience.com/.
23. Astruc, D., E. Boisselier, and C. Ornelas, *Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine.* Chemical Reviews, 2010. **110**(4): p. 1857-1959.

24. Grimsdale, A.C. and K. Müllen, *The Chemistry of Organic Nanomaterials.* Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(35): p. 5592-5629.
25. Goesmann, H. and C. Feldmann, *Nanoparticulate Functional Materials.* Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(8): p. 1362-1395.
26. Roduner, E., *Size matters: why nanomaterials are different.* Chemical Society Reviews, 2006. **35**(7): p. 583-592.
27. Faure, B., et al., *Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and.* Science and Technology of Advanced Materials, 2013. **14**(2): p. 023001.
28. Le Trequesser, Q., H. Seznec, and M.-H. Delville, *Functionalized nanomaterials: their use as contrast agents in bioimaging: mono- and multimodal approaches.* Nanotechnology Reviews, 2013. **2**(2): p. 125-169.
29. Jacob, Z., *Quantum plasmonics.* MRS Bull., 2012. **37**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 761-767.
30. Lavallard, P., *Excitons in nanocrystals.* Journal of Crystal Growth, 1998. **184–185**(0): p. 352-359.
31. Sugimoto, T., X. Zhou, and A. Muramatsu, *Synthesis of uniform anatase TiO2 nanoparticles by gel-sol method: 3. Formation process and size control.* Journal of Colloid and Interface Science, 2003. **259**(1): p. 43-52.
32. Lan, Y., Y. Lu, and Z. Ren, *Mini review on photocatalysis of titanium dioxide nanoparticles and their solar applications.* Nano Energy, 2013. **2**(5): p. 1031-1045.
33. Combres, Y., *Métallurgie et recyclage du titane et de ses alliages.* Techniques de l'ingénieur Métallurgie extractive et recyclage des métaux de transition, 1997.
34. Devore, J.R., *Refractive Indices of Rutile and Sphalerite.* Journal of the Optical Society of America, 1951. **41**(6): p. 416-417.
35. Fujishima, A., K. Hashimoto, and T. Watanabe, *TiO_2 photocatalysis: fundamentals and applications*. 1999: Bkc Incorporated.
36. Azouani, R., *Elaboration de nouveaux nanomatériaux photocatalytiques actifs sous rayonnement visible*, 2009, Université Paris 13.
37. Hanaor, D. and C. Sorrell, *Review of the anatase to rutile phase transformation.* Journal of Materials Science, 2011. **46**(4): p. 855-874.
38. INRS, *Dioxyde de titane*, S.t.e.m.d. l'INRS, Editor 2013.
39. Liao, Y., et al., *Controllable synthesis of brookite/anatase/rutile TiO2 nanocomposites and single-crystalline rutile nanorods array.* Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(16): p. 7937-7944.
40. Satoh, N., T. Nakashima, and K. Yamamoto, *Metastability of anatase: size dependent and irreversible anatase-rutile phase transition in atomic-level precise titania.* Sci. Rep., 2013. **3**.
41. Zhang, H. and J. F. Banfield, *Thermodynamic analysis of phase stability of nanocrystalline titania.* Journal of Materials Chemistry, 1998. **8**(9): p. 2073-2076.
42. Lazzeri, M., A. Vittadini, and A. Selloni, *Structure and energetics of stoichiometric TiO_2 anatase surfaces.* Physical Review B, 2001. **63**(15): p. 155409.
43. Landmann, M., E. Rauls, and W.G. Schmidt, *The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO 2.* Journal of Physics: Condensed Matter, 2012. **24**(19): p. 195503.
44. Diebold, U., *The surface science of titanium dioxide.* Surface Science Reports, 2003. **48**(5-8): p. 53-229.
45. Di Paola, A., M. Bellardita, and L. Palmisano, *Brookite, the Least Known TiO2 Photocatalyst.* Dozzi, Maria, 2013. **3**(1): p. 36-73.
46. Herrmann, J.-M., *Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants.* Catalysis Today, 1999. **53**(1): p. 115-129.

47. Li, Q., N.J. Easter, and J.K. Shang, *As(III) Removal by Palladium-Modified Nitrogen-Doped Titanium Oxide Nanoparticle Photocatalyst.* Environmental Science & Technology, 2009. **43**(5): p. 1534-1539.
48. Alrousan, D.M.A., et al., *Photocatalytic inactivation of E. coli in surface water using immobilised nanoparticle TiO2 films.* Water Research, 2009. **43**(1): p. 47-54.
49. Chong, M.N., et al., *Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review.* Water Research, 2010. **44**(10): p. 2997-3027.
50. Han, F., et al., *Tailored titanium dioxide photocatalysts for the degradation of organic dyes in wastewater treatment: A review.* Applied Catalysis A: General, 2009. **359**(1–2): p. 25-40.
51. Chabas, A., et al., *Wet and dry atmospheric deposition on TiO2 coated glass.* Environmental Pollution, 2010. **158**(12): p. 3507-3512.
52. Montazer, M. and S. Seifollahzadeh, *Enhanced self-cleaning, antibacterial and UV protection properties of nano TiO2 treated textile through enzymatic pretreatment.* Photochemistry and Photobiology, 2011. **87**: p. 877 - 883.
53. Kisch, H., *Semiconductor Photocatalysis—Mechanistic and Synthetic Aspects.* Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(3): p. 812-847.
54. Weir, A., et al., *Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products.* Environmental Science & Technology, 2012. **46**(4): p. 2242-2250.
55. Pfaff, G. and P. Reynders, *Angle-Dependent Optical Effects Deriving from Submicron Structures of Films and Pigments.* Chemical Reviews, 1999. **99**(7): p. 1963-1982.
56. Braun, J.H., A. Baidins, and R.E. Marganski, *TiO_2 pigment technology: a review.* Progress in Organic Coatings, 1992. **20**(2): p. 105-138.
57. Newman, M.D., M. Stotland, and J.I. Ellis, *The safety of nanosized particles in titanium dioxide– and zinc oxide–based sunscreens.* Journal of the American Academy of Dermatology, 2009. **61**(4): p. 685-692.
58. Labille, J., et al., *Aging of TiO(2) nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment.* Environ Pollut, 2010. **158**: p. 3482 - 3489.
59. Brezova, V., et al., *Photoinduced electron transfer between C70 fullerene and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine studied by electron paramagnetic resonance 165.* Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2000. **56**: p. 2729 - 2739.
60. Yadav, T.P., R.M. Yadav, and D.P. Singh, *Mechanical Milling: a Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites.* Nanoscience and nanotechnology, 2012. **2**(3): p. 22-48.
61. Livage, J., *Dossier sol-gel*, ed. R. VERRE. Vol. 6. 2000.
62. Brinker, C.J. and G.W. Scherer, *The physics and chemistry of sol-gel processing*. 1990: Academic press.
63. Sanchez, C. and F. Ribot, *Design of hybrid organic-inorganic materials synthesized via sol-gel chemistry.* New Journal of Chemistry, 1994. **18**(10): p. 1007-1047.
64. Nozawa, K., et al., *Growth of monodisperse mesoscopic metal-oxide colloids under constant monomer supply.* Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2005. **72**(1 Pt 1): p. 11.
65. Nozawa, K., et al., *Smart Control of Monodisperse Stöber Silica Particles: Effect of Reactant Addition Rate on Growth Process.* Langmuir, 2004. **21**(4): p. 1516-1523.
66. Sugimoto, T. and X. Zhou, *Synthesis of uniform anatase TiO2 nanoparticles by the gel-sol method 2. Adsorption of OH- Ions to Ti(OH)4 gel and TiO2 particles.* J Colloid Interface Sci, 2002. **252**(2): p. 347-53.
67. Suchanek, W. and R. Riman, *Hydrothermal synthesis of advanced ceramic powders.* advances in science and technology, 2006. **45**: p. 184-193.
68. Riman, R.E., W.L. Suchanek, and M.M. Lencka, *Hydrothermal crystallization of ceramics.* Annales de Chimie Science des Matériaux, 2002. **27**(6): p. 15-36.
69. Byrappa, K. and M. Yoshimura, *1 - Hydrothermal Technology—Principles and Applications*, in *Handbook of Hydrothermal Technology*, K. Byrappa and M. Yoshimura, Editors. 2001, William Andrew Publishing: Norwich, NY. p. 1-52.

70. Byrappa, K. and T. Adschiri, *Hydrothermal technology for nanotechnology.* Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2007. **53**(2): p. 117-166.
71. Delalande, M., *Synthèse chimique, structure et propriétés magnétiques de nanoparticules d'alliage FePt*, 2007.
72. Kumar, S. and T. Nann, *Shape Control of II–VI Semiconductor Nanomaterials.* Lewinski, Nastassja, 2006. **2**(3): p. 316-329.
73. Tao, A.R., S. Habas, and P. Yang, *Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals.* Lewinski, Nastassja, 2008. **4**(3): p. 310-325.
74. Barnard, A.S. and L.A. Curtiss, *Prediction of TiO_2 Nanoparticle Phase and Shape Transitions Controlled by Surface Chemistry.* Nano Letters, 2005. **5**(7): p. 1261-1266.
75. Barnard, A.S., P. Zapol, and L.A. Curtiss, *Anatase and rutile surfaces with adsorbates representative of acidic and basic conditions.* Surface Science, 2005. **582**(1–3): p. 173-188.
76. Sugimoto, T., K. Okada, and H. Itoh, *Synthetic of Uniform Spindle-Type Titania Particles by the Gel–Sol Method.* Journal of Colloid and Interface Science, 1997. **193**(1): p. 140-143.
77. Zaban, A., et al., *The Effect of the Preparation Condition of TiO2 Colloids on Their Surface Structures.* The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(17): p. 4130-4133.
78. Chemseddine, A. and T. Moritz, *ChemInform Abstract: Nanostructuring Titania: Control over Nanocrystal Structure, Size, Shape, and Organization.* ChemInform, 1999. **30**(14): p. no-no.
79. Gao, Y. and S.A. Elder, *TEM study of TiO2 nanocrystals with different particle size and shape.* Materials Letters, 2000. **44**(3–4): p. 228-232.
80. Penn, R.L. and J.F. Banfield, *Morphology development and crystal growth in nanocrystalline aggregates under hydrothermal conditions: insights from titania.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 1999. **63**(10): p. 1549-1557.
81. Nian, J.-N. and H. Teng, *Hydrothermal Synthesis of Single-Crystalline Anatase TiO_2 Nanorods with Nanotubes as the Precursor.* The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(9): p. 4193-4198.
82. Dinh, C.-T., et al., *Shape-Controlled Synthesis of Highly Crystalline Titania Nanocrystals.* ACS Nano, 2009. **3**(11): p. 3737-3743.
83. Cozzoli, P.D., A. Kornowski, and H. Weller, *Low-Temperature Synthesis of Soluble and Processable Organic-Capped Anatase TiO2 Nanorods.* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(47): p. 14539-14548.
84. Yang, S. *From nanorods to atomic wires of anatase TiO2: Synthesis, characterization, and applications*. 2010. American Chemical Society.
85. Jun, Y.-w., et al., *Surfactant-Assisted Elimination of a High Energy Facet as a Means of Controlling the Shapes of TiO2 Nanocrystals.* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(51): p. 15981-15985.
86. Joo, J., et al., *Large-Scale Synthesis of TiO2 Nanorods via Nonhydrolytic Sol−Gel Ester Elimination Reaction and Their Application to Photocatalytic Inactivation of E. coli.* The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(32): p. 15297-15302.
87. Yun, H.J., et al., *Influence of Aspect Ratio of TiO2 Nanorods on the Photocatalytic Decomposition of Formic Acid.* The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(8): p. 3050-3055.
88. Sugimoto, T., X. Zhou, and A. Muramatsu, *Synthesis of uniform anatase TiO2 nanoparticles by gel–sol method: 4. Shape control.* Journal of Colloid and Interface Science, 2003. **259**(1): p. 53-61.
89. *Aerosol processes*. 2008; Available from: http://www.uio.no/.
90. Inturi, S.N.R., et al., *Flame Aerosol Synthesized Cr Incorporated TiO2 for Visible Light Photodegradation of Gas Phase Acetonitrile.* The Journal of Physical Chemistry C, 2013.
91. Mädler, L., *Liquid-fed Aerosol Reactors for One-step Synthesis of Nano-structured Particle.* KONA, 2004. **22**: p. 107-120.
92. Strobel, R. and S.E. Pratsinis, *Flame aerosol synthesis of smart nanostructured materials.* Journal of Materials Chemistry, 2007. **17**(45): p. 4743-4756.

93. Pratsinis, S.E., *Flame aerosol synthesis of ceramic powders.* Progress in Energy and Combustion Science, 1998. **24**(3): p. 197-219.
94. Burda, C., et al., *Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes.* Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.), 2005. **105**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1025-1102.
95. Kammler, H.K., L. Mädler, and S.E. Pratsinis, *Flame Synthesis of Nanoparticles.* Chemical Engineering & Technology, 2001. **24**(6): p. 583-596.
96. Bischoff, B.L. and M.A. Anderson, *Peptization Process in the Sol-Gel Preparation of Porous Anatase (TiO2).* Chemistry of Materials, 1995. **7**(10): p. 1772-1778.
97. Jaroenworaluck, A., et al., *Characteristics of silica-coated TiO2 and its UV absorption for sunscreen cosmetic applications.* Surface and Interface Analysis, 2006. **38**(4): p. 473-477.
98. Shakeel, A., et al., *Synthesis of Fe2O3 nanoparticles by new Sol-Gel method and their structural and magnetic characterizations.* CORD Conference Proceedings, 2004.
99. Sugimoto, T., X. Zhou, and A. Muramatsu, *Synthesis of Uniform Anatase TiO2 Nanoparticles by Gel–Sol Method: 1. Solution Chemistry of Ti(OH)n(4−n)+ Complexes.* Journal of Colloid and Interface Science, 2002. **252**(2): p. 339-346.
100. Zha, J. and H. Roggendorf, *Sol–gel science, the physics and chemistry of sol–gel processing, Ed. by C. J. Brinker and G. W. Scherer, Academic Press, Boston 1990, xiv, 908 pp., bound—ISBN 0-12-134970-5.* Advanced Materials, 1991. **3**(10): p. 522-522.
101. Zhou, X., et al., *Effect of trimethylamine on the formation of anatase titania nanoparticles by gel-sol method.* Colloid Journal, 2008. **70**(1): p. 26-32.
102. Baek, S.Y., et al., *Synthesis of Highly Soluble TiO2 Nanoparticle with Narrow Size Distribution.* Bull. Korean. Chem. Soc, 2005. **26**(9): p. 1333.
103. Zhang, D., et al., *Formation of crystalline nanosized titania in reverse micelles at room temperature.* Journal of Materials Chemistry, 2002. **12**(12): p. 3677-3680.
104. Bavykin, D.V., J.M. Friedrich, and F.C. Walsh, *Protonated Titanates and TiO_2 Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications.* Advanced Materials, 2006. **18**(21): p. 2807-2824.
105. Beusen, J., et al., *Preparation of a porous nanocrystalline TiO2 layer by deposition of hydrothermally synthesized nanoparticles.* Journal of the European Ceramic Society, 2007. **27**(16): p. 4529-4535.
106. Chen, K., et al., *Effects of surfactants on microstructure and photocatalytic activity of TiO2 nanoparticles prepared by the hydrothermal method.* Materials Science in Semiconductor Processing, 2012. **15**(1): p. 20-26.
107. Han, X., et al., *Carbonate ions-assisted syntheses of anatase TiO_2 nanoparticles exposed with high energy (001) facets.* RSC Advances, 2012. **2**(8): p. 3251-3253.
108. Horváth, E., et al., *Hydrothermal Conversion of Self-Assembled Titanate Nanotubes into Nanowires in a Revolving Autoclave.* Chemistry of Materials, 2007. **19**(4): p. 927-931.
109. Kiatkittipong, K., et al., *Understanding Hydrothermal Titanate Nanoribbon Formation.* Crystal Growth & Design, 2010. **10**(8): p. 3618-3625.
110. Kim, G.-S., et al., *Sodium removal from titanate nanotubes in electrodeposition process.* Electrochemistry Communications, 2006. **8**(3): p. 471-474.
111. Lee, C.K., S.S. Liu, and H.C. Chen, *Application of hydrothermal method derived titanate nanotubes as adsorbents.* Recent Pat Nanotechnol, 2009. **3**(3): p. 203-12.
112. Liu, M., et al., *Anatase TiO2 single crystals with exposed {001} and {110} facets: facile synthesis and enhanced photocatalysis.* Chemical Communications, 2010. **46**(10).
113. Nakahira, A., T. Kubo, and C. Numako, *Formation Mechanism of TiO_2-Derived Titanate Nanotubes Prepared by the Hydrothermal Process.* Inorganic Chemistry, 2010. **49**(13): p. 5845-5852.
114. Nakahira, A., T. Kubo, and C. Numako, *TiO_2-Derived Titanate Nanotubes by Hydrothermal Process with Acid Treatments and Their Microstructural Evaluation.* ACS Applied Materials & Interfaces, 2010. **2**(9): p. 2611-2616.

115. Nawin, V.E., et al., *A step towards length control of titanate nanotubes using hydrothermal reaction with sonication pretreatment.* Nanotechnol, 2008. **19**: p. 1-6.
116. Ou, H.-H. and S.-L. Lo, *Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application.* Separation and Purification Technology, 2007. **58**(1): p. 179-191.
117. Pan, J., et al., *On the True Photoreactivity Order of {001}, {010}, and {101} Facets of Anatase TiO_2 Crystals.* Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(9): p. 2133-2137.
118. Papa, A.-L., et al., *Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier.* The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(39): p. 19012-19017.
119. Poudel, B., et al., *Formation of crystallized titania nanotubes and their transformation into nanowires.* Nanotechnology, 2005. **16**(9): p. 1935-1940.
120. Seo, H.-K., et al., *A study on the structure/phase transformation of titanate nanotubes synthesized at various hydrothermal temperatures.* Solar Energy Materials and Solar Cells, 2008. **92**(11): p. 1533-1539.
121. Shen, L., et al., *Hydrothermal Splitting of Titanate Fibers to Single-Crystalline TiO2 Nanostructures with Controllable Crystalline Phase, Morphology, Microstructure, and Photocatalytic Activity.* The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(24): p. 8809-8818.
122. Souvereyns, B., et al., *Hydrothermal synthesis of a concentrated and stable dispersion of TiO2 nanoparticles.* Chemical Engineering Journal, 2013. **223**(0): p. 135-144.
123. Testino, A., et al., *Optimizing the Photocatalytic Properties of Hydrothermal TiO2 by the Control of Phase Composition and Particle Morphology. A Systematic Approach.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(12): p. 3564-3575.
124. Thennarasu, S., K. Rajasekar, and K. Balkis Ameen, *Hydrothermal temperature as a morphological control factor: Preparation, characterization and photocatalytic activity of titanate nanotubes and nanoribbons.* Journal of Molecular Structure, 2013. **1049**(0): p. 446-457.
125. Tsai, C.-C. and H. Teng, *Regulation of the Physical Characteristics of Titania Nanotube Aggregates Synthesized from Hydrothermal Treatment.* Chemistry of Materials, 2004. **16**(22): p. 4352-4358.
126. Viriya-empikul, N., et al., *Effect of preparation variables on morphology and anatase-brookite phase transition in sonication assisted hydrothermal reaction for synthesis of titanate nanostructures.* Materials Chemistry and Physics, 2009. **118**(1): p. 254-258.
127. Wang, C., et al., *Hydrothermal Growth of Layered Titanate Nanosheet Arrays on Titanium Foil and Their Topotactic Transformation to Heterostructured TiO2 Photocatalysts.* The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(45): p. 22276-22285.
128. Wong, C.L., Y.N. Tan, and A.R. Mohamed, *A review on the formation of titania nanotube photocatalysts by hydrothermal treatment.* Journal of Environmental Management, 2011. **92**(7): p. 1669-1680.
129. Xu, D., et al., *From titanates to TiO_2 nanostructures: Controllable synthesis, growth mechanism, and applications.* Science China Chemistry, 2012. **55**(11): p. 2334-2345.
130. Yang, M.-H., et al., *Alkali metal ion assisted synthesis of faceted anatase TiO2.* CrystEngComm, 2013. **15**(15): p. 2966-2971.
131. Yang, X.H., et al., *Hydrothermal Stability of {001} Faceted Anatase TiO2.* Chemistry of Materials, 2011. **23**(15): p. 3486-3494.
132. Zhou, W., et al., *One-dimensional single-crystalline Ti-O based nanostructures: properties, synthesis, modifications and applications.* Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(29): p. 5993-6008.
133. Djenadic, R. and W. Markus, *Chemical Vapor Synthesis of Nanocrystalline Oxides*, in *Nanoparticles from the Gas Phase, NanoScience and Technology*, Springer, Editor. 2012.
134. Xie, H., et al., *Synthesis of TiO2 nanoparticles by propane/air turbulent flame CVD process.* Particuology, 2009. **7**(3): p. 204-210.

135. Paradis, S., *Synthèse de nanoparticules d'oxydes de titane par pyrolyse laser - Etude des propriétés optiques et de la structure électronique*, 2011, Université Paris Sud – Paris XI.
136. Dar, M.I., et al., *Controlled synthesis of TiO2 nanoparticles and nanospheres using a microwave assisted approach for their application in dye-sensitized solar cells.* Journal of Materials Chemistry A, 2014. **2**(6): p. 1662-1667.
137. Singh, A.K. and U.T. Nakate, *Photocatalytic Properties of Microwave-Synthesized TiO2 and ZnO Nanoparticles Using Malachite Green Dye.* Journal of Nanoparticles, 2013. **2013**: p. 7.
138. Jiang, J., G. Oberdörster, and P. Biswas, *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.* Journal of Nanoparticle Research, 2009. **11**(1): p. 77-89.
139. agency, E.U.s.e.p., *Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen*, N.C.f.E. Assessment, Editor 2010, U.S. Environmental Protection Agency.
140. Johnson, A.C., et al., *An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO2 nanoparticles in UK field scenarios.* Science of The Total Environment, 2011. **409**(13): p. 2503-2510.
141. Foltête, A.-S., et al., *Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO2 nanocomposites on Vicia faba.* Environmental Pollution, 2011. **159**(10): p. 2515-2522.
142. Botta, C., et al., *TiO2-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities.* Environmental Pollution, 2011. **159**(6): p. 1543-1550.
143. Kaegi, R., et al., *Synthetic TiO2 nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment.* Environmental Pollution, 2008. **156**(2): p. 233-239.
144. Menard, A., D. Drobne, and A. Jemec, *Ecotoxicity of nanosized TiO2. Review of in vivo data.* Environmental Pollution, 2011. **159**(3): p. 677-684.
145. Fouqueray, M., et al., *Effects of aged TiO2 nanomaterial from sunscreen on Daphnia magna exposed by dietary route.* Environmental Pollution, 2012. **163**(0): p. 55-61.
146. Mueller, N. and B. Nowack, *Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment.* Environ Sci Technol, 2008. **42**: p. 4447 - 4453.
147. Nogueira, V., et al., *Impact of organic and inorganic nanomaterials in the soil microbial community structure.* Science of The Total Environment, 2012. **424**(0): p. 344-350.
148. Shi, H., et al., *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data.* Particle and Fibre Toxicology, 2013. **10**(1): p. 15.
149. Tourinho, P.S., et al., *Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates.* Environmental Toxicology and Chemistry, 2012. **31**(8): p. 1679-1692.
150. DaNa. *Exposure*. 2012; Available from: www.nanopartikel.info.
151. Gottschalk, F., et al., *Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO(2), ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions.* Environ Sci Technol, 2009. **43**: p. 9216 - 9222.
152. Bigorgne, E., *Ecotoxicité des nanoparticules et des sous produits d'altération de dioxyde de titane sur le ver de terre, eisenia fetida*, in *Laboratoire des interactions ecotoxicologie*2011, Université Paul Verlaine - Metz.
153. INRS. *Tout savoir sur l'amiante, pour mieux s'en protéger*.
154. Schkroeder, H., J. Balassa, and I. Tipton, *Abnormal trace metals in man: titanium.* J Chronic Dis, 1963. **16**: p. 55 - 69.
155. Yin, J.-J., et al., *Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—Generation of reactive oxygen species and cell damage.* Toxicology and Applied Pharmacology, 2012. **263**(1): p. 81-88.
156. Daimon, T. and Y. Nosaka, *Formation and Behavior of Singlet Molecular Oxygen in TiO2 Photocatalysis Studied by Detection of Near-Infrared Phosphorescence.* The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(11): p. 4420-4424.

157. Ministère de lécologie du développement durable et de l'énergie. Available from: www.r-nano.fr.
158. Kreyling, W.G., Hirn, Stephanie, Schleh, Carsten, *Nanoparticles in the lung.* Nat Biotech, 2012. **28**(12).
159. Ivo Iavicoli, V.L., and Antonio Bergamaschi, *Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of In Vivo Studies.* Journal of Nanomaterials, 2012. **2012**: p. 36.
160. Iavicoli, I., et al., *Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies.* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011. **15**(5): p. 481-508.
161. Oberdörster, G., *Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology.* Journal of Internal Medicine, 2010. **267**(1): p. 89-105.
162. Hoet, P., I. Bruske-Hohlfeld, and O. Salata, *Nanoparticles - known and unknown health risks.* J Nanobiotechnology, 2004. **2**: p. 12.
163. INERIS, *Méthodes alternatives en expérimentation animale*, 2011.
164. Simon, M., et al., *The skin barrier function: a micro-PIXE study.* X-Ray Spectrometry, 2009. **38**(2): p. 132-137.
165. Gontier E., Y.M.-D., Bíró T., Hunyadi J., Kiss B., Gáspár K., Pinheiro T., Silva J-N., Filipe P. et al., *Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study.* Nanotoxicology, 2008. **2**(4): p. 218-231.
166. Simon, M., *Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro*, 2009, Université Bordeaux 1.
167. Filipe, P., et al., *Stratum corneum is an effective barrier to TiO2 and ZnO nanoparticle percutaneous absorption.* Skin Pharmacol Physiol, 2009. **22**: p. 266 - 275.
168. CNRS. Available from: http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/imgArt/peau/derme01.htm.
169. De Jong, W.H., et al., *Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration.* Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1912-1919.
170. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, in *Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc*, I.A.f.R.o. Cancer, Editor 2010.
171. Richmond, J., *The 3Rs - Past, Present and Future.* Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 2000. **27**(2).
172. Simon, M. and C. Proulx. *Cellules procaryotes et cellules eucaryotes*. Available from: www.cours-pharmacie.com.
173. *La cellule*, in *Encyclopédie Larousse*.
174. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell.* Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
175. Leclerc, L., *Internalisation cellulaire et activité biologique de micro et nanoparticules fluorescentes de chimie de surface contrôlée*, 2011, Ecole nationale supérieure des Mines de Saint-Etienne.
176. Benmerah, A. and C. Lamaze, *Endocytose : chaque voie compte !* médecine sciences, 2002. **18**(11): p. 1126-1136.
177. Panariti, A., G. Miserocchi, and I. Rivolta, *The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?* Nanotechnology, Science and Applications, 2012. **5**: p. 87-100.
178. Scitable. *Gene expression*. Available from: http://www.nature.com/.
179. Freshney, I., *Culture of animal cells*. 2000: wiley-liss.
180. Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek, *Cytotoxicity of Nanoparticles.* Small, 2008. **4**(1): p. 26-49.
181. Poumay, Y. and M.R. Pittelkow, *Cell Density and Culture Factors Regulate Keratinocyte Commitment to Differentiation and Expression of Suprabasal K1/K10 Keratins.* J Investig Dermatol, 1995. **104**(2): p. 271-276.
182. Pillai, S., et al., *Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: Modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium.* Journal of Cellular Physiology, 1990. **143**(2): p. 294-302.

183. Landry, J.J.M., et al., *The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line.* G3: Genes|Genomes|Genetics, 2013. **3**(8): p. 1213-1224.
184. Simon, M., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity.* Nanotoxicology, 2010: p. 126-140.
185. Yin, J.-J., et al., *Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes--generation of reactive oxygen species and cell damage.* Toxicology and Applied Pharmacology, 2012. **263**(Copyright (C) 2014 U.S. National Library of Medicine.): p. 81-8.
186. Jaeger, A., et al., *Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes.* Toxicology, 2012. **296**(1–3): p. 27-36.
187. Chan, J., et al., *In Vitro Toxicity Evaluation of 25-nm Anatase TiO2 Nanoparticles in Immortalized Keratinocyte Cells.* Biological Trace Element Research, 2011. **144**(1-3): p. 183-196.
188. Jin, C., et al., *Cellular Toxicity of TiO2 Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase.* Biological Trace Element Research, 2011. **141**(1-3): p. 3-15.
189. Xue, C., et al., *Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation.* J. Nanosci. Nanotechnol., 2010. **10**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 8500-8507.
190. Tucci, P., et al., *Metabolic effects of TiO2 nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes.* Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e549.
191. Kim, R., et al., *Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death.* The Journal of Pathology, 2006. **208**(3): p. 319-326.
192. Dunford, R., et al., *Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients.* FEBS Letters, 1997. **418**(1–2): p. 87-90.
193. Park, H.-O., et al., *Comparison of cellular effects of titanium dioxide nanoparticles with different photocatalytic potential in human keratinocyte, HaCaT cells.* Mol. Cell. Toxicol., 2011. **7**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 67-75.
194. Astashkina, A., B. Mann, and D.W. Grainger, *A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity.* Pharmacology & Therapeutics, 2012. **134**(1): p. 82-106.
195. Hope, I.A., ed. *In C. elegans: a practical approach*. Vol. Background on *Caenorhabditis elegans*. 1999, Oxford university press: NY.
196. Caswell-Chen, E.P., et al., *Revising the Standard Wisdom of C. elegans Natural History: Ecology of Longevity.* Sci. Aging Knowl. Environ., 2005. **2005**(40): p. pe30-.
197. Antoshechkin, I., Sternberg, Paul W., *The versatile worm: genetic and genomic resources for Caenorhabditis elegans research.* Nat Rev Genet, 2007. **8**(7).
198. Leung, M.C.K., et al., *Caenorhabditis elegans: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology.* Toxicological Sciences, 2008. **106**(1): p. 5-28.
199. Kaletta, T., Hengartner, Michael O., *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(5).
200. Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. *WormAtlas*. 2002-2012; (ed.s):[http://www.wormatlas.org].
201. Jospin, M., *Caractérisation électrophysiologique in situ à l'aide de la technique de patch-clamp de la cellule musculaire striee du nématode Caenorhabditis elegans*, 2004, Université Claude Bernard Lyon 1.
202. Baylis, H.A. and R.P. Vázquez-Manrique, *Genetic analysis of IP3 and calcium signalling pathways in C. elegans.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2012. **1820**(8): p. 1253-1268.
203. Kim, S.W., S.-H. Nam, and Y.-J. An, *Interaction of Silver Nanoparticles with Biological Surfaces of Caenorhabditis elegans.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012. **77**(0): p. 64-70.

204. Roh, J.-Y., et al., *Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints.* Environmental Toxicology and Pharmacology, 2010. **29**(2): p. 167-172.
205. Wu, Q., et al., *Small sizes of TiO2-NPs exhibit adverse effects at predicted environmental relevant concentrations on nematodes in a modified chronic toxicity assay system.* Journal of Hazardous Materials, (0).
206. Wu, Q., et al., *Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode Caenorhabditis elegans.* Chemosphere, (0).
207. Wang, H., R.L. Wick, and B. Xing, *Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al2O3 and TiO2 to the nematode Caenorhabditis elegans.* Environmental Pollution, 2009. **157**(4): p. 1171-1177.
208. Zhang, W.W., et al. *Reproductive Toxicity of Anatase TiO2 Nanoparticles in Caenorhabditis elegans*. in *Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference on*. 2011.
209. Cha, Y.J., J. Lee, and S.S. Choi, *Apoptosis-mediated in vivo toxicity of hydroxylated fullerene nanoparticles in soil nematode Caenorhabditis elegans.* Chemosphere, 2012. **87**(1): p. 49-54.
210. Qu, Y., et al., *Full Assessment of Fate and Physiological Behavior of Quantum Dots Utilizing Caenorhabditis elegans as a Model Organism.* Nano Letters, 2011. **11**(8): p. 3174-3183.
211. Zhao, Y., et al., *The in vivo underlying mechanism for recovery response formation in nano-titanium dioxide exposed Caenorhabditis elegans after transfer to the normal condition.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014. **10**(1): p. 89-98.
212. Meyer, J.N., et al., *Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in Caenorhabditis elegans.* Aquatic Toxicology, 2010. **100**(2): p. 140-150.
213. Pluskota, A., et al., *In Caenorhabditis elegans Nanoparticle-Bio-Interactions Become Transparent: Silica-Nanoparticles Induce Reproductive Senescence.* PLoS ONE, 2009. **4**(8): p. e6622.
214. Chen, J. and E.P. Caswell-Chen, *Facultative Vivipary is a Life-History Trait in Caenorhabditis elegans.* Journal of Nematology, 2004. **36**(2): p. 107.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules de dioxyde de titane

Comme évoqué dans l'état de l'art, trois morphologies de nanoparticules ont été sélectionnées pour l'étude toxicologique. La comparaison de ces NPs de même composition chimique mais de tailles, de formes et de structures cristallines variées pourront apporter des réponses sur les aspects qui ont un rôle majeur sur leur toxicité potentielle. Une caractérisation très précise des NPs notamment de leur état de surface est donc très importante pour toute compréhension et interprétation de leur interaction dans les modèles biologiques. Dans ce chapitre, les méthodes de synthèse des différentes NPs seront d'abord détaillées. Les propriétés physico-chimiques des NPs ainsi que leur comportement en solution seront ensuite exposés. La discussion s'orientera enfin sur la toxicité attendue des différentes NPs en fonction de chacun des paramètres.

1. Synthèse des nanoparticules de morphologies contrôlées

Deux types de précurseurs sont utilisés dans la littérature pour synthétiser les NPs de TiO_2 de morphologie contrôlée : d'une part des précurseurs moléculaires tels que les alcoxydes de titane ou les sels de titane, d'autre part du TiO_2 déjà formé et vendu sous forme d'une poudre blanche. Dans ce deuxième cas, un traitement très agressif est subi par les particules comme développé ci-dessous.

1.1. Le dioxyde de titane sous forme commerciale AEROXIDE® P 25

Les synthèses abordées dans ce chapitre utilisent comme précurseur le dioxyde de titane de type P 25 fabriqué par la société *Degussa* / *Evonik* basée en Allemagne. Ces particules sont synthétisées par la voie aérosol décrite en chapitre 1 (1.3.2.2.). Ces NPs sont présentes dans beaucoup de produits commerciaux et ont fait l'objet de nombreux travaux notamment dans le domaine de la photo-catalyse [1-4] où cette variété sert souvent de modèle de comparaison. Les NPs nous ont été gracieusement fournies par la société sous leur forme pulvérulente. Les propriétés annoncées par la société sont données dans le Tableau 1.

Propriétés	**Valeur typique**	**Unité**
Surface spécifique (BET)	50 ± 15	m^2/g
Diamètre moyen	21	nm
Densité (de la poudre)	130	g/L
Humidité	< 1,5	% massique
Pureté	> 99,5	% massique

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des nanoparticules de type P 25.

1.1.1. Caractérisation morphologique et dispersion en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission

Les NPs sont dispersées en solution aqueuse puis déposées sur des grilles de cuivre recouverte d'un film de carbone (Mesh 300) pour permettre leur observation par microscopie électronique en transmission (MET) HITACHI H7650. Les clichés MET, visibles sur la Figure 1 (a) et b)), permettent d'apprécier la taille et la forme des particules avec différents grossissements. L'analyse des clichés révèle des formes isotropes assez aléatoires. Certaines particules ressemblent en effet à de petites sphères, d'autres à de petits cubes et enfin quelques particules présentent le faciès d'embryon de bipyramide à base carrée (forme thermodynamiquement stable de l'anatase). La distribution statistique en taille a ensuite été mesurée à l'aide du logiciel *ImageJ*. Les résultats sont visibles sur la Figure 1 c). Les P 25 ont une taille moyenne de 24 nm avec un écart type de 8 nm. L'écart type apporte une indication sur la dispersité c'est-à-dire l'homogénéité en taille. Les P 25 ont une forte tendance à l'agrégation, connue dans la littérature, et inhérente à la voie de synthèse à haute température [5].

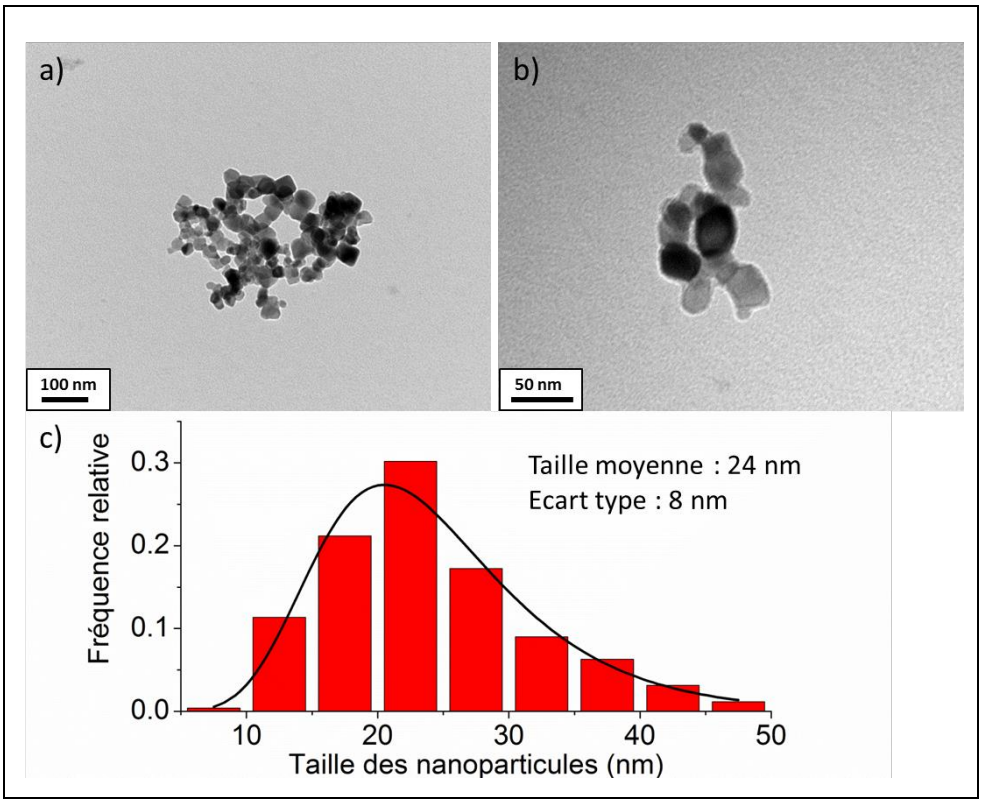


Figure 1 : Clichés de MET de nanoparticules P 25 à des grossissements de a) 200 kX et b) 500 kX. L'analyse révèle des NPs multiformes et une forte tendance à l'agrégation. c) Fréquence relative du diamètre de nanoparticules P 25 (250 particules mesurées). La taille des P 25 varie de 10 à 50 nm de diamètre avec une moyenne de 24 nm.

1.1.2. Caractérisation structurale par diffraction aux rayons X

La diffraction des rayons X sur poudre peut être comparée à un lecteur de codes-barres de la matière cristallisée. L'agencement des atomes dans une maille cristalline ainsi que la nature de ces atomes engendrent une diffraction spécifique des radiations X. La structure cristalline confère à un matériau des propriétés spécifiques influant sur la réactivité des surfaces et par conséquent sur la possible toxicité. En ce sens, l'étude de la structure cristalline des nanomatériaux est essentielle pour la compréhension des possibles effets néfastes.

La Figure 2 montre le diffractogramme obtenu par diffraction des rayons X des P 25. L'analyse de la position des pics révèle la présence d'une structure mixte incluant les phases anatase et rutile. Les principaux pics sont indexés avec les indices de Miller correspondants. Les fiches JCPDS correspondant à l'anatase et au rutile sont respectivement 021-1272 et 021-1276. L'utilisation de la loi de Scherrer permet en première approximation d'évaluer la taille moyenne des cristallites à partir de la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction. La loi de Scherrer se présente ainsi :

$$\beta(rad) = \frac{\lambda}{L.\cos\theta}$$

Avec β(rad) la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction, λ la longueur d'onde des rayons X incidents, L la taille des cristallites et θ la position angulaire des pics. D'après les pics principaux de l'anatase (101) et du rutile (110), les tailles de cristallites moyennes sont respectivement de 26 et 36 nm. La taille des cristallites est assez proche de la taille observée sur les clichés MET (24 nm). Cette correspondance suggère que les particules sont monocristallines, c'est-à-dire qu'elles ne sont constituées que d'un seul et même domaine cristallin. La taille des particules de rutile est plus importante et concorde avec des observations précédemment rapportées [6].

Une étude plus fine par affinement a été entreprise pour quantifier, le rapport des intensités des pics entre anatase et rutile dans la poudre.

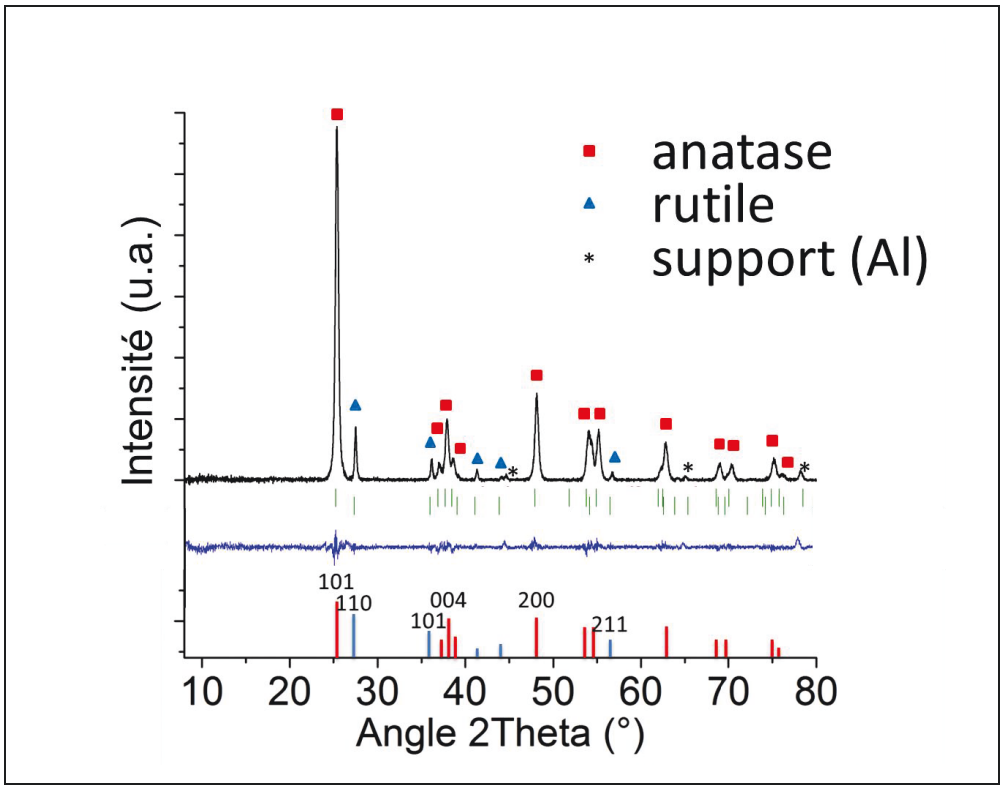


Figure 2 : Diffractogramme des nanoparticules P 25 montrant la présence des phases anatase et rutile. Les fiches JCPDS correspondantes sont respectivement 021-1272 et 021-1276 (source cuivre Ka = 1,54056 Å).

Dans un diffractogramme de poudre, les pics de diffraction apparaissent au-dessus d'un fond continu (background) et peuvent être caractérisés par 3 types de paramètres : la position, l'intensité et la forme. Il est alors possible de simuler un diffractogramme théorique correspondant au diffractogramme expérimental afin de remonter finement aux différents paramètres structuraux du matériau. Le logiciel *Fullprof* est utilisé dans ce but. La position des pics permet de remonter à beaucoup de paramètres notamment grâce à l'utilisation de la loi de Bragg :

$$2.d_{hkl}.\sin\theta = \lambda$$

λ représente la longueur d'onde des rayons X, d_{hkl} la distance entre deux plans équivalents hkl et θ l'angle de diffraction associé. La valeur de d_{hkl} permet ensuite de remonter aux paramètres de mailles a, b, c, α, β et γ. L'analyse approfondie, appelée « affinement Le Bail », permet également de déterminer la proportion de chaque phase dans un échantillon contenant un mélange comme les P 25. Les résultats sont résumés dans le Tableau 2. Ainsi, il a été déterminé que cet échantillon de P 25 est composé de 87 % d'anatase et 13 % de rutile. Ces valeurs sont assez cohérentes avec les résultats disponibles

dans la littérature [7]. Les paramètres de maille sont enfin très proches des valeurs théoriques (cf. fiches JCPDS).

			Paramètres de maille (Å, °)					
Phase	Groupe d'espace	Proportion %	a	b	c	α	β	γ
Anatase	I 4_1/a m d	87	3,78273	3,78273	9,50008	90	90	90
Rutile	P 4_2/m n m	13	4,59109	4,59109	2,95586	90	90	90

Tableau 2 : Récapitulatif des informations obtenues lors de l'affinement « Le Bail » du diffractogramme de P 25.

1.1.3. Etude des faces exposées

La réactivité de surface des NPs est définie par leur capacité à réagir avec le milieu environnant d'abord par adsorption des molécules puis parfois par l'induction d'une réaction chimique par des processus catalytiques (ex : dissociation de l'eau). La réactivité des particules dépend de la structure cristallographique, de la surface spécifique mais également de la morphologie qui détermine les faces cristallines exposées. La disposition et la coordinence des atomes de surface sont en effet spécifiques de la face cristalline exposée par un cristal [8]. Chaque face présente un nombre différent de défauts qui peuvent être des atomes de titane à coordinence incomplète ou bien des liaisons O-Ti-O distordues [9]. Nous avons évoqué dans l'état de l'art des différences d'énergies libres de surface pour les différentes faces. Il convient de faire la différence entre énergie libre et réactivité de surface qui sont deux aspects différents sur lesquels nous reviendront ultérieurement. La connaissance des faces exposées par les NPs peut donc aider à anticiper leur réactivité et par extension leur toxicité.

Les éléments de la littérature montrent que les P 25 AEROXIDE® ont une forme assez aléatoire ce qui signifie que les plans exposés sont variés. Toutefois, la forme bipyramidale de certaines particules peut aisément être reconnue. Les images de MET haute résolution (MET HR) obtenues par Deiana et *al.* [2, 3] montrent les projections 2D des P 25 (Figure 3). Il est possible de reconnaître différentes structures dérivées de la forme décrite par le théorème de Wulff et détaillée auparavant (chapitre 1, 1.3.2.1.3.). Il est en effet possible de retrouver des bipyramides à bases carrées avec différents rapports de forme. Il apparaît que les surfaces majoritairement exposées sont les faces (101) et (001). La forme plutôt cuboïde indique par ailleurs qu'aucun plan n'est favorisé et suggère donc que les faces sont exposées en proportions équivalentes.

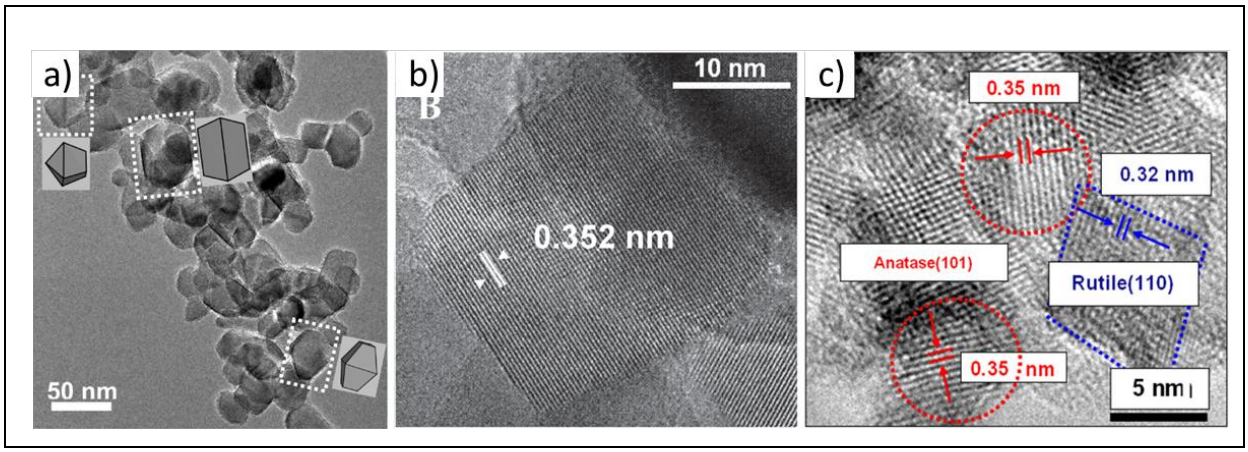


Figure 3 : Clichés de (a) MET HR des P 25 avec identification de la forme des cristaux (b) MET HR des P 25 avec mesure de la distance interplanaire indiquant la direction cristallographique et (c) MET HR de P 25 montrant à la fois des particules de rutile et d'anatase [2, 3, 10].

1.2. Les nano-feuillets enroulés

1.2.1. Synthèse et mécanisme réactionnel

Les nano-feuillets enroulés (NFs) ont été synthétisés pour la première fois par Kasuga *et al.* à la fin des années 90 [11-13]. Ces objets présentent une structure cylindrique avec une cavité centrale vide et un rapport de forme important. Ils possèdent une surface spécifique très grande ce qui a suscité beaucoup d'intérêt pour diverses applications telles que la catalyse [14, 15], le stockage de l'énergie [16], le photovoltaïque [17] ou encore les applications biomédicales [18-21] faisant notamment l'objet de plusieurs revues [22-26].

Ces objets sont obtenus par la voie hydrothermale qui consiste à détruire les NPs de TiO_2 préexistantes (AEROXIDE® P 25) par une attaque alcaline en milieu très basique. Les NPs sont dispersées dans une solution concentrée de soude (10 M) puis transvasées dans un autoclave en Téflon renforcé d'une coque en acier (Figure 4). Le taux de remplissage est toujours précisément contrôlé car la pression interne lors de la réaction en dépend fortement. Le réacteur est enfourné à 130 °C pour une durée de 20 heures. En fin de réaction, le précipité obtenu est lavé avec un acide peu concentré (0,1 M), neutralisé puis stocké en milieu aqueux. Les détails expérimentaux sont exposés en fin de chapitre.

Les conditions opératoires sont précisément contrôlées car il est possible, en faisant varier la température ou la nature de la base, d'obtenir des objets différents comme illustré dans la Figure 4.

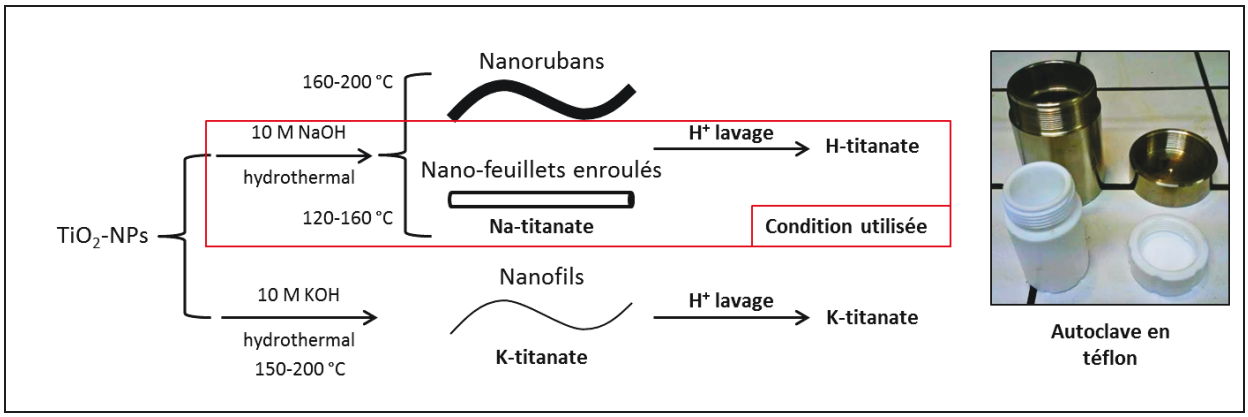


Figure 4 : Synthèse des procédés permettant l'obtention de structures « titanate » [27].

Depuis la découverte de cette synthèse, de nombreuses études ont tenté de décrire les mécanismes réactionnels de la transformation [6, 28-40]. A ce jour, deux hypothèses s'affrontent :

(i) La théorie de l'exfoliation / enroulement

Ce modèle, qui est le plus communément admis, se déroule en quatre étapes : (i) une partie du précurseur est dissoute avec rupture des liaisons Ti-O-Ti par la solution alcaline formant des monomères de type « TiO_6 » ; (ii) il se forme alors des structures correspondant à des empilements de feuillets de titanate de sodium de la forme $Na_2Ti_3O_7$ probablement à la surface des NPs de départ ; (iii) les feuillets sont exfoliés ; (iv) les feuillets s'enroulent puis grandissent dans l'axe de la longueur. Le mécanisme est schématisé sur la Figure 5.

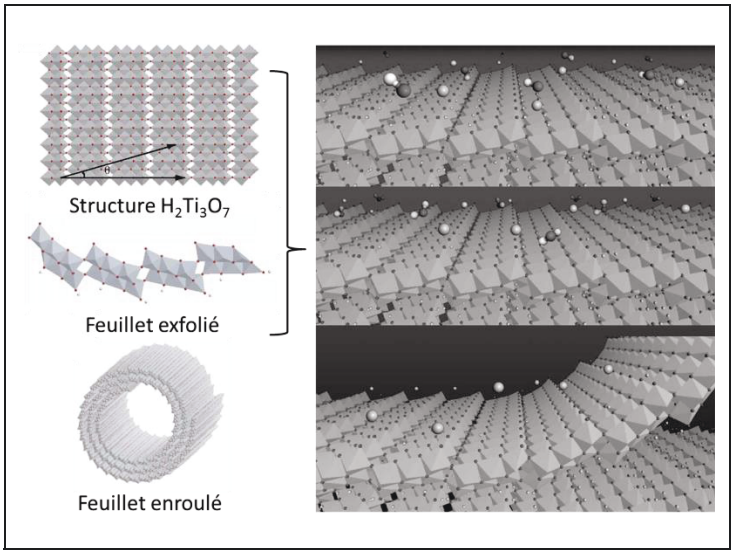


Figure 5 : Mécanisme de réaction avec la formation d'une structure de $Na_2Ti_3O_7$, l'exfoliation des feuillets puis leur enroulement (figure adaptée de la référence [39]).

(ii) La théorie de la dissolution / nucléation

La théorie de la dissolution / nucléation a été proposée par Kukovecz *et al* . [40]. Dans ce modèle, les conditions très basiques et sous pression conduisent à la dissolution d'une partie des NPs de départ formant des monomères de type « TiO_6 ». Ces monomères se condenseraient ensuite pour donner des feuillets de titanate de sodium ($Na_2Ti_3O_7$) qui s'enroulerait par la suite tout en continuant de croitre selon l'axe de la longueur. Ce modèle diffère de la théorie précédente par l'absence d'un empilement de feuillets de titanate de sodium par la suite exfoliés. Le mécanisme est schématisé sur la Figure 6.

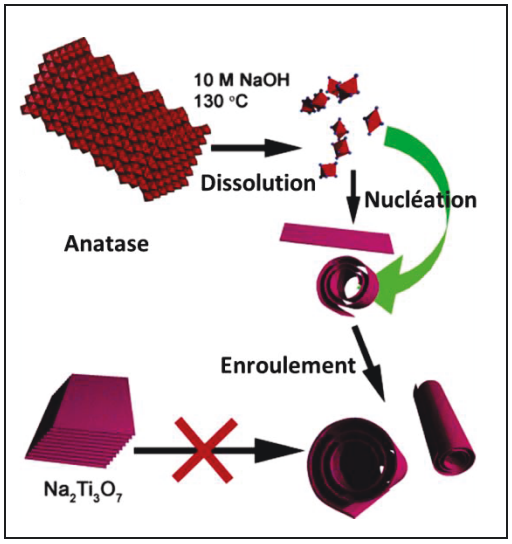


Figure 6 : Mécanisme de réaction postulé par Kukovecz *et al* . [40].

Nous ne prendrons pas parti dans ce débat car le propos est ici plutôt de comprendre la toxicité potentielle de ces objets.

Les nano-feuillets enroulés obtenus seront utilisés tels quels ou après un séchage à basse température (40 °C). Ils serviront également de précurseurs pour la synthèse de particules possédant d'autres morphologies. En effet, la structure tubulaire de ces objets, si elle n'est pas consolidée, leur confère une réactivité potentielle qui permet, en conditions hydrothermales, leur redissolution sous conditions peu acide ou peu basique en vue d'obtenir des objets de morphologie contrôlée [27]. La nucléation-croissance à partir des octaèdres TiO_6 permet alors d'obtenir des NPs de TiO_2 structurées selon une orientation spécifique qui dépend des conditions opératoires.

1.2.2. Caractérisation morphologique et dispersions en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission

Les clichés MET des nano-feuillets sont visibles sur la Figure 7 (a) et b)). Les images montrent des objets allongés de tailles assez variables. La transparence des objets sur la partie centrale indique une densité inférieure et confirme leur morphologie tubulaire. Il est également possible de voir que certains feuillets ne sont que partiellement enroulés et présentent donc encore une structure lamellaire. L'extrémité des tubes est par ailleurs ouverte ce qui pourrait influer sur les capacités de pénétration des NFs au travers des membranes cellulaires par exemple. La distribution statistique en taille a ensuite été mesurée (Figure 7 c) et d)). La longueur des tubes peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. La taille moyenne des tubes est de 172 nm avec un écart type de 94 nm ce qui dénote d'une grande dispersité. Certains tubes dépassent plusieurs centaines de nanomètres en longueur. Le diamètre des tubes ne varie cependant que très peu et est de l'ordre de 9 nm ± 1,6 nm.

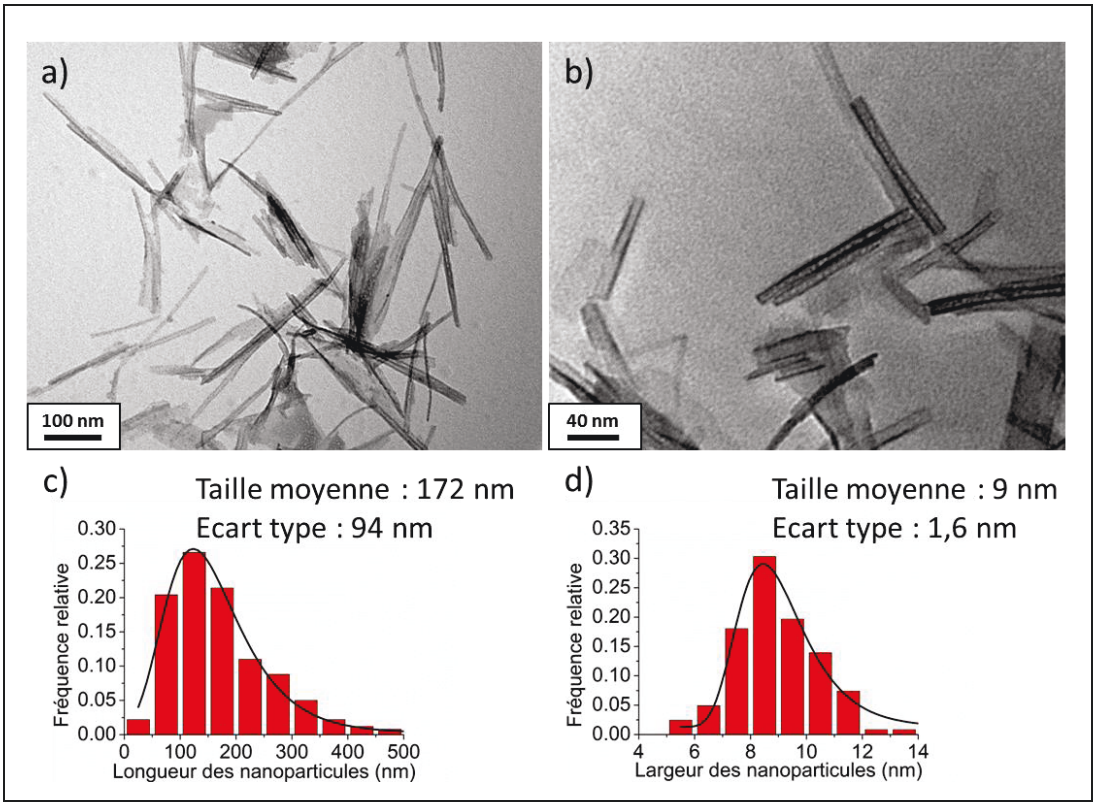


Figure 7 : Clichés de microscopie électronique en transmission des nano-feuillets enroulés à a) 200 kX et b) 500 kX. Les images révèlent la structure tubulaire de ces objets. Sur les images, certains feuillets ne sont que partiellement enroulés ce qui montre que ces objets ne sont pas parfaitement définis.

1.2.3. Caractérisation structurale par diffraction aux rayons X

Les diffractogrammes des nano-feuillets enroulés obtenus avant et après lavage acide et séchage à 40 °C sont montrés en Figure 8. Les deux courbes correspondent respectivement aux phases titanate de sodium et d'hydrogène. L'évolution du diffractogramme correspond à une modification structurale qui se produit lors du remplacement des ions Na^+ par les ions H^+ entre les feuillets pendant le lavage acide [13].

La phase cristalline obtenue a également été l'objet de débats au sein de la communauté au cours de nombreux travaux [41-54] synthétisées, en 2014, par Liu et al. [26]. Plusieurs structures ont été proposées pour ces objets telles que le réseau monoclinique $H_2Ti_3O_7$ [53, 54], la structure type lepidocrocite $H_{0.7}Ti_{1.825}\square_{0.175}O_4.H_2O$ [41, 44] (avec $\square$ une lacune) ou encore la phase orthorhombique $H_2Ti_2O_5$ [49-51]. L'ensemble de la communauté est cependant unanime sur l'obtention d'une forme protonée d'un oxyde de titane ou titanate d'hydrogène pouvant s'écrire $H_{2m}Ti_nO_{2n+m}$ [22] et proposant des aspects similaires (pour une source cuivre) : (i) quatre pics principaux à 2θ = 10°, 24°, 28° et 48° ; (ii) un pic à 10° correspondant à la distance inter-feuillets (0,7-0,8 nm).

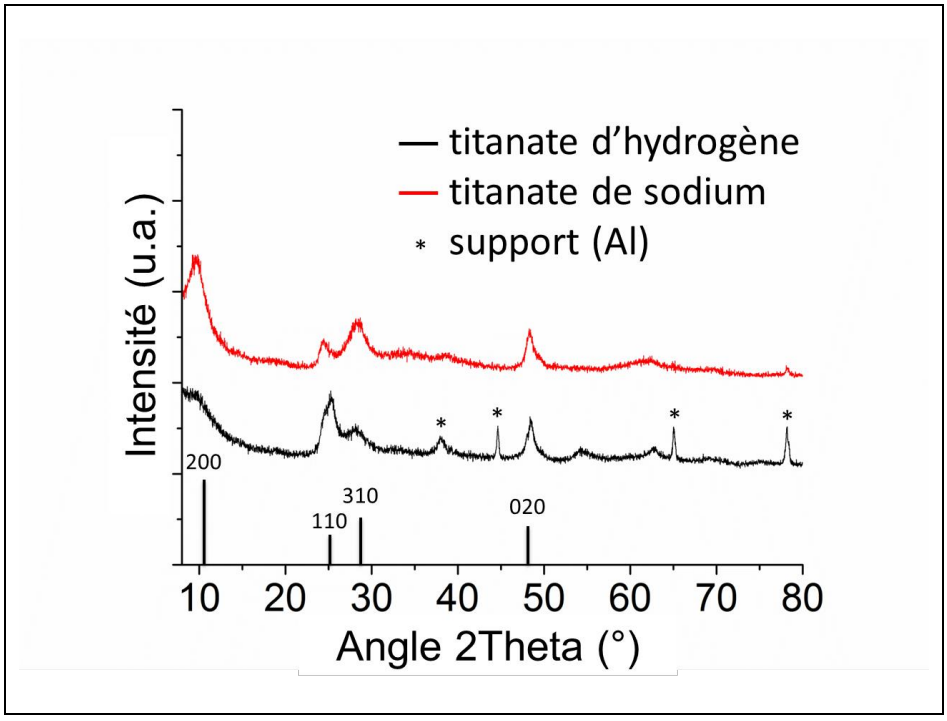


Figure 8 : Diffractogrammes des nano-feuillets enroulés avant et après lavage acide et neutralisation. Les astérisques montrent les pics correspondant au support en aluminium. Les traits sous les courbes représentent les pics de diffraction de la phase $H_2Ti_3O_7$ d'après la fiche JCPDS N°47-0561.

Suivant la phase envisagée, la structure même des feuillets est modifiée comme montré sur la Figure 9. Les deux structures modélisées par Gao *et al.* [41] sont, dans les deux cas, des assemblages de d'octaèdre de TiO_6 agencés différemment. La structure lepidocrocite est décrite comme plate avec les octaèdres de TiO_6 partageant les arêtes et la structure monoclinique est constituée de « rubans » reliés par les coins en formant des « marches ».

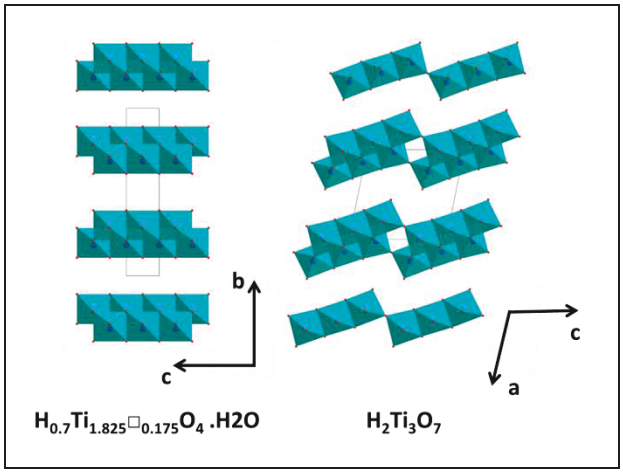


Figure 9 : Représentation schématique des nano-feuillets enroulés selon les deux théories évoquées dans la littérature [41].

Nous avons essayé de confirmer une des hypothèses avec des analyses en MET HR. Les images et la transformée de Fourier (TF) sont visibles sur la Figure 10. Les images de TF sont cependant très irrégulières et n'ont pas permis de déterminer l'orientation cristalline. Nous ne prendrons donc pas parti sur une des structures et considérerons simplement un titanate d'hydrogène.

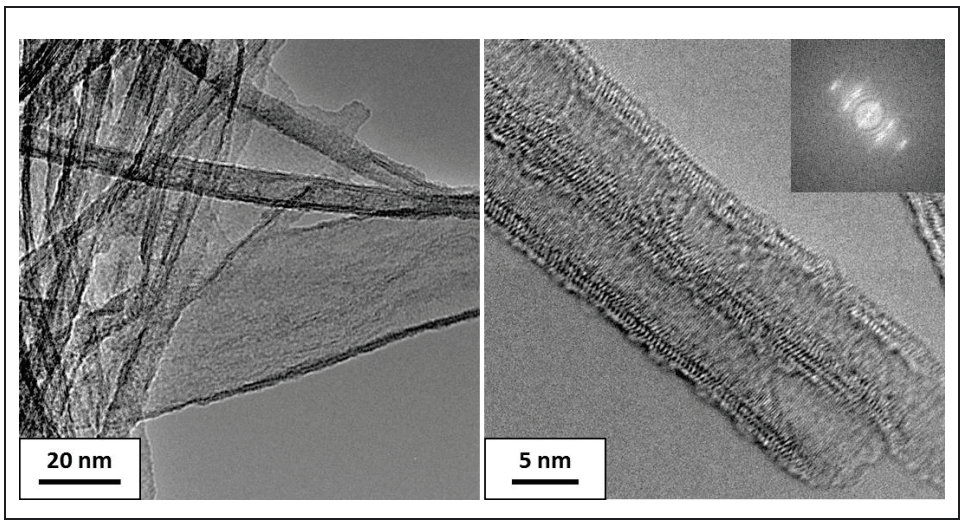


Figure 10 : Clichés de MET HR de NFs avec la transformée de Fourier.

Les images de MET HR ont cependant permis de mieux visualiser les NFs et leur structure tubulaire. Notons par ailleurs le caractère très acéré des extrémités de ces nanotubes enroulés qui pourrait jouer un rôle vis-à-vis des membranes cellulaires.

1.3. Les nano-aiguilles

1.3.1. Synthèse et mécanisme réactionnel

La synthèse des nano-aiguilles (NAs) s'effectue également par voie hydrothermale, en utilisant le principe sus-décrit avec les nano-feuillets enroulés comme matériaux de départ. Cette synthèse, décrite par Nian et Teng, utilise le principe de contrôle de morphologie en jouant sur le pH (cf. chapitre 1 1.3.2.1.3.1.) [55]. Les NFs lavés et stockés en solution aqueuse sont synthétisés par la voie décrite précédemment. De la soude est ajoutée jusqu'à obtention d'un pH de 9 puis la solution subit un traitement hydrothermal en autoclave à 140 °C pendant 72 h. Conformément aux prévisions décrites dans le chapitre 1, l'ajustement du pH permet d'obtenir des objets allongés assimilables à des NAs.

La formation des objets de morphologie contrôlée décrite par Xu *et al.* [27] est schématisée sur la Figure 11. Celle-ci débute par un processus de « dissolution-nucléation » des nano-feuillets suivi de la croissance cristalline. Comme pour la synthèse précédente, il se produit une dissolution des NFs formant des octaèdres de type « TiO_6 ». La réaction se poursuit ensuite par la nucléation de germes à la surface des NFs. Lors de cette étape, les fragments (TiO_6) se réorganisent et s'assemblent par olation ou oxolation [56]. La température élevée permet une croissance rapide du TiO_2 et sa cristallisation. Comme prédit par le modèle de Barnard et *al*. [57], la croissance cristalline des germes d'anatase en solution à pH basique s'effectue préférentiellement selon l'axe (001) car c'est la face qui possède l'énergie libre la plus élevée.

Une autre théorie décrite par Li et al. [58] permet d'expliquer la formation d'objets allongés. Dans ce modèle, des ions OH^- sont graduellement libérés lors de la dissolution des feuillets. Ils peuvent ensuite sélectivement s'adsorber sur les faces équivalentes (100) et (010) abaissant ainsi leur énergie libre et ralentissant leur croissance. Les nano-aiguilles ainsi formées seront d'autant plus allongées que ces phénomènes d'écrantage de croissance seront importants. La réaction s'achève enfin avec la consommation de la totalité des fragments issus des NFs.

Nous avons également effectué cette réaction en utilisant le P 25 comme matériau de départ afin de vérifier la nécessité de l'utilisation des NFs. Ces conditions opératoires ont montré que les NPs de TiO_2 conservaient leur morphologie initiale. Il s'avère donc indispensable de passer par cette étape d'attaque de la structure cristalline de l'oxyde en milieu très basique.

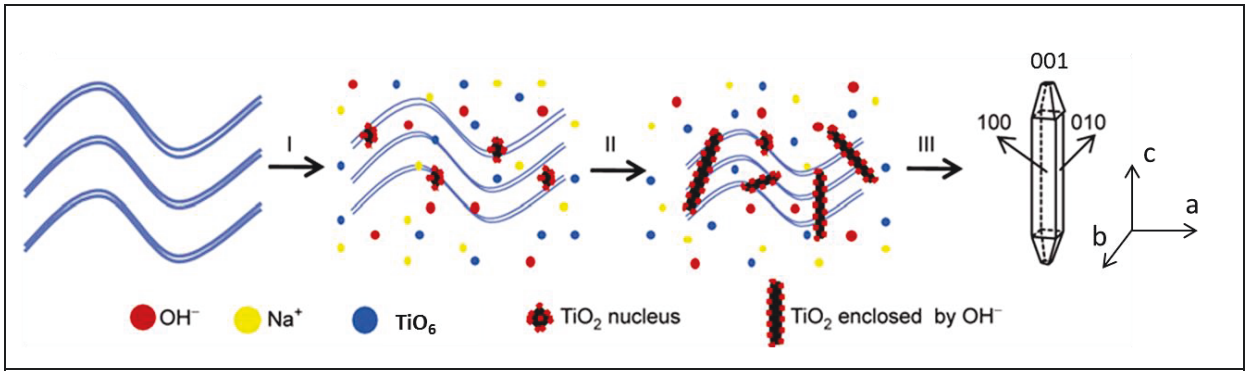


Figure 11 : Mécanismes de dissolution - nucléation lors de la synthèse des nano-aiguilles. Les nano-feuillets se décomposent en fragments qui peuvent s'assembler pour former des germes de TiO_2. Les germes grossissent ensuite pour donner des NAs allongées selon l'axe c [27].

1.3.2. Caractérisation morphologique des nanoparticules par microscopie électronique en transmission

Les images de MET des NAs (Figure 12 a) et b)) montrent des particules qui possèdent des formes allongées et qui peuvent être comparées à des aiguilles. Leur forme varie légèrement mais conserve systématiquement cet aspect allongé. La dispersité en taille a ensuite été mesurée (Figure 12 c) et d)). Les NAs ont une longueur moyenne de 45 nm avec un écart type de 16 nm. La largeur des particules est de l'ordre de 15 nm ce qui leur confère un facteur de forme moyen de 3. Ces particules sont par ailleurs bien dispersées sur les grilles.

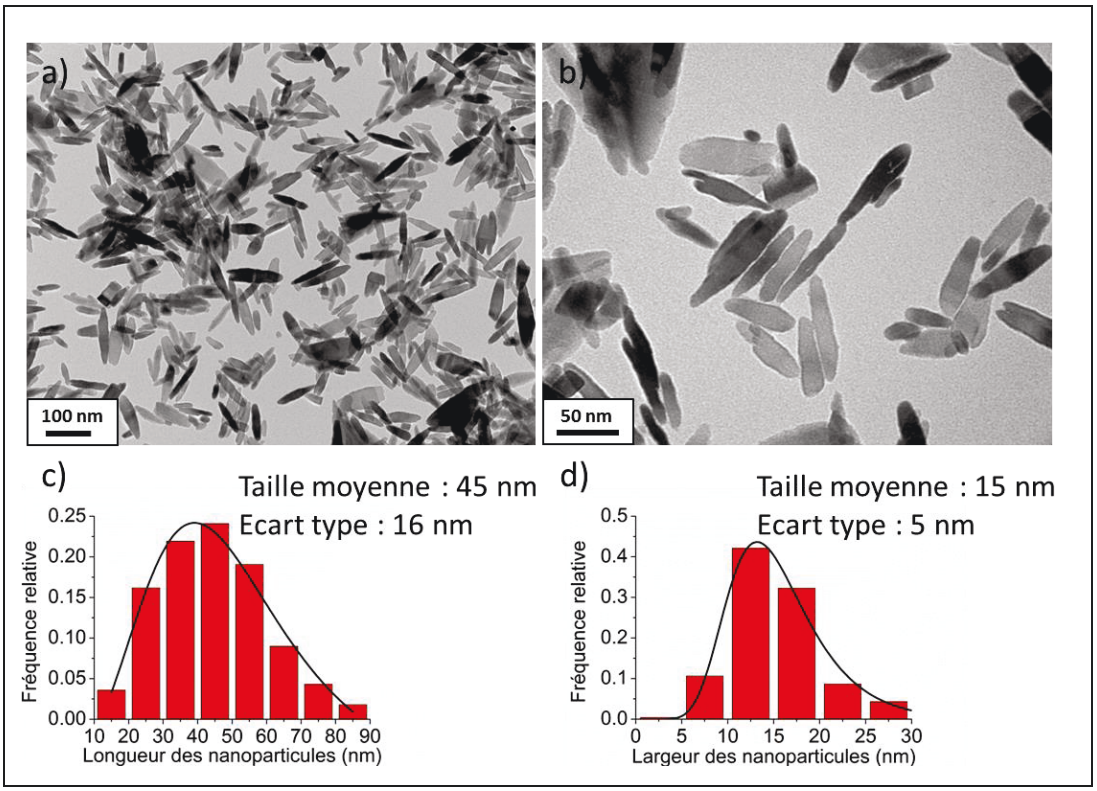


Figure 12 : Clichés de microscopie électronique en transmission des nano-aiguilles à a) 200 kX et b) 400 kX. c) et d) répartitions en longueur et largeur des nano-aiguilles (250 particules analysées).

1.3.3. Caractérisation structurale par diffraction aux rayons X

Le diffractogramme des nano-aiguilles est montré en Figure 13. Les pics caractéristiques de l'anatase et de la brookite sont observés et indexés avec leurs indices de Miller respectifs (fiches JCPDS correspondantes à l'anatase et à la brookite respectivement 021-1272 et 029-1360). Comme pour les P 25, les pics ont une largeur à mi-hauteur très faible ce qui indique une bonne cristallinité. La taille moyenne des cristallites a été évaluée dans un premier temps à l'aide de la loi de Scherrer pour les 3 principaux pics de l'anatase. Les résultats sont affichés dans le Tableau 3. La taille de cristallites calculée pour l'axe c (face (002)) est plus importante que celle des faces (101) et (100) ceci est caractéristique d'un objet anisotrope allongé selon cet axe [59]. D'autre part, la taille des cristallites est comparable à la taille observée en MET ce qui suggère que les particules sont monocristallines. Dans le cas de la brookite, la trop faible intensité des pics ne permet pas de calculer la taille des cristallites.

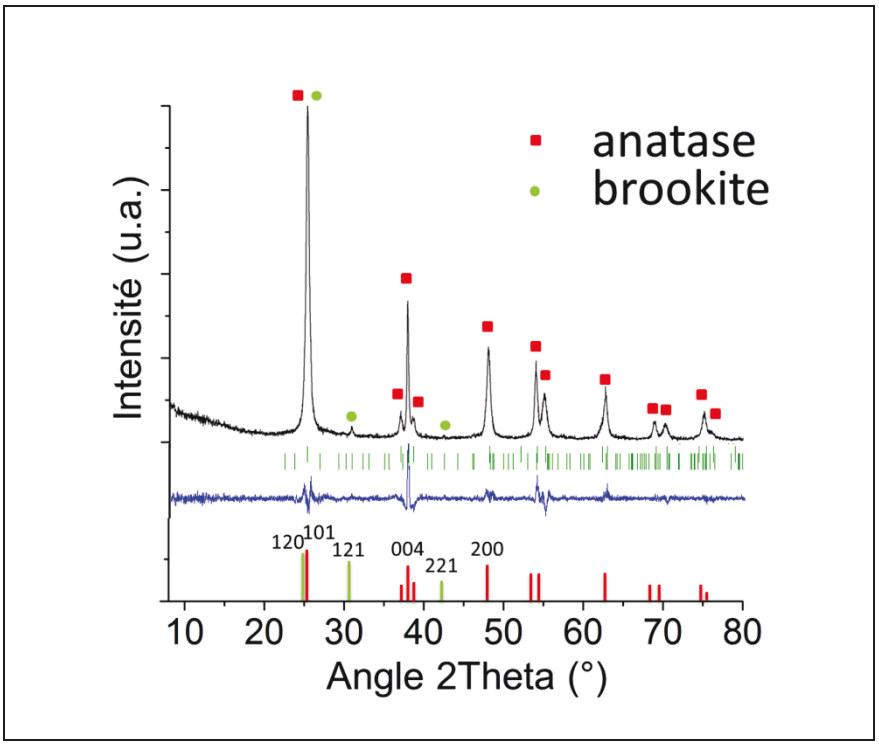


Figure 13 : Diffractogramme des nano-aiguilles avec les phases anatase et brookite.

Pic	Largeur à mi-hauteur (deg)	Taille cristallites (nm)
101	0,527	16
002	0,226	36
200	0,38	21

Tableau 3 : Largeurs à mi-hauteur et tailles des cristallites des trois principaux pics de diffraction de la phase anatase.

L'analyse approfondie du diffractogramme par affinement « Le Bail » a démontré une proportion de 96 % d'anatase contre 4 % de brookite dans l'échantillon. Les résultats sont résumés dans le Tableau 4. Les paramètres de maille de l'anatase se rapprochent beaucoup des valeurs théoriques (fiche JCPDS). Ceux de la brookite sont très différents des valeurs théoriques. L'intensité des pics est cependant très faible ce qui pourrait expliquer cet écart.

			Paramètres de maille (Å, °)					
Phase	Groupe d'espace	Proportion %	a	b	c	α	β	γ
Anatase	I 4_1/a m d	96	3,7877	3,7877	9,4959	90	90	90
Brookite	P b c a	4	7,8799	6,1338	5,9399	90	90	90

Tableau 4 : Récapitulatif des informations obtenues lors de l'affinement « Le Bail » du diffractogramme des nano-aiguilles

1.3.4. Etude des faces exposées

Les faces exposées par les NAs ont été évoquées dans les précédentes parties relatives à leur synthèse. Ainsi, les NAs peuvent présenter les faces (101), (001) et (010) / (100) selon leur longueur. Ces données ont pu être vérifiées par l'étude de l'orientation cristalline de NAs obtenues dans des conditions similaires à l'aide d'un MET haute résolution. Les clichés et la transformée de Fourier sont visibles sur la Figure 14. L'étude de l'orientation et de la localisation des taches de diffraction obtenues par transformée de Fourier montre que les objets sont allongés selon l'axe [001]. Comme évoqué dans le chapitre 1, l'anatase cristallise avec une forme de bipyramide tronquée composée de 8 équivalents de la face (101) et deux équivalents de la face (001). Cette configuration n'est en revanche possible que pour les petites aiguilles [57]. Lorsque les aiguilles sont allongées (> 30 nm), la face (100) apparaît comme décrit sur la Figure 14. Les axes cristallographiques ont été identifiés grâce à la transformée de Fourier et les distances réticulaires sont indiquées en rouge. Les NAs utilisées pour les études toxicologiques mesurent en moyenne 45 nm et exposent donc majoritairement les faces (101) et (100) dans des proportions variables. La forme des NAs n'est en effet pas homogène et il est difficile de quantifier les proportions des faces exposées.

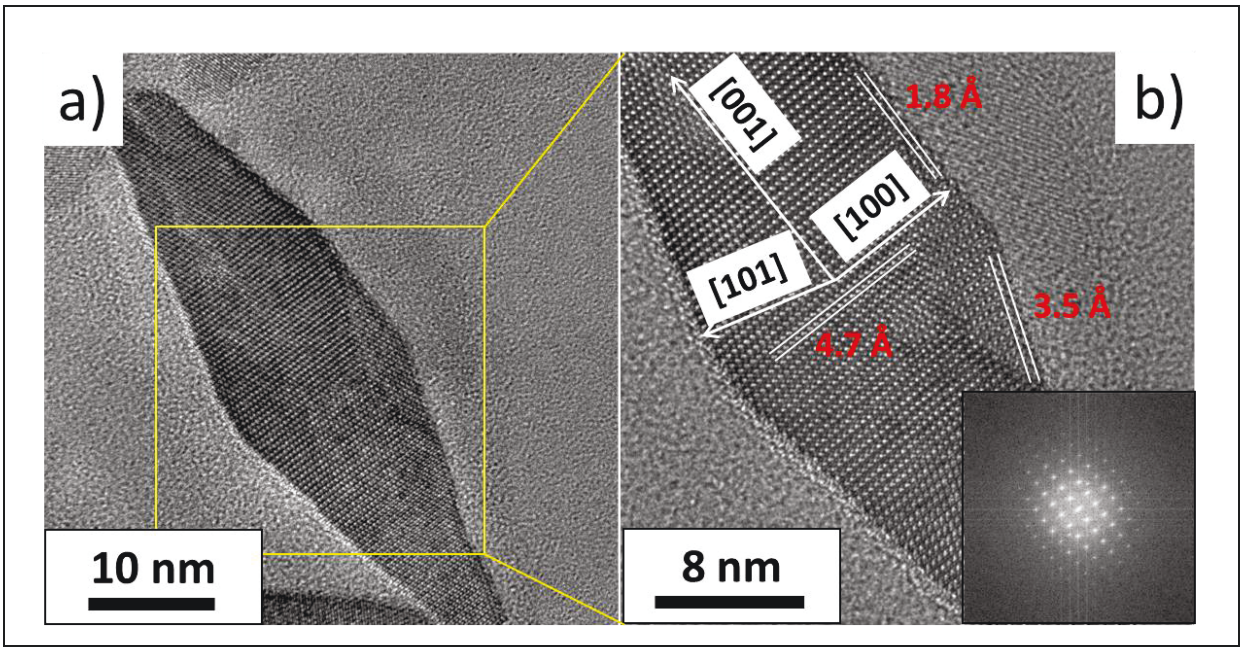


Figure 14 : Clichés de microscopie électronique haute résolution et transformée de Fourier d'une nano-aiguilles de tailles supérieures à 30 nm.

2. Caractérisation surfacique des nanoparticules

La surface des NPs constitue l'interface entre la matière et le milieu environnant. C'est à cette interface que les réactions chimiques peuvent se produire. La connaissance de l'état de surface (surface spécifique, réactivité des faces exposées, hydroxylation) est donc un point important pour toute étude toxicologique.

2.1. Analyse de surface spécifique (BET)

La mesure de surface spécifique est basée sur la détermination du volume d'azote gazeux nécessaire pour former une monocouche adsorbée à la surface de l'échantillon à 78 K. L'adsorption est un phénomène de surface par lequel une molécule liquide ou gazeuse se fixe de manière plus ou moins forte par des interactions de type van der Waals. Les informations sont ensuite souvent interprétées selon le modèle de Brunauer, Emmett et Teller (méthode BET). Ce modèle permet ensuite de calculer la surface spécifique des NPs donnée en m²/g.

En connaissant, (i) la quantité n^a_m d'adsorbable nécessaire pour recouvrir la totalité de la surface exposée avec une monocouche moléculaire et (ii) l'aire σ_m occupée par une molécule adsorbée (σ_m = 0.162 nm² à 77.4 K), il est possible de remonter à la surface spécifique (a) à l'aide de l'équation suivante [60]:

$$a = \frac{A}{m^s} = \left(\frac{n_m^a}{m^s}\right) N_A \sigma_m$$

Avec A la surface recouverte d'une monocouche d'adsorbable, m^s la masse de l'adsorbant et N_A le nombre d'Avogadro.

Les valeurs des surfaces spécifiques obtenues après applications de la loi BET sont regroupées en Tableau 5. Les P 25 ont une surface spécifique de 56 m²/g ce qui est en accord avec les données du fabricant (50 ± 15 m²/g). Les mesures ont donné une valeur de surface spécifique de 86 m²/g pour les NAs. Cette valeur est consistante avec la surface théorique calculée (115 m²/g) en considérant une bipyramide à base carrée avec une taille moyenne de particules de L=45 nm et l=15 nm. Enfin, les mesures sur les NFs ont donné une surface spécifique de 380 m²/g. L'ordre entre les particules est donc :

Surface spécifique (P 25) < Surface spécifique (NAs) << Surface spécifique (NFs)

Particule	Surface spécifique (m^2/g)
P 25 AEROXIDE	56
Nano-feuillets	381
Nano-aiguilles	86

Tableau 5 : Surfaces spécifiques des différentes particules obtenues par la méthode BET.

2.2. Surfaces exposées, propriétés photo-catalytiques et réactivité

Les NPs sont souvent caractérisées comme très « réactives ». Cette réactivité est assimilée à leur très large surface spécifique mais peut se manifester de différentes manières. Comme nous l'avons vu auparavant, la réactivité des surfaces des NPs dépend de la nature du matériau et des faces cristallines exposées par celui-ci. L'énergie libre de surface des différentes faces peut être calculée ce qui permet de prévoir la morphologie des NPs. Cependant, ces modèles ne permettent pas de prévoir les propriétés catalytiques qui dépendent d'autres paramètres. Enfin, la réactivité des NPs peut découler des fonctions hydroxyles de surface qui peuvent dans certains cas induire des réactions acido-basiques.

2.2.1. Energies libres des faces cristallines du TiO_2

Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, l'énergie libre de surface joue un rôle au moment de la synthèse des NPs faisant l'objet de nombreuses publications [57, 61-76]. Les énergies de surface sont calculées selon les modèles thermodynamiques de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Ce type de modélisation permet de décrire des systèmes moléculaires ou solides et de calculer les énergies de surface associées. D'après ce modèle, la surface de l'anatase la moins énergétique est la face (101) avec une énergie de l'ordre de 0,49 J/m^2. En ordre croissant viennent ensuite la face (100) (0,58 J/m^2) et la face (001) avec une énergie libre de 0,98 J/m^2 [62, 63, 77]. Ces modèles permettent d'expliquer les cinétiques de croissance cristalline des particules mais ne suffisent cependant pas pour expliquer leur réactivité vis-à-vis d'autres espèces chimiques comme le montrent les travaux faits en photo-catalyse.

2.2.2. Propriétés photo-catalytiques des faces cristallines du TiO_2

Les propriétés photo-catalytiques des NPs de TiO_2 d'anatase sont au cœur d'un débat au sein de la communauté. Si les énergies de surface en lien avec le nombre d'atomes de titane de surface à coordinence incomplète sont connues et approuvées unanimement,

l'efficacité photo-catalytique est, elle, encore discutée. Il convient en effet de dissocier deux phénomènes influents : (i) la création de porteurs de charge (trous et électrons) et (ii) l'interaction entre la surface et la molécule [9].

Certains travaux s'accordent pour confirmer le lien entre énergie de surface et propriétés photo-catalytiques. Dans ce cas de figure, la face (001) est la plus réactive [78-80]. D'autres études montrent au contraire que les faces (100) et (101) présentent une activité photo-catalytique supérieure à la face (001) [74, 81-83]. Cependant, les mesures de réactivité peuvent aisément être faussées dans le cas de NPs exposant plusieurs faces différentes. Afin de s'affranchir de cette contrainte, Ye et *al.* [77] ont synthétisé des NPs n'exposant qu'une seule face à hauteur d'au moins 90 % et ont ainsi hiérarchisé les différentes faces de l'anatase. Les résultats, visibles sur la Figure 15, montrent que l'activité photo-catalytique ne dépend pas directement de l'énergie libre de surface et que l'ordre réel est le suivant : (001) > (101) > (100).

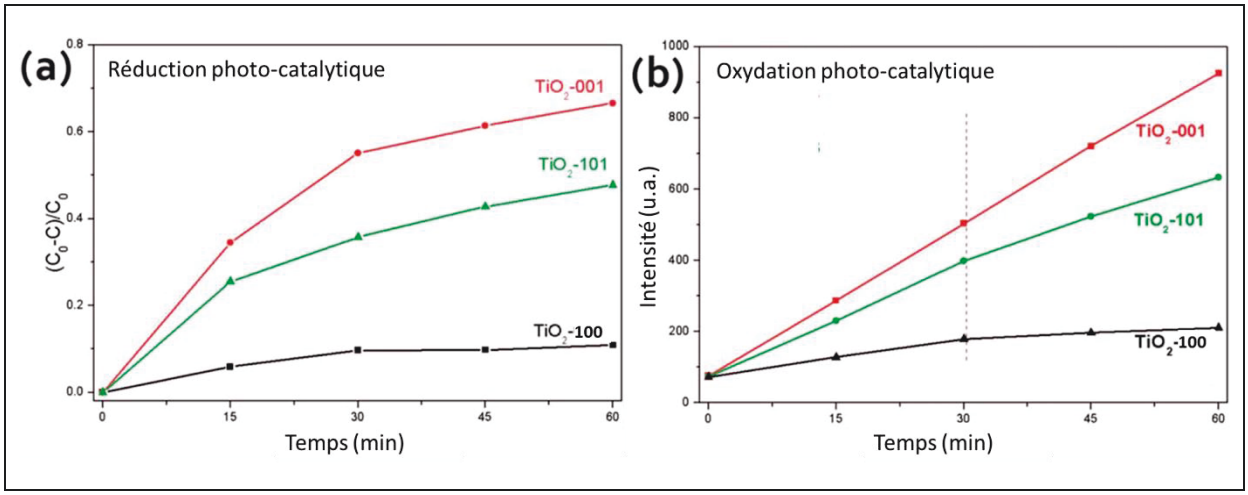


Figure 15 : Ordre d'activité photo-catalytique des faces (001), (101) et (100) de l'anatase pour a), la réduction (génération de $O_2^{\cdot-}$) et b) l'oxydation (génération de $^{\cdot}OH$) (figure adaptée de la référence [77]).

D'autre part, les NFs ont également fait l'objet d'études sur leurs propriétés photo-catalytiques en raison de leur surface spécifique importante. Ils se sont cependant avérés moins efficaces que des P 25 par exemple [84, 85] notamment à cause de leur faible cristallinité [86, 87]. Leur surface demeure très réactive par la présence de nombreuses fonctions hydroxyles (-OH). Leur nombre a en effet été estimé à approximativement 5,8 fonctions par nm^2 [88].

A ce stade, nous ne savons pas quel type de réactivité influe sur la toxicité.

2.3. Récapitulatif général des propriétés des particules et discussion intermédiaire

Les trois types de NPs sélectionnées possèdent des propriétés physico-chimiques propres qui sont regroupées dans le Tableau 6.

Propriétés	**P 25 AEROXIDE**	**Nano-feuillets enroulés**	**Nano-aiguilles**
Forme	mal définie	Tubes	Aiguilles
Longueur / largeur (nm)	24	172 / 9	44 / 15
Rapport de forme	1	19,1	3
Phases	Anatase / rutile	Titanate d'hydrogène	Anatase / brookite
Surface spécifique (m^2/g)	56	380	86
Faces exposées	(001), (101)	(100)	(100), (101)

Tableau 6 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des NPs sélectionnées.

Nous avons vu dans l'état de l'art que les propriétés des NPs pouvaient influer sur leur toxicité. En se basant sur les critères étudiés et en admettant que la toxicité est proportionnelle à la réactivité, nous avons conjecturé un classement hiérarchisant les différentes NPs :

- Sur un critère de **morphologie** et de **longueur**, c'est la forme allongée qui concentre les inquiétudes. La forme fibrillaire a en effet déjà été reconnue comme néfaste avec l'exemple de l'amiante [89]. De la même manière, les nanotubes de carbone fibrillaires sont reconnus comme dangereux [90]. Le classement de toxicité serait alors : NFs > NAs > P 25.
- Ensuite, dans le cas où la toxicité serait en relation directe avec la **surface spécifique**, les NFs arriveraient encore très largement en tête devant les NAs puis les P 25. Classement : NFs >> NAs > P 25.
- Enfin, la toxicité pourrait également provenir de **l'état de surface** et des propriétés photo-catalytiques des faces exposées par les NPs. Avec la présence des faces (001) et (101), les P 25 sont potentiellement plus réactives que les NAs. Les NFs arrivent en dernière position à cause notamment d'une mauvaise cristallinité. Il faut cependant noter que leur surface est très fortement hydroxylée et donc très réactive. Classement : P 25 > NAs > NFs.

Selon les critères sélectionnés, il demeure difficile de pronostiquer lesquelles, parmi les particules choisies, seront les plus réactives et s'avèreront plus toxiques que les autres. Seule l'expérience permettra de conclure.

3. Comportement des nanoparticules en solution

La toxicité des NPs vis-à-vis de cellules ou d'organismes vivants est le plus souvent testée en milieu humide. Dans le cas des cellules, les expositions sont réalisées *via* le milieu de culture dans lequel les cellules baignent. Il est donc fondamental d'avoir une idée du comportement de ces objets non seulement en solution mais aussi dans ces milieux spécifiques. C'est ce que nous allons aborder dans les paragraphes suivants.

3.1. Charges de surface, stabilité colloïdale et comportement en solution

Lorsqu'elles sont mises en solution, les particules forment ce que l'on appelle une dispersion ou suspension colloïdale. Les objets en suspension dans les liquides subissent la gravité et doivent donc naturellement sédimenter. La vitesse de sédimentation (V_{sed}) donnée par l'équation (1) dépend notamment du différentiel de densité qui existe entre le solide et le liquide ($\Delta\rho$) et du rayon de la NP (R) :

$$V_{sed} = \frac{2}{9}\frac{R^2}{\eta}\Delta\rho g \qquad \textbf{(1)}$$

η (Pa.s) représente ici la viscosité du liquide et g ($m.s^{-2}$) l'accélération due à la pesanteur. Les NPs sont par ailleurs soumises à une agitation incessante de la part des molécules du milieu dispersant qui entraine ce qui est appelé le mouvement Brownien. Cette force est proportionnelle à la température (T) du milieu et peut être comparée à la vitesse balistique (V_{bal}) qui caractérise le déplacement des particules sur un temps court dans l'équation (2) :

$$V_{bal} \approx \sqrt{\frac{k_B T}{m}} \qquad \textbf{(2)}$$

K_B est la constante de Boltzmann et m la masse de la NP. Lorsque le mouvement Brownien est suffisant pour contrebalancer la gravité, les particules ne sédimentent plus et la dispersion est dite stable. On parle alors de particules browniennes [91]. Par extension, il est

possible de définir une taille R_{col} appelée limite colloïdale, donnée par l'équation (3), en dessous de laquelle les particules sphériques sont browniennes :

$$R_{col} = \left(\frac{\eta^2 k_B T}{\rho^3 g^2}\right) \qquad \textbf{(3)}$$

Dans le cas du TiO_2 ce rayon se situe aux alentours de 600 nm. En dessous de cette valeur, les NPs généralement Browniennes devraient être stables en solution. Cependant, pour persister en suspensions stables, il faut contrôler la balance entre les forces répulsives et attractives, les NPs subissent alors une stabilisation électrostatique. Si au contraire elles s'attirent et s'agrègent par des interactions de type van der Waals, elles peuvent former des amas plus ou moins compacts et floculer. Pour deux sphères de rayons R_1 et R_2 séparés d'une distance D, le potentiel d'attraction (W_D) est donné par la relation suivante :

$$W_D = -\frac{A}{6D}\,\frac{R_1 R_2}{(R_1+R_2)} \qquad \textbf{(4)}$$

Avec A la constante d'Hamaker intrinsèque au matériau. La stabilité d'une suspension exige donc l'existence de forces répulsives entre les particules afin qu'une barrière énergétique limite leur approche. Ces forces peuvent résulter de la présence de charges électrostatiques sur les surfaces qui dépendent elles-mêmes du pH de la solution et de la nature des NPs [56].

La stabilisation des colloïdes par des répulsions électrostatiques est décrite par la théorie de DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek). La force subie par les particules résulte des forces attractives de type van der Waals et des répulsions électrostatiques créées par les charges adsorbées en surface. La barrière répulsive dépend de deux types d'ions : les ions adsorbés à la surface de la particule qui déterminent la charge et les contre-ions présents en solution qui agissent comme des écrans. Pour les oxydes métalliques, les ions adsorbés (H^+ et OH^-) établissent la charge par protonation ou déprotonation des liaisons hydroxyles de surface selon les équations suivantes :

$$Ti - OH + H^+ \rightarrow Ti - OH_2^+ \qquad \textbf{(5)}$$

$$Ti - OH + OH^- \rightarrow Ti - O^- + H_2O \qquad \textbf{(6)}$$

La plupart des oxydes métalliques sont ainsi amphotères ce qui signifie qu'ils peuvent être chargés positivement ou bien négativement en fonction du pH du milieu. La modification

du pH influe sur une grandeur appelée densité superficielle globale de charge nette notée σ_o pouvant s'écrire :

$$\sigma_o = \frac{F}{A} \times ([Ti - OH_2^+] - [Ti - O^-]) \qquad (7)$$

A est l'aire totale des particules données en $m^2.L^{-1}$, F la constante de Faraday (96500 $C.mol^{-1}$) et les quantités en crochets représentent les concentrations en $mol.L^{-1}$ des sites chargés de surface. σ_o peut être positive, négative ou nulle selon les conditions du milieu. Le point de charge nulle (PCN) correspond au pH pour lequel cette grandeur s'annule. A pH < PCN, l'équation (5) prédomine alors qu'à pH > PCN, c'est l'équation (6).

Dans le cas des oxydes métalliques, la couche de molécules d'eau adsorbée à la surface et la couche de contre-ions sont très fortement liées à la particule par des forces de type van der Waals. Il en résulte une double couche schématisée sur la Figure 16.

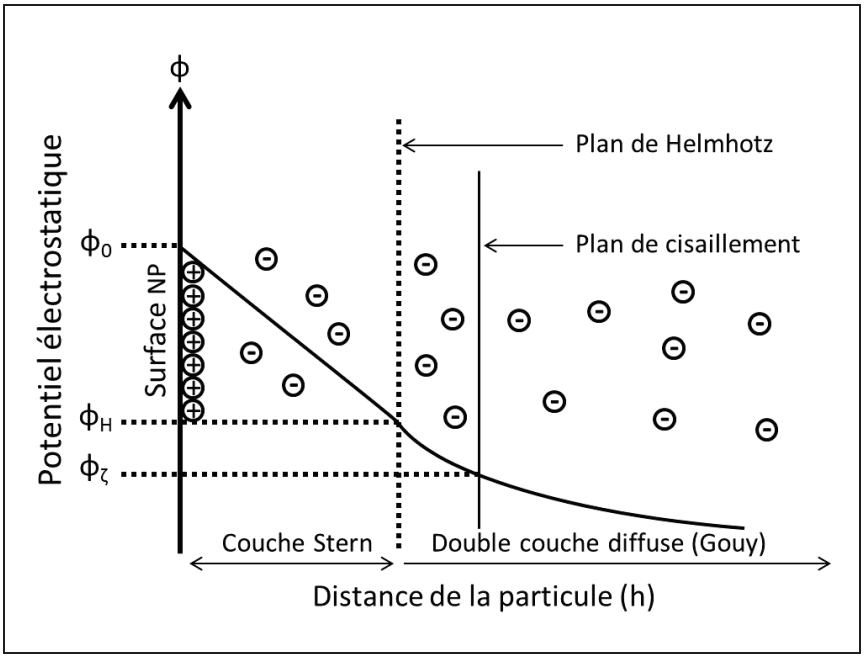


Figure 16 : Schématisation des couches Stern et Gouy en fonction du potentiel électrostatique [92].

D'après la théorie DLVO, la première couche compacte composée de molécules d'eau adsorbées et de contre-ions est appelée couche Stern. Elle s'étend jusqu'au plan de Helmhotz qui définit le début de la couche diffuse. Au-delà, dans la couche de Gouy, les contre-ions sont présents de manière diffuse et les répulsions électrostatiques décroissent exponentiellement avec la distance h.

Lorsqu'un champ magnétique est appliqué à un colloïde, les particules chargées se déplacent en direction de l'électrode de charge opposée. Ce transport est appelé électrophorèse. Lorsque la particule est en mouvement, elle entraine avec elle la couche Stern et une partie du nuage de contre-ions de la couche diffuse. Il se forme alors un plan de cisaillement qui sépare le fluide de cette double couche. La vitesse de déplacement des NPs dépend du potentiel électrostatique dans ce plan de cisaillement appelé potentiel Zêta (ϕ_ζ). Le pH pour lequel ce potentiel est nul est appelé point isoélectrique (PIE). Ce point n'est pas forcément égal au PCN. La stabilité d'un colloïde dépend fortement du potentiel Zêta. D'une manière générale, si des particules possèdent, à un pH donné, un potentiel Zêta supérieur à + 30 mV ou bien inférieur à – 30 mV, la dispersion est considérée comme stable. A l'inverse, lorsqu'il est compris entre -30 et +30 mV, la suspension est déstabilisée. Enfin, lorsqu'il est nul, le point de floculation est atteint et l'agrégation est maximale [92-94].

3.1.1. Détermination du potentiel Zêta

Une particule chargée se déplace à vitesse fixe dans un liquide lorsqu'un champ électrique est appliqué. Le déplacement des particules appelé « mobilité » peut être quantifié par la technique de micro-électrophorèse c'est-à-dire le couplage entre observation directe (microscopie) et déplacement de particules en suspension sous un champ électrique (électrophorèse). La technique consiste à suivre le déplacement de particules induit par un courant électrique grâce à une caméra numérique. La mobilité électro-phorétique (u_E) peut ensuite être reliée au potentiel Zêta (ϕ_ζ) avec l'équation de Smoluchowski :

$$u_E = (4\pi\varepsilon_0).\frac{D\phi_\zeta}{4\pi\eta} = \frac{\varepsilon\phi_\zeta}{\eta}$$

Avec ε et ε_0 les permittivités diélectriques du milieu et du vide, D la constante diélectrique et η la viscosité du milieu. La mesure systématique du potentiel Zêta en milieux acides et basiques permet de tracer son évolution en fonction du pH et de déterminer le PIE d'un lot de NPs [95, 96].

3.1.2. Etude du potentiel Zêta en fonction du pH

Les mesures de Zêtamétrie (variation du potentiel zêta) en fonction du pH des différentes nanoparticules sont montrées sur la Figure 17. Les P 25 ont un PIE situé à un pH de 5.9 ; ce résultat est en accord avec ceux de la littérature [97, 98]. Les PIE des NAs et NFs

sont respectivement trouvés à des pH de 5 et 4 et sont également consistants avec la littérature [18].

Les valeurs de PIE du TiO_2 varient selon la taille, la forme et surtout la méthode de préparation des nanoobjets comme le montre la gamme de PIE observée (2,9-6,9) par Kosmulski [99, 100]. Dans notre cas, les variations pourraient être en lien avec le nombre de fonctions hydroxyles de surface. En effet, la surface des oxydes formés par voie sèche, comme les P 25, est souvent peu hydratée et hydroxylée [56]. A l'opposé, la synthèse de particules en milieu liquide favorise la présence de fonctions de type hydroxyle en surface du matériau (Ti-OH). Le nombre de fonctions hydroxyle de surface influe sur l'acidité de la surface des particules et donc sur le PIE. Cet état de fait explique également le PIE des nano-feuillets qui se situe à un pH de 4. Ces objets possèdent en effet une grande surface spécifique et donc un grand nombre de groupements de surface disponibles réduisant le PIE [101].

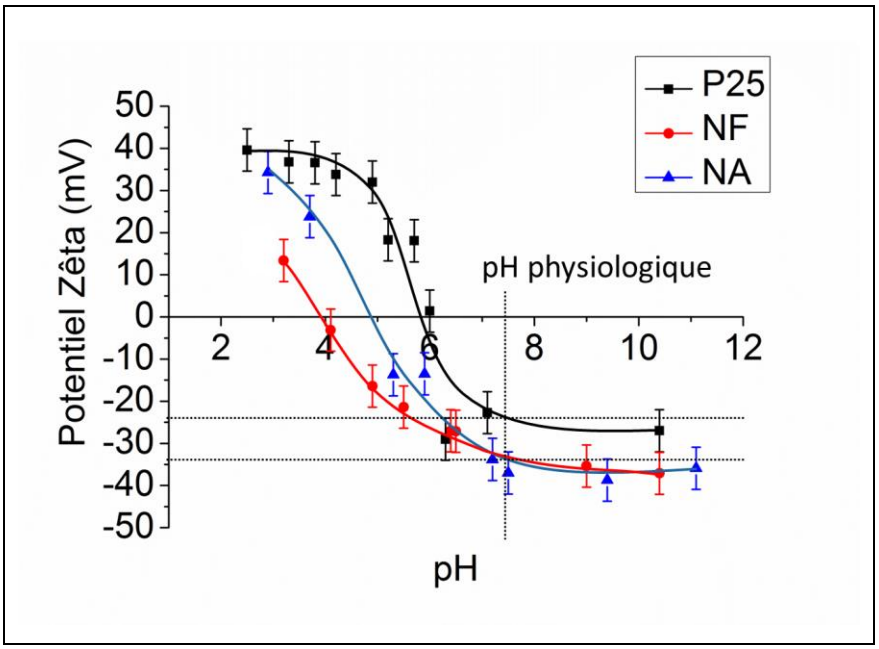


Figure 17 : Evolution du potentiel Zêta (mV) des différentes NPs en fonction du pH.

L'abaissement du PIE vers des pH acides a été vérifié en réalisant une expérience simple. Un lot de P 25 a été traité avec de l'acide nitrique (1 M) pendant 1 h afin d'augmenter le nombre de fonction hydroxyle et donc la réhydratation de surface. Des mesures de potentiel Zêta en fonction du pH ont ensuite été réalisées et les résultats sont montrés dans la Figure 18. La courbe verte montre l'évolution du potentiel Zêta des NPs modifiées et la courbe noire celle des P 25 normales. Le PIE est alors déplacé de 6 à 4 (pH). Cette observation prouve

qu'un plus grand nombre de fonctions –OH de surface a une influence sur le PIE et confirme les résultats obtenus avec les autres NPs.

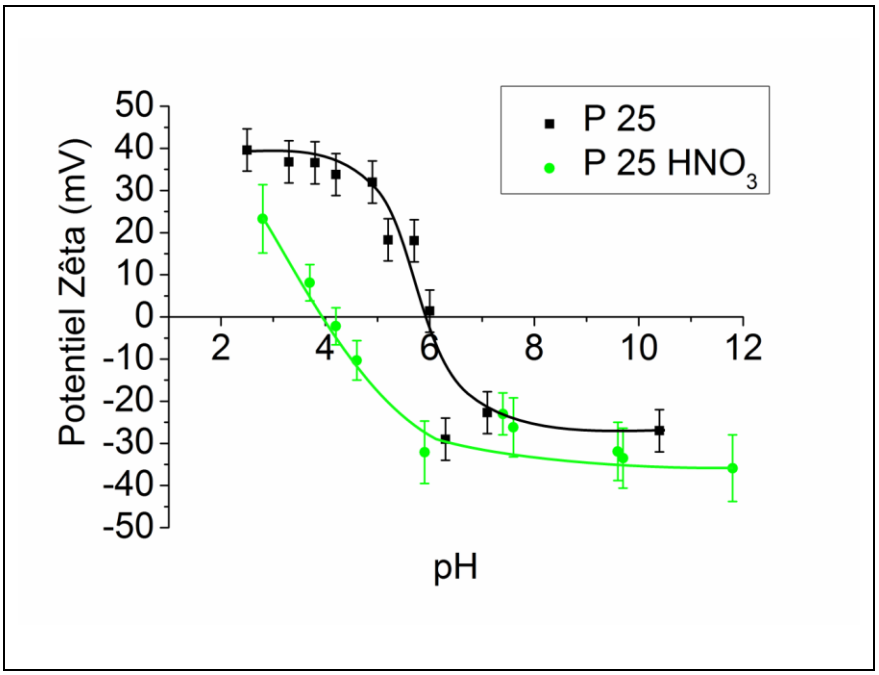


Figure 18 : Evolution du potentiel Zêta (mV) des P 25 traitées ou non à l'acide nitrique en fonction du pH.

3.1.3. Conséquence sur les dispersions

Le pH physiologique des modèles biologiques utilisés pour l'étude est de 7,4. Or à ce pH, les potentiels Zêta sont de -25 mV pour les P 25 et -35 mV pour les NAs et NFs ce qui, d'après la littérature [94], est limite pour maintenir des suspensions stables.

3.2. Etude de l'évolution du diamètre hydrodynamique des particules en fonction du temps

3.2.1. Principe de la diffusion dynamique de la lumière

La technique de diffusion dynamique de la lumière (« Dynamic Light Scattering » (DLS)) mesure le mouvement Brownien d'une particule et remonte mathématiquement à son diamètre hydrodynamique. La technique utilise l'équation de Stokes-Einstein qui relie le coefficient de diffusion D_Z au diamètre hydrodynamique des particules $Ø_h$:

$$D_Z = \frac{k_B T}{3\pi\eta Ø_h}$$

Le diamètre hydrodynamique correspond au diamètre de la particule ainsi que de la bicouche électrique qui adhère à sa surface (Figure 19 (a)). Cette mesure est effectuée en illuminant les particules avec un laser et en analysant les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée. Plus précisément, des particules en solution sont déposées dans une petite cuvette irradiée avec un laser. Un détecteur placé typiquement à 90° mesure une intensité lumineuse générée par la diffusion de la lumière du laser sur les particules. Il en résulte des interférences destructives et constructives ; l'intensité moyenne mesurée permet de remonter à la vitesse de déplacement des particules et intrinsèquement à la taille de celles-ci. Le principe est décrit en Figure 19 (b).

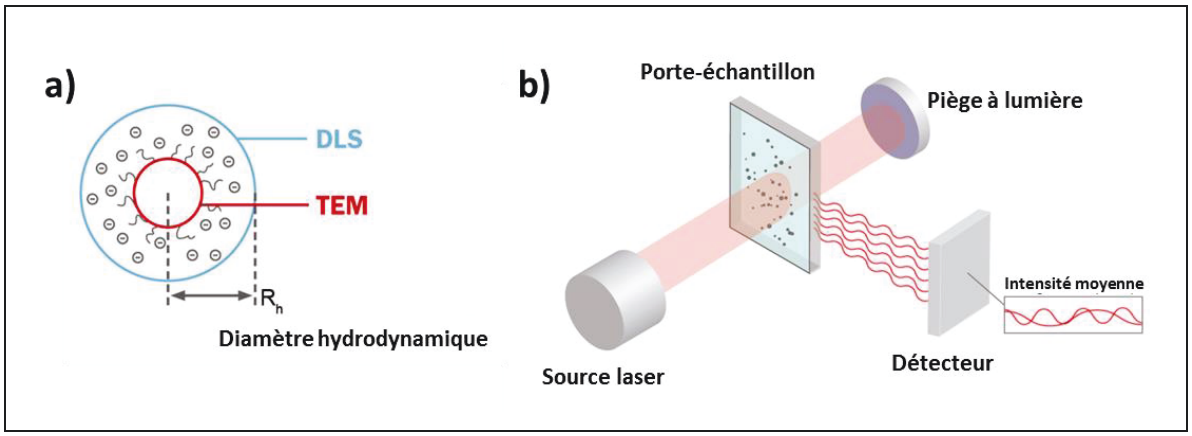


Figure 19 : a) Description du diamètre hydrodynamique et b) principe de la DLS. La lumière émise par le laser traverse l'échantillon. Une partie de la lumière est alors diffusée vers un détecteur qui mesure l'intensité lumineuse moyenne [102].

Les données de diffusion dynamique de la lumière sont généralement interprétées pour des sphères. Autrement dit, les résultats correspondent au diamètre d'une sphère qui se déplace de la même manière que la particule d'analysée. Cependant, ce n'est ni le cas pour les NAs ni pour les NFs qui sont des objets allongés avec des rapports de forme de 3 et 20 environ. Ainsi, les résultats de DLS ne correspondent pas clairement à une seule dimension (longueur ou diamètre) de la NP, mais plutôt à une valeur combinée. Néanmoins, en raison de sa vitesse, la DLS est une bonne technique pour caractériser la taille de ces objets. Il est possible, d'après Nair *et al*. [103] d'estimer le coefficient de diffusion d'un objet allongé en considérant qu'il est composé d'un empilement d'anneaux de taille fixe avec l'équation suivante :

$$\emptyset_{théorique} = \frac{L}{\ln\left(\frac{L}{d}\right) + 0.32}$$

Avec L la longueur moyenne des objets et d leur diamètre. Les valeurs de diamètres hydrodynamiques théoriques sont donc de 32 nm pour les NAs et de 53 nm pour les NFs.

Généralement, la distribution en taille de particules est donnée en intensité, en volume et en nombre. Les mesures en volume dépendent naturellement du volume des particules et les mesures en intensité dépendent de la surface exposée par celles-ci. Dans notre cas, la mesure en nombre est donc la mieux adaptée et sera utilisée pour évaluer les états d'agrégation [104].

3.2.2. Mesures de diamètre hydrodynamique

Les mesures de diamètre hydrodynamiques (DH) en solution renseignent sur les états d'agrégation des NPs. L'évolution de la taille relative des distributions de particules peut ainsi être observée en fonction du temps écoulé [105, 106]. Une étude de l'évolution des DH de nos NPs dans l'eau à pH neutre et température ambiante en fonction du temps a été réalisée après une ultra-sonification (15 secondes et 100 W dans un volume de 10 mL). Les résultats sont exposés en Figure 20. Dans tous les cas, la sonification initiale a induit une réduction significative du DH des particules. Ce résultat prouve que la sonification est un moyen efficace pour casser les agglomérats de particules en solution. Les différentes NPs ont ensuite montré des comportements différents.

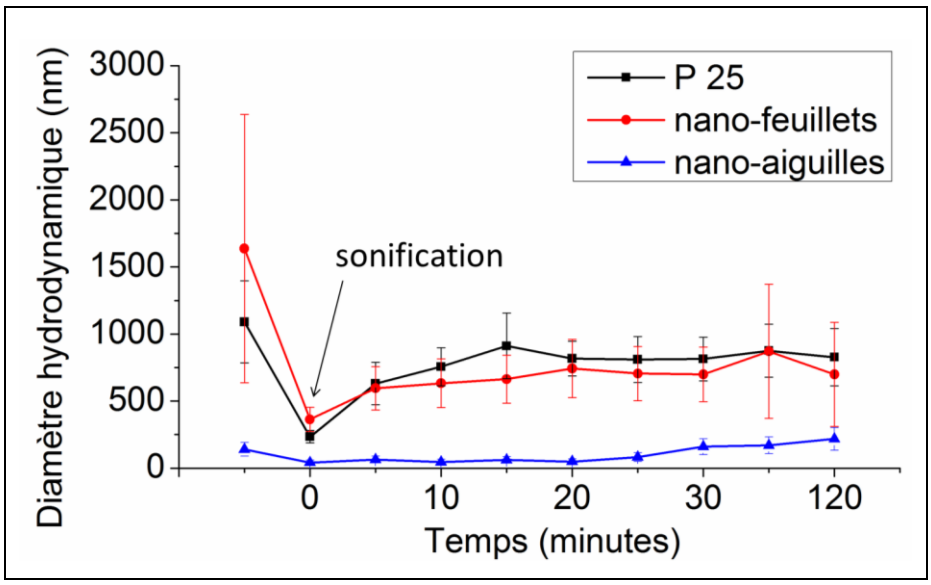


Figure 20 : Evolution du rayon hydrodynamique des NPs dans l'eau en fonction du temps après l'ultra-sonification.

Les P 25 connaissent une baisse de DH très importante après sonification passant de 1000 à 250 nm. Comme évoqué plus haut, les P 25 sont naturellement agrégées à cause de phénomènes de frittage lors de la synthèse. Il est donc normal que le diamètre mesuré ne

puisse pas correspondre à la taille réelle des particules de base (~ 24 nm). Il semble donc que ces agrégats de 250 nm soient encore capables de s'agréger à nouveau dans ce milieu. Cette valeur augmente rapidement par la suite avant de se stabiliser autour de 800 nm au bout d'une dizaine de minutes.

Les NFs sont des objets avec un rapport de forme très important (~20) ce qui fait qu'il faut prendre ces mesures avec beaucoup de réserve et ne tenir compte que de la tendance avec un comportement identique à celui des NPs P 25.

Les NAs ont un comportement très différent des autres NPs. Avec un facteur de forme de 3, il faut en première approximation parler de « pseudo » rayon hydrodynamique. La valeur de DH initiale oscille autour de 140 nm. Après sonification, le DH chute autour de 40 nm et reste stable pendant 30 minutes avant de remonter progressivement. Les NAs sont les seules particules à présenter un DH comparable à la taille réelle des NPs juste après l'ultra sonification. Cette information indique que les NPs sont stables en solution et qu'elles s'agrègent peu dans ces conditions.

3.3. Comportement des NPs dans les milieux de culture cellulaire

3.3.1. Phénomènes d'agrégations en milieux biologiques

L'exposition de cellules en culture aux nanoparticules implique leur dispersion dans les milieux biologiques associés. Ces milieux biologiques sont généralement riches en sels minéraux ainsi qu'en protéines diverses qui auront une influence sur la stabilité finale des dispersions. En effet, l'introduction de sels est reconnue comme pouvant interférer avec les couches électriques de surface des particules réduisant les répulsions électrostatiques entre celles-ci [107]. Les différents ions n'influent de plus pas de la même façon sur la stabilité colloïdale des dispersions. Par exemple, les ions divalents tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} déstabilisent plus les dispersions que les ions monovalents tels que Na^{+} comme montré par Metin *et al.* [108]. La présence de protéines peut également jouer un rôle sur la qualité des dispersions dans la mesure où elles sont susceptibles de s'adsorber en surface des particules [109].

3.3.2. Mesures de diamètre hydrodynamique et potentiel Zêta en milieux biologiques

Les milieux de culture cellulaires diffèrent selon les lignées utilisées. Le Kératinocyte Serum Free Medium (K-SFM), le Debulcco's Modified Eagle Medium (DMEM) et le Medium 200 (M200) permettent respectivement la culture des kératinocytes primaires, des HeLas et des cellules endothéliales. La composition de ces milieux vendus par *Life Technologies* n'est pas révélée mais nous savons qu'ils contiennent des sels minéraux c'est-à-dire des substances susceptibles d'influer sur la stabilité des dispersions. Les milieux contiennent également du sérum de veau fœtal qui à l'inverse est reconnu, dans certains cas, comme pouvant stabiliser les suspensions de NPs [110].

Les différentes NPs ont été dispersées dans ces milieux de culture à raison de 10^{-2} mg/mL pour la DLS et 10^{-4} mg/mL pour la Zêtamétrie. Le DH ainsi que le potentiel Zêta ont ensuite été mesurés avant et après sonification et comparés avec les résultats obtenus dans de l'eau à pH physiologique (pH = 7,4). L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 7.

L'analyse des résultats montre tout d'abord qu'en raison des écarts types obtenus, il n'y a pas de différence majeure entre les différents milieux pour les P 25. Les DH dans les milieux de culture sont proches des valeurs dans l'eau pure. Le potentiel Zêta est négatif et reste également proche de la valeur dans l'eau à pH = 7,4. Cette donnée est importante puisqu'elle montre que les particules peuvent être dispersées en solution sans craindre une floculation instantanée. L'augmentation des conductivités s'explique par la présence des sels utiles à la viabilité des cellules.

Les NFs et les NAs présentent en revanche des différences significatives entre les analyses réalisées dans l'eau et dans les milieux de culture. Les DH sont en effet supérieurs d'un facteur 2 à 3 pour les NFs et d'un facteur 6 à 12 pour les NAs. Cette donnée est importante puisqu'elle démontre qu'il existe bien des interactions particulières entre les milieux de culture et ces NPs. De plus, les milieux DMEM et K-SFM induisent une augmentation de DH plus importante que le M200.

Ces interactions vont dans le sens d'une déstabilisation des dispersions avec une probable augmentation des états d'agrégation des particules. Ces résultats sont cependant à prendre avec beaucoup de précaution tant les écarts et les barres d'erreurs sont élevés.

Particule	milieu	sonification	rayon hydrodynamique (nm)	écart type	potentiel Zeta (mV)	écart type	conductivité (mS/cm)
P 25	eau	Non	1354	267	-16,9	9,2	0,02
		Oui	251	79			
	K-SFM	Non	983	391	-14,4	6,8	9,6
		Oui	242	65			
	DMEM	Non	1128	586	-20,8	6,4	9,1
		Oui	269	103			
	M200	Non	795	398	-17	7,2	7,8
		Oui	209	97			
Nano-feuillets enroulés	eau	Non	1637	1005	-25,1	4,1	0,02
		Oui	364	90			
	K-SFM	Non	1554	1047	-17,6	10,9	6,8
		Oui	**1145 ***	357			
	DMEM	Non	1726	585	-16,9	8,2	7,1
		Oui	**641 ***	29			
	M200	Non	1243	596	-24,1	11,9	5,3
		Oui	**439 ***	203			
nano-aiguilles	eau	Non	140	51	-26,6	3,2	0,02
		Oui	41	19			
	K-SFM	Non	945	335	-24,8	13,7	6,8
		Oui	**523 ***	234			
	DMEM	Non	861	428	-19,6	14	8,4
		Oui	**557 ***	92			
	M200	Non	353	121	-18,5	9,3	6,7
		Oui	**249 ***	107			

Tableau 7 : Mesures de diamètre hydrodynamique et potentiel Zêta des différentes NPs dans les milieux de culture cellulaire. Les astérisques indiquent les valeurs très différentes des valeurs obtenues dans l'eau à pH = 7,4.

4. Fonctionnalisation des NPs de TiO_2 avec un agent fluorescent

Les NPs de TiO_2 ne sont pas fluorescentes naturellement comme peuvent l'être certains quantum dots (ex : CdSe, nanodiamants). Leur détection et localisation dans les milieux biologiques par des méthodes de base requièrent en conséquence l'utilisation d'artifices comme la fonctionnalisation à l'aide d'un agent fluorescent. Dans notre cas, deux fluorophores émettant à des longueurs d'onde différentes ont été utilisés : la rhodamine et la fluorescéine. Le greffage des NPs induit une modification de surface qui a une influence sur la toxicité des particules [111].

4.1. Méthode de fonctionnalisation

La fonctionnalisation a été adaptée à partir de plusieurs protocoles et s'effectue en deux étapes : (i) greffage d'un aminosilane à la surface des particules créant des liaisons Ti-O-Si covalentes ; (ii) ajout d'un fluorophore qui vient se greffer également de manière covalente sur l'aminosilane via la formation de ponts « thio-urées » [111-114].

4.1.1. Greffage de l'aminosilane

Le greffage du 3-aminopropyltriméthoxysilane se déroule de la manière suivante. Les NPs dispersées en milieu aqueux sont chauffées à 80 °C sous agitation. L'aminosilane est ensuite ajouté goutte à goutte dans le réacteur. Le mécanisme de la réaction est décrit sur la Figure 21. Les groupements méthoxy sont tout d'abord hydrolysés (1) pour donner des silanols qui ensuite se condensent en chaînes par polycondensation [114]. Les groupements hydroxyle de surface des NPs de TiO_2 vont enfin réagir avec les silanols en formant des liaisons covalentes de type Ti – O – Si (2).

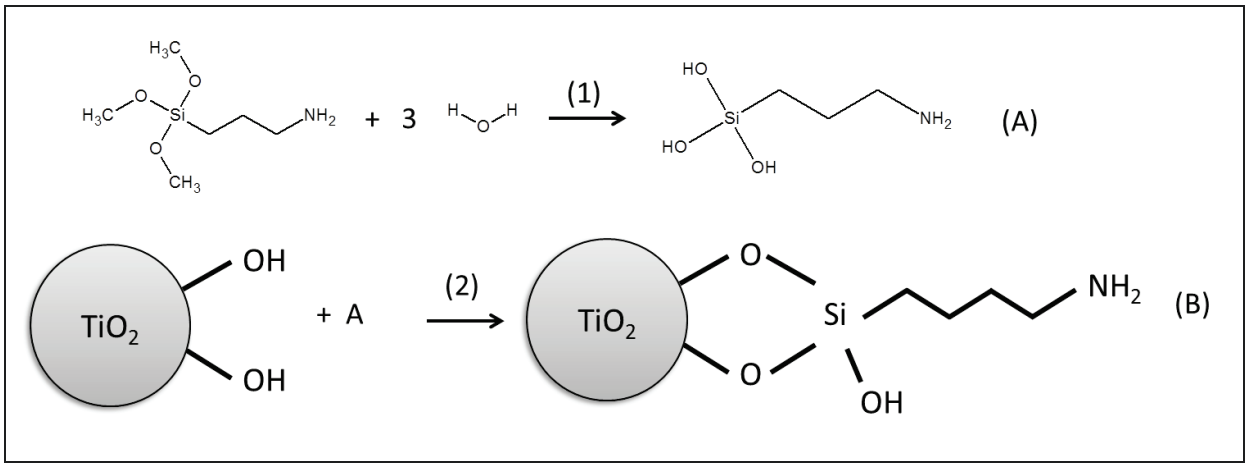


Figure 21 : Schéma de la réaction de greffage de l'aminosilane sur les NPs de TiO_2.

4.1.2. Greffage du fluorophore

La seconde partie vise à ajouter un fluorophore à la surface de la particule. Dans notre cas, deux fluorophores différents ont été choisis : la rhodamine B isothiocyanate (TRITC) et la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Ces deux fluorophores (montrés en Figure 22) ne fluorescent pas à la même longueur d'onde et l'un ou l'autre pourra être utilisé préférentiellement en fonction des autres agents fluorescents présents dans les milieux. Les longueurs d'onde d'excitation / émission sont montrées dans le chapitre 3 (partie 1.1.2.3.3.). Le greffage des fluorophores s'effectue sur les NPs fonctionnalisées par un groupement

amine. Il se réalise sous agitation à température ambiante par simple mélange des réactifs en milieu aqueux tampon pH 9.2. Les fluorophores et les NPs se lient alors par des liaisons de type thio-urée montrées sur la Figure 22.

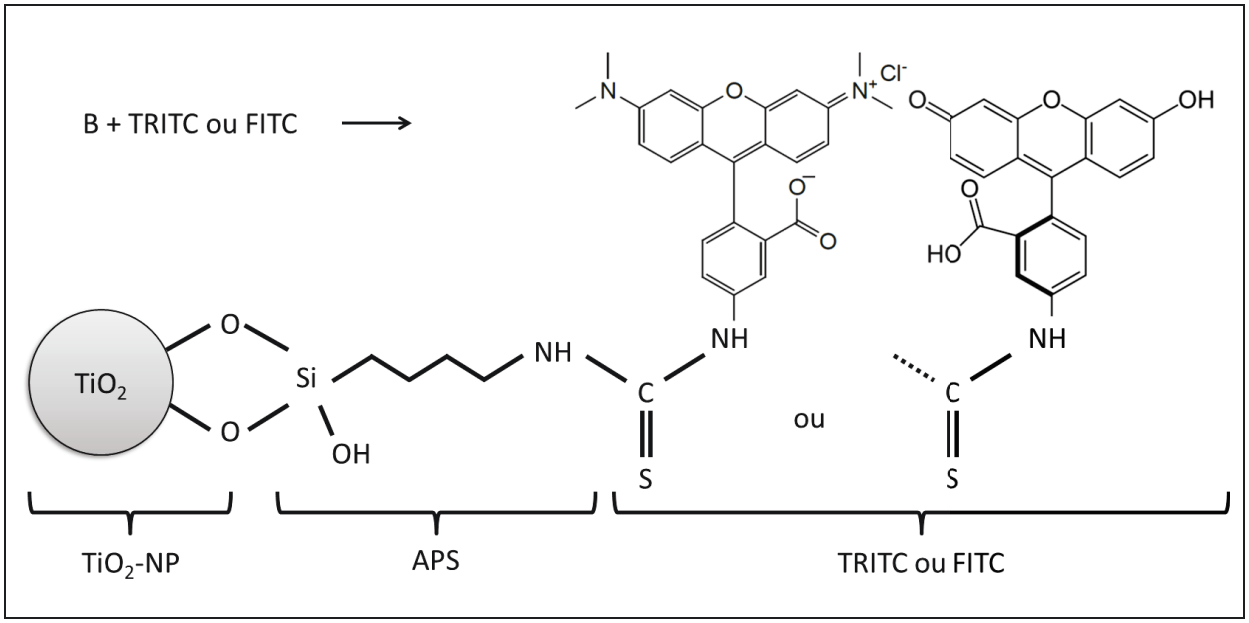


Figure 22 : NP de TiO_2 fonctionnalisée APS et liée avec un fluorophore par une liaison thio-urée.

4.2. Caractérisation des NPs fonctionnalisées

4.2.1. Caractérisation physico-chimique

4.2.1.1. Caractérisation morphologique par MET

Lors de la fonctionnalisation, de nombreuses liaisons Ti-O-Si et Si-O-Si sont créées. Si cette chimie n'a *a priori* pas d'effet sur les NPs elles-mêmes, elle peut avoir un effet sur les états d'agrégation des particules car elle modifie leur état de surface. Pour vérifier cette conjecture, les NPs fonctionnalisées ont été analysées par microscopie électronique en transmission. Les clichés, visibles sur la Figure 23, montrent qu'il n'y a pas d'altération particulière des particules. Celles-ci ne sont également pas plus agrégées ou agglomérées qu'auparavant. La fonctionnalisation n'influe donc aucunement sur la morphologie et l'agrégation des particules.

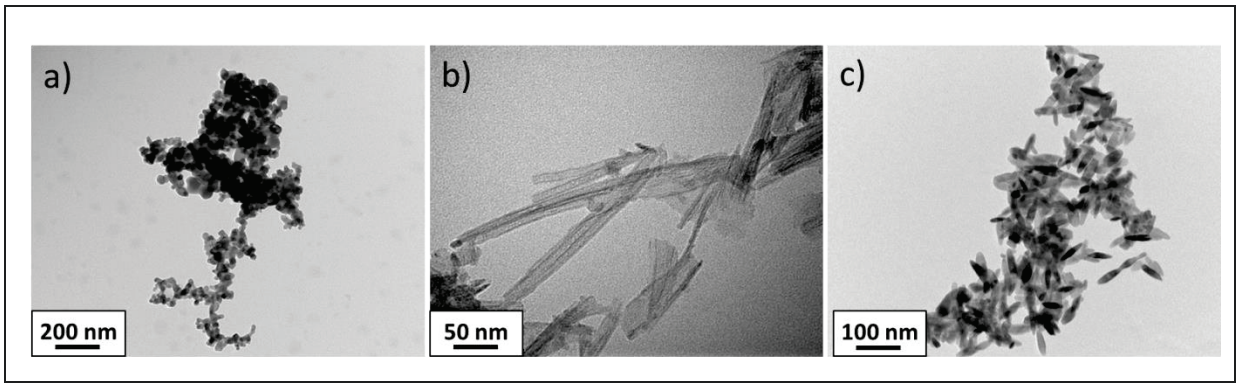


Figure 23 : Clichés de MET de a) les P 25, b) les NFs et c) les NAs fonctionnalisés avec de la rhodamine B isothiocyanate.

4.2.1.2. Caractérisation structurale

L'analyse des particules par diffraction aux rayons X n'a révélé aucune modification structurale des NPs (données non montrées).

4.2.2. Mise en évidence de la fonctionnalisation avec un agent fluorescent

Nous avons ensuite voulu caractériser la fonctionnalisation et vérifier la nature des liaisons chimiques entre les fluorophores et les NPs. La fonctionnalisation est utilisée pour localiser les NPs dans les milieux biologiques. Il est donc nécessaire de s'assurer que la liaison avec le fluorophore est covalente. Pour cela, nous avons réalisé des analyses XPS et DRIFT dont les résultats sont présentés dans cette partie.

4.2.2.1. Analyse élémentaire par XPS

4.2.2.1.1. Principe de l'analyse

La spectroscopie de photoélectrons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy : XPS) permet d'obtenir la composition chimique de la surface d'un matériau avec une profondeur maximale de 10 nm. Le principe de la technique repose sur l'interaction entre la matière et un rayonnement X. L'apport d'énergie par les photons rend instables les atomes qui peuvent ainsi s'ioniser par le départ d'électrons. Les électrons émis sont collectés et comptés en fonction de leur énergie cinétique. La mesure de l'énergie cinétique permet de remonter à l'énergie de liaison des électrons et d'identifier les atomes et les orbitales dont ils proviennent [115].

4.2.2.1.2. Caractérisation élémentaire de la surface des NPs fonctionnalisées

Les NPs sont recouvertes dans un premier temps d'un aminosilane (APS) constitué de silicium, de carbone, d'oxygène et d'une fonction amine. Le spectre XPS des P 25 fonctionnalisées est comparé à celui des P 25 natives sur la Figure 24.

Le premier spectre correspond à l'analyse générale des NPs natives. Chaque pic correspond à l'émission d'un type d'électron relié à un atome et à une orbitale atomique. Nous retrouvons la contribution des orbitales 2s (567 eV), 2p (459 eV), 3s (63 eV) et 3p (38 eV) du titane. Plus les orbitales sont proches du noyau, plus l'énergie de l'électron est importante. Le pic correspondant à l'orbitale $2p_{3/2}$ situé à 459 eV a été analysé plus finement. L'énergie des électrons émis depuis du titane métallique oscille traditionnellement autour de 454 eV. Le décalage observé est significatif du fait que le titane est sous une forme oxydée et lié avec des atomes d'oxygène en réseau TiO_2 [116]. Les éléments oxygène 1s (530 eV) et carbone 1s (286 eV) sont également retrouvés. Le carbone provient d'impuretés de contamination adsorbées à la surface des NPs et inhérentes à la technique. L'analyse du spectre des NPs fonctionnalisées avec l'APS révèle la présence d'atomes d'azote 1s (401 eV) et de silicium 2s (151 eV) et 2p (102 eV) dans des proportions attendues de 1 pour 1. Le pic correspondant à l'azote a été simulé pour en extraire la contribution de deux pics situés à 401,7 eV et 399,8 eV. Les variations en énergies proviennent des interférences induites par la liaison avec l'atome adjacent. Ainsi la contribution à 399,8 eV a été attribuée aux fonctions amines (NH_2) et le pic à 401,7 eV aux fonctions NH_3^+ en interaction avec les groupements $Ti\text{-}O^-$ de la surface.

La rhodamine et la fluorescéine sont liées à l'APS par une liaison thio-urée comprenant un atome de soufre. Sur les spectres associés, les pics de l'APS sont retrouvés auxquels s'ajoutent le pic du soufre (2s : 228 eV) et celui du sodium pour les NPs fonctionnalisées FITC (pollution). La quantification des atomes de silicium et d'azote a également été simulée et les ratios N / Si sont de 1,6 pour la fluorescéine et 2 pour la rhodamine. Les ratios théoriques attendus étaient de 2 et 4 ce qui montre que le taux de greffage n'est pas de 100 %.

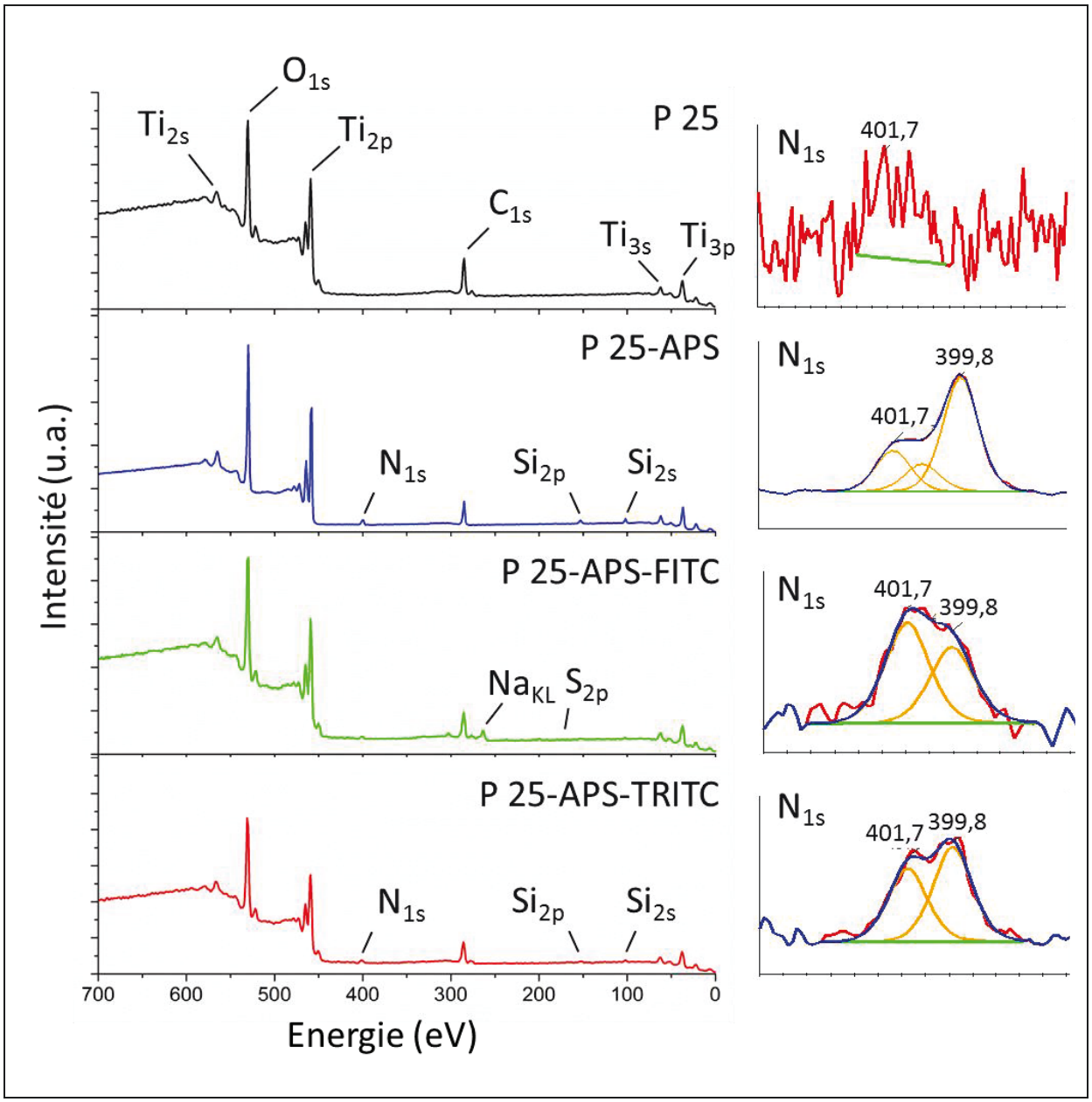


Figure 24 : Spectres XPS de a) NPs de TiO_2 natives et b), c) et d) NPs fonctionnalisées respectivement avec l'aminosilane, la fluorescéine et rhodamine B isothiocyanate. La contribution de l'azote (1s) est systématiquement zoomée.

4.2.2.2. Analyse de surface par spectroscopie infrarouge à réflexion diffuse

4.2.2.2.1. Principe de l'analyse

L'analyse à réflexion diffuse (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy : DRIFT) repose sur le fait que la radiation pénètre à l'intérieur de l'échantillon sous forme de poudre, subit des effets de réflexion, réfraction, absorption et diffusion, avant d'être réémise dans toutes les directions d'une hémisphère environnante, avec une distribution

d'énergie sphérique plus ou moins déformée. Le rayonnement IR, compris entre la longueur d'onde du visible (800 nm) et les ondes hertziennes (1 mm), induit des vibrations et des élongations des liaisons entre les atomes. L'énergie et donc la longueur d'onde nécessaire pour le mouvement interne des molécules dépendent des atomes et de la nature de la liaison impliquée.

4.2.2.2.2. Analyse surfacique

Les NPs natives et fonctionnalisées ont été analysées en réflexion diffuse (DRIFT) après 32 passages de faisceau et avec une résolution de 2 cm^{-1}. Les résultats des NPs natives et fonctionnalisées APS sont présentés en Figure 25. La courbe noire correspondant aux NPs natives sert de contrôle pour extraire les pics de réflexion attribuables aux molécules greffées. Les courbes sont réalisées après avoir chassé l'air ambiant et après l'enregistrement d'un fond continu (background). Des pics peuvent cependant découler de la présence d'humidité résiduelle dans l'échantillon.

Le spectre de TiO_2 P 25 (courbe 1) présente une bande d'absorption très large centrée vers 3300 cm^{-1} υ(OH) due aux vibrations des molécules d'eau adsorbées, elle interfère avec la faible absorption des groupements hydroxyles de surface située à 3630 cm^{-1} et une bande à 1630 cm^{-1} aux vibrations de déformation de l'eau physi-sorbée $\delta(H_2O)$ sur la surface du TiO_2 [117, 118].

Le greffage effectif du 3-aminopropyltriméthoxysilane sur la silice est illustré par la modification du spectre DRIFT (Figure 25). Nous observons tout d'abord la disparition de la bande de vibration des Ti-OH à 3630 cm^{-1} et de celle à 1630 cm^{-1}. De plus, nous observons une modification de la forme de la bande située aux environs de 3600 cm^{-1}. Ceci s'explique par l'apparition dans cette région des bandes de vibration des NH. Les bandes situées à 2969 cm^{-1}, 2940 cm^{-1} et 2860 cm^{-1} correspondent aux vibrations de la chaîne alcane greffée (CH aliphatiques) (υC_{sp3}-H). Enfin, le greffage du 3-aminopropyltriméthoxysilane a été confirmé par la présence des deux bandes caractéristiques : l'une à 1540 cm^{-1} imputable aux C-N, et l'autre à 1450 cm^{-1} correspondant à la vibration des liaisons Si-CH_2.

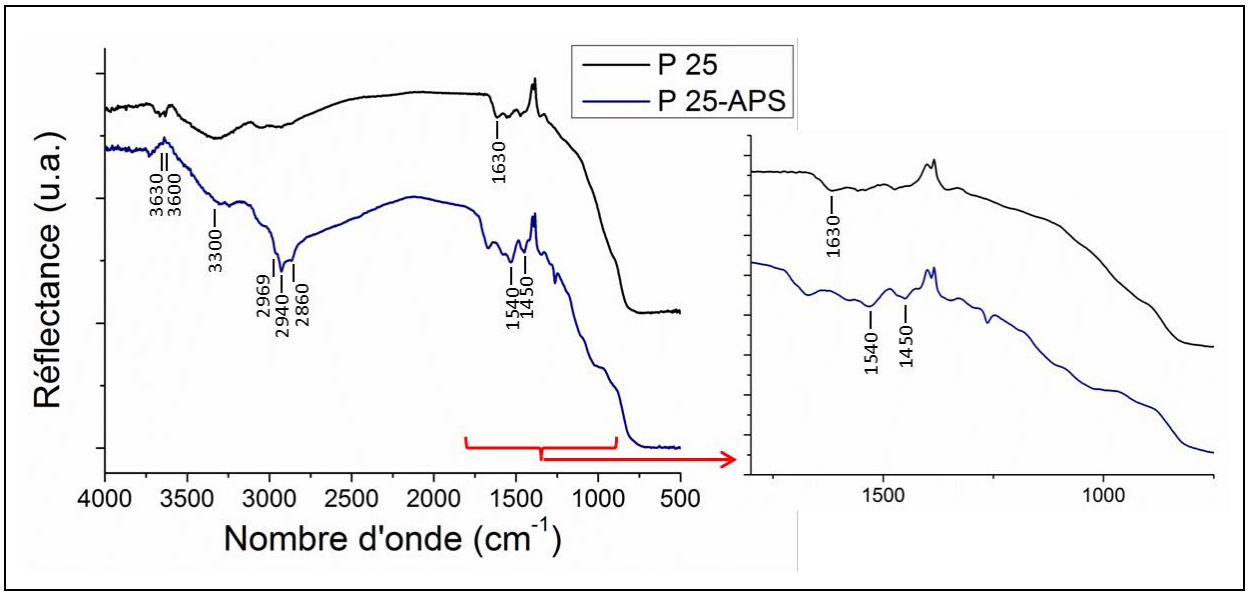


Figure 25 : Spectres DRIFT entre 4000 et 400 cm^{-1} des P 25 natives (courbe noire) et des P 25-APS (courbe bleue).

De la même façon nous avons examiné les spectres DRIFT du P 25 fonctionnalisé par chacun des fluorophores. Une illustration est donnée avec le spectre du P 25 greffé rhodamine et fluorescéine (Figure 26). Il est ainsi possible de confirmer le greffage de cette molécule en examinant la région comprise entre 1700 et 1000 cm^{-1} où se trouvent les vibrations des composés organiques. Les vibrations CH aliphatiques sont retrouvées à 2931 et 2870 cm^{-1} dues à la composante de l'aminosilane. Les bandes à 1380 cm^{-1} et 1410 cm^{-1} sont issues de l'élongation de ces mêmes liaisons C-H. La bande à 1720 cm^{-1} peut être due aux liaisons des groupements carboxyliques (υC=O) et aux vibrations υC=N. La bande à 1590 cm^{-1} peut être attribuée aux élongations des doubles liaisons C=C présentes dans les noyaux aromatiques (υC=C) mais aussi aux vibrations δNH_2 des amines non protonées. Les bandes à 1246 cm^{-1} et 1460 cm^{-1} correspondent quant à elles aux liaisons (υC-O) et (δO-H) des acides carboxyliques). La bande à 1340 cm^{-1} est le reflet des liaisons des groupements « C=S » (pour la rhodamine), celle à 1123 cm^{-1}, celui des fonctions éthers cycliques (C-O-C). Les bandes à 1157 cm^{-1} et 1531 cm^{-1} correspondent aux vibrations (C-N) des amines et (N-H) des amines protonées.

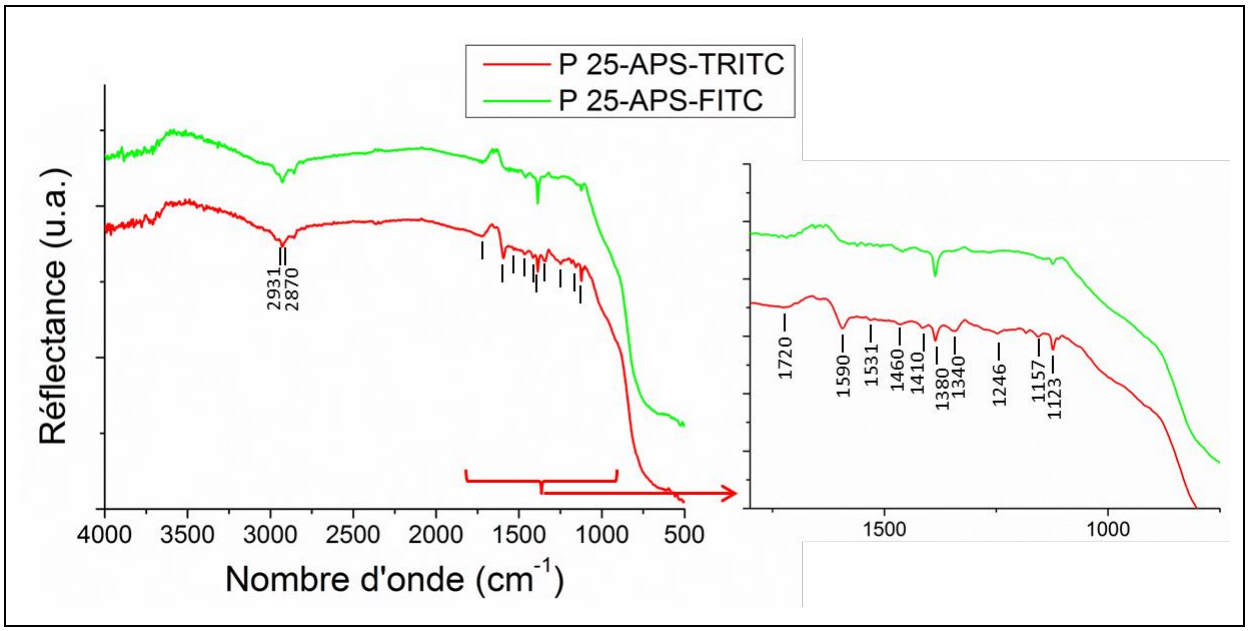


Figure 26 : Spectres DRIFT entre 4000 et 400 cm^{-1} des P 25-APS FITC (courbe verte) et TRITC (courbe rouge).

4.2.3. Comportement en solution

4.2.3.1. Influence de la fonctionnalisation sur le potentiel Zêta

4.2.3.1.1. NPs fonctionnalisées avec l'aminosilane

L'évolution du potentiel Zêta en fonction du pH des NPs fonctionnalisées avec l'aminosilane est montrée sur la Figure 27. Le PCN est déplacé à 7,5 pour les P 25-APS et les NF-APS et à 8,5 pour les NA-APS. Cette différence provient la présence de fonctions amines ($-NH_2$) à l'extrémité des silanes greffés qui déplacent le pH pour lequel le potentiel Zêta s'annule vers les valeurs correspondantes au pK_a de l'amine soit 10,6. Ce pK_a n'est par ailleurs pas atteint car certaines chaînes de l'aminosilane peuvent se replier vers la NPs formant un zwitterion comme nous l'avons également observé en XPS avec la contribution oxydée de l'azote. La différence qui existe entre les NPs est probablement due à une variation du taux de greffage de l'aminosilane.

La fonctionnalisation induit une modification du comportement des particules en solution à un pH choisi. Au pH physiologique (7,4) par exemple, les NPs fonctionnalisées avec l'aminosilane ont une charge de surface positive ou nulle ce qui influe sur leur comportement en milieux liquide. Les P 25 et les NFs ont à ce pH un potentiel Zêta faiblement négatif et auront ainsi une tendance accrue à floculer et sédimenter.

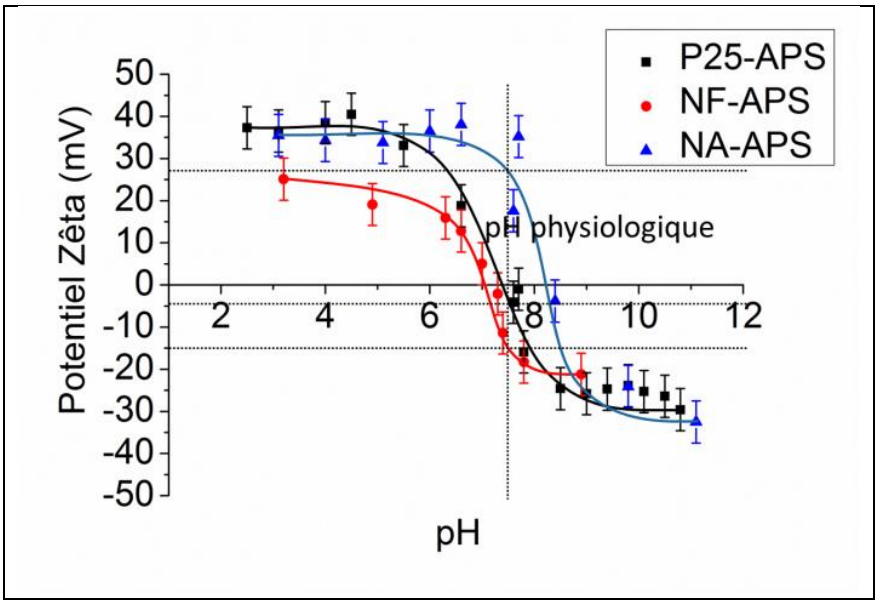


Figure 27 : Evolution du potentiel Zêta des NPs fonctionnalisées avec l'aminosilane en fonction du pH.

4.2.3.1.2. NPs fonctionnalisées avec les fluorophores

Les évolutions des potentiels Zêta en fonction du pH des NPs fonctionnalisées avec les fluorophores sont montrées sur la Figure 28. Après greffage du fluorophore, toutes les NPs ont un PIE situé autour d'un pH de 6. Ce revirement s'explique par la disparition d'une partie des groupements amines de surface qui ont réagi avec les fluorophores pour donner des liaisons thio-urées. Ce résultat est très important car il confirme qu'à pH physiologique, les NPs fonctionnalisées auront, à l'instar des NPs natives, des charges de surface négatives et par conséquent un comportement à priori similaire dans les milieux biologiques.

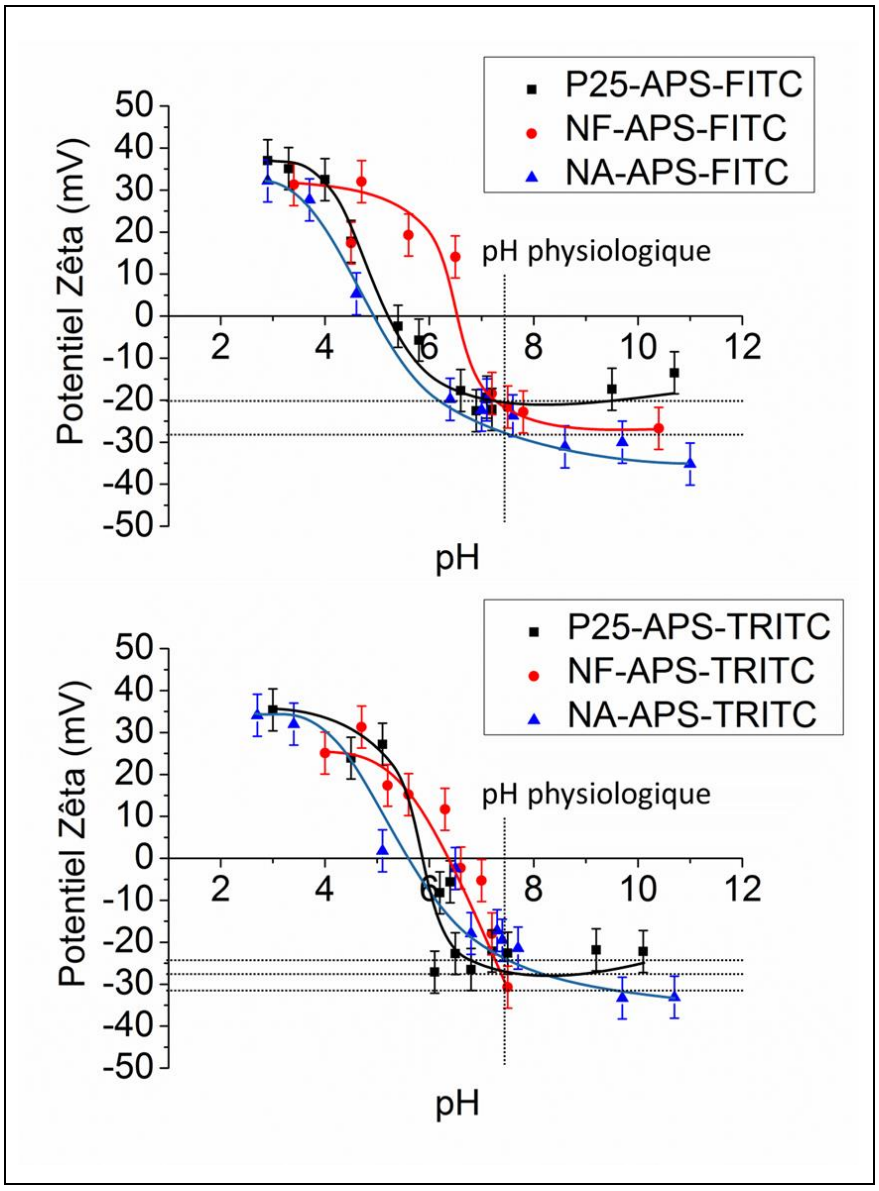


Figure 28 : Evolution du potentiel Zêta des NPs fonctionnalisées avec la fluorescéine et la rhodamine en fonction du pH.

4.3. Récapitulatif des potentiels Zêta des NPs natives et fonctionnalisées

Afin de se rendre compte de l'impact de la fonctionnalisation sur chaque type de particule, j'ai représenté l'évolution du potentiel Zêta en fonction du pH, du type de NPs et de la fonctionnalisation. Les graphiques, visibles sur la Figure 29, montrent que le greffage modifie la position du PIE. Dans tous les cas, l'APS l'a déplacé vers des pH basiques (7,5 ou 8,5). Ensuite, l'ajout du fluorophore a ramené ce PIE à des pH proches de 6. Les NFs sont les NPs dont l'impact est le plus important avec un PIE situé à pH 4 pour les NPs natives et 6,5 pour les NPs fluorescentes.

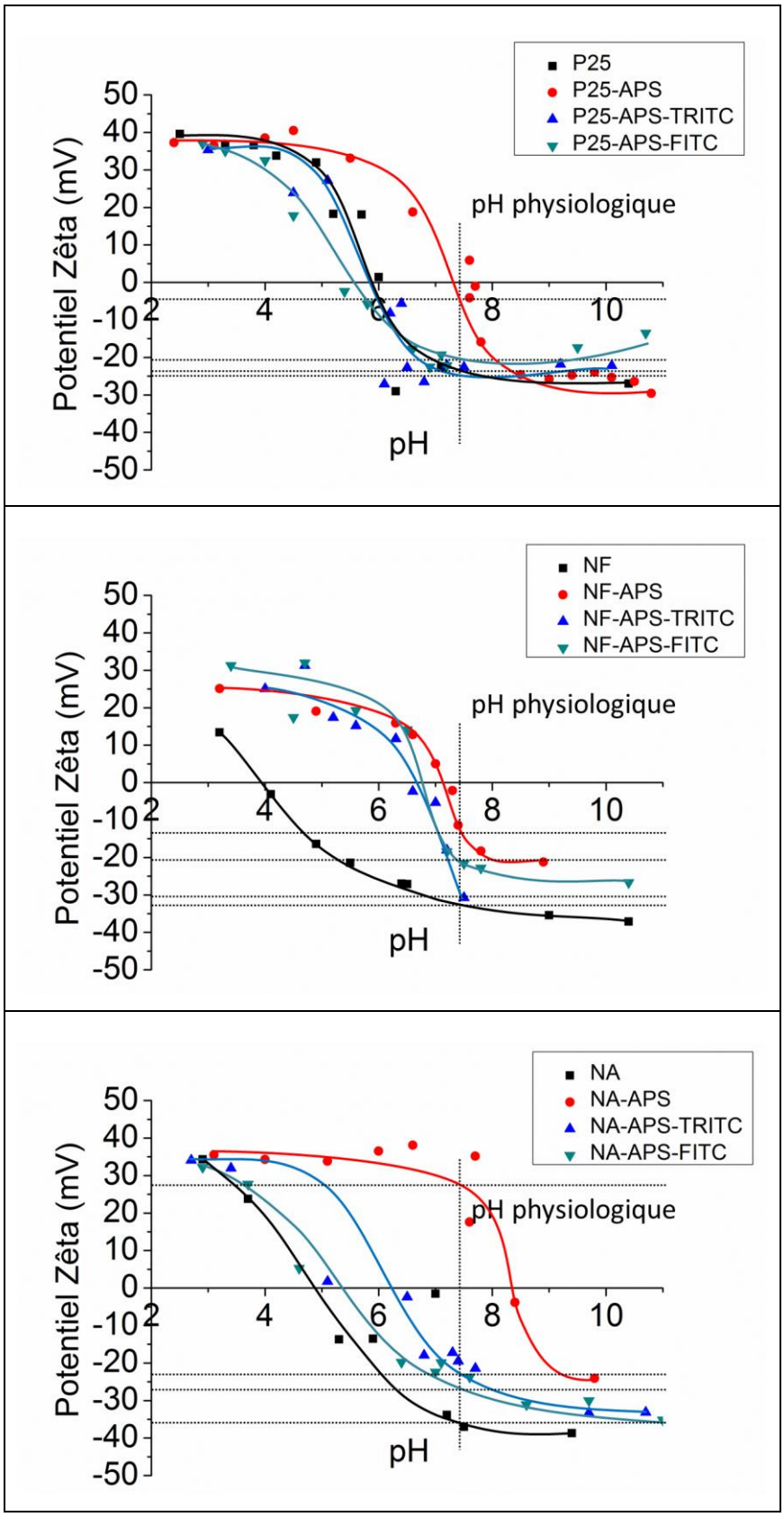


Figure 29 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du greffage pour les différentes NPs.

5. Conclusion

La synthèse d'objets à morphologies contrôlées a donc été réalisée avec succès. Deux morphologies, complémentaires aux P 25, vont permettre d'étudier l'impact des différentes caractéristiques des NPs sur leur toxicité.

Les P 25 sont des modèles standards avec une surface spécifique modérée, une forme isotropique et des faces cristallines équilibrées. Les nano-feuillets enroulés, synthétisées par voie hydrothermale, présentent une structure stratifiée, une surface spécifique géante et une forme allongée assimilables à des fibres. La surface spécifique et la forme sont deux paramètres pouvant potentiellement influer sur la toxicité. Les NFs possèdent une forme très allongée et des extrémités ouvertes ce qui suggère une capacité de pénétration des membranes supérieure aux autres NPs. Leur structure n'est cependant pas bien définie ce qui influe sur les propriétés photo-catalytiques et donc sur leur réactivité. Les NAs présentent enfin une surface supérieure aux P 25 avec une morphologie allongée et effilée ce qui pourrait, à l'instar des NFs, leur conférer un pouvoir pénétrant accru. Les NAs sont bien cristallisées et peuvent donc potentiellement présenter une activité photo-catalytique importante. Néanmoins, leur stabilité en solution pourrait avoir un impact sur leur biodisponibilité.

Chacune des NPs présentent des propriétés propres qui pourront apporter des réponses sur les paramètres physico-chimiques pouvant influer sur leur toxicité dans des cellules en culture (chapitre 4) ou dans un organisme pluricellulaire (chapitre 5). Le passage de la chimie à la biologie nécessite cependant la compréhension d'outils différents qui seront décrits dans le chapitre 3.

6. Partie expérimentale

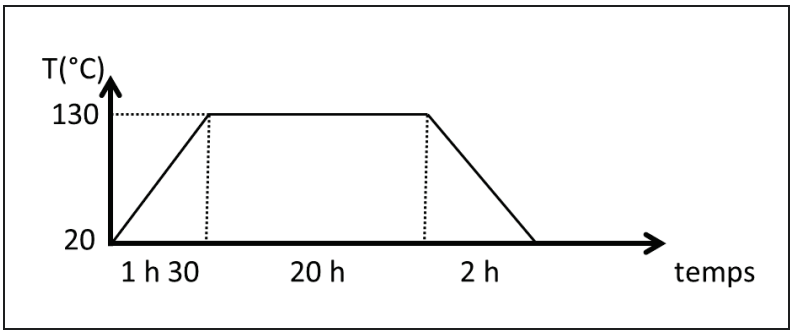
6.1. Synthèse des nanoparticules de morphologie contrôlée

6.1.1. Matériaux et produits utilisés

Les nanoparticules de départ (P 25 AEROXIDE) ont été gracieusement fournies par la société Degussa / Evonik. L'hydroxyde de sodium (NaOH) 98 %, la rhodamine (B isothiocyanate mixed isomer) et la fluorescéine (isothiocyanate isomer I) ont été fournies par Sigma-Aldrich et l'acide nitrique 65 % par Scharlau. Le sonificateur utilisé est le vibra^{TM}cell (75042) de bioblock scientific (puissance 500 W, fréquence 20 kHz).

6.1.2. Synthèse des nano-feuillets enroulés

La synthèse des NFs a été adaptée du travail de Kasuga et *al.* [11-13]. 2 g de NPs P 25 sont pesés et introduits dans un autoclave en Téflon de 50 mL de capacité. 28 mL d'une solution de soude (NaOH) 10 M sont ensuite ajoutés et le mélange est agité manuellement jusqu'à homogénéisation. L'autoclave est ensuite scellé puis enfermé dans une coque protectrice en acier. L'ensemble est ensuite chauffé dans un four (Memmert 1400 W) en suivant la courbe suivante :



Le chauffage est ensuite arrêté, la température est abaissée naturellement et l'autoclave est ouvert. Le solide blanc obtenu est lavé avec de l'acide nitrique (HNO_3) 0.1 M jusqu'à obtention d'un pH acide. Généralement, 450 à 500 mL d'acide sont nécessaires. Des cycles de lavage centrifugation à l'eau sont enfin réalisés jusqu'à neutralité. Les NFs obtenus sont ensuite conservés en milieu aqueux ou séchés à 40 °C.

6.1.3. Synthèse des nano-aiguilles

La synthèse des nano-aiguilles utilise les nano-feuillets enroulés comme matériaux de départ comme décrit par Nian et Teng [55]. 30 mL d'une solution de NFs (contenant 665 mg)

sont préparés. Son pH est élevé à 9 par ajout de petites fractions de NaOH 0.1 M. A ce stade, la stabilisation du pH peut être accélérée avec l'usage de l'ultra-sonification. Le volume est ensuite réajusté à 30 mL. L'ensemble est enfermé en autoclave puis enfourné à 140 °C dans un four préchauffé. Au bout de 72 h, la suspension est lavée à l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un pH neutre. Une partie est séchée à 40 °C pendant 24 h pour les analyses DRX, BET, XPS ou DRIFT.

6.1.4. Fonctionnalisation des NPs

250 mg de NPs (P 25, NFs ou NAs) de TiO_2 sont dispersés dans 50 mL d'eau par ultra-sonification. La dispersion est ensuite transférée dans un ballon de 100 mL et l'aminosilane (3-(aminopropyl)trimethoxysilane) est ajouté goutte à goutte avec un rapport molaire de 1 : 1 (soit 0,5 mL de solution). La solution est ensuite portée à 80 °C à reflux et sous agitation vive pendant 18 heures. Une fois le temps de réaction écoulé, 20 mL de glycérol sont ajoutés et le mélange est agité pendant 20 minutes. L'eau est ensuite éliminée à 80 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif. 10 mL d'éthanol et 10 mL d'acétone sont ensuite ajoutés et le mélange est de nouveau agité plusieurs minutes. Ce traitement au glycérol permet de passer par un état totalement anhydre ce qui réduit le repliement de l'aminosilane et donc la formation du zwitterion. L'ensemble est ensuite centrifugé puis lavé plusieurs fois à l'eau pour éliminer tous les résidus de réaction ainsi que les produits ajoutés.

Les nanoparticules fonctionnalisées sont ensuite placées dans une solution aqueuse de Na_2CO_2 0,1 M (tampon pH = 8). 1.5 mg de rhodamine (B isothiocyanate mixed isomer) ou 1 mg de fluorescéine (isothiocyanate isomer I) sont ensuite ajoutés à la solution qui est agitée pendant 48 heures à température ambiante. A l'issu de la réaction, les particules sont lavés plusieurs fois à dans la solution tampon et à l'éthanol jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide.

6.2. Méthodes de caractérisation

6.2.1. Microscopie électronique en transmission

Pour observer une nanoparticule à l'aide d'un microscope électronique en transmission, un support sous forme de grille est utilisé. Il s'agit d'une grille en cuivre de 3 mm de diamètre recouverte d'un film de carbone. 10 µL d'une solution diluée de particules à 1/1000 sont déposés puis laissés sécher à l'air. Un traitement au plasma cleaner (10 min) peut

être effectué sur les grilles pour augmenter leur caractère hydrophile. Les grilles sont ensuite observées au Bordeaux Imaging Center (BIC – Bordeaux 2) à l'aide d'un microscope HITACHI H7650 disposant d'une tension d'accélération de 60 à 120 kV et une résolution de l'ordre du nanomètre. L'appareil est enfin équipé d'une caméra ORIUS SC1000 11MPx (GATAN) et est géré par le logiciel Digital Micrograph.

La microscopie haute résolution a été réalisée au CREMEM sur un MET JEOL 2200FS ayant une tension d'accélération de 200kV et une caméra haute résolution.

6.2.2. Mesures de diffraction aux rayons X

Les poudres sont tamisées et déposées sur un support en aluminium puis aplanies à l'aide d'une lame de verre. Les échantillons sont ensuite analysés à l'aide d'un diffractomètre Philips PW1820 avec un domaine angulaire de 5 à 80° et un pas de 0,02° (source cuivre Ka = 1,54056 Å). Les diffractogrammes sont ensuite analysés à l'aide du logiciel EVA.

6.2.3. Mesure de surface spécifique par BET

Les mesures de surfaces spécifiques ont été réalisées à l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) par Odile Babot et Thierry Toupance. L'analyse de sorption isotherme (77 K) a été réalisée avec un ASAP2010 (Micromeritics). Les surfaces spécifiques ont été calculées en appliquant le modèle de BET.

6.2.4. Mesures de potentiel Zêta

Le potentiel Zêta peut être obtenu par l'étude de la mobilité des particules en solution lorsqu'un champ électrique est appliqué. Concrètement, les particules sont placées dans une cuve horizontale présentant une électrode de platine à chaque extrémité. Un potentiel électrique est ensuite appliqué alternativement sur chacune des électrodes. Une caméra filme alors le déplacement des particules et relie la mobilité observée au potentiel Zêta par l'équation de Smoluchowski.

Le potentiel Zêta a été estimé à l'aide d'un ZetaCompact® (CAD). Les particules sont dispersées dans une solution aqueuse avec une concentration de 10^{-4} mg/mL. La solution subit ensuite une ultra-sonification. L'ajout de HNO_3 0.1 M ou NaOH 0.1 M permet de faire varier le pH. A chaque pas, 10 mL de solution sont prélevés et stockés. Chaque aliquote est ensuite analysée dans le ZetaCompact. Le pH est enfin mesuré une seconde fois plusieurs heures

après la mesure initiale. Cette deuxième mesure est considérée comme plus fiable considérant le temps de stabilisation de pH nécessaire. Cette dernière mesure est donc conservée. Les courbes de potentiel Zeta en fonction du pH peuvent ainsi être tracées révélant la position du point de charge nulle. Dans le cas de l'analyse du potentiel Zêta en milieux de culture, l'eau a simplement été remplacée.

6.2.5. Mesure de DLS

Les NPs doivent être dispersées dans l'eau ou dans le milieu de culture avec une concentration de l'ordre de 10^{-2} mg/mL. Quelques gouttes sont ensuite déposées sur la cuve d'un analyseur de taille de particule VASCO de Cordouan. Dans le logiciel NanoQ, l'intensité du signal est ajustée pour que la mesure soit optimale (2000 u.a.) et 5 mesures de 30 secondes sont effectuées à la suite. Le résultat « en nombre » est enfin conservé.

6.2.6. Analyse DRIFT

Les analyses DRIFT ont été réalisées avec un spectromètre FTIR infrarouge Bruker permettant la réalisation de spectres d'absorption et de réflexion (de 7500 cm^{-1} à 40 cm^{-1}). Les poudres sont mélangées à une espèce transparente aux IR (KBr) avec une concentration de 3 % massique et analysés sur 32 scans.

6.2.7. Analyse XPS

Les analyses XPS (X-ray Photoelectron Spectrometry) ont été conduites avec un VG ESCALAB 220i-XL permettant de faire une analyse sur 5 nm de profondeur avec une résolution de 150 µm en routine. Il possède des chambres annexes permettant de racler des échantillons massifs, d'effectuer des traitements thermiques et des dépôts sous ultravide. Il est par ailleurs équipé d'une lampe UV pour la spectroscopie UPS.

Références

1. Wang, G., et al., *Enhanced Photocatalytic Activity of TiO_2 Powders (P25) via Calcination Treatment.* International Journal of Photoenergy, 2012. **2012**: p. 9.
2. Deiana, C., et al., *Shape-controlled TiO_2 nanoparticles and TiO_2 P25 interacting with CO and H_2O_2 molecular probes: a synergic approach for surface structure recognition and physico-chemical understanding.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(1): p. 307-315.
3. Deiana, C., et al., *Surface Structure of TiO_2 P25 Nanoparticles: Infrared Study of Hydroxy Groups on Coordinative Defect Sites.* The Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(49): p. 21531-21538.
4. Hurum, D.C., et al., *Recombination Pathways in the Degussa P25 Formulation of TiO2: Surface versus Lattice Mechanisms.* The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **109**(2): p. 977-980.
5. *Aerosol processes*. 2008; Available from: http://www.uio.no/.
6. Morgan, D.L., et al., *Implications of Precursor Chemistry on the Alkaline Hydrothermal Synthesis of Titania/Titanate Nanostructures.* The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **114**(1): p. 101-110.
7. Kehres, J., et al., *Combined in situ small- and wide-angle X-ray scattering studies of TiO2 nanoparticle annealing to 1023 K.* Journal of Applied Crystallography, 2010. **43**(6): p. 1400-1408.
8. Selloni, A., *Crystal growth: Anatase shows its reactive side.* Nat Mater, 2008. **7**(8): p. 613-615.
9. D'Arienzo, M., et al., *Photogenerated Defects in Shape-Controlled TiO2 Anatase Nanocrystals: A Probe To Evaluate the Role of Crystal Facets in Photocatalytic Processes.* Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(44): p. 17652-17661.
10. Zhu, H.Y., et al., *Phase Transition between Nanostructures of Titanate and Titanium Dioxides via Simple Wet-Chemical Reactions.* Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(18): p. 6730-6736.
11. Kasuga, T., *Formation of titanium oxide nanotubes using chemical treatments and their characteristic properties.* Thin Solid Films, 2006. **496**(1): p. 141-145.
12. Kasuga, T., et al., *Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing.* Advanced Materials, 1999. **11**(15): p. 1307-1311.
13. Kasuga, T., et al., *Formation of Titanium Oxide Nanotube.* Langmuir, 1998. **14**(12): p. 3160-3163.
14. Sun, X. and Y. Li, *Synthesis and Characterization of Ion-Exchangeable Titanate Nanotubes.* Chemistry – A European Journal, 2003. **9**(10): p. 2229-2238.
15. Wang, C., et al., *Hydrothermal Growth of Layered Titanate Nanosheet Arrays on Titanium Foil and Their Topotactic Transformation to Heterostructured TiO2 Photocatalysts.* The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(45): p. 22276-22285.
16. Li, J., Z. Tang, and Z. Zhang, *H-titanate nanotube: a novel lithium intercalation host with large capacity and high rate capability.* Electrochemistry Communications, 2005. **7**(1): p. 62-67.
17. Lee, K.-M., et al., *Enhancing the performance of dye-sensitized solar cells based on an organic dye by incorporating TiO2 nanotube in a TiO2 nanoparticle film.* Electrochimica Acta, 2009. **54**(16): p. 4123-4130.
18. Papa, A.-L., et al., *Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier.* The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(39): p. 19012-19017.
19. Kubota, S., et al., *Titanium oxide nanotubes for bone regeneration.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2004. **15**(9): p. 1031-1035.
20. Papa, A.-L., et al., *Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes.* Jackson, P, 2013. **7**(6): p. 1131-1142.

21. Mirjolet, C., et al., *The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept.* Radiotherapy and Oncology, 2013. **108**(1): p. 136-142.
22. Bavykin, D.V., J.M. Friedrich, and F.C. Walsh, *Protonated Titanates and TiO_2 Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications.* Advanced Materials, 2006. **18**(21): p. 2807-2824.
23. Lan, Y., Y. Lu, and Z. Ren, *Mini review on photocatalysis of titanium dioxide nanoparticles and their solar applications.* Nano Energy, 2013. **2**(5): p. 1031-1045.
24. Ou, H.-H. and S.-L. Lo, *Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application.* Separation and Purification Technology, 2007. **58**(1): p. 179-191.
25. Sekino, T., *Synthesis and Applications of Titanium Oxide Nanotubes*, in *Inorganic and Metallic Nanotubular Materials*, T. Kijima, Editor. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 17-32.
26. Liu, N., et al., *A review on TiO2-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications.* Catalysis Today, 2014. **225**(0): p. 34-51.
27. Xu, D., et al., *From titanates to TiO_2 nanostructures: Controllable synthesis, growth mechanism, and applications.* Science China Chemistry, 2012. **55**(11): p. 2334-2345.
28. Casarin, M., A. Vittadini, and A. Selloni, *First Principles Study of Hydrated / Hydroxylated TiO_2 Nanolayers: From Isolated Sheets to Stacks and Tubes.* ACS Nano, 2009. **3**(2): p. 317-324.
29. Ferrari, A.M., D. Szieberth, and Y. Noel, *DFT modeling of anatase nanotubes.* Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(12): p. 4568-4580.
30. Gao, T., et al., *Topological Properties of Titanate Nanotubes.* The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(23): p. 8548-8552.
31. Horváth, E., et al., *Hydrothermal Conversion of Self-Assembled Titanate Nanotubes into Nanowires in a Revolving Autoclave.* Chemistry of Materials, 2007. **19**(4): p. 927-931.
32. Huang, J., et al., *Tailoring of low-dimensional titanate nanostructures.* Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(35): p. 14748-14754.
33. Kiatkittipong, K., et al., *Understanding Hydrothermal Titanate Nanoribbon Formation.* Crystal Growth & Design, 2010. **10**(8): p. 3618-3625.
34. Ma, R. and T. Sasaki, *Conversion of Metal Oxide Nanosheets into Nanotubes Inorganic and Metallic Nanotubular Materials*, T. Kijima, Editor. 2010, Springer Berlin / Heidelberg. p. 135-146.
35. Nakahira, A., T. Kubo, and C. Numako, *Formation Mechanism of TiO_2-Derived Titanate Nanotubes Prepared by the Hydrothermal Process.* Inorganic Chemistry, 2010. **49**(13): p. 5845-5852.
36. Tsai, C.-C. and H. Teng, *Regulation of the Physical Characteristics of Titania Nanotube Aggregates Synthesized from Hydrothermal Treatment.* Chemistry of Materials, 2004. **16**(22): p. 4352-4358.
37. Yao, B.D., et al., *Formation mechanism of TiO_2 nanotubes.* Applied Physics Letters, 2003. **82**(2): p. 281-283.
38. Yuan, Z.-Y. and B.-L. Su, *Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004. **241**(1-3): p. 173-183.
39. Zhang, S., et al., *Formation Mechanism of $H_2Ti_3O_7$ Nanotubes.* Physical Review Letters, 2003. **91**(25): p. 256103.
40. Kukovecz, Á., et al., *Oriented Crystal Growth Model Explains the Formation of Titania Nanotubes.* Zaban, A., 2005. **109**(38): p. 17781-17783.
41. Gao, T., H. Fjellvåg, and P. Norby, *Crystal Structures of Titanate Nanotubes: A Raman Scattering Study.* Inorganic Chemistry, 2009. **48**(4): p. 1423-1432.
42. Khan, M.A., H.-T. Jung, and O.B. Yang, *Synthesis and Characterization of Ultrahigh Crystalline TiO2 Nanotubes.* The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(13): p. 6626-6630.

43. Lan, Y., et al., *Titanate Nanotubes and Nanorods Prepared from Rutile Powder.* Advanced Functional Materials, 2005. **15**(8): p. 1310-1318.
44. Ma, R., Y. Bando, and T. Sasaki, *Nanotubes of lepidocrocite titanates.* Chemical Physics Letters, 2003. **380**(5-6): p. 577-582.
45. Mogilevsky, G., et al., *Layered Nanostructures of Delaminated Anatase: Nanosheets and Nanotubes.* The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(9): p. 3239-3246.
46. Nakahira, A., T. Kubo, and C. Numako, *TiO_2-Derived Titanate Nanotubes by Hydrothermal Process with Acid Treatments and Their Microstructural Evaluation.* ACS Applied Materials & Interfaces, 2010. **2**(9): p. 2611-2616.
47. Poudel, B., et al., *Formation of crystallized titania nanotubes and their transformation into nanowires.* Nanotechnology, 2005. **16**(9): p. 1935-1940.
48. Seo, H.-K., et al., *A study on the structure/phase transformation of titanate nanotubes synthesized at various hydrothermal temperatures.* Solar Energy Materials and Solar Cells, 2008. **92**(11): p. 1533-1539.
49. Tsai, C.-C. and H. Teng, *Nanotube Formation from a Sodium Titanate Powder via Low-Temperature Acid Treatment.* Langmuir, 2008. **24**(7): p. 3434-3438.
50. Wang, Y.Q., et al., *Microstructure and formation mechanism of titanium dioxide nanotubes.* Chemical Physics Letters, 2002. **365**(5-6): p. 427-431.
51. Weng, L.Q., et al., *Synthesis and characterisation of nanotubular titanates and titania.* Journal of the European Ceramic Society, 2006. **26**(8): p. 1405-1409.
52. Yang, J., et al., *Study on composition, structure and formation process of nanotube Na2Ti2O4(OH)2.* Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions, 2003(20): p. 3898-3901.
53. Du, G.H., et al., *Preparation and structure analysis of titanium oxide nanotubes.* Applied Physics Letters, 2001. **79**(22): p. 3702-3704.
54. Chen, Q., et al., *Trititanate Nanotubes Made via a Single Alkali Treatment.* Advanced Materials, 2002. **14**(17): p. 1208-1211.
55. Nian, J.-N. and H. Teng, *Hydrothermal Synthesis of Single-Crystalline Anatase TiO_2 Nanorods with Nanotubes as the Precursor.* The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(9): p. 4193-4198.
56. Jolivet, J.-P., *De la solution à l'oxyde*. CNRS editions, ed. s. actuels. 1994: EDP sciences
57. Barnard, A.S. and L.A. Curtiss, *Prediction of TiO_2 Nanoparticle Phase and Shape Transitions Controlled by Surface Chemistry.* Nano Letters, 2005. **5**(7): p. 1261-1266.
58. Li, J., et al., *Tetragonal faceted-nanorods of anatase TiO_2 with a large percentage of active {100} facets and their hierarchical structure.* CrystEngComm, 2012. **14**(1): p. 83-85.
59. Gravereau, P., *Introduction à la pratique de la diffraction des rayons X par les poudres*. 2012, Bordeaux 1: ICMCB-CNRS.
60. Rouquerol, J., et al., *Texture des matériaux pulvérulents ou poreux.* Techniques de l'ingénieur Études de structure et caractérisation, 2003. **base documentaire : TIB386DUO**(ref. article : p1050).
61. Vittadini, A., et al., *Structure and Energetics of Water Adsorbed at TiO_2 Anatase (101) and (001) Surfaces.* Physical Review Letters, 1998. **81**(14): p. 2954-2957.
62. Lazzeri, M., A. Vittadini, and A. Selloni, *Structure and energetics of stoichiometric TiO_2 anatase surfaces.* Physical Review B, 2001. **63**(15): p. 155409.
63. Lazzeri, M., A. Vittadini, and A. Selloni, *Erratum: Structure and energetics of stoichiometric TiO_2 anatase surfaces [Phys. Rev. B (63), 155409 (2001)].* Physical Review B, 2002. **65**(11): p. 119901.
64. Vittadini, A., M. Casarin, and A. Selloni, *Chemistry of and on TiO_2-anatase surfaces by DFT calculations: a partial review.* Theoretical Chemistry Accounts, 2007. **117**(5-6): p. 663-671.
65. Dai, Y., et al., *Synthesis of Anatase TiO_2 Nanocrystals with Exposed {001} Facets.* Nano Letters, 2009. **9**(6): p. 2455-2459.

66. Herman, G.S., M.R. Sievers, and Y. Gao, *Structure Determination of the Two-Domain (1 x 4) Anatase TiO_2 (001) Surface.* Physical Review Letters, 2000. **84**(15): p. 3354.
67. Diebold, U., *Structure and properties of TiO_2; surfaces: a brief review.* Applied Physics A: Materials Science & Processing, 2003. **76**(5): p. 681-687.
68. Diebold, U., *The surface science of titanium dioxide.* Surface Science Reports, 2003. **48**(5-8): p. 53-229.
69. Gong, X.-Q., et al., *Steps on anatase TiO_2 (101).* Nat. Mater., 2006. **5**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 665-670.
70. Zeng, W., et al., *Oxygen adsorption on anatase TiO_2 (101) and (001) surfaces from first principles.* Mater. Trans., 2010. **51**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 171-175.
71. Gong, X.-Q. and A. Selloni, *Reactivity of Anatase TiO_2 Nanoparticles: The Role of the Minority (001) Surface.* The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(42): p. 19560-19562.
72. Liu, G., et al., *Enhanced Photoactivity of Oxygen-Deficient Anatase TiO2 Sheets with Dominant {001} Facets.* The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(52): p. 21784-21788.
73. Henderson, M.A., *The interaction of water with solid surfaces: fundamental aspects revisited.* Surface Science Reports, 2002. **46**(1–8): p. 1-308.
74. Pan, J., et al., *On the True Photoreactivity Order of {001}, {010}, and {101} Facets of Anatase TiO_2 Crystals.* Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(9): p. 2133-2137.
75. Saponjic, Z.V., et al., *Shaping Nanometer-Scale Architecture Through Surface Chemistry.* Advanced Materials, 2005. **17**(8): p. 965-971.
76. Barnard, A.S., P. Zapol, and L.A. Curtiss, *Anatase and rutile surfaces with adsorbates representative of acidic and basic conditions.* Surface Science, 2005. **582**(1–3): p. 173-188.
77. Ye, L., et al., *Synthesis of anatase TiO_2 nanocrystals with {101}, {001} or {010} single facets of 90% level exposure and liquid-phase photocatalytic reduction and oxidation activity orders.* Dar, M. Ibrahim, 2013. **1**(35): p. 10532-10537.
78. Han, X., et al., *Carbonate ions-assisted syntheses of anatase TiO_2 nanoparticles exposed with high energy (001) facets.* RSC Advances, 2012. **2**(8): p. 3251-3253.
79. Yang, H.G., et al., *Solvothermal Synthesis and Photoreactivity of Anatase TiO2 Nanosheets with Dominant {001} Facets.* Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(11): p. 4078-4083.
80. Han, X., et al., *Synthesis of Titania Nanosheets with a High Percentage of Exposed (001) Facets and Related Photocatalytic Properties.* Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(9): p. 3152-3153.
81. Ma, X., et al., *Relative Photooxidation and Photoreduction Activities of the {100}, {101}, and {001} Surfaces of Anatase TiO_2.* Langmuir, 2013. **29**(44): p. 13647-13654.
82. Gordon, T.R., et al., *Nonaqueous Synthesis of TiO_2 Nanocrystals Using TiF_4 to Engineer Morphology, Oxygen Vacancy Concentration, and Photocatalytic Activity.* Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(15): p. 6751-6761.
83. Zhao, X., et al., *Shape- and Size-Controlled Synthesis of Uniform Anatase TiO_2 Nanocuboids Enclosed by Active {100} and {001} Facets.* Advanced Functional Materials, 2011. **21**(18): p. 3554-3563.
84. Bouazza, N., et al., *TiO_2 nanotubes and CNT-TiO_2 hybrid materials for the photocatalytic oxidation of propene at low concentration.* Applied Catalysis B: Environmental, 2009. **92**(3-4): p. 377-383.
85. Janus, M., et al., *TiO2 Nanoparticles with High Photocatalytic Activity Under Visible Light.* Catalysis Letters, 2009. **128**(1-2): p. 36-39.
86. Nishijima, K., et al., *Development of an S-doped titania nanotube (TNT) site-selectively loaded with iron(III) oxide and its photocatalytic activities.* Bouazza, N., 2008. **84**(3-4): p. 584-590.
87. Shi, L., et al., *A study on partially protonated titanate nanotubes: Enhanced thermal stability and improved photocatalytic activity.* Ceramics International, 2014. **40**(3): p. 4717-4723.
88. Bavykin, D. and F. Walsh, *Titanate and titania nanotubes*. 2009: PSCPublishing.

89. INRS. *Tout savoir sur l'amiante, pour mieux s'en protéger*.
90. Liu, Y., et al., *Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes.* Accounts of Chemical Research, 2012. **46**(3): p. 702-713.
91. Di Meglio, J.-M., *Colloïdes et nanosciences.* Techniques de l'ingénieur Principes de formulation, 2007. **base documentaire : TIB489DUO**(ref. article : j2130).
92. Brinker, C.J. and G.W. Scherer, *The physics and chemistry of sol-gel processing*. 1990: Academic press.
93. Jiang, J., G. Oberdörster, and P. Biswas, *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.* Journal of Nanoparticle Research, 2009. **11**(1): p. 77-89.
94. Bihari, P., et al., *Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies.* Particle and Fibre Toxicology, 2008. **5**(1): p. 14.
95. Mornet, S., *Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales*, 2002, Bordeaux 1.
96. CAD-Instrument, *ZetaCompact instruction manual*.
97. Suttiponparnit, K., et al., *Role of Surface Area, Primary Particle Size, and Crystal Phase on Titanium Dioxide Nanoparticle Dispersion Properties.* Nanoscale Research Letters, 2011. **6**(1): p. 27.
98. Sentein, C., et al., *Dispersion and stability of TiO_2 nanoparticles synthesized by laser pyrolysis in aqueous suspensions.* Journal of Physics: Conference Series, 2009. **170**(1): p. 012013.
99. Kosmulski, M., *pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach.* Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **337**(2): p. 439-448.
100. Kosmulski, M., *Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature.* Advances in Colloid and Interface Science, 2009. **152**(1–2): p. 14-25.
101. Liao, D.L., G.S. Wu, and B.Q. Liao, *Zeta potential of shape-controlled TiO2 nanoparticles with surfactants.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2009. **348**(1–3): p. 270-275.
102. *Hydrodynamic diameter*, in *Fritsch Encyclopedia*.
103. Nair, N., et al., *Dynamics of Surfactant-Suspended Single-Walled Carbon Nanotubes in a Centrifugal Field.* Ma, Xiangchao, 2008. **24**(5): p. 1790-1795.
104. Arzenšek, D., *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions.* 2010.
105. Moon, Y.K., et al., *Synthesis of Length-Controlled Aerosol Carbon Nanotubes and Their Dispersion Stability in Aqueous Solution.* Ma, Xiangchao, 2009. **25**(3): p. 1739-1743.
106. Smith, B., et al., *Colloidal Properties of Aqueous Suspensions of Acid-Treated, Multi-Walled Carbon Nanotubes.* Environmental Science & Technology, 2008. **43**(3): p. 819-825.
107. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles.* Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.
108. Metin, C., et al., *Stability of aqueous silica nanoparticle dispersions.* Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(2): p. 839-850.
109. Sager, T.M., et al., *Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity.* Nanotoxicology, 2007. **1**(2): p. 118-129.
110. Housni, A., et al., *Monodisperse Protein Stabilized Gold Nanoparticles via a Simple Photochemical Process.* The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(32): p. 12282-12290.
111. Simon, M., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity.* Nanotoxicology, 2010: p. 126-140.
112. Quintin, M., *Synthèse et caractérisation de nanoparticules et de nanocomposites, étude de leur comportement vis-à-vis de l'insertion électrochimique du lithium*, in *physico-chimie de la matière condensée*2006, Bordeaux 1.

113. Pinho, S.L.C., et al., *Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents.* Biomaterials, 2012. **33**(3): p. 925-935.
114. Zhao, J., et al., *Surface modification of TiO_2 nanoparticles with silane coupling agents.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, (0).
115. Benoit, R. *Technique d'analyse XPS*. Available from: www.sciencefrance.com.
116. Moulder, J., et al., *Handbook of X-ray Photoelectron Spectrocopy*. 1995.
117. Park, H.K., D.K. Kim, and C.H. Kim, *Effect of Solvent on Titania Particle Formation and Morphology in Thermal Hydrolysis of TiCl4.* Journal of the American Ceramic Society, 1997. **80**(3): p. 743-749.
118. Deng, C., P. F. James, and P. V. Wright, *Poly(tetraethylene glycol malonate)-titanium oxide hybrid materials by sol-gel methods.* Journal of Materials Chemistry, 1998. **8**(1): p. 153-159.

Chapitre 3 : Challenges techniques liés à l'observation des nanomatériaux dans le vivant

Le développement des techniques de synthèse des nanomatériaux est associé à celui de la compréhension et de l'exploitation des propriétés nouvelles qui résultent de cet état de la matière. De plus, l'expérience des grands scandales sanitaires comme le cas de l'amiante a soulevé une méfiance sociétale envers les nouveaux matériaux et il devient urgent de procéder à de nombreuses études toxicologiques comme évoqué dans l'état de l'art.

Dans ce travail nous ferons appel à deux types de caractérisations : celles de NPs en tant telles (cf. chapitre 2 : zêtamétrie, MET, BET…..) et celles qui s'intéressent plus spécifiquement aux NPs en interactions avec les organismes biologiques qui seront développées dans ce chapitre. Ces techniques doivent tenir compte de la différence de taille qui existe entre les structures du vivant et les NPs. Typiquement, les plus petites cellules d'un être humain sont 10 à 100 fois plus grandes qu'une NPs (Figure 1). Détecter et localiser les NPs dans les cellules requiert donc l'utilisation combinée de techniques pour l'analyse *in vivo / in vitro* et de techniques pour l'analyse *in situ*.

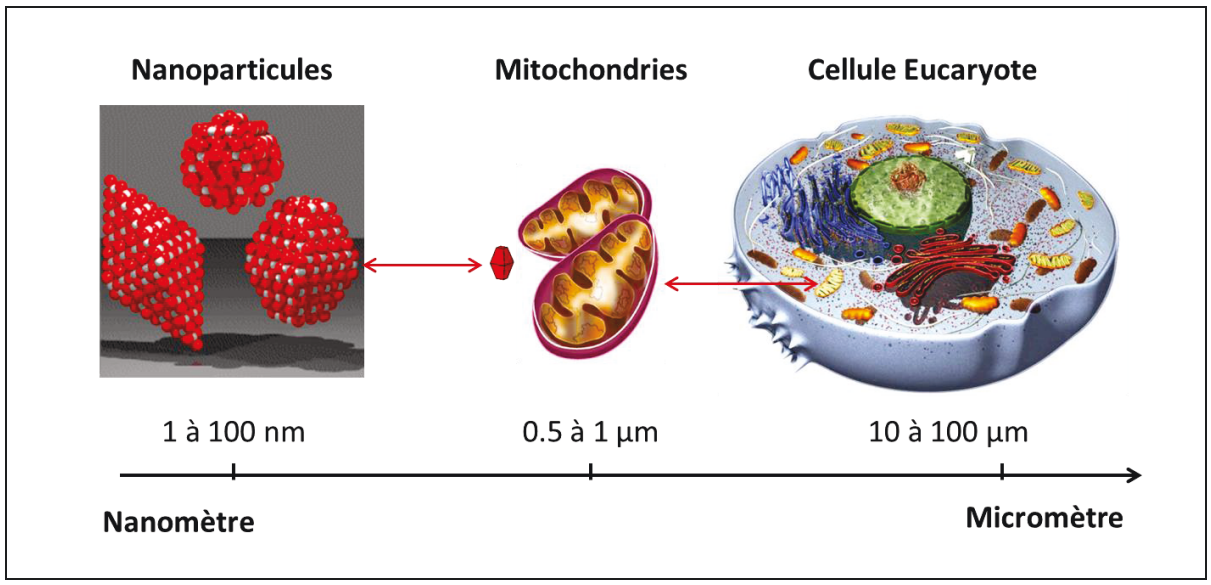


Figure 1 : Schématisation de la différence d'échelle entre les NPs et les structures du vivant (figure adaptée des références [1-3]).

La nanotoxicologie utilise des techniques classiquement utilisées en biologie allant de l'analyse *in vivo / in vitro* par des techniques de microscopie optique à l'analyse *ex vivo* par des techniques comme la microscopie électronique et les méthodes d'analyse par faisceaux d'ions. Le principe de ces techniques sera rappelé dans ce chapitre. Enfin, la microscopie corrélative mêlant ces différents types d'analyse sera expliquée.

1. Description des méthodes d'analyse

1.1. L'analyse *in vivo / in vitro* par microscopie optique et épi-fluorescence

1.1.1. Généralités

La microscopie optique (MO) est universellement utilisée en biologie car elle permet l'observation de tissus, de cellules ou de petits organismes vivants. Le principe est schématisé sur la Figure 2. La MO est une technique non intrusive qui donne la possibilité d'observer des échantillons biologiques *in vitro* ou *in vivo* sans perturber leur existence ou *ex vivo* dans un état figé. Un microscope est constitué d'un objectif et d'un oculaire reliés par un tube. L'éclairage se fait en transmission et requiert l'utilisation d'un condenseur qui focalise la lumière sur l'échantillon. La variation d'absorption naturelle des échantillons permet d'observer les structures biologiques.

La résolution spatiale d'un microscope limite la taille des détails observables d'un échantillon. Elle correspond, en microscopie, à la capacité à distinguer deux points. Dans le cas de la MO, la résolution d'un objectif est donnée par l'équation suivante :

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

Avec d la résolution, $\boldsymbol{\lambda}$ longueur d'onde et NA ouverture numérique de l'objectif qui dépend notamment de l'indice de réfraction en sortie d'objectif. Pour la MO la limite se situe vers 400 nm soit la limite de la longueur d'onde du visible [4, 5].

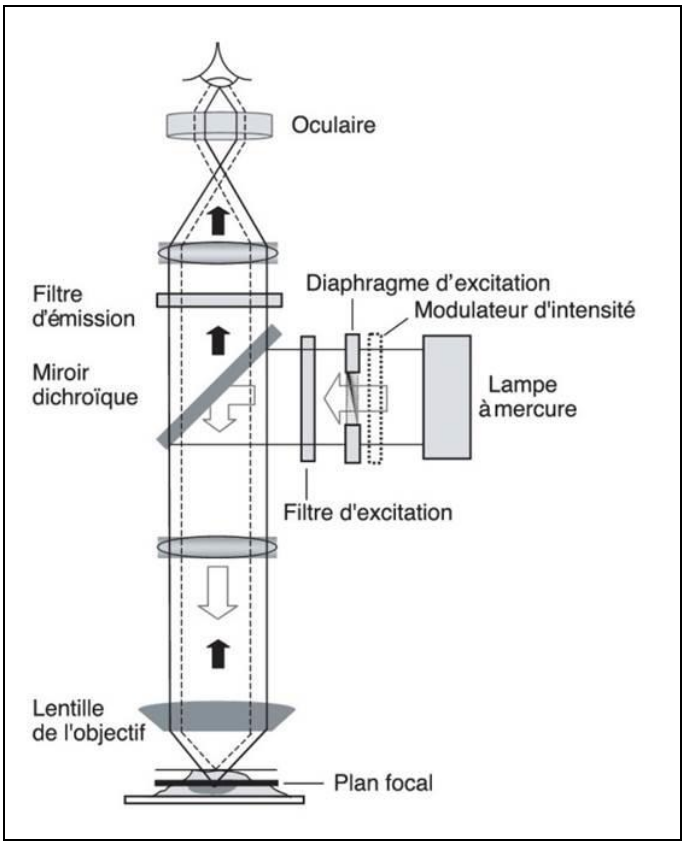


Figure 2 : Schéma d'un microscope optique ou à épi-fluorescence [6].

1.1.2. Microscopie à épi-fluorescence

1.1.2.1. Principe de la microscopie à épi-fluorescence

La microscopie à épi-fluorescence est un outil très sensible qui permet de détecter les molécules ou particules fluorescentes dans un compartiment spécifique. La combinaison de différentes méthodologies a en outre permis de comprendre beaucoup de mécanismes en rendant visibles des structures, des protéines ou encore des particules exogènes dans les milieux biologiques [7]. Les méthodes de détection par fluorescence sont basées sur l'utilisation d'agents fluorescents ou fluorophores directement greffés ou intégrés à une particule ou à une molécule. Ces techniques sont simples et permettent de réaliser des analyses *in situ* non destructives des échantillons biologiques. Les fluorophores peuvent être des colorants organiques, des protéines ou bien des complexes de métaux luminescents [8].

1.1.2.2. Principe de la fluorescence

Le phénomène de fluorescence est décrit par l'émission d'une lumière de longueur d'onde définie après l'absorption d'un rayon incident par la substance appelée fluorophore. L'émission de lumière correspond à la désexcitation d'un électron de la substance d'un état

d'énergie vers son état fondamental. Le phénomène de fluorescence suit un processus en trois étapes schématisées sur la Figure 3 (diagramme de Jablonski) : (i) tout d'abord, un photon incident provenant d'une source externe est absorbé par le fluorophore excitant un électron vers un état d'énergie supérieur noté S_1 ; (ii) l'état excité est instable et existe pendant un temps fini allant de 1 à 10 nanosecondes. Pendant ce temps, le fluorophore connait des variations de conformation sujettes à une multitude d'interactions possibles avec l'environnement. Lors de cette désexcitation, une partie de l'énergie est généralement perdue de manière non radiative ; (iii) Un photon est émis ramenant le fluorophore à un état d'énergie fondamental S_0. A cause de l'énergie dissipée lors de la phase (ii), le photon émis a une énergie inférieure à celle du photon incident et donc une longueur d'onde supérieure. La différence d'énergie, appelé déplacement de Stokes, est essentielle car elle permet de détecter le photon émis, avec un bruit de fond réduit, isolé des photons incidents [9].

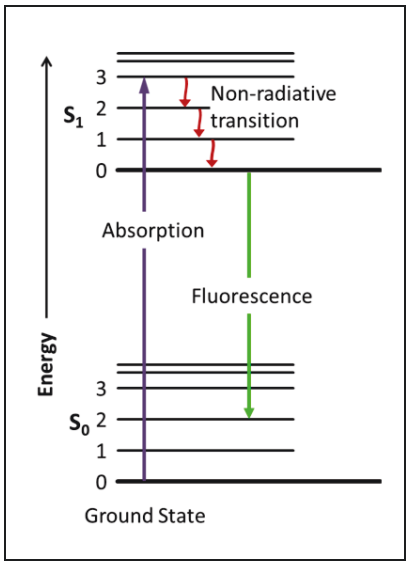


Figure 3 : Diagramme de Jablonski montrant le mécanisme de la fluorescence. Les traits horizontaux représentent les niveaux d'énergie disponibles. L'absorption d'un photon entraine l'excitation d'un électron qui se désexcite ensuite de manière non radiative et par émission de fluorescence.

Le déplacement de Stokes est schématisé sur Figure 4. La figure montre les courbes d'excitation / émission de trois fluorophores courants : le Hoechst, la GFP et la rhodamine. Les trois types de fluorophores présentent un déplacement de Stokes suffisant pour séparer les signaux incidents / émis à l'aide de filtres chromatiques adaptés.

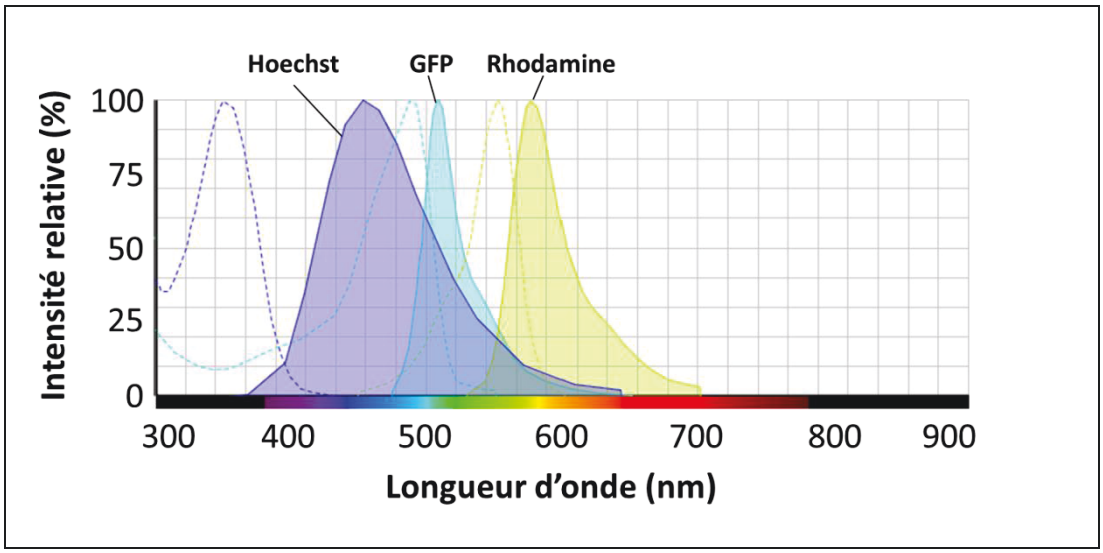


Figure 4 : Courbes d'excitation / émission de trois fluorophores : le Hoechst, la GFP et la rhodamine [10].

Un même fluorophore peut être excité / désexcité de manière cyclique générant des milliers de photons détectables. En ce sens, la microscopie à épi-fluorescence est une technique très sensible. L'intensité de fluorescence est également quantitativement dépendante de l'absorbance (A_λ) définie par la loi de Beer-Lambert établissant une relation entre la concentration (c) d'une solution, son coefficient d'extinction (ε_λ) et la distance du trajet optique (l) à une longueur d'onde ($\boldsymbol{\lambda}$) selon l'équation [11, 12] :

$$A_\lambda = \log\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} = \varepsilon_\lambda lc$$

Avec I^0_λ l'intensité du faisceau incident et I_λ l'intensité transmise. La microscopie à épi-fluorescence est donc une technique particulièrement adaptée pour l'étude des phénomènes biologiques à l'échelle cellulaire. La fluorescence peut cependant être altérée dans des conditions d'illumination intense. Le fluorophore peut en effet être détruit de manière irréversible ; ce phénomène est appelé photo-bleaching [9].

1.1.2.3. Fluorophores courants

1.1.2.3.1. La Green Fluorescent Protein (GFP)

La GFP est une protéine issue d'une méduse bioluminescente l'*Aequorea victoria*. Cette protéine découverte en 1962 est utilisée aujourd'hui en biologie pour mesurer l'expression de gènes et localiser les protéines associées. Cette utilisation a été rendue possible par le clonage de la séquence génétique permettant sa production, qui peut ensuite

être ajoutée à une autre séquence choisie chez un autre animal. La protéine issue de cette dernière devient alors fluorescente et peut donc être détectée. La détection de la GFP permet ainsi de suivre des évènements moléculaires en temps réels dans des échantillons vivants. Couplée à des protéines spécifiques, la GFP peut également permettre de marquer des structures cellulaires comme les organites ou le cytoplasme [9, 13, 14]. Un exemple de cellule avec les lysosomes marqués à la GFP est visible sur la Figure 5 b) et c). La GFP est excitée à une longueur d'onde de 475 nm (bleu) et émet à 508 nm (vert).

1.1.2.3.2. Le Hoechst

Le Hoechst (33342) est un fluorophore bleu utilisé pour colorer l'ADN. Il s'agit d'un agent intercalant de l'ADN, qui permet de distinguer le noyau cellulaire en microscopie à épi-fluorescence. Il est alors possible de réaliser des comptages cellulaires ou simplement de récolter des informations sur les cellules. La Figure 5 a) et c) montre un exemple de cellule dont le noyau a été marqué avec du Hoechst. Ce marqueur est excité à 350 nm (UV) et émet à 461 nm (bleu).

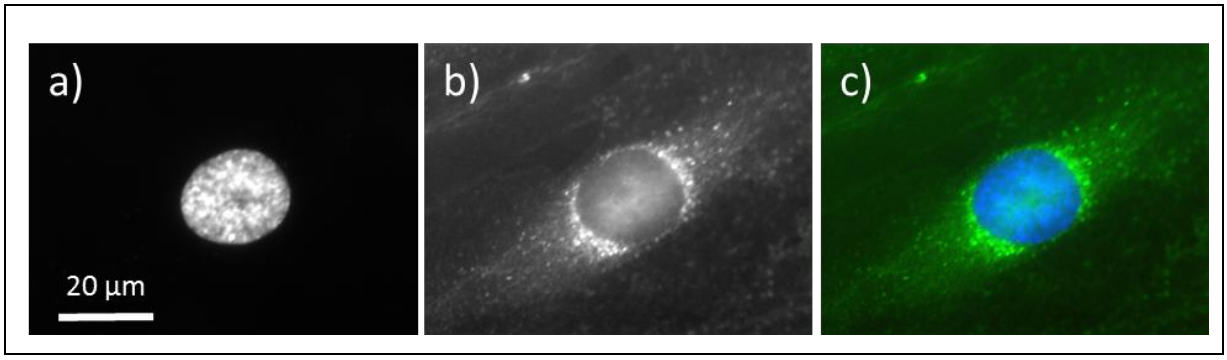


Figure 5 : Cellule HUVEC avec a) le noyau cellulaire marqué avec du Hoechst^{33342}, b) les lysosomes marqués à la GFP et c) le mélange des images (images réalisées au laboratoire (cf. chapitre 4)).

1.1.2.3.3. Les NPs fluorescentes

Les NPs de TiO_2 peuvent également être détectées et localisées par microscopie à épi-fluorescence [15, 16]. Pour ce type d'analyse, des fluorophores doivent être greffés sur les NPs. La fluorescéine et la rhodamine sont les deux fluorophores qui ont été utilisés pour cette étude. La fonctionnalisation permet de réaliser le suivi en temps réel de la localisation des NPs dans les cellules. Les NPs fluorescentes peuvent également être observées dans les petits animaux comme *C. elegans*. La méthode de fonctionnalisation est décrite dans le chapitre 2. La Figure 6 montre les diagrammes d'excitation / émission des deux fluorophores. Le choix

du fluorophore dépend généralement des autres agents fluorescents présents dans l'échantillon. Par exemple, pour détecter des NPs dans une cellule marquée avec du Hoechst et de la GFP (Figure 5), la rhodamine sera plus adaptée car elle fluoresce dans le rouge (620 nm). La fluorescéine ne convient pas dans ce cas car elle interfère avec la GFP en émettant dans le vert (525 nm).

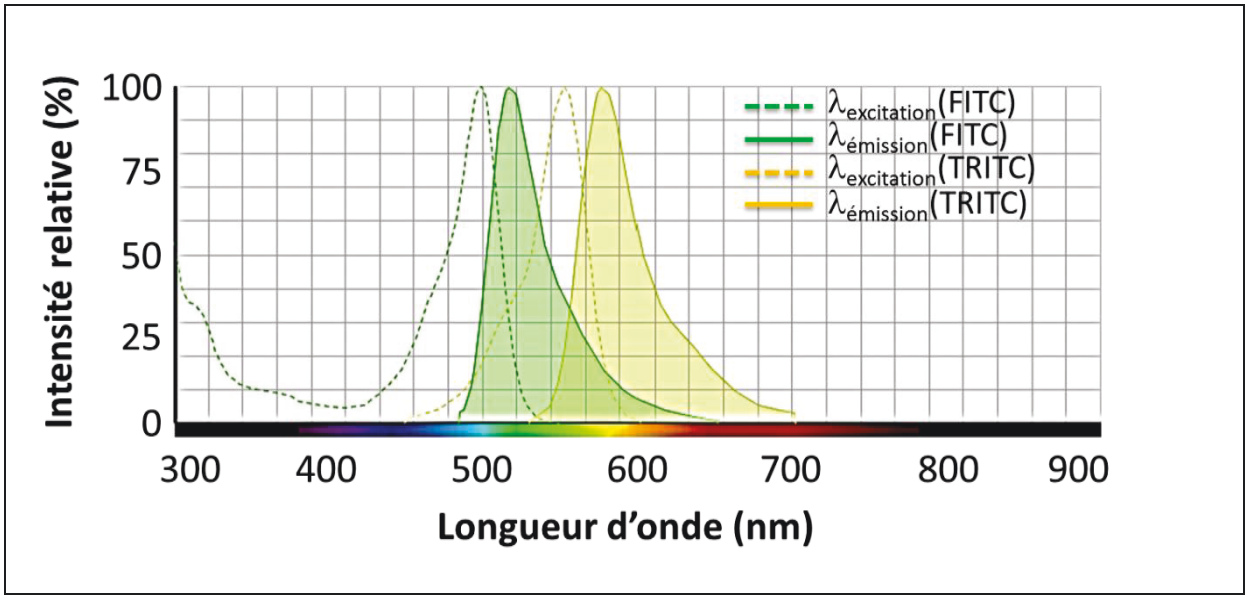


Figure 6 : Courbes d'excitation / émission de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et de la rhodamine B isothiocyanate (TRITC) [10].

1.1.2.4. Quantification des NPs par microscopie à épi-fluorescence

La quantité de nanoparticules dans les cellules et plus généralement dans les modèles biologiques peut être évaluée localement en utilisant la MO. L'intensité du signal de fluorescence détectée dans les cellules exposées aux NPs dépend de leur nombre, de la quantité de fluorophores greffés et de la sensibilité des caméras de microscopie mais aussi des interactions avec le milieu. La quantité de fluorophores et la sensibilité étant constantes, le nombre de NPs peut être calculé à l'aide de la loi de Beer-Lambert. La quantification des NPs nécessite cependant une calibration préalable en utilisant des standards de concentrations connues. L'intérêt majeur de la quantification par MO est qu'elle peut être réalisée *in vivo* et qu'il est ainsi possible de réaliser des suivis dans le temps. La précision des mesures de concentrations demeure cependant assez faible ce qui en constitue la principale limite [17-20]. Dans le cas de NPs fluorescentes, les imprécisions peuvent notamment venir de l'agrégation des particules [21].

1.1.2.5. La microscopie confocale

La microscopie confocale (MC) permet de générer des reconstructions en trois dimensions d'échantillons biologiques. L'efficacité de cette technique réside dans la possibilité d'éliminer, à l'aide d'un collimateur, les signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal étudié qui peuvent altérer l'image de l'échantillon.

Le principe de la MC diffère fondamentalement de la MO. Dans la MO, l'échantillon est uniformément illuminé et l'ensemble du signal est capté par les objectifs. Il peut en résulter des effets de flou provenant des plans focaux inférieurs ou supérieurs. La MC utilise un principe d'illumination séquentielle à l'aide de lasers. La lumière émise est focalisée sur un point précis localisé dans l'espace et dans le temps et conduit par un système de balayage. Le diaphragme de détection appelé « pinhole » (trou d'aiguille) a un rôle prépondérant dans l'élimination du signal indésirable. Les MC utilisent un laser comme source d'excitation car il s'agit d'une source facilement focalisable, la lumière d'un laser étant cohérente (sans interférence) et unidirectionnelle. Le schéma d'un MC est montré sur la Figure 7 [22, 23].

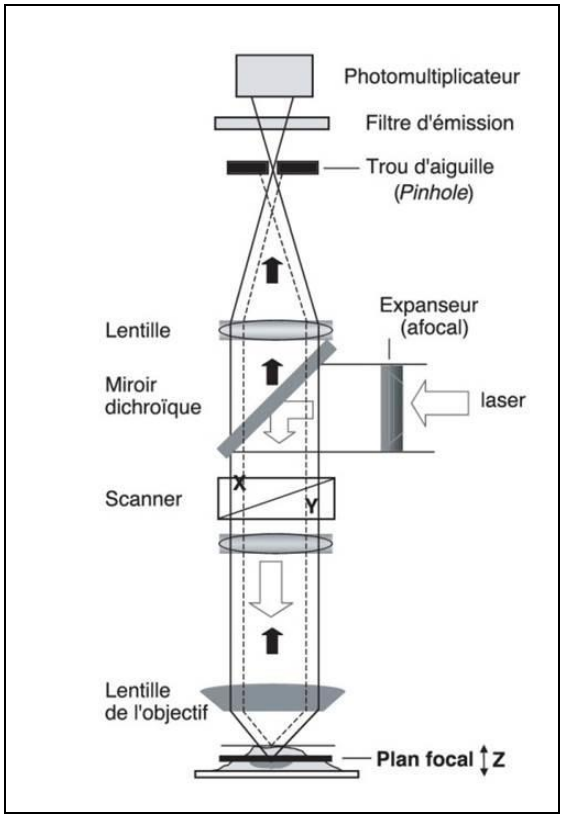


Figure 7 : Schéma d'un microscope confocale [6].

La MC présente des avantages importants par rapport à la MO : (i) le signal indésirable provenant des plans focaux non étudiés est réduit grâce au pinhole ce qui (ii)

permet également l'obtention de coupes optiques très fines (500 nm). La résolution de l'image est améliorée d'un facteur deux par rapport à de la MO (200 nm) et (iii) l'excitation est focalisée ce qui réduit les phénomènes de photo-bleaching autour du point analysé. (iv) Il est enfin possible de réaliser des reconstructions 3D des échantillons.

1.2. L'analyse *ex vivo* et *in situ*

1.2.1. La fixation des échantillons

La fixation permet de conserver et d'observer un échantillon biologique dans un état figé se rapprochant le plus possible de l'état physiologique. La fixation empêche également que les échantillons ne se dégradent en bloquant les réactions biochimiques. En effet, lorsque les tissus sont extraits de leur hôte (ou milieu), les cellules meurent et déversent leurs enzymes ce qui provoque leur autodigestion. La présence de bactéries dans le milieu ambiant peut également entrainer la putréfaction des tissus. Il existe deux voies principales de fixation choisies selon la méthode d'analyse envisagée.

1.2.1.1. La fixation chimique

La fixation chimique consiste à stabiliser les structures biologiques hydratées par la création de nouvelles liaisons chimiques. Cette méthode consiste à créer de longues chaînes insolubles par pontage des molécules organiques à l'aide d'un agent chimique (fixateur) permettant la déshydratation des tissus. L'agent chimique fixateur peut être un aldéhyde (ex : paraformaldéhyde) ou un oxydant puissant (ex : tétroxyde d'osmium) [24].

L'échantillon vivant est prélevé de son milieu le plus rapidement possible puis immergé dans la solution fixatrice. Cette technique entraîne la déshydratation des tissus sans détruire la structure générale. L'échantillon peut ensuite être enrobé avec une résine pour le conserver. L'intérêt d'utiliser la fixation chimique est qu'il est possible d'observer les structures d'une cellule ou d'un petit organisme vivant figé dans un état donné. L'utilisation de marqueurs fluorescents permet par ailleurs d'identifier précisément des organites cellulaires ou des organes ciblés. Dans notre cas, la localisation des NPs fluorescentes est également rendue possible. Le principal inconvénient de cette technique provient de la déshydratation rapide associée à l'apport non négligeable de molécules exogènes qui limitent l'analyse chimique. L'étude de la répartition des éléments chimiques et la localisation des ions diffusibles est alors rendue impossible.

1.2.1.2. La fixation physique

1.2.1.2.1. Fixation en plongée

La fixation physique ou cryofixation consiste à stabiliser les structures biologiques fortement hydratées par le froid puis à les déshydrater par lyophilisation. Cette technique consiste à plonger l'échantillon dans un solvant organique (ex : isopentane) refroidi à l'azote liquide (-196 °C) qui se substitue à l'eau puis à le sécher à froid dans un lyophilisateur. Ce type de fixation permet de conserver parfaitement les structures biologiques, ne déplace ni les petites molécules, ni les ions diffusibles et permet l'analyse chimique des échantillons.

Le procédé de congélation est cependant difficile à maitriser et la formation de cristaux de glace est souvent observée. Il peut en résulter la dégradation des échantillons ou bien l'apparition d'artéfacts dans les structures biologiques. De plus, l'équipement nécessaire est couteux et l'ensemble des manipulations doivent être réalisés en atmosphère sèche [24].

1.2.1.2.2. Fixation haute pression

La méthode de fixation en plongée est très efficace pour les échantillons très fins comme les monocouches cellulaires en culture. Cette méthode n'est en revanche pas adaptée à la fixation d'échantillons plus épais (~ 200 µm) tels que des tissus ou des petits organismes pluricellulaires comme *C. elegans* (cf. chapitre 5). Pour ce type d'échantillon, il existe une technique de fixation utilisant de l'azote liquide sous une pression de 2 000 bar. La pression permet tout d'abord une vitrification plus rapide de la matière organique avec une vitesse d'environ 20 000 K/s. Elle agit également sur les propriétés de vitrification de l'eau en abaissant la température de fusion de l'eau et donc en réduisant les chances de former des cristaux de glace. Enfin, la pression réduit le volume des substances gazeuses présentes dans les échantillons évitant la formation de bulles. La fixation haute pression requiert cependant l'utilisation d'équipements lourds et couteux [25].

1.2.2. L'inclusion en résine et la microtomie

Pour observer les tissus par des techniques utilisant la transmission, les échantillons doivent être assez fins pour laisser passer le projectile (électrons, ions ou photons). L'inclusion en résine des échantillons biologiques consiste à infiltrer puis à enrober des tissus en vue de les diviser en coupes ultrafines par la suite. La résine est d'abord diluée dans un solvant organique qui est ensuite injecté dans l'échantillon. L'évaporation du solvant entraine

ensuite le durcissement de la résine. Les blocs de résine sont ensuite découpés selon l'épaisseur voulue à l'aide d'un microtome. Les coupes obtenues sont enfin observées par la technique adéquate [24].

1.3. Analyse par microscopie électronique

1.3.1. Microscopie électronique en transmission (MET)

La MET est une technique très couramment utilisée par les chimistes travaillant avec des nanomatériaux. Cette technique utilise le même principe que la MO mais remplace le faisceau lumineux par un faisceau d'électrons. La MET permet ainsi d'atteindre des résolutions de l'ordre du nanomètre.

Les électrons sont produits dans une chambre sous vide puis focalisés à l'aide de lentilles magnétiques. Le flux d'électrons traverse ensuite l'échantillon et est collecté. La MET est parfaitement adaptée à l'observation des NPs de taille allant de quelques nanomètres à plusieurs microns. Dans le cas des coupes de tissus biologiques préparées par fixation et microtomie, l'analyse n'est possible que si la découpe est assez fine. Les électrons sont en effet rapidement ralentis ou stoppés par la matière ce qui limite l'observation à des coupes ultrafines à quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur (70 nm). L'observation des tissus requiert également l'utilisation d'agents contrastants tels que le tétroxyde d'osmium. La MET est par ailleurs une technique qui fonctionne exclusivement sous vide. Les échantillons biologiques contenant de l'eau, ils doivent en conséquence être fixés.

1.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB est une technique permettant l'observation de la topographie des surfaces. Elle est principalement fondée sur la détection d'électrons secondaires ou rétrodiffusés générés sous l'impact d'électrons primaires qui balayent la surface observée. Les électrons rétrodiffusés proviennent d'interactions élastiques avec la matière ce qui signifie que la totalité de l'énergie cinétique de l'électron incident est conservée. Seule la direction de propagation est modifiée. Les électrons rétrodiffusés ont donc une énergie suffisante (allant jusqu'à 30 KeV) pour traverser la matière sur une épaisseur variant de 0,1 à 1 µm ce qui permet d'observer les structures proches de la surface des échantillons. Les électrons secondaires sont à l'opposé issus d'interactions inélastiques dans lesquelles une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne. Les électrons émis sont en conséquence

moins énergétiques (5 à 10 eV) et traversent très peu de matière. Ils sont ainsi très sensibles aux irrégularités de surface, même minimes, ce qui permet l'observation très précise de la topographie des échantillons. Lors d'interactions inélastiques entre un électron primaire et un électron de cœur de l'atome cible, il peut y avoir un transfert d'énergie susceptible d'ioniser le niveau considéré. Le réarrangement de la structure électronique peut se traduire par l'émission de photons X caractéristiques permettant l'analyse de la composition chimique : c'est l'analyse dispersive en énergie ou EDX (Energy-dispersive X-ray spectrocopy) [26].

La MEB requiert idéalement que la surface à analyser soit conductrice pour évacuer efficacement les électrons incidents et éviter leur accumulation ; cela provoque en général une surbrillance qui perturbe l'observation. L'utilisation de microscopes à vide partiel, aussi appelés MEB environnementaux permet de s'affranchir de cette contrainte. En effet, les électrons accumulés sont dans ce cas neutralisés par les charges positives provenant majoritairement de l'azote atmosphérique.

1.4. Analyse par faisceau d'ions

Les biologistes disposent d'un grand nombre d'outils pour observer et comprendre les organismes biologiques. L'utilisation des techniques conventionnelles décrites ci-dessus permet de répondre à beaucoup de questions mais peut parfois s'avérer insuffisante pour expliquer certains phénomènes. En ce sens l'utilisation de techniques moins conventionnelles peut être un plus pour les analyses toxicologiques. La plate-forme AIFIRA du CENBG dispose d'un accélérateur de particules permettant de réaliser de la microanalyse par faisceau d'ions. Cette technologie a été utilisée pour répondre à certaines problématiques au cours de cette étude.

1.4.1. Principe de la méthode

1.4.1.1. Généralités

La microanalyse par faisceau d'ions (Ion Beam Analysis : IBA) regroupe différentes techniques basées sur la détection de particules ou rayonnements qui accompagnent l'interaction des ions légers (protons : H^+, alphas : He^+, deutons D^+) dans la matière. Ce type d'analyse nécessite un faisceau avec une énergie de quelques mégaélectronvolts (10^6 eV). Une microsonde nucléaire utilise un faisceau focalisé et permet par un système de balayage de faire des images en densitométrie et des cartographies des éléments chimiques [27].

1.4.1.2. La plate-forme AIFIRA

Le CENBG s'est doté il y a quelques années d'une plate-forme appelée AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) proposant cinq lignes dont deux microsondes, une ligne d'analyse macroscopique, une ligne d'analyse à l'air et une ligne de physique expérimentale (Figure 8). Dans cette étude nous avons utilisé la ligne montrée sur la Figure 8 f) qui est nano-focalisée. Le système est alimenté par un accélérateur de particule de 3,5 MeV Singletron^{TM} (HVEE, The Netherlands) qui sert de source d'ions pour l'analyse. Le faisceau qui en découle est focalisé, sous vide, grâce à un système utilisant des quadripôles magnétiques et un système de balayage permet de réaliser les cartographies [28, 29].

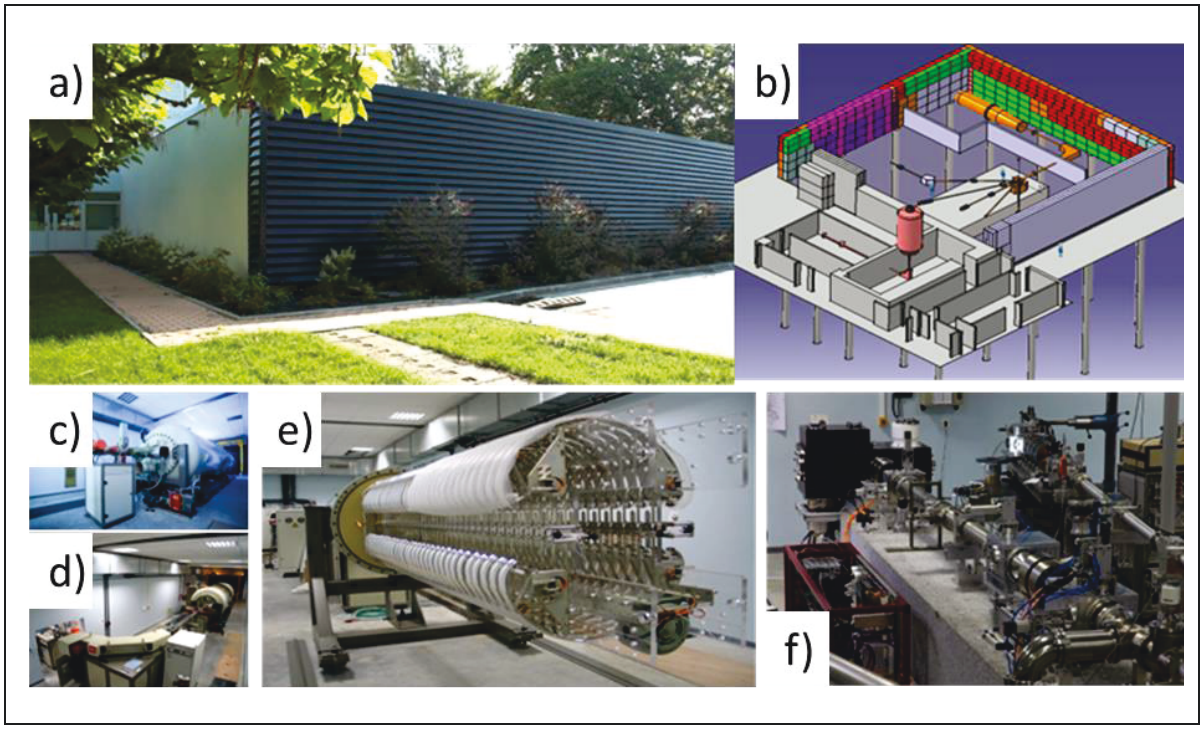


Figure 8 : a) Vu extérieure de la plate-forme AIFIRA, b) schéma de l'accélérateur des différentes lignes, c) photo de la cuve de l'accélérateur, d) de l'aimant d'analyse, e) section accélératrice et f) la ligne « nano » terminée par la boite objet maintenue sous vide lors des expériences.

1.4.1.3. Interactions ions-matière

Lorsqu'un faisceau de particules chargées pénètre dans la matière, différentes interactions peuvent se produire. Lors de son passage dans la cible, l'ion incident peut interagir avec les noyaux atomiques ou bien avec le cortège électronique. Les interactions avec les atomes de la cible sont principalement d'origine électronique. Les ions transmettent

leur énergie aux électrons créant une forte ionisation. La différence entre la masse d'un atome et d'un électron étant significative, les ions sont peu déviés et suivent leur trajectoire de manière rectiligne. Lors de leur passage, les ions peuvent cependant, le cas échéant, percuter des noyaux atomiques déviant ainsi leur trajectoire. Ces différentes interactions possibles sont schématisées sur la Figure 9. Les différentes techniques d'analyse qui en découlent sont décrites ci-dessous.

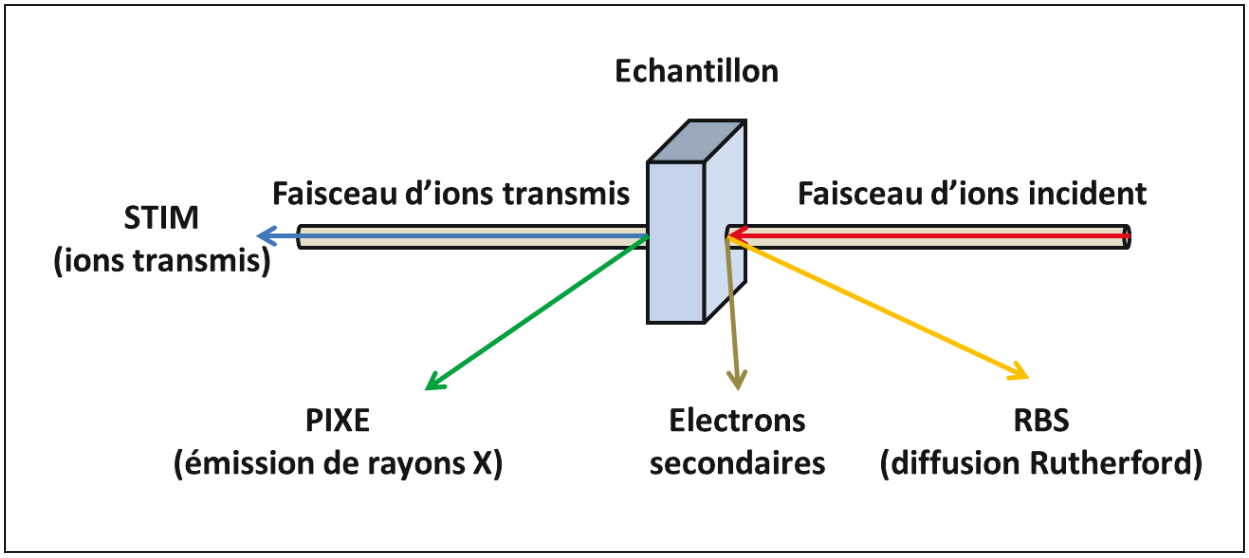


Figure 9 : Techniques d'analyses par faisceau d'ions. Les techniques utilisées dans cette étude sont la STIM, l'émission d'électrons secondaires, la PIXE et la RBS [29].

1.4.2. Les principales méthodes d'analyse

1.4.2.1. Microscopie ionique en transmission (STIM)

1.4.2.1.1. Principe de la technique

La méthode STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) est une méthode d'imagerie densitométrique basée sur la mesure de la perte d'énergie des ions incidents pendant leur passage dans la matière. L'énergie perdue est directement associée à la quantité de matière traversée. L'échantillon doit en conséquence être assez fin pour laisser passer les ions mais assez épais pour que la perte d'énergie soit mesurable par le détecteur semi-conducteur placé derrière l'échantillon. Dans les échantillons biologiques, l'épaisseur maximale traversée est de l'ordre de 100 µm pour les protons de 3 MeV et de 10 µm pour les alphas. Ces derniers, plus lourds, sont plus facilement ralentis par la matière et donc adaptés pour l'analyse de tapis cellulaires très fins. Les protons conviennent pour analyser les *C. elegans*, plus épais. L'image

obtenue est une projection de la densité de l'échantillon ; l'équivalent d'une radiographie pour les rayons X [30-32].

La STIM utilise un faisceau de faible intensité (< femto-ampère) et peut donc offrir une résolution spatiale de l'ordre de la centaine de nanomètre pour des temps d'analyse courts (quelques minutes) [32]. Elle a été utilisée dans cette étude pour l'imagerie et également pour permettre la mesure de masse des échantillons pour la quantification.

1.4.2.1.2. Reconstruction des images et calcul de la masse

L'analyse par faisceau d'ion se fait par balayage de la cible point par point à l'instar des microscopies confocales ou électroniques à balayage. A chaque point, le détecteur collecte les particules, l'énergie moyenne transmise est calculée et un spectre est enregistré. L'ensemble peut ensuite être sommé et visualisé comme sur la Figure 10 a). L'utilisation du logiciel « Supavisio » permet ensuite de reconstruire la cartographie en densité de l'échantillon, chaque intensité pouvant être assimilée à une valeur de gris. Un exemple de tapis cellulaire reconstruit est montré sur la Figure 10 b).

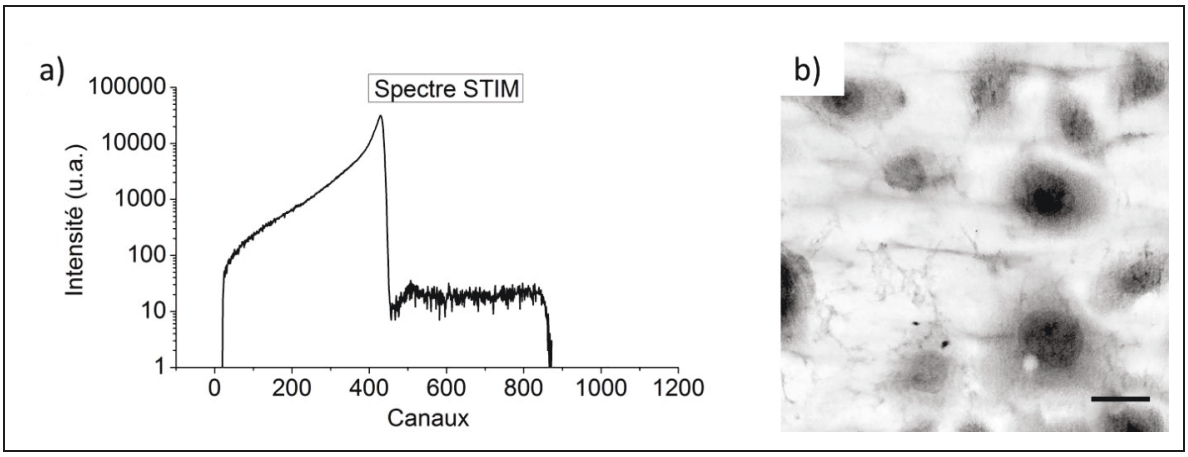


Figure 10 : a) Exemple de spectre STIM et b) reconstruction de cellules observées en STIM (échelle 20 µm).

1.4.2.1.3. Analyse quantitative

L'imagerie STIM donne une projection 2D des échantillons et n'apporte donc pas d'information sur l'épaisseur de celui-ci. Cependant, la perte d'énergie des ions est proportionnelle à la quantité de matière traversée. La mesure du pouvoir d'arrêt ε est donc possible ce qui permet de remonter à la masse surfacique d'un échantillon ρ.dx (en µg/cm²) par l'équation suivante :

$$\rho . dx = \frac{M}{N_A}\left(\frac{dE}{\varepsilon}\right)$$

Avec M la masse molaire de l'élément considéré, N_A le nombre d'Avogadro et dE la variation d'énergie de l'ion incident. Dans le cas des matériaux poly-atomiques, comme la matière organique, les pouvoirs d'arrêt des différents éléments sont pondérés par leur abondance et additionnés [32]. La mesure de la masse surfacique est, comme expliqué plus bas, essentielle pour la quantification des éléments chimiques dans l'échantillon.

1.4.2.2. Emission de rayons X induits par faisceau d'ions (PIXE)

1.4.2.2.1. Principe de la technique

La technique PIXE (Particle-Induced X-ray Emission) est la technique analogue au MEB-EDX pour l'IBA. Elle utilise les protons comme projectiles. Lorsque les particules chargées traversent l'échantillon, les atomes cibles sont ionisés. Le cortège électronique se réorganise alors rapidement pour retourner à l'état fondamental. Comme pour l'EDX, le réarrangement de la structure électronique de l'atome peut conduire à l'émission d'un photon X spécifique. La méthode PIXE repose sur la détection des rayonnements X. L'énergie donne la nature des atomes ionisés et l'intensité permet de les quantifier. La Figure 11 illustre l'interaction inélastique avec a) l'ionisation et b) la relaxation qui s'en suit avec émission d'un photon X.

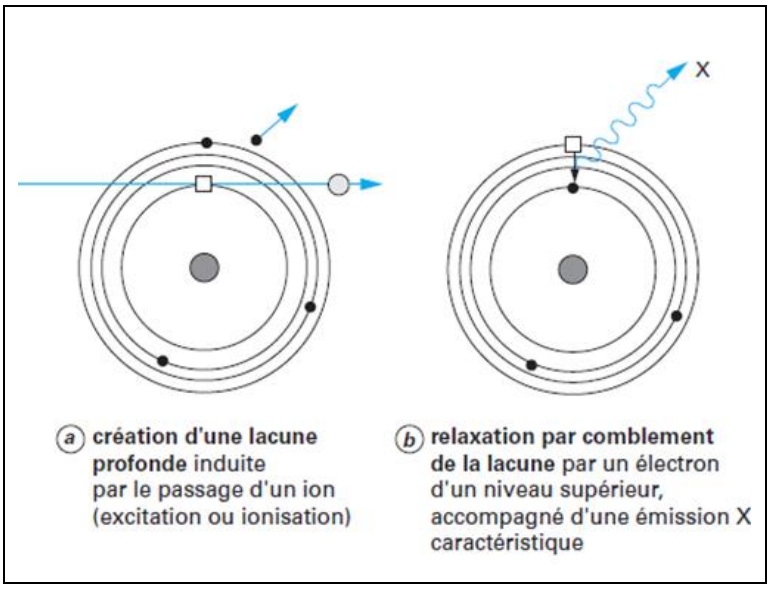


Figure 11 : a) Ionisation d'un atome cible au passage d'une particule chargée et b) relaxation de l'atome cible avec émission d'un photon X [27].

Contrairement aux électrons, les ions ne sont pas rapidement stoppés à la surface des échantillons et les traversent intégralement s'ils sont assez fins. Dans le cas des tapis cellulaires et de *C. elegans*, il est ainsi possible de cartographier tout le volume de l'échantillon. Les ions sont également moins déviés par le rayonnement continu de freinage que les électrons c'est-à-dire le champ électrique des noyaux cibles ce qui permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 1 µg/g.

1.4.2.2.2. Reconstruction des images PIXE

Les photons X émis sont mesurés par un détecteur semi-conducteur haute résolution de type Silicium-Lithium (Si-Li). L'énergie minimale des photons pouvant être mesurée par ce type de détecteur est de l'ordre de 1 keV. Par conséquent, la technique donne accès à tous les éléments dont le numéro de masse atomique est supérieur ou égal à 11 ($Z \geq 11$, Na). Un exemple de spectre PIXE est montré en Figure 12. Chaque pic correspond à un élément chimique. Pour les éléments les plus lourds, les raies d'émission K_α et K_β sont visibles. Il n'est pas possible de dissocier les raies pour les éléments les plus légers à cause de la résolution en énergie du détecteur qui est insuffisante. Les deux raies sont visibles à partir du chlore. Le potassium et le calcium se recouvrent par ailleurs partiellement.

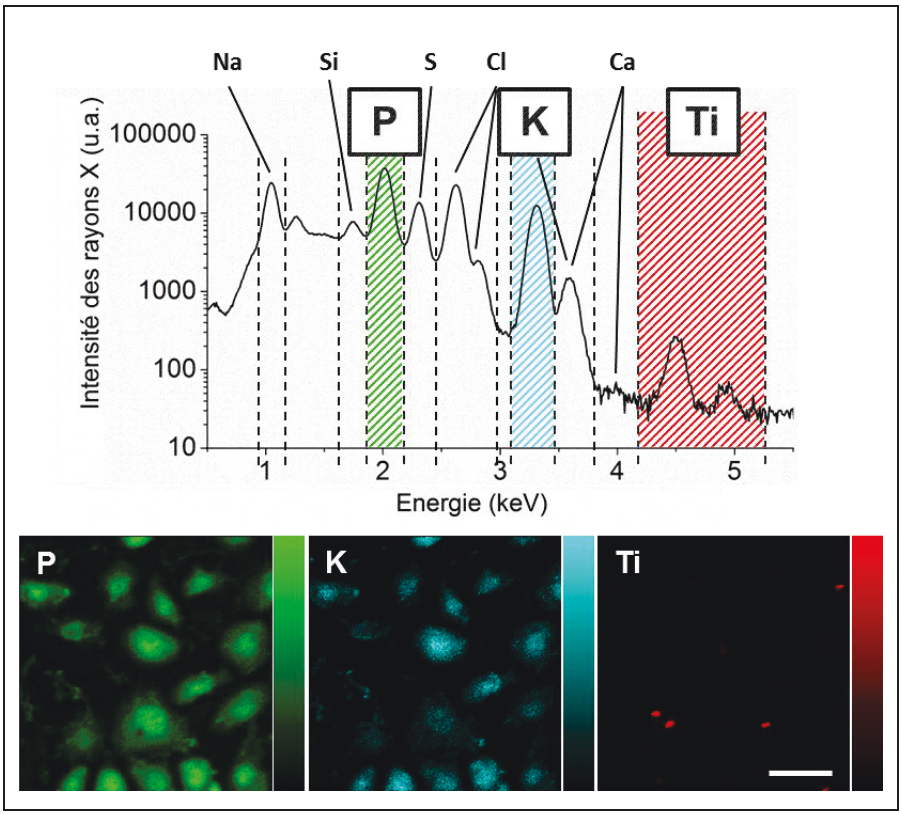


Figure 12 : Exemple de spectre PIXE et répartitions élémentaires du phosphore, du potassium et du titane de kératinocytes exposés aux NPs de TiO_2 (échelle 40 µm).

Comme pour la STIM, le spectre montré en Figure 12 est une moyenne d'un l'ensemble des spectres correspondant à une zone de l'échantillon. Il est possible de reconstruire les cartographies des éléments chimiques en sélectionnant un domaine d'énergie caractéristique d'un élément à l'aide du logiciel « *Supavisio* ». Un exemple de reconstruction est montré sur la Figure 12. Les cartographies des éléments phosphore, potassium et titane permettent de visualiser les cellules sur l'échantillon et également de localiser les NPs de TiO_2. L'intensité des rayons X émis par l'échantillon dépend de la concentration des éléments chimiques. Pour la quantification, les spectres PIXE dont simulés à l'aide du logiciel « *Gupix* » développé pas Campbell et *al.* à l'Université de Guelph (Canada) [33]. Ce logiciel permet par ailleurs de séparer les contributions des pics qui se recouvrent.

1.4.3. Spectroscopie de rétrodiffusion Rutherford (RBS)

L'analyse RBS, pour Rutherford Backscattering Retrodiffusion, est basée sur l'étude de la diffusion élastique c'est-à-dire sur la conservation de l'énergie cinétique et de la quantité de mouvement du système projectile-cible. Lors du passage des particules chargées dans l'échantillon, certains ions peuvent être rétrodiffusés c'est-à-dire renvoyés à l'issu d'une collision avec un atome cible. Le schéma de l'interaction est montré sur la Figure 13. L'intérêt de cette technique est qu'elle découle de l'application directe des lois de la cinématique qui permet par simple mesure de l'énergie de l'ion rétrodiffusé non seulement l'identification du noyau diffuseur mais également sa localisation en profondeur dans l'échantillon [27, 34].

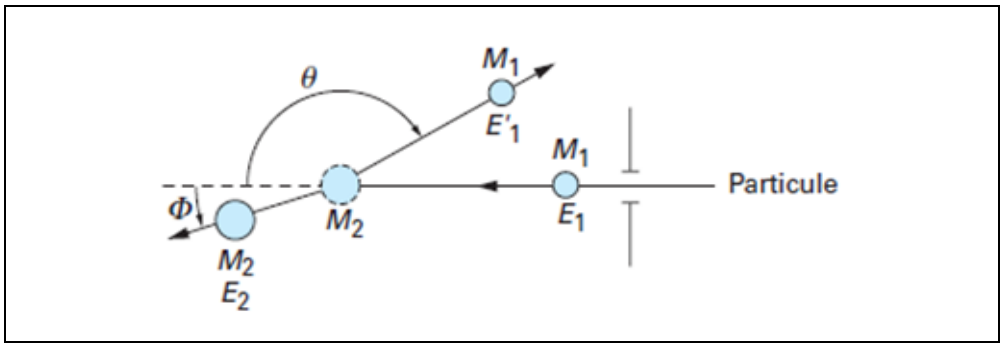


Figure 13 : Représentation schématique de la collision entre une particule de masse M_1, animée d'une vitesse V_0 et un atome de masse M_2 au repos (E_1=E'_1+E_2) [27].

La RBS est impliquée dans les calculs de quantification. Elle permet en effet de quantifier la charge déposée qui est proportionnelle au nombre d'ions envoyés sur la cible. Le nombre d'ions est essentiel pour la quantification comme expliqué ci-dessous. Le logiciel *SimNRA* permet de simuler les spectres RBS pour en extraire la charge et donc le nombre de particules incidentes [35].

1.4.4. Emission d'électrons secondaires

Lors de leur retour à l'état fondamental, les atomes ionisés génèrent aussi des électrons secondaires lors de processus non radiatifs. Ces électrons peuvent alors être détectés pour de l'imagerie. A l'image de la MEB, il est alors possible de caractériser la topographie des échantillons pendant l'analyse avec une profondeur inférieure à la centaine de nanomètre. La résolution de cette technique est cependant limitée à la taille du faisceau incident qui en PIXE, de l'ordre de 800 nm.

1.4.5. Quantification des éléments chimiques

Comme évoqué auparavant, l'IBA permet de réaliser la quantification des éléments chimiques *in situ*. La première étape pour le dosage des éléments chimiques est le choix d'une zone d'intérêt. Dans le cas des tapis cellulaires, la zone d'intérêt peut être une cellule ou bien seulement son noyau. L'intensité des rayons X émis (PIXE) donne le nombre de photons X émis (N_x) et donc les concentrations relatives des éléments chimiques dans les échantillons. Des analyses STIM et RBS sont ensuite extraits respectivement le nombre d'atome total (N_{atome}) et le nombre d'ions (N_{ions}). L'équation suivante permet enfin d'obtenir les concentrations absolues :

$$[concentration] = \frac{N_x}{N_{atomes}.N_{ions}.P_x}$$

Avec P_x la probabilité de création d'un photon X après ionisation d'un atome.

2. Microscopie corrélative

2.1. Principe et intérêt de la microscopie corrélative

La MO est une méthode dynamique d'observation de phénomènes moléculaires. Les méthodes de microscopies électroniques (ME) ou ioniques permettent d'aller plus loin dans l'analyse avec des informations sur les ultrastructures, sur la localisation des éléments chimiques ou encore sur leur concentration. Il existe cependant entre la MO et les autres microscopies un vide qui est comblé par la microscopie corrélative (correlative microscopy : CM)).

La CM est la combinaison de deux techniques ou plus ayant différentes résolutions spatiales ou temporelles pour caractériser la même région d'intérêt. Traditionnellement, la MO est utilisé pour les analyses *in vivo* / *in vitro* et la microscopie électronique (ME) pour les analyses *ex vivo*. Ces observations sont généralement conduites sur des populations différentes et le lien entre les observations est alors supposé. Cependant, certains évènements biologiques ou structures cellulaires sont assez rares et difficiles à observer en ME. Le but global de la CM est de combiner les informations contextuelles provenant de la MO avec la résolution de la ME pour s'affranchir des suppositions et relier les évènements observés entre eux. La CM peut également apporter des informations globales sur l'échantillon afin de savoir où chercher par la suite en ME. Par exemple, la localisation de NPs fluorescentes dans des cellules peut être effectuée en MO puis affinée par ME une fois la région d'intérêt définie. Cette combinaison de technique est très employée et est classiquement appelée CLEM (correlative light-electronic microscopy) [36-41]. D'autres techniques telles que l'IBA peuvent également être utilisées pour caractériser un échantillon observé en MO [42].

L'approche multimodale de la CM est aujourd'hui essentielle pour la compréhension de phénomènes complexes ou discrets. La toxicité des NPs de TiO_2 s'inscrit directement dans cette problématique.

2.2. Challenges techniques pour l'observation multimodale

La CM existe en tant que discipline à part entière car elle comporte des difficultés majeures. Il est en effet souvent très difficile de retrouver les régions d'intérêts dans le passage d'une technique à l'autre. Cette remarque est d'autant plus avérée lorsqu'il est nécessaire de réaliser des étapes de fixation et d'inclusion en résine. Pour faciliter la localisation des régions d'intérêt, des portes échantillons adaptés ont été développés [43, 44]. D'autres méthodes visant à synchroniser les méthodes de microscopie ont également été développées [37]. Enfin, un support universel capable de permettre, la culture biologique, la fixation et l'analyse peut être utilisé. Cette stratégie a été choisie au laboratoire et sera plus amplement décrite dans le chapitre 4 [45].

3. Conclusion

L'analyse toxicologique ne se résume pas à observer les phénomènes macroscopiques qui occurrent dans les échantillons biologiques. L'utilisation de différentes techniques d'analyses permet de se pencher sur les phénomènes se produisant à toutes les échelles. La MO permet de localiser les organites cellulaires, les molécules d'intérêt ou encore les particules exogènes. L'utilisation d'équipements plus lourds comme la ME permet ensuite d'accéder à de l'imagerie avec une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre pour observer plus finement les structures biologiques. La topographie peut ainsi être nettement caractérisée avec la MEB et les ultrastructures peuvent être observées en MET. Enfin, l'utilisation de méthodes complémentaires comme l'IBA permet de remonter aux concentrations élémentaires à l'échelle cellulaire ou subcellulaire.

Références

1. NutraNews. *L'acétyl-L-carnitine et l'acide alpha-lipoïque redonnent une nouvelle jeunesse à des rats âgés*. 2002; Available from: http://www.nutranews.org/.
2. Barnard, A. *Understanding Nanocrystal Shapes through Simulation*. 2004; Available from: http://nano.anl.gov/.
3. Bodin, L. *Nos cellules émecttrices de lumière*. Available from: http://stageslucbodin.canalblog.com/.
4. Roblin, G., *Microscopie.* Techniques de l'ingénieur Métrologie optique et photonique, 1998. **base documentaire : TIB143DUO**(ref. article : r6710).
5. Roblin, G., *Microscopie optique.* Roblin Gérard, 1999. **base documentaire : TIB143DUO**(ref. article : r6712).
6. Brown, S., et al., *L'apport de la microscopie et de l'imagerie en génomique*. 2004.
7. Fernando, L.P., et al., *Mechanism of Cellular Uptake of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles.* Biomacromolecules, 2010. **11**(10): p. 2675-2682.
8. Ruedas-Rama, M.J., et al., *Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review.* Anal. Chim. Acta, 2012. **751**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1-23.
9. Haugland, R., *Handbook of fluorescent probes and research products*. ninth edition ed. 2002: Molecular probes.
10. LifeTechnologies. *Fluorescence SpectraViewer*. Available from: www.lifetechnologies.com.
11. Banerjee, A., et al., *Concentration dependence of fluorescence signal in a microfluidic fluorescence detector.* Journal of Luminescence, 2010. **130**(6): p. 1095-1100.
12. Breuil, P. and D. Di Benedetto, *Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible.* Techniques de l'ingénieur Spectrométries, 2007. **base documentaire : TIB390DUO**(ref. article : p2795).
13. Kain, S.R., *Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery.* Drug Discovery Today, 1999. **4**(7): p. 304-312.
14. Tavare, J.M., L.M. Fletcher, and G.I. Welsh, *Using green fluorescent protein to study intracellular signalling.* J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 297-306.
15. Kamps, K., et al., *Surface modification of the TiO2 nanoparticle surface enables fluorescence monitoring of aggregation and enhanced photoreactivity.* Integrative Biology, 2013. **5**(1): p. 133-143.
16. Wang, K., et al., *Functionalized Silica Nanoparticles: A Platform for Fluorescence Imaging at the Cell and Small Animal Levels.* Accounts of Chemical Research, 2013.
17. Ha, S.-W., et al., *Bio-active engineered 50 nm silica nanoparticles with bone anabolic activity: Therapeutic index, effective concentration, and cytotoxicity profile in vitro.* Toxicology In Vitro, 2014. **28**(3): p. 354-364.
18. James, S.A., et al., *Quantification of ZnO Nanoparticle Uptake, Distribution, and Dissolution within Individual Human Macrophages.* Rivera, Gil Pilar, 2013. **7**(12): p. 10621-10635.
19. Liu, Y. and J. Wang, *Comparative and quantitative investigation of cell labeling of a 12-nm DMSA-coated Fe3O4 magnetic nanoparticle with multiple mammalian cell lines.* Journal of Materials Research, 2011. **26**(06): p. 822-831.
20. Neumeyer, A., et al., *Propidium iodide labeling of nanoparticles as a novel tool for the quantification of cellular binding and uptake.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. **7**(4): p. 410-419.
21. Zhang, X.-F., S. Liu, and X. Shao, *Fluorescence of chemically derived graphene: Effect of self-rolling up and aggregation.* Journal of Luminescence, 2013. **136**(0): p. 32-37.
22. St. Croix, C., S. Shand, and S. Watkins, *Confocal microscopy: comparisons, applications and problems.* BioTechniques, 2005. **39**.
23. Singh, A. and K.P. Gopinathan, *Confocal microscopy: a powerful technique for biological research.* Current science, 1998. **74**(10).

24. in2p3. *Microscopie electronique en transmission : guide de préparation des échantillons*. Available from: http://temsamprep.in2p3.fr/.
25. Studer, D., B. Humbel, and M. Chiquet, *Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution.* Histochemistry and Cell Biology, 2008. **130**(5): p. 877-889.
26. Ruste, J., *Microscopie électronique à balayage Principe et équipement.* Techniques de l'ingénieur Techniques d'analyse par imagerie, 2013. **base documentaire : TIB387DUO**(ref. article : p865).
27. Revel, G. and P. Berger, *Microsonde nucléaire Principe et appareillage.* Techniques de l'ingénieur Méthodes nucléaires d'analyse, 2005. **base documentaire : TIB389DUO**(ref. article : p2563).
28. Barberet, P., et al., *First results obtained using the CENBG nanobeam line: Performances and applications.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2011. **269**(20): p. 2163-2167.
29. www.cenbg.in2p3.fr. *Les techniques d'analyse par faisceau d'ions disponibles à AIFIRA*.
30. Jeynes, C., R.P. Webb, and A. Lohstroh, *Ion Beam Analysis: A Century of Exploiting the Electronic and Nuclear Structure of the Atom for Materials Characterisation.* Reviews of Accelerator Science and Technology, 2011. **04**(01): p. 41-82.
31. Simon, M., *Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro*, 2009, Université Bordeaux 1.
32. Devès, G., *Analyse chimique quantitative à haute résolution spatiale par microsonde et nanosonde nucléaires*, in *école doctorale des sciences chimiques*2010, Bordeaux 1.
33. Campbell, J.L., et al., *The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2000. **170**(1-2): p. 193-204.
34. Simon, M., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity.* Nanotoxicology, 2010: p. 126-140.
35. Mayer, M., *SIMNRA, A simulation program for the analysis of NRA, RBS and ERDA*. 1998.
36. Shu, X., et al., *A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms.* PLoS Biology, 2011. **9**(4): p. e1001041.
37. Liv, N., et al., *Simultaneous Correlative Scanning Electron and High-NA Fluorescence Microscopy.* PLoS ONE, 2013. **8**(2): p. e55707.
38. Jahn, K.A., et al., *Correlative microscopy: Providing new understanding in the biomedical and plant sciences.* Micron, 2012. **43**(5): p. 565-582.
39. Mironov, A.A. and G.V. Beznoussenko, *Correlative microscopy: a potent tool for the study of rare or unique cellular and tissue events.* Journal of Microscopy, 2009. **235**(3): p. 308-321.
40. Mironov, A.A. and G.V. Beznoussenko, *Chapter 11 - Correlative Microscopy*, in *Methods in Cell Biology*, P.M. Conn, Editor. 2013, Academic Press. p. 209-255.
41. Watanabe, S., et al., *Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy.* Nat Meth, 2011. **8**(1): p. 80-84.
42. Kopek, B.G., et al., *Correlative 3D superresolution fluorescence and electron microscopy reveal the relationship of mitochondrial nucleoids to membranes.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012.
43. Spiegelhalter, C., et al., *From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy.* PLoS ONE, 2010. **5**(2): p. e9014.
44. Kukulski, W., et al., *Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision.* The Journal of Cell Biology, 2011. **192**(1): p. 111-119.
45. Le Trequesser, Q., et al., *Correlative microscopy, manucrit in progress.* 2014.

Chapitre 4 : Interactions entre les nanoparticules de TiO_2 et les cellules *in vitro*

Après l'étape préliminaire de synthèse et caractérisation, les NPs ont été introduites dans les milieux de culture des différentes lignées cellulaires. Les trois lignées HUVEC, PHFK et HeLa ont été exposées aux trois types de NPs et différentes techniques de caractérisation ont été utilisées. Les objectifs étaient de (i) détecter, localiser et quantifier les NPs dans les cellules, (ii) identifier les interactions entre elles et (iii) évaluer leur toxicité. La comparaison des effets des différentes NPs avait ensuite pour but d'identifier quels sont les paramètres physico-chimiques qui peuvent influer sur la toxicité. Dans ce chapitre, je montrerai les résultats les plus significatifs obtenus avec les différentes lignées cellulaires.

Ce travail a été réalisé en équipe entre l'ICMCB et le CENBG. J'ai été impliqué dans la préparation et l'analyse des échantillons. Une partie des résultats présentés a été obtenue en collaboration avec Gladys Saez. De la même manière, certaines expériences ont été réalisées au Bordeaux Imaging Center (BIC) en collaboration avec Etienne Gontier et Mélina Petrel.

Je présenterai dans un premier temps, les différentes observations effectuées sur les lignées cellulaires dans le but de comprendre comment se comportent les NPs lorsqu'elles sont introduites dans les milieux de culture. Je me suis intéressé notamment à leur localisation et à leur quantification à l'échelle de la cellule unique. Du fait de certaines limites inhérentes aux techniques de caractérisation, une méthodologie de microscopie corrélative a été développée et sera présentée. Enfin, les premiers effets biologiques observés seront montrés.

1. Détection, localisation et quantification des nanoparticules

1.1. Exposition des cellules en culture aux NPs de TiO_2

1.1.1. Les cellules en culture

La culture cellulaire est le maintien en dehors de l'organisme (*in vitro*), de cellules non organisées en tissus, mais capables de se diviser et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques. Elle est basée sur la capacité des cellules à adhérer sur un support permettant leur survie et leur prolifération sur le long terme. Le support peut être une flasque en plastique pour l'entretien et la conservation des lignées, une lamelle de verre ou un puits PEEK (support pour la microanalyse par faisceau d'ions).

Les cellules sont déposées sur le support et recouvertes de milieu de culture adapté à la lignée contenant l'essentiel des nutriments nécessaires à leur survie et leur prolifération.

L'ensemble est ensuite conservé dans les conditions optimales de prolifération cellulaire (37 °C, 5 % CO_2). Le milieu contient également du sérum de veau fœtal et des antibiotiques pour minimiser le risque de contamination.

L'exposition *in vitro* de cellules aux NPs s'effectue *via* le milieu de culture et est schématisée sur la Figure 1. Les NPs sont conservées sous forme de dispersions aqueuses à des concentrations connues (données en mg/mL). Ces solutions subissent toujours une ultra-sonification (1 minute, 100 W) pour casser les agglomérats de particules pouvant se former au cours du temps (cf. chapitre 2, 3.2.2.). Un volume de ces dispersions correspondant à la dose souhaitée est ensuite ajouté à chaque puits. Une phase d'agitation manuelle permet enfin d'homogénéiser le milieu.

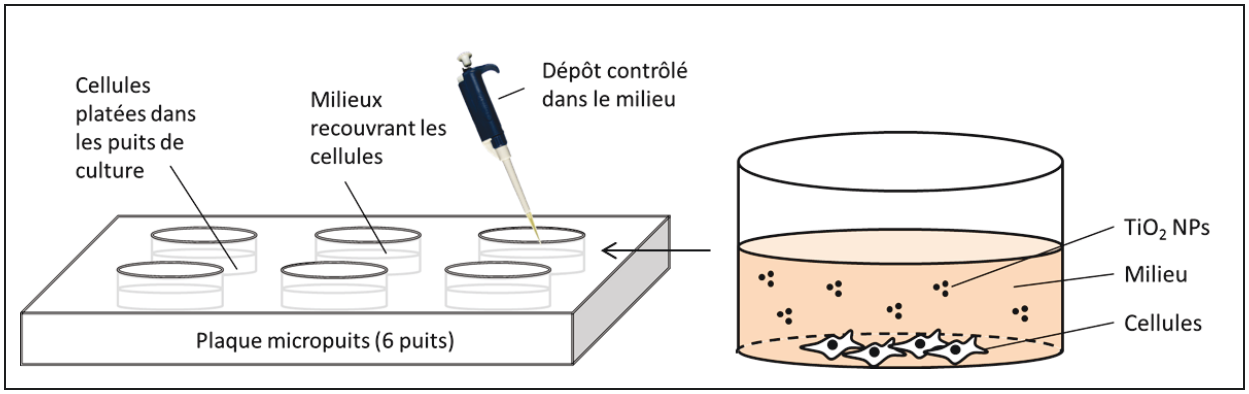


Figure 1 : Schéma de principe de l'exposition *in vitro* avec le dépôt contrôlé de NPs dans le milieu de culture cellulaire.

1.1.2. Expression de la dose d'exposition

L'objectif de cette étude est de comparer les effets / interactions des NPs de TiO_2 en fonction de leurs différentes morphologies. Classiquement, la dose est la quantité de substance toxique (ou non) à laquelle un organisme est exposé. Généralement, il y a une relation entre la dose reçue et l'intensité des effets toxiques. La comparaison des effets toxiques des NPs nécessite donc une harmonisation de la quantité de NPs introduite dans les milieux de culture.

D'un point de vue physico-chimique, cette quantité peut s'exprimer de manières différentes. Elle peut en effet être donnée en masse, en nombre ou bien en surface exposée. Les différentes NPs utilisées dans l'étude présentent des surfaces spécifiques et des morphologies très différentes. Les surfaces exposées et le nombre de NPs varient ainsi significativement pour une même masse. Ces deux paramètres peuvent également varier

lorsque les NPs s'agrègent ou s'agglomèrent. Nous avons donc dans un premier temps choisi de quantifier les NPs en masse, seule quantité invariante.

Il faut dans un deuxième temps rapporter cette masse à une quantité de matière biologique. Les cellules sont étalées sur un support plat recouvert d'un milieu de culture dans lequel les NPs sont dispersées. Le nombre de cellule dépend du degré de confluence, qui décrit le pourcentage de surface occupé par celles-ci sur le support. Selon le degré de confluence et la lignée cellulaire, le nombre de cellules et la surface occupée sur le support sont variables. Nous avons donc choisi de rapporter la masse de NPs à la surface du support qui reste également invariante. Les doses d'exposition sont ainsi exprimées en unité de masse par surface (µg/cm²).

1.1.3. Préparation des dispersions de nanoparticules

Lors de la préparation des dispersions de NPs, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Il faut dans un premier temps réaliser des dispersions les plus stables possibles dans lesquels les phénomènes d'agrégation sont minimaux. Pour rappel, ces dispersions sont effectuées dans l'eau à pH proche du pH physiologique (7,4). Un volume correspondant à la dose d'exposition souhaitée est ensuite ajouté au milieu de culture cellulaire. Le milieu ne doit pas être altéré par l'ajout d'eau (dilution) et il est donc préférable de réduire les volumes ajoutés. En ce sens, la concentration des dispersions ne doit pas être trop faible. D'un autre côté, plus la solution est concentrée, plus les phénomènes d'agrégation sont importants [1]. Il est donc nécessaire de trouver un juste milieu. Nous avons donc décidé de travailler avec des solutions de concentrations comprises entre 0,1 et 1 mg/mL. Ainsi pour une exposition à 2 µg/cm² dans un puits de 3,5 cm² contenant 2 mL de milieu, il faut ajouter 70 µL de solution à 0,1 mg/mL soit 3,5 % du volume total. Les NPs synthétisées (NFs et NAs) ne sont par ailleurs jamais séchées avant l'exposition pour éviter les phénomènes d'agrégation pouvant générer des agrégats solides non redispersables.

Nous aurions pu réaliser les dispersions de NPs directement dans le milieu de culture des cellules afin d'éviter un changement de milieu brutal lors de l'exposition. Les NPs passent en effet d'un milieu aqueux très pur à un autre très riche en sels et en protéines ce qui peut provoquer leur agrégation. Cette méthode n'a cependant pas été utilisée car elle présentait trop de risque de contamination et ne permettait pas de conserver les dispersions dans le temps.

1.2. Détection des nanoparticules par microscopie à épi-fluorescence

1.2.1. Détection et localisation des nanoparticules fluorescentes en fonction du temps

Les précédents travaux réalisés au laboratoire par M. Simon et A. Girard ont montré que les NPs de TiO_2 pouvaient être internalisées dans les cellules. Les observations avaient notamment montré une localisation péri-nucléaire (autour du noyau) des NPs mais jamais d'internalisation dans le noyau [2, 3]. Pour affiner ces résultats, nous avons voulu avoir une idée sur la cinétique d'internalisation des NPs dans les cellules. La connaissance de cette cinétique permet d'optimiser les analyses suivantes par un choix avisé du temps d'exposition des cellules au NPs.

Les interactions entre les cellules et les NPs ont ainsi été étudiées au cours du temps. Les résultats présentés ici ont été obtenus sur des cellules HUVEC. Ces cellules entrent dans la constitution des endothéliums présents dans les vaisseaux sanguins. Les vaisseaux jouent un rôle prépondérant dans les échanges de nutriments. Les HUVEC sont donc intéressantes pour étudier les échanges entre les cellules et le milieu de culture.

L'évolution de la présence de NPs dans les cellules est montrée sur la Figure 2. Les cellules ont été exposées à une dose de 2 µg/cm² de P 25-APS-TRITC dans leur milieu de culture et ont été observées après 1, 4, 8 et 24 h d'incubation. Elles ont ensuite été rincées, fixées chimiquement et les noyaux des cellules ont été marqués avec du Hoechst^{33342}. Le rinçage permet d'éliminer les NPs qui ne sont pas internalisées ou collées aux membranes plasmiques.

Le Hoechst^{33342} (agent intercalant de l'ADN) permet de visualiser les noyaux cellulaires et de les différencier des NPs fluorescentes. Les NPs sont majoritairement localisées dans les cellules exposées plus particulièrement autour des noyaux cellulaires. A l'opposé, aucun signal de fluorescence associé à la rhodamine n'est détecté dans les contrôles. L'utilisation de l'imagerie à épi-fluorescence montre qu'il y a une augmentation progressive du nombre de NPs dans les cellules au cours du temps. En effet, après 1 et 4 h d'exposition, quelques NPs ou agrégats de NPs sont présents. Après 8 h d'exposition, il y a une grande quantité de NPs adoptant par ailleurs une localisation péri-nucléaire.

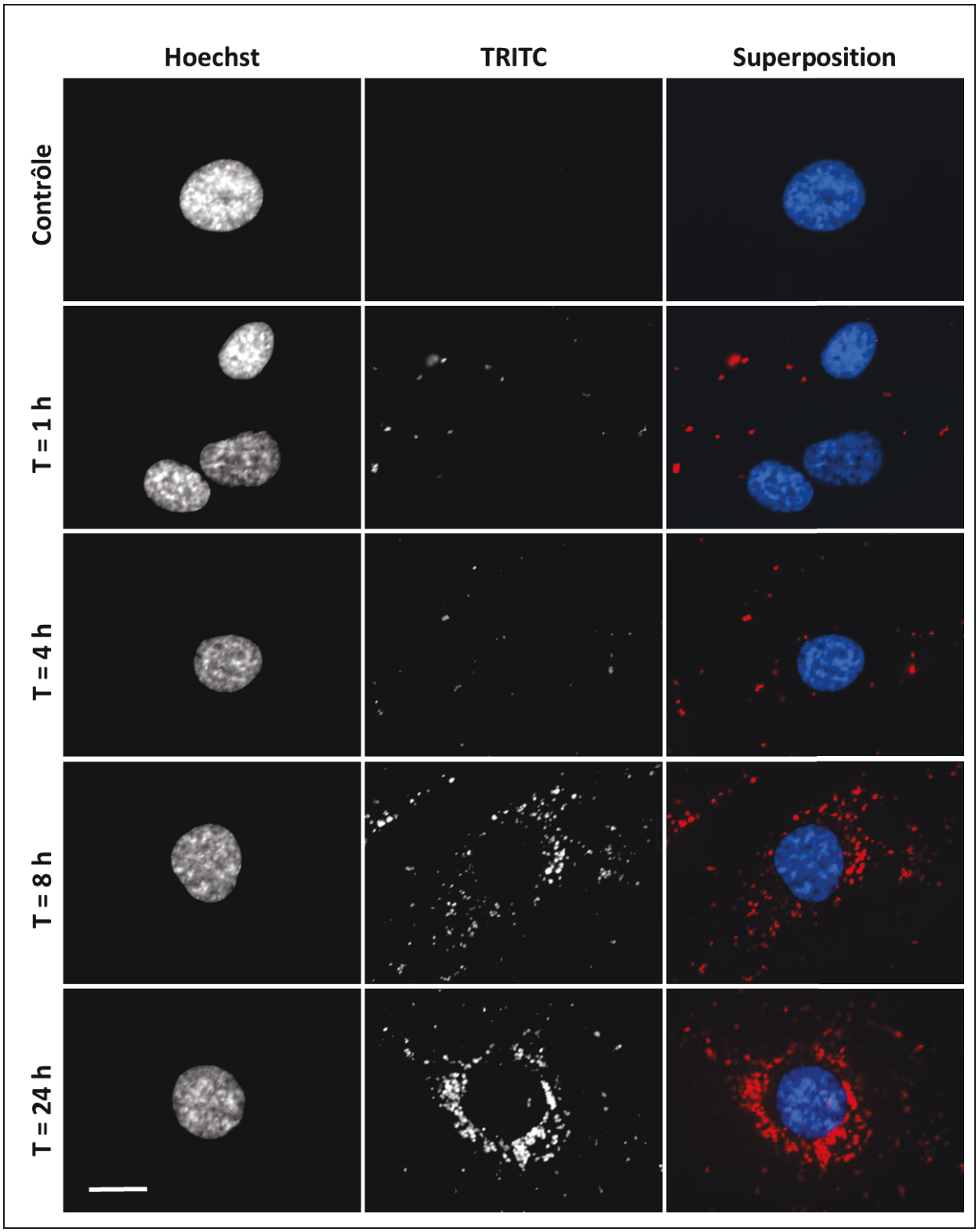


Figure 2 : Evolution de l'internalisation des NPs dans les cellules HUVEC au cours du temps. Les cellules ont été marquées avec du Hoechst^{33342} et exposées à 2 µg/cm² de P25-APS-TRITC pendant 1 h, 4 h, 8 h et 24 h (échelle 20 µm).

Cette distribution est probablement due à la structure même de la cellule dans laquelle le noyau dense et volumineux est entouré d'un milieu fluide et donc plus mobile. Une cellule

est schématisée sur la Figure 3. Après 24 h d'exposition, le nombre de NPs dans les cellules est très important ce qui suggère que les NPs persistent à court terme.

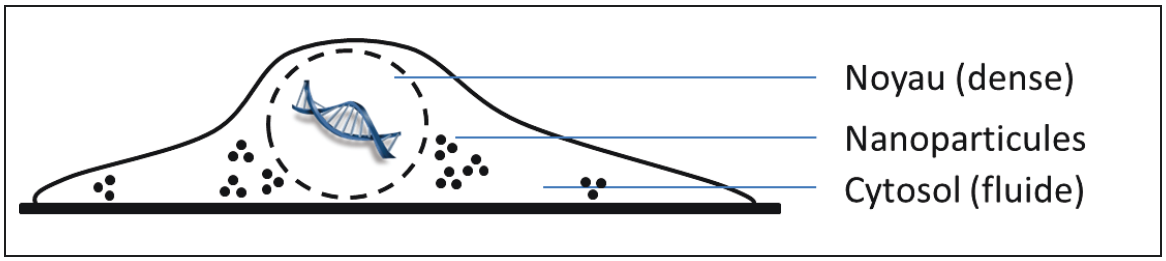


Figure 3 : Schéma d'une cellule avec le noyau dense et volumineux et les NPs agglutinées autour.

Ces résultats montrent que les NPs peuvent être internalisées dans les cellules mais que celles-ci ne semblent pas pénétrer le noyau. De plus, l'augmentation du nombre de NPs au cours du temps suggère que les cellules ne peuvent pas les éliminer efficacement et qu'il se produit donc des phénomènes d'accumulation.

1.2.2. Localisation intracellulaire des NPs et marquages d'organites

Nous avons ensuite voulu préciser la localisation *in vitro* des NPs dans le cytosol et tenter d'apporter des informations sur leur prise en charge par les cellules. L'internalisation des NPs peut se produire de différentes manières : (i) l'endocytose : les différents mécanismes d'endocytose (transport actif) sont décrits dans l'état de l'art. Rappelons brièvement qu'ils peuvent, par invagination de la membrane plasmique, entourer les NPs et les internaliser dans le cytosol [4]. Les NPs se retrouvent alors localisées dans des vacuoles (endosomes ou lysosomes) comme le montre la Figure 4 ; (ii) diffusion passive : les NPs peuvent également entrer par diffusion passive c'est-à-dire sans interaction spécifique avec la cellule et se retrouvent ainsi libres dans le cytosol [5, 6]. Les techniques que nous avons mises en jeu ne nous permettent pas d'observer les processus d'internalisation. Cependant nous avons pu mettre en place une méthodologie permettant de montrer qu'une fois dans la cellule, les NPs internalisées par endocytose se retrouvent piégées dans des endosomes dits « précoces ». Ils fusionnent ensuite avec des vésicules pré-lysosomiales pour évoluer en endosomes « tardifs » dans lesquels le pH est abaissé à environ 5. Enfin, les endosomes tardifs deviennent des lysosomes dans lequel le pH est encore abaissé (4,5). Ces vésicules ont une fonction de digestion et de régulation dans la cellule.

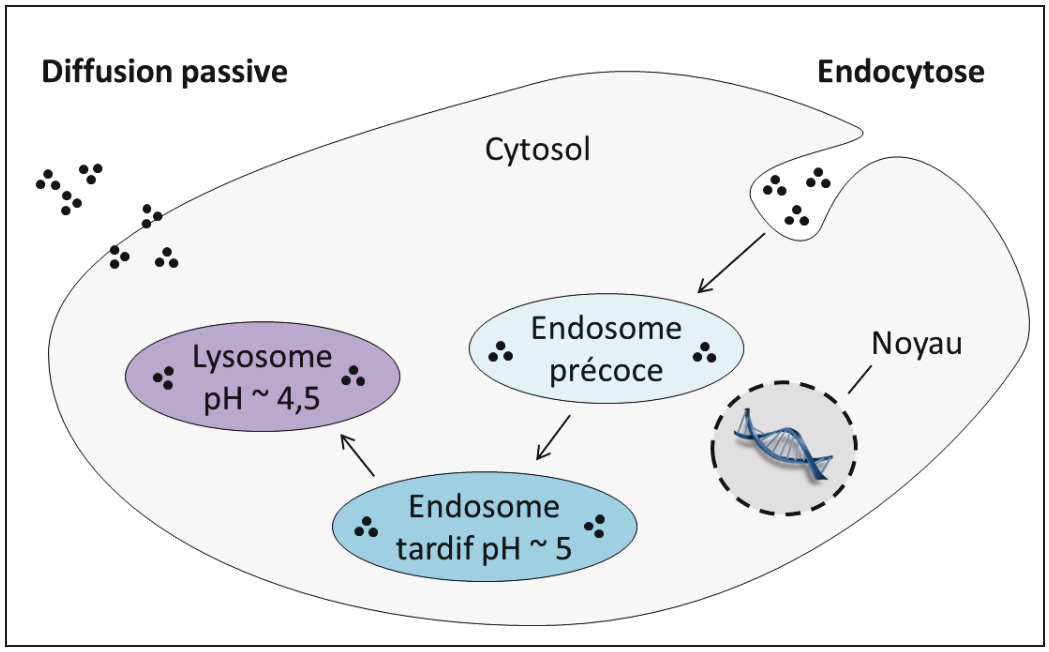


Figure 4 : Schématisation des mécanismes d'internalisation et d'évolution des endosomes jusqu'au lysosome [5].

Les protéines et récepteurs biologiques présents à la surface des vésicules sont caractéristiques du type d'endosome ou lysosome ce qui permet de les rendre sélectivement fluorescents. Les marquages spécifiques sont réalisés grâce à des kits (*CellLight® Invitrogen*). Ces marquages sont basés sur l'introduction de matériel génétique par transduction permettant l'expression de protéines recombinantes associées à la GFP qui se lient sélectivement à des organites cellulaires. L'introduction du matériel génétique s'effectue avec l'infection des cellules par un baculovirus [7]. L'utilisation de ce type de protocole simple à mettre en place, associée à l'exposition aux NPs fluorescentes permet d'observer si celles-ci sont vacuolisées par la présence simultanée de fluorescence verte et rouge dans un endroit précis (co-localisation) [8].

L'expérience présentée ici a été réalisée sur des cellules HUVEC exposées à des P 25 fluorescentes (TRITC) pendant une durée de 8 h puis fixées chimiquement. La durée d'exposition a été choisi en fonction des résultats précédents qui ont montré qu'après 8 h, les cellules contiennent un nombre de NPs suffisant pour étudier leur localisation mais pas trop important pour ne pas les surcharger. Les trois types de vésicules ont été alternativement marquée (GFP) et les cellules ont été observées par microscopie à épi-fluorescence (Figure 5).

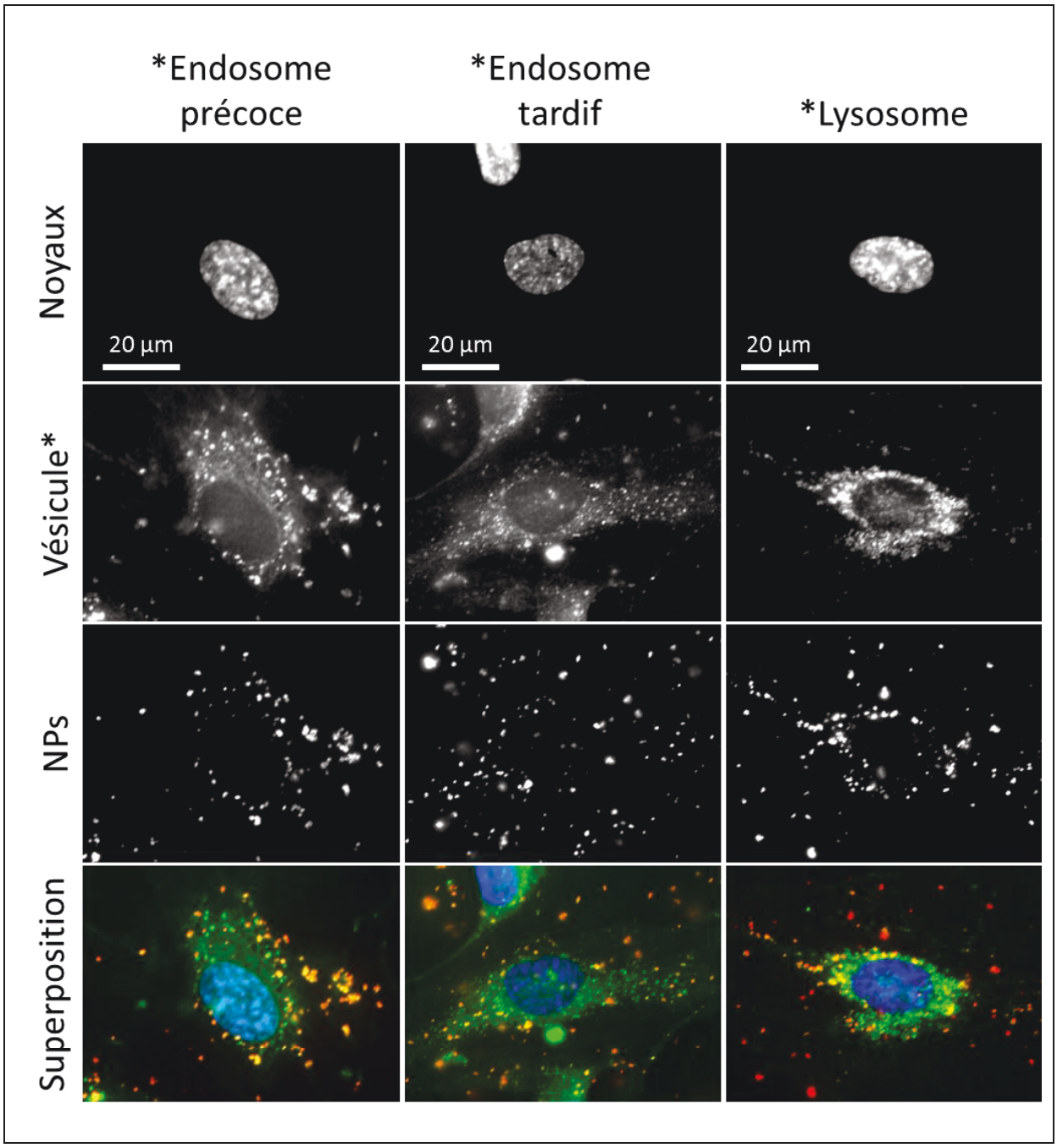


Figure 5 : Localisation intracellulaire des P 25-APS-TRITC dans des cellules de type HUVEC avec différents marquages de vésicules d'intérêt (*CellLight*®) telles que les endosomes précoces et tardifs et les lysosomes après 8 h d'exposition.

Nous observons que les organites choisis (endosomes précoces et tardifs et lysosomes) sont distribués de manière ponctiforme dans le cytosol de la cellule. Une co-localisation entre NPs et vacuoles se traduit par une couleur jaune sur la figure. Il semble que ce soit le cas pour les trois essais. Cependant, il faut noter que cette dominante jaune ne traduit pas forcément une internalisation des NPs dans les vacuoles. La présence de la couleur rouge n'est pas non

plus à ce stade significative de l'internalisation (les NPs pourraient se trouver en surface des cellules ou bien libres dans le cytosol).

Ces analyses préliminaires demandent une confirmation par d'autres techniques plus résolues (la microscopie électronique en transmission) car : (i) il s'agit d'une projection en deux dimensions (vue du dessus), les NPs et les vésicules peuvent en fait être superposées ; (ii) la résolution du système (400 nm) est insuffisante pour conclure de manière définitive sur les interactions entre les cellules et les NPs. Dans tous les cas, il n'apparaît pas de manière claire et significative d'accumulation prépondérante et spécifique des NPs au temps d'analyse et pour la lignée considérée. Ceci suggère donc un mode d'internalisation aspécifique soit passif, soit actif (endocytose, macropinocytose). Ces données sont à confirmer notamment par des analyses de microscopie électronique.

1.3. Localisation des NPs de TiO_2 dans les cellules : observation par microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission permet de localiser les NPs dans les cellules à l'échelle nanométrique. Les observations sont réalisées sur des coupes ultrafines (70 nm) ce qui permet d'affirmer que les NPs présentes dans les cellules sont internalisées. L'objectif est d'affiner la localisation des NPs dans les cellules *via* cette technique plus résolue et également de vérifier leur état (morphologie et agrégation). Cette étude a été effectuée sur des kératinocytes qui possèdent une fonction barrière dans le corps humain vis-à-vis du milieu extérieur. Elles limitent ainsi leurs échanges avec le milieu environnant et internalisent ainsi moins de NPs que les HUVEC. Ces cellules sont donc mieux adaptées pour étudier finement leur localisation intracellulaire.

A ce stade, nous savons que les NPs sont internalisées et l'expérience précédente a montré que celles-ci pouvaient être inclues dans des vésicules cytoplasmiques mais aussi se retrouver directement dans le cytosol. Ces résultats ont été vérifiées à l'aide de la MET sur la plateforme du Bordeaux Imaging Center. L'expérience a été réalisée sur des kératinocytes exposés aux trois types de NPs natives pendant 24 h. La préparation des échantillons est décrite dans la partie expérimentale. Les clichés de microscopie sont montrés sur la Figure 6.

Tout d'abord, l'internalisation des NPs dans les cellules est confirmée. Les NPs sont de plus présentes dans le cytosol et ne sont pas retrouvées dans le noyau. Les structures intracellulaires ne sont pas altérées. Par exemple, les mitochondries présentent des

morphologies normales et il ne semble pas y avoir de lien direct entre ces dernières et les NPs dans les cas observés. Cette technique montre également que les NPs peuvent être à la fois présentes dans des vacuoles (flèches rouges) et directement dans le cytosol (flèches blanches) notamment dans le cas des NAs et de NFs.

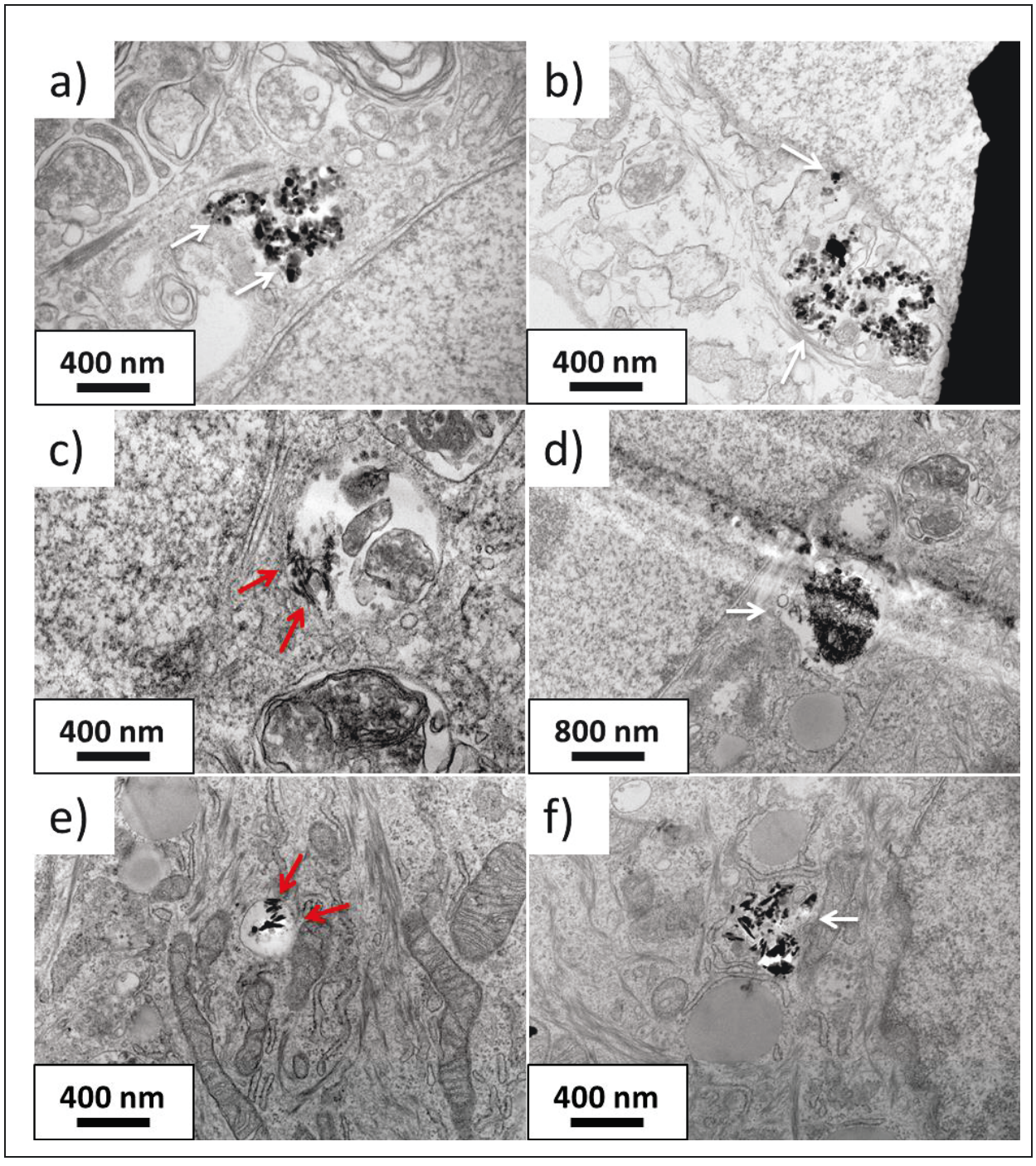


Figure 6 : Microscopie électronique en transmission de PHFK exposées aux a) et b) P 25, c) et d) NFs et e) et f) NAs. Les flèches rouges indiquent les NPs internalisées en vacuoles et les flèches blanches montrent les NPs directement situées dans le cytosol.

La présence de NPs libres dans le cytosol peut découler de deux phénomènes distincts : (i) les NPs ont été internalisées par diffusion passive c'est-à-dire sans mécanisme d'endocytose ; (ii) les NPs ont détruit la vacuole dans laquelle elles étaient contenues par un effet mécanique ou chimique. Les analyses se poursuivent à ce jour pour déterminer quelle hypothèse est valide.

Enfin, les différentes NPs sont présentes sous forme d'agrégats de tailles variables. Les P 25 et les NFs apparaissent en agrégats conséquents allant de quelques dizaines de NPs à plusieurs centaines (image d)). A l'inverse, les NAs sont retrouvées en petits groupes de quelques particules.

En conclusion, ces images confirment les observations réalisées en imagerie optique avec la présence de NPs dans les cytosols des cellules dans des vacuoles ou bien libres. La présence de ces dernières n'est pas encore expliquée et fera l'objet de nouvelles observations. Cette expérience a également permis de montrer que les NPs peuvent être retrouvées sous forme d'agrégats de tailles diverses dans les cellules. Nous ne savons cependant pas si l'agrégation a lieu avant ou après l'internalisation.

1.4. Détection, localisation et quantification des NPs de TiO_2 par IBA

La microanalyse par faisceau d'ions (IBA) a ensuite été utilisée pour caractériser les cellules exposées aux NPs. Cette technique permet de réaliser de l'imagerie chimique ce qui donne la possibilité de détecter les NPs natives (non fonctionnalisées) grâce à leur signature chimique. Ensuite, elle peut quantifier les éléments chimiques *in situ* et nous a permis de mesurer la teneur en titane et donc le nombre de NPs internalisées (i) à l'échelle de la cellule unique et (ii) à l'échelle d'une population.

1.4.1. Localisation dans les cellules

En première approche, l'IBA donne la possibilité de réaliser de l'imagerie chimique et en densité. Ce type d'analyse permet en outre de détecter et localiser les NPs de TiO_2 natives dans les cellules en utilisant la signature chimique du titane. Nous avons montré dans le chapitre 2 que la modification de surface des NPs pouvait avoir un impact sur leur comportement en solution en augmentant leur agrégation (chapitre 2, 3.3.2.). Nous avons donc voulu vérifier dans un premier temps les observations réalisées en microscopie optique avec les NPs modifiées en utilisant des NPs natives.

La microanalyse par faisceau d'ions permet de réaliser des cartographies chimiques des éléments à partir du sodium vers les éléments plus lourds dont le titane. Ce type d'analyse peut être réalisé sur une population cellulaire cryofixée / lyophilisée (fixation physique). Un exemple de cellules contrôles et de cellules exposées 24 h aux trois types de NPs de TiO_2 natives est montré sur la Figure 7. L'expérience montrée ici a été réalisée avec des kératinocytes. Les mêmes analyses ont également été effectuées avec les HUVEC et les HeLa au cours de ma thèse et ont donné des résultats similaires.

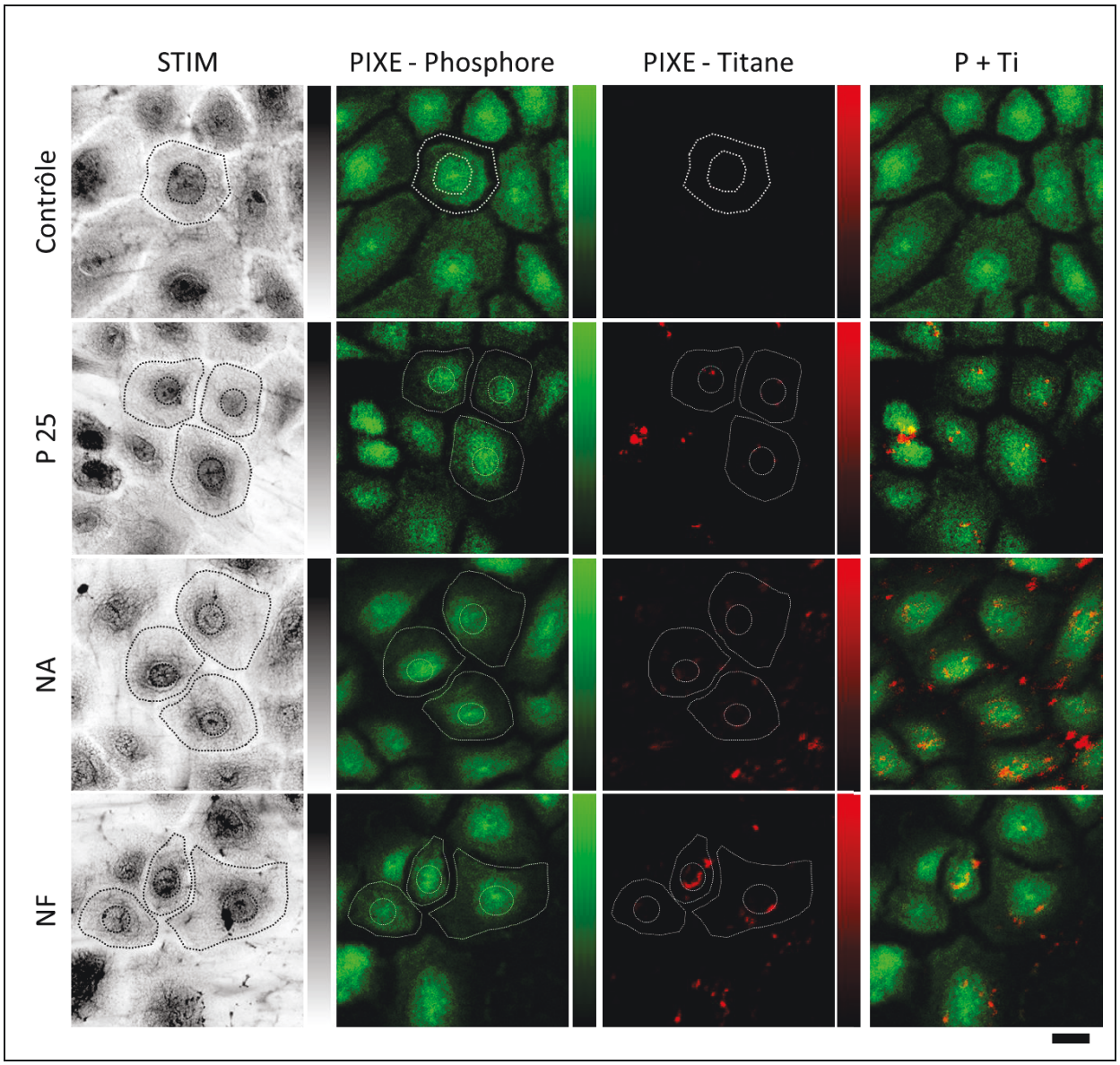


Figure 7 : images STIM et PIXE de cellules PHFK contrôles et exposées à des NPs de TiO_2 P 25, NAs et NFs natives puis cryofixées / lyophilisées (2 µg/cm²). Les cartographies du phosphore et du titane permettent de visualiser les NPs par rapport aux cellules (échelle 20 µm).

Les analyses d'IBA se déroulent en deux temps. Les cellules sont d'abord examinées à l'aide de la technique STIM (transmission) qui permet d'obtenir une cartographie en densité. Cette première analyse s'effectue rapidement (quelques minutes) et permet de vérifier l'état des cellules qui peuvent dans certains cas être dégradées lors de l'étape de fixation. Elle permet également de mesurer la masse surfacique qui, comme évoqué dans le chapitre 3 (partie 1.4.2.1.3), est essentielle pour la quantification. L'imagerie STIM permet enfin d'observer les structures denses dans les cellules comme les nucléoles qui apparaissent sous forme de points noirs dans le noyau. Les échantillons sont ensuite analysés en PIXE pendant une à deux heures et certains éléments sont sélectionnés pour en faire la cartographie. La résolution spatiale des cartographies est de l'ordre du micron avec une sensibilité proche du ppm.

Les structures cellulaires et le noyau sont riches en phosphore (phospholipides et phosphates). La cartographie de cet élément permet ainsi d'observer l'étalement des cellules et le noyau (très riche en ADN donc plus dense). Ensuite, la cartographie du titane donne la localisation des NPs de TiO_2. La superposition de ces images permet ainsi de localiser les NPs par rapport aux cellules. Celles-ci ayant été rincées, nous pouvons raisonnablement penser que les NPs ont été internalisées ou ont adhéré à la membrane cellulaire. Dans tous les cas, les NPs sont présentes en petits ou gros agrégats et de manière aléatoire dans les cellules de la zone. La quantité de NPs de TiO_2 internalisées varie également d'une cellule à l'autre. Ce résultat est illustré par la présence simultanée sur une même zone de cellules contenant de gros agrégats de NPs et de cellules où très peu de titane est détecté. A l'image des observations réalisées grâce à la fluorescence, les NPs ont souvent une localisation péri-nucléaire. Ce résultat suggère que (i) les agents de fluorescence sont encore localisés sur les NPs et (ii) la fonctionnalisation des NPs n'a pas d'influence majeure sur leur localisation dans les cellules.

Au-delà de la localisation des NPs natives, l'IBA permet ensuite de quantifier les éléments chimiques et, par extension, de calculer la quantité de titane présente dans chaque cellule.

1.4.2. Quantification des NPs de TiO_2 à l'échelle de la cellule

La deuxième contribution majeure de l'IBA est sa capacité à fournir la quantification des éléments chimiques. En examinant les images de la Figure 7, nous pouvons supposer que

la quantité de NPs internalisées peut varier d'une cellule à l'autre. Il devient donc indispensable de disposer d'un outil permettant connaitre le nombre de particules par cellule. Une étude de faisabilité a été réalisée en IBA au CENBG sur une cellule unique et sur une population de cellules.

Pour illustrer cette étude, nous avons choisi de montrer les résultats obtenus pour des cellules PHFK exposées à des P 25-APS-TRITC pendant 24 h. Une cellule contenant des NPs a ainsi été analysée en IBA et la quantité de titane a été calculée et rapportée au nombre de NPs P 25. Cette même cellule a également été observée en MEB/EDX pour obtenir une image avec une meilleure résolution spatiale. La cellule choisie est montrée sur la Figure 8.

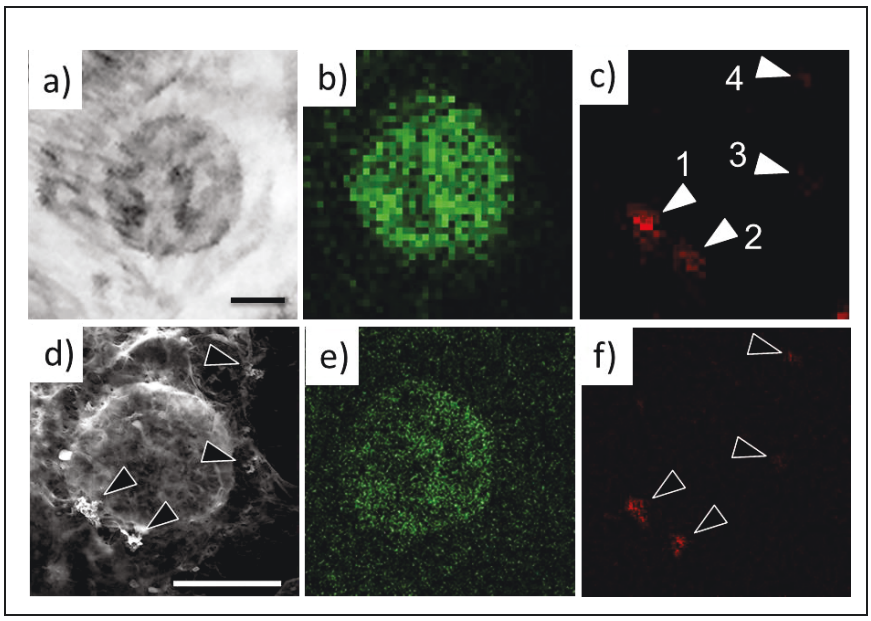


Figure 8 : Quantification des NPs à l'échelle de la cellule unique réalisée sur un kératinocyte exposé à des P 25 fonctionnalisées TRITC. Image a) STIM et b) PIXE phosphore, c) PIXE titane, d) MEB et e) et f) EDX du phosphore et du titane (échelle 5 µm).

Les images montrent la même cellule observée en IBA et en MEB. La cellule présente quatre agrégats de TiO_2 de tailles variables observables par les deux techniques. Les images de MEB sont ici intéressantes pour visualiser la cellule avec une meilleure résolution spatiale. La quantité de titane a ensuite été mesurée puis rapportée au nombre de P 25 selon un calcul décrit en partie expérimentale. Les résultats sont montrés dans le Tableau 1. Les agrégats 3 et 4 sont composés d'environ 1500 NPs et les agrégats 1 et 2 en contiennent plusieurs milliers (7300 et 5600 respectivement). A l'opposé, la quantité de NPs dans le noyau est nulle ce qui confirme que les NPs ne traversent pas la membrane nucléaire. Ensuite, la somme du nombre de P 25 dans les 4 agrégats montrés n'est pas égale au nombre total de NPs présentes dans la

cellule (23600). Cette donnée montre que les NPs non agrégées sont difficilement visibles sur les cartographies mais que leur détection / quantification reste possible.

Zone	Concentration (ng/cm^2)	Nombre de P 25
1	0,494	7297
2	0,379	5598
3	0,0998	1474
4	0,104	1536
Noyau	0	0
Cellule entière	1,6	23634

Tableau 1 : Concentrations et nombres de P 25 correspondants dans une cellule.

En conclusion, ces résultats prouvent qu'il est possible de quantifier les NPs à l'échelle de la cellule ce qui ouvre la voie à l'analyse des effets toxiques à cette même échelle.

1.4.3. Quantification des NPs sur une population de cellules

Nous avons montré dans le chapitre 2 que les P 25 et les NFs ont tendance à s'agréger plus rapidement que les NAs et donc à sédimenter (partie 3.2.2.). De plus, les images PIXE ont montré que la quantité de NPs de TiO_2 internalisées pouvait varier d'une cellule à l'autre. Nous avons donc voulu caractériser ces différences grâce à l'IBA en mesurant systématiquement la concentration en titane dans des cellules exposées aux différentes NPs (P 25, NA et NF) et donc la dose réelle internalisée. La notion de dose est essentielle en toxicologie. La caractérisation de la distribution des NPs est donc un paramètre important pour l'exploitation des résultats toxicologiques présentés plus loin.

Pour caractériser les distributions, la quantification du titane a été réalisée systématiquement sur une population cellulaire (kératinocyte) exposée aux trois morphologies de NPs natives pendant 24 h à d'une dose d'exposition de 2 µg/cm². Les résultats statistiques sont regroupés en boîte à moustache sur la Figure 9. Cette présentation donne schématiquement la distribution des concentrations (en mg/g) retrouvées dans les cellules. Ces statistiques ont été obtenues sur des populations de 152 cellules contrôles, 62 cellules exposées au P 25, 125 cellules exposées aux NAs et 67 cellules exposées aux NFs.

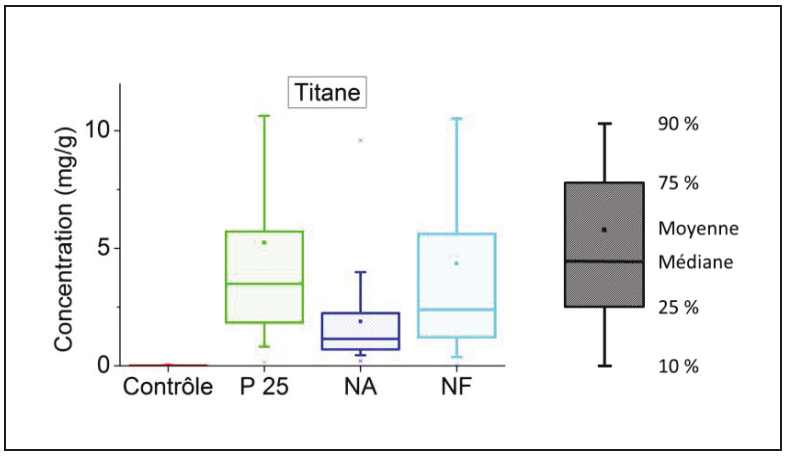


Figure 9 : Concentrations en titane, calculées par IBA, retrouvées dans des kératinocytes exposées à 2 µg/cm² pour une durée de 24 h. Les statistiques ont été réalisées sur des populations de respectivement 152, 62, 125 et 67 cellules.

Cette représentation permet de voir que pour une même dose d'exposition (2 µg/cm²) la quantité de titane calculée varie en fonction du type de NPs. En effet, les P 25 ont une concentration moyenne de 5,2 mg/g contre 4,4 mg/g pour les NFs et 1,9 mg/g pour les NAs. De plus, la répartition des concentrations, schématisée par la hauteur des boîtes à moustaches, est très large notamment dans le cas des P 25 et des NFs. La largeur importante de ces boîtes montre que la concentration en NPs peut varier très fortement d'une cellule à l'autre.

Ces résultats ont ensuite été représentés d'une manière différente avec la distribution statistique des concentrations en titane dans les cellules (Figure 10). Les concentrations en NPs varient entre 0 et 20 mg/g. Pour bien se rendre compte, 20 mg/g représentent plusieurs centaines de milliers de NPs dans les cellules.

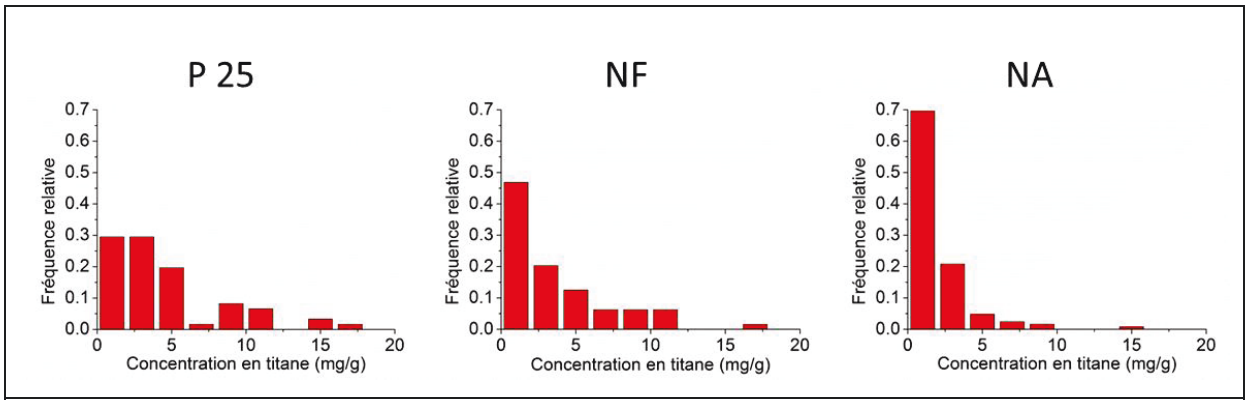


Figure 10 : Distributions statistiques des concentrations en titane retrouvées dans les cellules.

Les graphiques montrent que dans la majorité des cas, les concentrations dans les cellules sont inférieures à 5 mg/g. Dans le cas des NFs, 50 % des cellules ont une

concentration inférieure à 3 mg/g et dans le cas des NAs cette mesure compte pour 70 %. Cette analyse tend tout d'abord à montrer qu'il existe bien des différences de concentrations internalisées entre les NPs. Les P 25 sont internalisées en concentrations aléatoires probablement sous forme d'agrégats plus ou moins larges. Les NFs ont une distribution en concentrations plus restreinte ce qui suggère une répartition ou une internalisation plus homogène des NPs sur les cellules. Enfin, les NAs ont la répartition la plus homogène et les valeurs les plus faibles. Ces résultats visent à illustrer que la répartition des NPs dans les cellules dépend des propriétés des celles-ci. Par exemple, les NAs sont dans ce cas en doses plus faibles dans les cellules ce qui peut s'expliquer par le fait qu'elles sont plus stables en solution et donc moins sensibles à la gravité.

En résumé, cette expérience permet de montrer que selon le type de NPs et pour une même dose d'exposition (2 µg/cm²), la dose réelle internalisée dans les cellules varie notablement. La quantité de NAs internalisées est ainsi inférieure à la quantité de P 25 et NFs. Nous avons également montré que selon le type de NPs, les quantités retrouvées par cellules sont plus ou moins homogènes.

1.5. Microscopie corrélative à l'échelle de la cellule unique

Lors de cette étude, nous avons eu l'occasion de mettre en œuvre un développement original impliquant les techniques de microscopies conventionnelles telles que la microscopie à épi-fluorescence et la microscopie électronique à balayage à la microanalyse par faisceau d'ions. Ce type de microscopie corrélative peu répandue permet d'aller de l'analyse *in vitro* classique vers une analyse complète de la topographie des cellules ainsi que de l'analyse élémentaire *in situ* avec quantification, le tout sur une même zone d'intérêt.

Si la toxicité des NPs de TiO_2 est dose-dépendante, il est essentiel de pouvoir les quantifier à l'échelle cellulaire. La fluorescence permet de localiser les NPs dans les compartiments cellulaires. Elle permet même dans certains cas leur quantification [9, 10]. La quantification requiert cependant l'utilisation d'étalons et peut être faussée par un taux de greffage variable en surface des particules, par l'agrégation des NPs ou même par des phénomènes de *photo-bleaching* (photo-blanchiment) [7]. De plus, la modification de surface subie par les NPs peut également influer sur leur toxicité ainsi que sur leur comportement vis-à-vis des organismes biologiques. En conséquence, les expériences réalisées avec ces NPs

fonctionnalisées ne donneront pas une idée exacte du comportement toxique de la NP native en elle-même.

Il est donc crucial de mettre au point des techniques qui permettent la localisation et la quantification de ces dernières sans avoir recours à la modification de surface. L'IBA et la MEB sont des techniques puissantes pour l'analyse chimique *in situ* et l'observation de la topographie des échantillons et sont là pour répondre à ces requis. Elles permettent l'observation des NPs natives mais ne sont pas adaptées à l'observation *in vitro* / *in vivo*. Ainsi, pour répondre à cette problématique, il faut corréler toutes ces techniques et les appliquer sur un même échantillon de cellules exposées à des NPs fonctionnalisées pour prouver le concept puis étendre l'ensemble à des NPs natives.

Le but de ce travail fut donc de combiner ces différentes méthodes d'analyse pour valider les observations et obtenir une vue d'ensemble d'un échantillon avec de l'imagerie classique, de l'imagerie haute résolution avec la MEB et de l'imagerie chimique et quantitative avec l'IBA.

Les échantillons ont été cultivés sur des puits PEEK recouverts de polycarbonate et exposées aux NPs fonctionnalisées pendant 24 h. Le design de ce porte échantillon est essentiel puisqu'il doit (i) être compatible avec toutes les techniques d'analyse envisagées (ii) permettre la cryofixation / lyophilisation (iii) permettre la traçabilité et la relocalisation aisée (dans le plan (x, y)) sous le faisceau (lumineux, électronique ou ionique) d'une cellule donnée entre deux techniques d'analyse. Les noyaux des cellules ont ensuite été marqués au Hoechst^{33342} et l'appareil de Golgi à la GFP puis les cellules ont été observées vivantes et fixées en microscopie à épi-fluorescence.

La première phase de ce travail est montrée sur la Figure 11. L'image de microscopie à épi-fluorescence *in vitro* (a) est comparée avec l'image après fixation (b). Comme précédemment présenté, les NPs sont localisées autour du noyau à proximité de l'appareil de Golgi [2]. Après fixation, les marquages fluorescents ont été altérés. Il est possible de voir que le signal de fluorescence est plus diffus et que la contribution de la GFP a disparu. Cette disparition est fréquemment rapportée pour les marqueurs organiques ou les protéines fluorescentes lorsque du passage d'un milieu aqueux vers un solvant organique ou un environnement déshydraté [11].

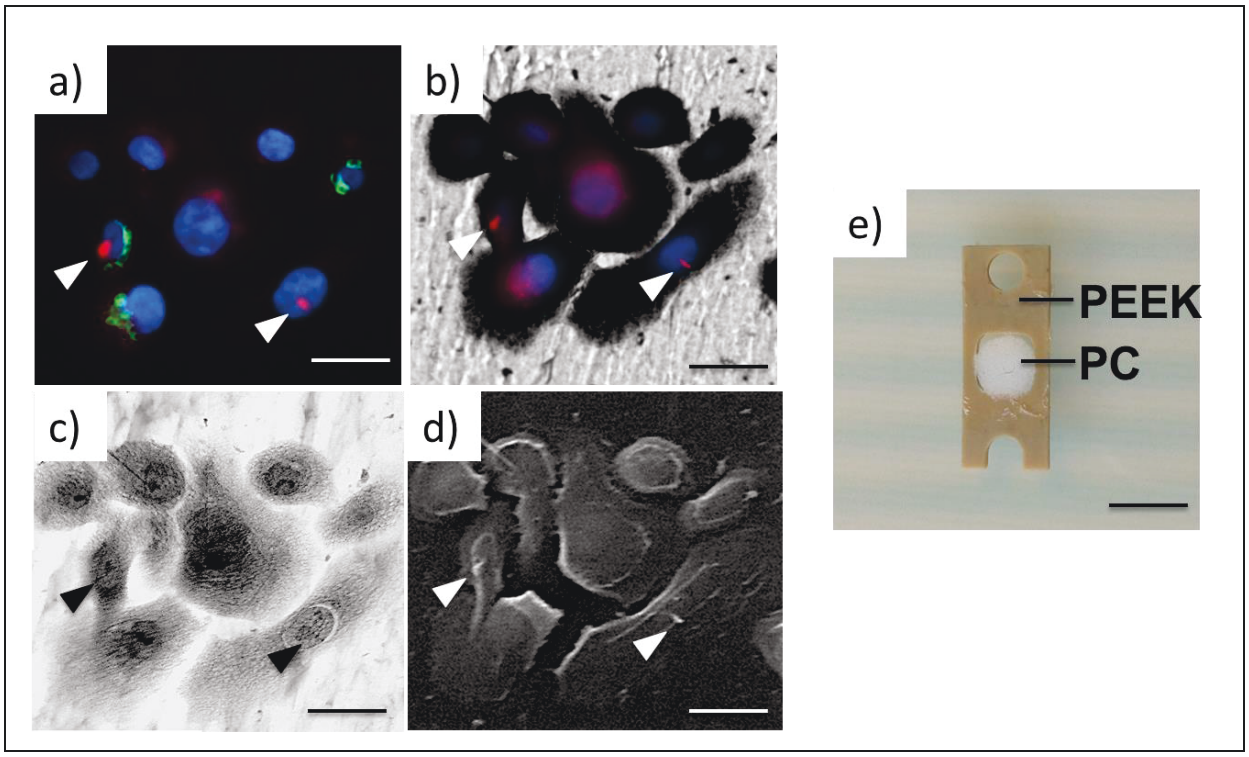


Figure 11 : Microscopie corrélative montrant un groupe de cellules a) *in vitro* et b) après fixation, par microscopie à épi-fluorescence, c) en STIM et d) par analyse « électrons secondaires » induits par les ions (échelle 40 µm). e) puits PEEK surmonté d'un film de polycarbonate (PC) (échelle 3 cm)

Les échantillons ont ensuite été analysés par IBA. Comme évoqué dans le chapitre 3, le challenge à relever est ici de repositionner les cellules analysées en MO sous le faisceau utilisé en IBA. Pour simplifier cette étape, l'ensemble des puits de culture ont été cartographiés en MO et fluorescence. La configuration du porte-échantillon permet son orientation et le repérage des cellules par simple positionnement géométrique (coordonnées x et y).

Les images STIM et « électrons secondaires » sont montrées sur les Figure 11 c) et d). L'image STIM laisse apparaitre des zones de rétractation sur les cellules qui sont invisibles sur l'image électrons secondaires et également en microscopie optique (figure 8b). Ce type d'image suggère une légère altération des cellules lors de la fixation impliquant une contraction des structures. La surface des cellules est visible par l'analyse des électrons secondaires. Ces électrons ne traversent en effet qu'une très fine couche de matière (< 100 nm) et l'analyse se limite donc à la surface de l'échantillon. Les deux agrégats de NPs sont présents sur l'image de la surface ce qui indique qu'ils sont localisés à la surface des cellules. Les autres NPs dont la présence est indiquée par la fluorescence rouge ne sont cependant pas visibles ce qui suggère qu'elles sont internalisées. L'analyse PIXE du même groupe de cellule

(Figure 12) montre la répartition homogène dans les cellules des éléments phosphore et potassium [12].

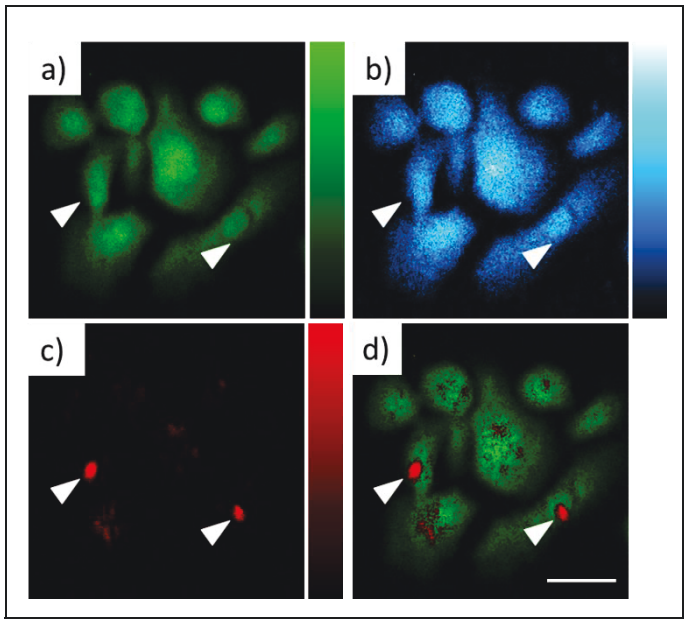


Figure 12 : Reconstruction PIXE des éléments a) phosphore, b) potassium, c) titane et d) phosphore + titane des cellules précédemment observées. Le phosphore et le potassium permettent de visualiser le contour et la surface occupée par les cellules ; le titane indique la position des NPs de TiO_2 fonctionnalisées TRITC (échelle 40 µm).

Ces cartographies sont tout à fait superposables à l'image obtenue par fluorescence (cf. Figure 11). De même, la cartographie du titane permet de localiser les NPs de TiO_2. Nous constatons que le signal du titane est co-localisé avec la fluorescence rouge observée en MO. La localisation est cependant plus affinée et moins diffuse. Cette observation est fondamentale pour le chimiste puisqu'elle valide l'intégrité de la liaison entre le fluorophore et la NP au sein du milieu cellulaire. Cet aspect est en effet quelque fois discuté sachant que le pH à l'intérieur des cellules peut descendre jusqu'à 3 dans certaines organites et provoquer des réactions non désirées de dégreffage (lysosomes) [13].

La Figure 13 montre enfin le même groupe de cellules observé à l'aide d'un MEB. Les électrons rétrodiffusés permettent une observation de la structure présente juste en dessous de la surface (de l'ordre du micron). L'EDX offre par ailleurs la possibilité de réaliser la cartographie des éléments chimiques présents à la surface de la cellule. La haute résolution permet ici d'observer la surface dentelée des cellules après lyophilisation. La cryofixation est en effet un protocole qui se focalise plus sur la conservation des ions diffusibles que sur la préservation des ultrastructures [14]. Sur la partie zoomée (figure 13 b)), deux flèches

pointent des zones légèrement plus brillantes qui indiquent la présence d'objets plus denses que la cellule. L'analyse EDX valide qu'il s'agit de titane et donc de NPs.

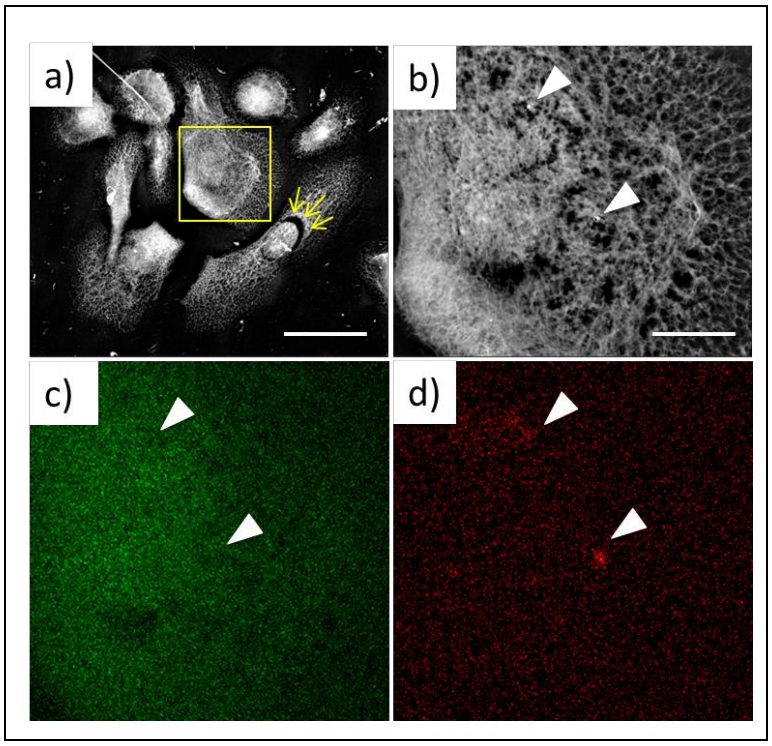


Figure 13 : Clichés de MEB (électrons rétrodiffusés) a) du groupe de cellules et b) de la cellule centrale zoomée. c) et d) montrent respectivement les analyses EDX du phosphore et du titane de la cellule (échelle 40 µm et 10 µm).

La comparaison entre la MO, l'IBA et le MEB-EDX montre qu'il est possible d'observer un même échantillon par différentes techniques d'analyse complémentaires. Le premier avantage de ce type de microscopie corrélative est la **concordance des observations**. Celle-ci permet ainsi de valider toutes les observations réalisées avec les NPs fluorescentes et de les transposer aux NPs natives utilisées pour l'analyse toxicologique.

Le développement en routine de ce type de microscopie corrélative, avec la possibilité de fixer les échantillons à n'importe-quel moment, permet également d'aller plus loin et de **réaliser des analyses dynamiques**. Il est ainsi possible de suivre des évènements biologiques *in vivo* / *in vitro* et de les caractériser ensuite plus finement à un instant donné à l'aide de la **quantification**. Par exemple, il est possible de suivre l'internalisation des NPs dans les cellules ou encore l'impact de leur présence sur le taux de calcium intracellulaire comme dans les précédents travaux rapportés par le groupe [2].

2. Premiers résultats sur la toxicité des nanoparticules

L'étape suivante de l'étude a été de mesurer l'impact de la présence des NPs sur la prolifération des cellules et si celles-ci pouvaient entrainer leur mort. L'objectif était également de comparer l'influence de la morphologie des particules et de la dose d'exposition. Des comptages cellulaires ont ainsi été réalisés au CENBG en collaboration avec Gladys Saez sur des cellules HUVEC et exposées aux NPs (P 25, NAs et NFs) natives avec des concentrations de 0,7, 3,7 et 18,3 µg/cm² sur une période de 8 jours. Les résultats sont condensés dans la Figure 14. Les effets varient en fonction de la dose d'exposition, du type de NPs et également en fonction de la lignée cellulaire étudiée :

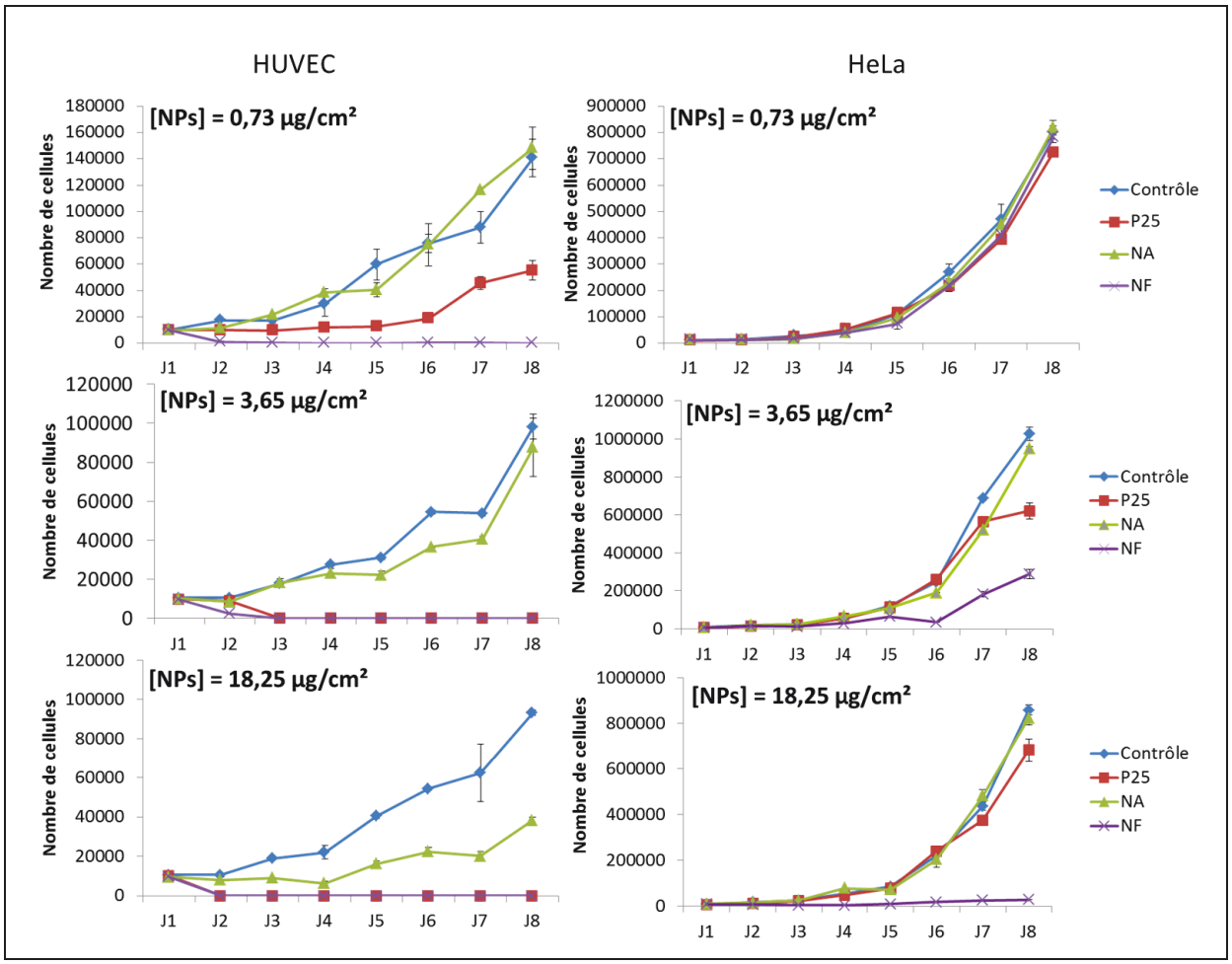


Figure 14 : Influence de la présence des différentes NPs de TiO_2 (P 25, NAs, NFs) à différentes concentrations (0,73, 3,65 et 18,25 µg/cm²) sur la prolifération des cellules HUVEC et HeLa.

(i) Effet du type de NPs sur la prolifération cellulaire

Il est tout d'abord observable que les différentes NPs étudiées n'ont pas le même impact sur la prolifération des cellules. Ainsi à dose identique :

Les HUVEC : L'évolution du nombre de cellules HUVEC à une concentration de 0,73 µg/cm² (premier graphique) montre clairement l'impact du type de NP. Les cellules « contrôles » permettent d'apprécier l'évolution normale de la prolifération cellulaire avec une croissance exponentielle. A cette concentration, la présence de NAs n'influe pas sur le nombre de cellules comptées. A l'inverse, il y a bien un impact sur les cellules exposées aux P 25 et aux NFs. Les P 25 induisent une baisse importante de prolifération et les NFs entrainent la mort de toutes les cellules dès le deuxième jour. Cette tendance est ensuite retrouvée pour toutes les concentrations étudiées.

Les HeLa : Dans le cas des HeLa, seules les NFs ont une influence sur le nombre de cellules aux concentrations 3,65 et 18,25 µg/cm². La légère baisse de prolifération dans le cas des P 25 à 3,65 µg/cm² est très probablement un artéfact de mesure et fera l'objet de vérification.

(ii) Effet de la dose de NPs sur la prolifération cellulaire

Les HUVEC : Nous remarquons également que la dose d'exposition des NPs a un impact important sur la prolifération des cellules quelle que soit la morphologie des particules. L'augmentation de la dose d'exposition tend à réduire le nombre de cellules comptées et à induire la mort des cellules. Cette tendance est observable pour les NAs qui n'induisent des effets qu'à la concentration maximale étudiée pour les HUVEC. Elle se vérifie ensuite pour les P 25 dont l'effet est modéré à la concentration minimale mais devient mortel à partir de 3,65 µg/cm².

Les HeLa : La même tendance est enfin observée sur les HeLa exposées aux NFs avec une baisse progressive de prolifération en fonction de la dose. Les autres NPs n'induisent pas de baisse de prolifération à ces concentrations. Des concentrations plus élevées devront être testées pour vérifier que la tendance se confirme pour les autres NPs.

(iii) NPs et « sensibilité » des différentes lignées cellulaires

Les deux lignées étudiées ne répondent pas de la même manière. Les HeLa semblent en effet plus résistantes que les HUVEC. Il faut en effet une concentration supérieure à 3,65 µg/cm² de NFs pour entrainer la mort des HeLa alors que la concentration minimale suffit pour les HUVEC. Cette tendance se vérifie également pour les autres types des NPs. Cette différence pourrait provenir de plusieurs paramètres :

(i) Une sensibilité intrinsèque différente en fonction de la lignée : les cellules primaires sont d'ordinaire plus fragiles que les cellules immortalisées ;
(ii) Moins d'internalisation dans les HeLa ;
(iii) Des interactions différentes entre les NPs et les milieux de culture.

Ces données toxicologiques sont des résultats préliminaires. Elles serviront de base de travail pour les futures analyses qui seront prochainement conduites au laboratoire visant notamment à mesurer la production d'EROs, l'activité génomique ou encore l'activité protéique.

3. Discussion

L'objectif de l'étude était d'observer les phénomènes consécutifs à l'exposition des lignées cellulaires aux NPs de TiO_2 natives et fonctionnalisées. Nous voulions connaitre la localisation intracellulaire afin de comprendre les interactions entre les NPs et les cellules. La quantification et l'étude de la toxicité devaient enfin permettre de caractériser la toxicité des NPs.

Accumulation intracellulaire de NPs au cours du temps : Nous avons dans un premier temps observé l'évolution de la quantité de NPs dans les cellules en fonction du temps d'exposition aux NPs (sur une durée de 24 h, Figure 2). Il a eu un phénomène d'accumulation sur cette période et les cellules ne semblent pas capables de dégrader ou expulser la matière qu'elles « considèrent » comme étrangère à la cellule (xénobiotique). Dans ce cas, plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette accumulation : (i) les cellules ne sont pas capables d'excréter assez rapidement les NPs ; (ii) l'inertie chimique du TiO_2 empêche sa dégradation par les lysosomes par exemple ; (iii) le titane n'étant pas un élément utilisé par les organismes vivants, il n'est pas reconnu comme tel par les cellules et donc pas systématiquement pris en charge.

Les NPs n'interagissent pas avec un organite cellulaire en particulier : La localisation intracellulaire des NPs a ensuite été étudiée grâce à la fluorescence. Les organites généralement impliqués dans la digestion et le transport intracellulaire ont été marqués. L'étude de co-localisation n'a pas montré clairement une interaction préférentielle entre les NPs et un de ces organites (Figure 5). De plus, avec la MET, nous avons pu vérifier que les NPs pouvaient être aussi bien vacuolisées qu'exister seules dans le cytosol (Figure 6). Ce résultat montre que les NPs peuvent être internalisées par un phénomène d'endocytose défini mais également par diffusion passive. Il se peut également que les NPs internalisées dans les vacuoles aient la faculté de les détruire soit par abrasion mécanique, soit par autre effet comme par exemple la production d'EROs. Ces informations concordent avec les observations précédemment rapportées au sein du groupe [2] et ailleurs [5, 15-17].

L'IBA un outil adapté pour la localisation et la quantification : Un des points clés de ce travail a consisté à montrer qu'il est possible de détecter, localiser et quantifier des NPs de TiO_2 natives grâce à l'IBA (Figure 7) ; qu'il n'est plus nécessaire de les modifier en surface pour pouvoir les voir dans la cellule et qu'il devient possible de regarder l'interaction directe

entre le milieu cellulaire et la surface de la NP. La question de la chimie de surface des NPs est en effet au cœur des problématiques de toxicité et la fonctionnalisation est en conséquence un générateur potentiel d'artéfacts de mesure. L'impact de la fonctionnalisation sur la prolifération de kératinocytes primaires a en effet déjà été illustré par une diminution moins importante de prolifération des cellules par rapport à des cellules natives, faisant état de la protection apportée par la monocouche organique en surface [2]. La quantification *in situ* est également un autre aspect fondamental pour étudier la toxicité des NPs à l'échelle de la cellule. Des techniques d'analyse élémentaire telles que la spectrométrie de masse sont souvent utilisées en nanotoxicologie notamment pour quantifier les NPs [18-21]. Cette technique est cependant destructive ; de plus elle donne un résultat global et ne permet pas de localiser les NPs *in situ* [22]. La force de l'IBA est que sur un lot de cellules il est possible de les sélectionner séparément pour n'en prendre en compte qu'une seule comme région d'intérêt et en quantifier *in situ* les éléments chimiques [23]. Nous avons en outre pu mettre en évidence qu'il y avait pour une même dose d'exposition théorique de NPs, une variation importante de la dose réelle déposée dans les cellules en fonction du type de NPs (Classement : P 25 > NFs > NAs, Figure 9 et 10).

L'IBA ouvre la voie à la nanotoxicologie dose dépendante à l'échelle de la cellule : Un point qui n'a pas été abordé dans la thèse est la possibilité de quantifier les éléments traces présents dans les cellules. Certains mécanismes cellulaires tels que la différenciation ou l'apoptose sont déclenchés par des signaux chimiques. Par exemple, les travaux de M. Simon avaient montré que la différenciation des kératinocytes primaires s'accompagnait d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire [2]. Dans le cas où les effets des NPs se traduisent par une variation de concentration d'éléments traces, l'IBA peut donc permettre l'analyse nanotoxicologique en fonction de la dose à l'échelle de la cellule unique. Cet aspect fait partie des perspectives de cette étude.

La toxicité des NPs dépend de leur morphologie et de la dose : L'étude de prolifération a montré que les différentes NPs choisies et la dose d'exposition avaient des effets différents sur les cellules HUVEC et sur les HeLa (Figure 14). Dans tous les cas, l'augmentation de la concentration en NPs a ralenti la prolifération des cellules jusqu'à leur mort dans plusieurs cas. Dans l'intervalle des concentrations étudiées, la toxicité des NPs de TiO_2 est donc dose-dépendante. Ensuite, les effets observés ont été différents selon les NPs. Les NFs sont les particules qui ont le plus d'effet sur les cellules devant les P 25 et les NAs (Classement : NFs > P 25 > NAs). Or, d'après les résultats de quantification, la quantité réelle de NPs présentes

dans les cellules varie en fonction de la morphologie (Figure 9). Ces résultats ont été obtenus sur des PHFK mais nous attendons un comportement similaire quelle que soit la lignée puisque cette donnée dépendrait de la stabilité en solution des NPs. Dans cette hypothèse, les P 25 et les NFs sont retrouvées en quantités comparables. Il est donc possible de conclure que les NFs sont plus toxiques que les P 25 pour les cellules. Cette différence peut être due à différents paramètres : (i) la surface spécifique ; (ii) la réactivité de surface (fonctions –OH) ou encore (iii) la forme allongée et acérée. D'autres morphologies devront être testées pour affiner ces données.

Le comportement des NAs en solution (mieux dispersées) a eu un impact sur la quantité retrouvée dans les cellules. Les images de MET vont également dans ce sens avec des agrégats internalisés de plus petite taille (Figure 6). Cette différence pourrait expliquer les effets moins prononcés sur la prolifération cellulaire. Les NAs ne sont donc peut-être pas moins toxique mais seulement moins biodisponibles. Pour vérifier ces données, des NPs ressemblant aux P 25 possédant un comportement en solution similaire aux NAs ont été synthétisées et feront prochainement l'objet d'une étude de leur impact sur la prolifération des cellules.

Les faibles doses peuvent avoir un impact : J'ai montré dans l'état de l'art que des NPs étaient déversées dans les écosystèmes par différentes voies. Les prévisions sont par ailleurs alarmistes quant aux futurs rejets. Les résultats présentés dans cette partie montrent que de faibles doses suffisent à déclencher des effets pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. Il y a donc urgence par rapport à la prise de conscience du risque lié à la présence de NPs dans l'environnement et les études visant à comprendre les interactions avec le vivant doivent s'intensifier.

Perspectives : Les analyses présentées dans ce chapitre sont essentielles pour comprendre les mécanismes de toxicité des NPs. Ce travail servira de base pour les futures analyses qui seront conduites au sein du groupe. L'équipe s'est en effet récemment équipée d'appareillage visant à mieux comprendre les effets biologiques directs tels que la production d'EROs, l'activité génomique ou encore l'activité protéique. Les résultats devront, par ailleurs, toujours être rapportés aux propriétés des NPs pour définir de manière très claire la toxicité des NPs de TiO_2 et ainsi évaluer le risque. Cette méthodologie pourra également être transposée à l'étude de la toxicité de n'importe quel type de NPs.

4. Partie expérimentale

4.1. Culture cellulaire

4.1.1. Exposition

Les cellules HUVEC et PHFK sont des lignées primaires qui possèdent des caractéristiques connues et reproductibles. Elles sont conservées en flasque ou puits de culture avec un milieu commercial adapté (*Gibco*®, *LifeTechnologies*). Les puits de culture sont placés en enceinte thermostatée à 37 °C avec un taux de CO_2 de 5 %.

Type cellulaire	Nom du milieu	Additifs
HUVEC	M200	antibiotiques, antimycotique, pénicilline streptomycine, LSGS (low serum growth supplement)
PHFK	K-SFM (Keratinocyte serum free medium)	antibiotiques, antimycotique, pénicilline streptomycine, Complément kératinocyte
HeLa	DMEM (Dubelcco's modified eagle medium	antibiotiques, antimycotique, pénicilline streptomycine, L-Glutamine, SVF (sérum de veau fœtal)

Les suspensions de NPs de 1 ou 0,1 mg/mL subissent une sonification juste avant l'exposition. Le volume correspondant à la dose est ensuite prélevé et déposé dans le milieu de culture au-dessus des cellules puis la flasque (ou la plaque 6 / 12 puits) est lentement agitée manuellement. Le volume à prélever dépend de la surface du puits et de la concentration de la solution de NPs.

4.1.2. Préparation des cellules pour l'observation en MO

Les cellules sont étalées sur des lamelles de verre placées au fond de plaques 12 puits avec 2 mL de milieu. Les agents de transduction sont ensuite ajoutés pendant une durée minimale de 12 h. Les marqueurs organitiques visant les endosomes précoces, les lysosomes, les endosomes tardifs ou encore l'appareil de Golgi ont été achetés auprès d'*Invitrogen* : Celllight® Reagent Bacman 2.0. Le protocole est issu de la référence [24]. Après 16 h

minimum d'incubation, les cellules sont exposées aux NPs selon la méthode décrite en début de chapitre.

Les cellules sont ensuite rincées 3 à 5 fois avec 2 mL de milieu de culture puis avec 2 mL de PFA (paraformaldéhyde) 4 % volumique à pH 7,4 puis laissées incuber pendant 30 minutes à l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS (phosphate buffer saline) puis perméabilisées avec une solution de Triton X100 à 0,2 % dans du PBS. Les cellules sont encore rincées 3 à 5 fois avec du PBS puis incubées 5 minutes avec du Hoechst^{33342} (5 µL dans 50 mL de PBS). Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS. La lamelle est ensuite récupérée et déposée sur une goutte de ProLong® Gold Antifade Reagent elle-même déposée sur une lame de verre. Le montage est enfin laissé à T_{amb} une nuit puis conservé à 4 °C.

4.1.3. Préparation des cellules pour l'observation en IBA

4.1.3.1. Montage des puits de culture

Les puits de culture PEEK (polyétheréthercétone) sont surmontés d'un film de polycarbonate (PC) de 2 µm d'épaisseur à l'aide de formvar. Le PC a été choisi pour sa biocompatibilité et ses bonnes propriétés mécaniques. Le polycarbonate montre aussi une bonne résistance aux faisceaux d'ions sans pour autant les arrêter [25].

4.1.3.2. Culture cellulaire

Les puits montés sont déposés dans des plaques 12 puits puis recouverts de milieu de culture contenant les cellules. L'adhésion des cellules sur le support se fait généralement rapidement (typiquement 1 h 30). Les NPs conservées sous forme de dispersions aqueuses de concentrations connues sont ensuite ajoutées à chaque puits et une phase d'agitation manuelle permet enfin d'homogénéiser le milieu.

4.1.3.3. Cryofixation / lyophilisation

La fixation s'effectue dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide à une température comprise entre -120 et -100 °C. Les puits sont récupérés puis rincés 2 fois dans le milieu de culture puis une fois dans l'eau milliQ. Les cellules sont ensuite plongées 1 minute dans l'isopentane, puis lyophilisées dans une enceinte refroidie à -40 °C.

4.1.4. Protocole de fixation des cellules pour la MET

Les protocoles de fixation ont été réalisés par le Bordeaux Imaging Center (Bordeaux Segalen). 40 000 cellules sont étalées sur des lames de microscopie dans des chambres de culture LAB-TEK (NUNC) et sont cultivées dans 500 µl de milieu (37 °C, 5 % CO_2, obscurité) avec ou sans nanoparticules de TiO_2 (P 25 Evonik, NAs et NFs) à la concentration de 2 µg/cm^2. Après 24 h d'exposition, les cellules sont rincées trois fois dans du PBS (phosphate buffer saline) 0,1 M et fixées 2 h à 20 °C dans une solution de glutaraldéhyde 1.6 %-PBS 0.1 M (Sigma). Les cellules fixées sont rincées deux fois (10 min) avec du PBS 0,1 M puis post-fixées au tétroxyde d'osmium 1 %-PBS 0,1 M (1 h 30, température ambiante, obscurité). Les échantillons post-fixés sont traités avec une solution filtrée d'acétate d'uranyle 0,5 % puis déshydratés dans une gamme de solution d'éthanol (50° à 100°) avant l'imprégnation dans la résine epoxy (Epon 13 g, MNA (methyl nadic anhydre) 7 g, DDSA (dodecenyl succinic anhydride) 8 g, DMP30 (dimethylaminomethylphenol, 85 %) 0,45 g). Les ultra-coupes sont préparées avec l'ultra-microtome LEICA EM-UC 7.

4.2. Observation des échantillons

4.2.1. Microscopie optique / épifluorescence

Les échantillons cellulaires ont tous été observés à l'aide d'un microscope optique permettant l'analyse *in vitro* ou *ex vivo*. L'équipe IPCV (CENBG) dispose d'un AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) équipé de filtres chromatiques Hoechst (Hoechst set 02), GFP (eGFP set 38HE) et rhodamine (DsRed set 31) [26]. L'échantillon est placé sur une plate-forme mobile automatisée ce qui permet par ailleurs de réaliser des cartographies des puits de culture en vue de retrouver des zones d'intérêt par une autre technique d'analyse.

4.2.2. Analyse par faisceau d'ions

Les analyses STIM, PIXE et RBS ont été conduites au CENBG sur la plate-forme AIFIRA. L'équipement est décrit dans le chapitre 3. Les concentrations sont obtenues à 'aide du logiciel Gupix (en ng/cm²) puis converties en nombre de P 25. La masse d'une P 25 a été évaluée à 3,1.10^{-8} ng en considérant la particule sphérique ayant une densité de 3.8 [27].

$$Nb_{P\,25} = \frac{concentration\ en\ titane\ \left(\frac{ng}{cm^2}\right).surface\ zone\ d'intérêt(cm^2)}{masse\ d'une\ P\ 25\ (ng)}$$

4.2.3. Microscopie électronique à balayage

Les analyses MEB ont été conduites au Bordeaux Imaging Center (BIC – Université de Bordeaux) à l'aide d'un FEI QUANTA 200 possédant une tension d'accélération de 200 V à 30 KV. Les images ont été effectuées sous pression de vapeur d'eau réduite (0,4 Torr) pour réduire les phénomènes de charge de l'échantillon. Les techniques de MEB électrons secondaires et électrons rétrodiffusés ont été utilisées. La cartographie de la surface des échantillons a enfin été réalisée par EDX avec un détecteur SDD (Silicon Drift Detector) refroidi par effet Peltier.

4.2.4. Microscopie électronique en transmission

Les analyses MET ont été effectuées au Bordeaux Imaging Center (BIC – Université de Bordeaux) à l'aide de deux microscopes électroniques. Le premier est décrit dans la partie expérimentale du chapitre 2 et le second est un FEI TECNAI 12 possédant une tension d'accélération de 60 à 120 KV. Le microscope est équipé d'une caméra ORIUS SC1000 (11 MPx) (GATAN) et fonctionne avec le logiciel Digital Micrograph.

4.3. Mesure de prolifération

Tous les comptages cellulaires sont réalisés avec le compteur cellulaire TC20 (Biorad). 10 000 cellules HUVEC sont étalées par puits dans des plaques 6 puits (cellstar) et cultivées dans 3 mL de milieu M200 au maximum 8 jours avec ou sans NPs de TiO_2. Nous avons choisi dans un premier temps d'exposer les cellules HUVEC à une faible concentration de NPs de TiO_2, à savoir 0,73 µg/cm². Les P25 Evonick, NFs et NAs natives ont ainsi été testé. Chaque jour, les cellules d'un puits par condition (soit 4 conditions par jour) sont délicatement rincées (milieu M200), trypsinées (400 µl de trypsine, 7 min à 37 °C-5 % CO_2), récupérées (ajout de 1 ml de milieu M200) et centrifugées (1 200 rpm, 4 °C, 5 min). Le culot est ensuite repris dans un volume défini de milieu et 10 µl sont mis à compter avec du bleu de trypan (Biorad) dans le compteur cellulaire. Le nombre de cellules par puits est ensuite recalculé manuellement selon le volume de reprise du culot. En parallèle, 1 mL de milieu des puits non trypsinés est changé quotidiennement. Chaque condition est comptée trois fois, l'expérimentation a été réalisée deux fois de façon indépendante.

Références

1. Vauthier, C., B. Cabane, and D. Labarre, *How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(2): p. 466-475.
2. Simon, M., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity.* Nanotoxicology, 2010: p. 126-140.
3. Simon, M., *Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro*, 2009, Université Bordeaux 1.
4. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell.* Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
5. Panariti, A., G. Miserocchi, and I. Rivolta, *The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?* Nanotechnology, Science and Applications, 2012. **5**: p. 87-100.
6. Geiser, M., et al., *Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease.* Shi, Hongbo, 2013. **10**(1): p. 19.
7. Haugland, R., *Handbook of fluorescent probes and research products*. ninth edition ed. 2002: Molecular probes.
8. Fernando, L.P., et al., *Mechanism of Cellular Uptake of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles.* Biomacromolecules, 2010. **11**(10): p. 2675-2682.
9. Ha, S.-W., et al., *Bio-active engineered 50 nm silica nanoparticles with bone anabolic activity: Therapeutic index, effective concentration, and cytotoxicity profile in vitro.* Toxicology In Vitro, 2014. **28**(3): p. 354-364.
10. Liu, Y. and J. Wang, *Comparative and quantitative investigation of cell labeling of a 12-nm DMSA-coated Fe3O4 magnetic nanoparticle with multiple mammalian cell lines.* Journal of Materials Research, 2011. **26**(06): p. 822-831.
11. Tavare, J.M., L.M. Fletcher, and G.I. Welsh, *Using green fluorescent protein to study intracellular signalling.* J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 297-306.
12. Gupta, U.C. and S.C. Gupta, *Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review.* Pedosphere, 2014. **24**(1): p. 13-38.
13. Mindell, J.A., *Lysosomal acidification mechanisms.* Annual Review of Physiology, 2012. **74**: p. 69-86.
14. in2p3. *Microscopie electronique en transmission : guide de préparation des échantillons*. Available from: http://temsamprep.in2p3.fr/.
15. Chithrani, B.D. and W.C.W. Chan, *Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes.* Nano Letters, 2007. **7**(6): p. 1542-1550.
16. Lévy, R., et al., *Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review*. 2010. 2010.
17. Rima, W., et al., *Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles.* Biomaterials, 2013. **34**(1): p. 181-195.
18. Yu, S.-j., et al., *Quantification of the Uptake of Silver Nanoparticles and Ions to HepG2 Cells.* Environmental Science & Technology, 2013. **47**(7): p. 3268-3274.
19. Herzog, F., et al., *Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface.* Shi, Hongbo, 2013. **10**(1): p. 11.
20. Li, N., et al., *Interaction between nano-anatase TiO_2 and liver DNA from mice in vivo.* Nanoscale Res. Lett., 2010. **5**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 108-115.
21. Alkilany, A. and C. Murphy, *Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?* Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(7): p. 2313-2333.

22. James, S.A., et al., *Quantification of ZnO Nanoparticle Uptake, Distribution, and Dissolution within Individual Human Macrophages.* Rivera, Gil Pilar, 2013. **7**(12): p. 10621-10635.
23. Moretto, P., *Nuclear microprobe: a microanalytical technique in biology.* Cell Mol Biol, 1996. **42**(1): p. 1-16.
24. Life-technologies. *CellLight Reagents Bacman 2.0*. 2014; Available from: http://tools.lifetechnologies.com/.
25. Devès, G., *Analyse chimique quantitative à haute résolution spatiale par microsonde et nanosonde nucléaires*, in *école doctorale des sciences chimiques*2010, Bordeaux 1.
26. Zeiss. Available from: www.micro-shop.zeiss.com.
27. Mehrvar, M., W.A. Anderson, and M. Moo-Young, *Comparison of the photoactivities of two commercial titanium dioxide powders in the degradation of 1,4-dioxane.* International Journal of Photoenergy, 2002. **4**(4): p. 141-146.

Chapitre 5 : Internalisation et écotoxicologie *in vivo* des nanoparticules de TiO_2 sur un organisme pluricellulaire : *Caenorhabditis elegans*

Les modèles *in vitro* tels que les cellules en culture sont des modèles de choix dans les premières étapes d'analyses toxicologiques et permettent de simplifier l'observation des interactions et des réponses de ces systèmes biologiques. Cependant, l'ensemble des interactions biologiques existantes chez un organisme vivant est bien plus complexe. Dans le cadre de notre étude, l'approche multicellulaire nécessitait de disposer d'un organisme bien connu et bien caractérisé mais surtout manipulable aisément avec des contraintes de culture limitées. *C. elegans* répond à toutes ces exigences. Il est en effet pratique à cultiver et peu coûteux en entretien et surtout, il présente beaucoup de mécanismes physiologiques essentiels et des voies métaboliques observables chez les organismes supérieurs dont l'homme [1, 2]. Du fait de son abondance dans les écosystèmes, il peut également répondre à des problématiques d'écotoxicologie [3, 4].

Ce modèle a donc été choisi pour tester la toxicité des NPs de TiO_2. Comme pour les cellules en culture, les premières questions auxquelles il a fallu répondre ont concerné le devenir des NPs lorsqu'elles étaient introduites dans le milieu des nématodes. Je me suis donc focalisé sur la détection, la localisation et l'internalisation des NPs dans les nématodes. Des analyses écotoxicologiques complètes ont ensuite été entreprises par Gladys Saez afin de mettre en exergue les effets potentiels des NPs de TiO_2 sur des paramètres biologiques clés du cycle de vie de *C. elegans* : la survie, la croissance, la reproduction et l'apparition du phénotype « bag of worms » (BOW).

1. Détection et localisation des nanoparticules de TiO_2

1.1. Exposition des *C. elegans* aux nanoparticules

Les *C. elegans* sont cultivés en boites de pétri sur des géloses d'agar enrichies en sels minéraux. Les vers vivent, se déplacent, mangent et se reproduisent sur la gélose dans l'obscurité. La nourriture de base du nématode est la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Les géloses sont recouvertes de bactéries et incubées pour 12 heures minimum afin de proposer une nourriture suffisante aux vers. L'exposition aux NPs, schématisée en Figure 1, se déroule de la même manière. Des solutions aqueuses de concentrations en NPs connues (1 mg/mL) sont préparées puis subissent un traitement de sonification (1 minute, 100 W) pour réduire au maximum les états d'agrégation. Une quantité donnée de solution est ensuite déposée sur la gélose, étalée à l'aide d'un râteau puis laissée sécher. La concentration en NPs est calculée en fonction de la surface de la gélose et est donnée en µg/cm². Ce mode de préparation permet de

bien répartir les NPs sur la surface. Une autre voie de culture des *C. elegans* utilise un milieu liquide. Nous avons cependant choisi de ne pas explorer cette voie car elle n'est pas adaptée à nos NPs dont certaines ont tendance à sédimenter.

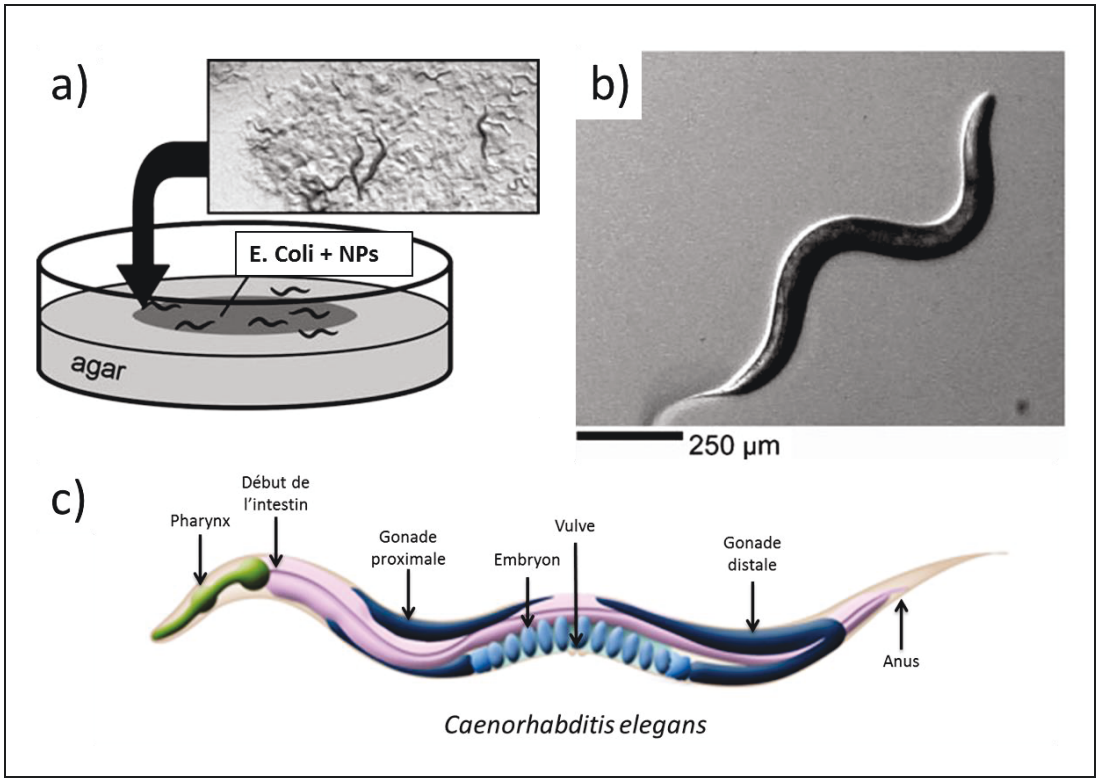


Figure 1 : a) Schéma du mode de culture et d'exposition aux NPs de TiO_2 des *C. elegans* et b) photographie d'un ver se déplaçant sur la gélose et c) rappel anatomique (figure adaptée des références [4, 5]).

1.2. Localisation des nanoparticules par microscopie à épi-fluorescence

1.2.1. Ingestion des nanoparticules

Après le dépôt des NPs sur le support de culture des vers, nous avons tout d'abord observé leur comportement vis-à-vis d'elles. Nous avons notamment cherché à savoir si les vers ingéraient les NPs. Le suivi *in vivo* des NPs a été réalisé grâce à la fluorescence en microscopie optique. Les expériences ont été réalisées avec ou sans bactéries avec des concentrations de 2 et 30 µg/cm² sur des vers issus de populations synchronisées c'est-à-dire ayant tous le même stade (L1, L4 ou adulte). Les observations ont été réalisées en déposant plusieurs vers dans une solution d'azoture de sodium (1 mM) qui permet de les immobiliser. Les *C. elegans* ont enfin été placés entre lames et lamelles pour l'observation.

Des exemples de vers contrôle et exposés sont montrés sur la Figure 2. Des vers adultes ont été exposés à une dose de 2 µg/cm² de P 25-APS-TRITC pendant 4 h et 24 h avec ou sans bactéries. Les vers n'apparaissent pas naturellement droits, il s'agit en réalité d'une retouche à l'aide du plugin « *straighten* » du logiciel *ImageJ* qui permet de redresser les structures courbées.

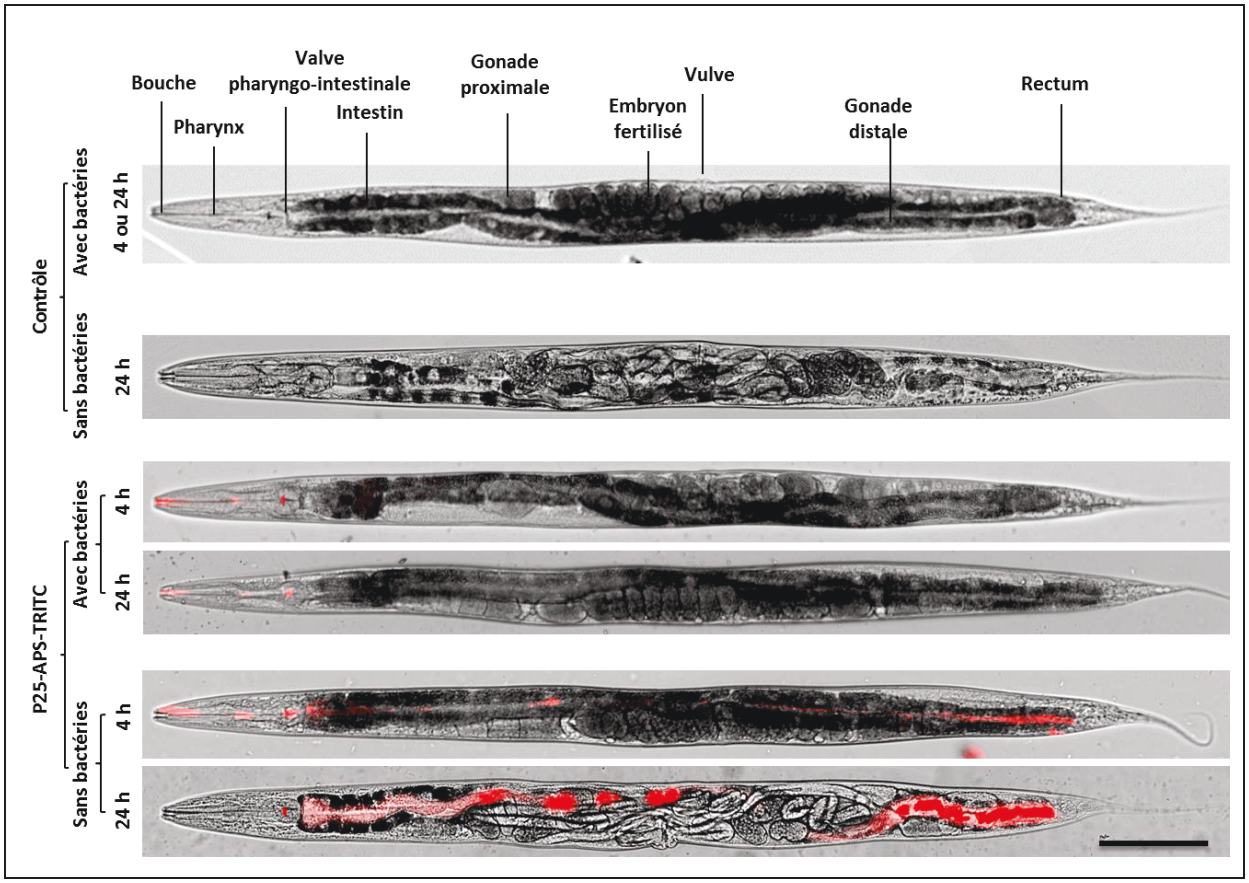


Figure 2 : Microscopie optique de *C. elegans* « contrôles » et exposés au stade adulte à des NPs fonctionnalisées TRITC pendant 4 et 24 h avec ou sans bactéries. La présence de bactéries a un effet sur la quantité de NPs retrouvée dans l'intestin des vers et également sur l'apparition du phénotype BOW (échelle 100 µm).

Les images de microscopie montrent tout d'abord qu'après 4 h d'exposition, les NPs ont été ingérées par les vers. En présence de bactéries, les NPs sont retrouvées dans la bouche, dans le pharynx ainsi que dans l'intestin en faible quantité. Lorsqu'il n'y a pas de bactéries, les quantités de NPs retrouvées sont plus importantes. Cette différence a été décrite par Kiyama *et al*. [6], comme provenant d'une discrimination volontaire basée sur la taille et la nature chimique des NPs. En résumé, lorsqu'ils ont le choix, les vers préfèrent ingérer les bactéries plutôt que les NPs. Dans ce cas, la santé des vers ne semble pas atteinte par la présence de NPs. Nous verrons cependant plus loin que l'exposition a bien un effet (cf. partie écotoxicologie). Dans le cas des vers exposés sans bactéries, le fait marquant est l'apparition

du phénotype BOW. Pour rappel, ce phénotype se caractérise tout d'abord par un arrêt de ponte suivi de l'éclosion *in utero* des embryons [5, 7]. L'arrêt de ponte est facilement observable puisque les embryons commencent alors à s'accumuler dans l'utérus. Nous avons également remarqué que cet état de stress précoce était accompagné d'un agrandissement (dilatation) de la cavité proximale de l'intestin mais nous reviendrons sur cet aspect dans le paragraphe suivant. La présence de NPs en absence de bactérie a eu pour effet d'accélérer l'arrêt de ponte et la dilatation de l'intestin qui apparaissent dès 4 h contre 7 à 8 h sans NPs. Ce constat a été réalisé pour toutes les NPs utilisées quelle que soit la morphologie, la fonctionnalisation et la dose d'exposition. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de translocation des NPs dans les cellules intestinales ou adjacentes par cette méthode.

1.2.2. Dilatation de l'intestin

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, lorsque les vers sont privés de nourriture, le phénotype BOW apparait (éclosion des embryons dans l'utérus de l'adulte). Ce processus est naturellement précédé par une perturbation de la ponte qui peut aller jusqu'à l'arrêt complet. Ce phénomène est encore mal compris mais pourrait être le résultat de mécanismes de défense déclenchés par le ver pour protéger sa progéniture [7, 8].

Lors de nos observations, nous avons donc également remarqué, qu'en prémices de ces phénomènes, la partie proximale de l'intestin se dilatait. Un exemple de ver à l'intestin dilaté est montré sur la Figure 3. Cette dilatation pourrait être en lien direct avec l'apparition du phénotype BOW. Ce phénomène n'a cependant été que très rarement décrit dans la littérature. Certains auteurs pensent qu'il s'agit d'une réponse immunitaire à un stress pouvant être d'ordre infectieux [9-12] ou bien qu'il pourrait être dû au vieillissement [13].

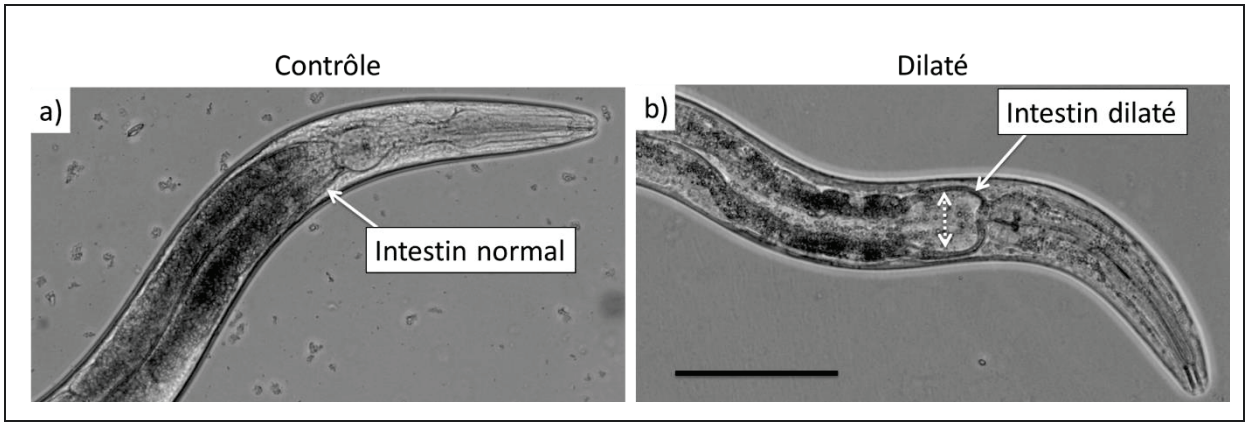


Figure 3 : Observation de MO a) d'un ver adulte contrôle en bonne santé et b) d'un ver dont l'intestin est dilaté (échelle 100 µm).

1.2.3. Récapitulatif des observations en microscopie optique

Quelles que soient les conditions testées, les NPs sont ingérées par les *C. elegans*. La présence de bactéries dans le milieu influe par ailleurs de manière importante sur la quantité retrouvée dans les vers. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 1. Lorsque les vers sont privés de bactéries, les vers passent par différents stades aboutissant à l'apparition du phénotype BOW. Ce processus est accéléré lorsqu'il y a des NPs dans le milieu avec l'apparition de la dilatation de l'intestin dès 4 h. La présence de NPs dans l'environnement des *C. elegans* a donc dans certains cas une influence évidente sur la santé des vers. Cependant, lorsque les expositions sont réalisées en présence de bactéries, les vers semblent manger les NPs en quantité moindre et le phénotype BOW n'est pas observé.

Temps d'exposition	Présence de bactéries	Présence de NPs	Quantité de NPs retrouvées	Etat des vers
4 h	Oui	Non	-	Normal
		Oui	++	Normal
	Non	Non	-	Normal
		Oui	+++	Intestins dilatés
7 h	Oui	Non	-	Normal
		Oui	++	Normal
	Non	Non	-	Intestins dilatés
		Oui	++++	Perturbation ponte
24 h	Oui	Non	-	Normal
		Oui	+	Normal
	Non	Non	-	Vers BOW
		Oui	++++	Vers BOW

Tableau 1 : Récapitulatif des observations effectuées sur les *C. elegans* exposés au stade adulte en présence de NPs de TiO_2 (P 25, NAs, NFs).

1.3. Imagerie confocale

Un des objectifs de l'étude était de déterminer si les NPs peuvent traverser ou non les parois intestinales des vers et se propager vers les organes internes. L'imagerie confocale, plus résolue que la MO classique a été réalisée pour affiner la localisation des NPs dans les *C. elegans.*

Pour cela, les vers ont été exposés à des NPs fluorescentes, fixés chimiquement puis analysés en microscopie confocale (MC). Les fibres musculaires et le pharynx ont été marqués avec un fluorophore (phalloïdine-Alexa fluor® 594) qui se lient à l'actine, une protéine très présente dans ces structures. Enfin, les noyaux cellulaires ont été marqués au

Hoechst^{33342}. Les images sont montrées sur la Figure 4 et permettent d'observer les points suivants :

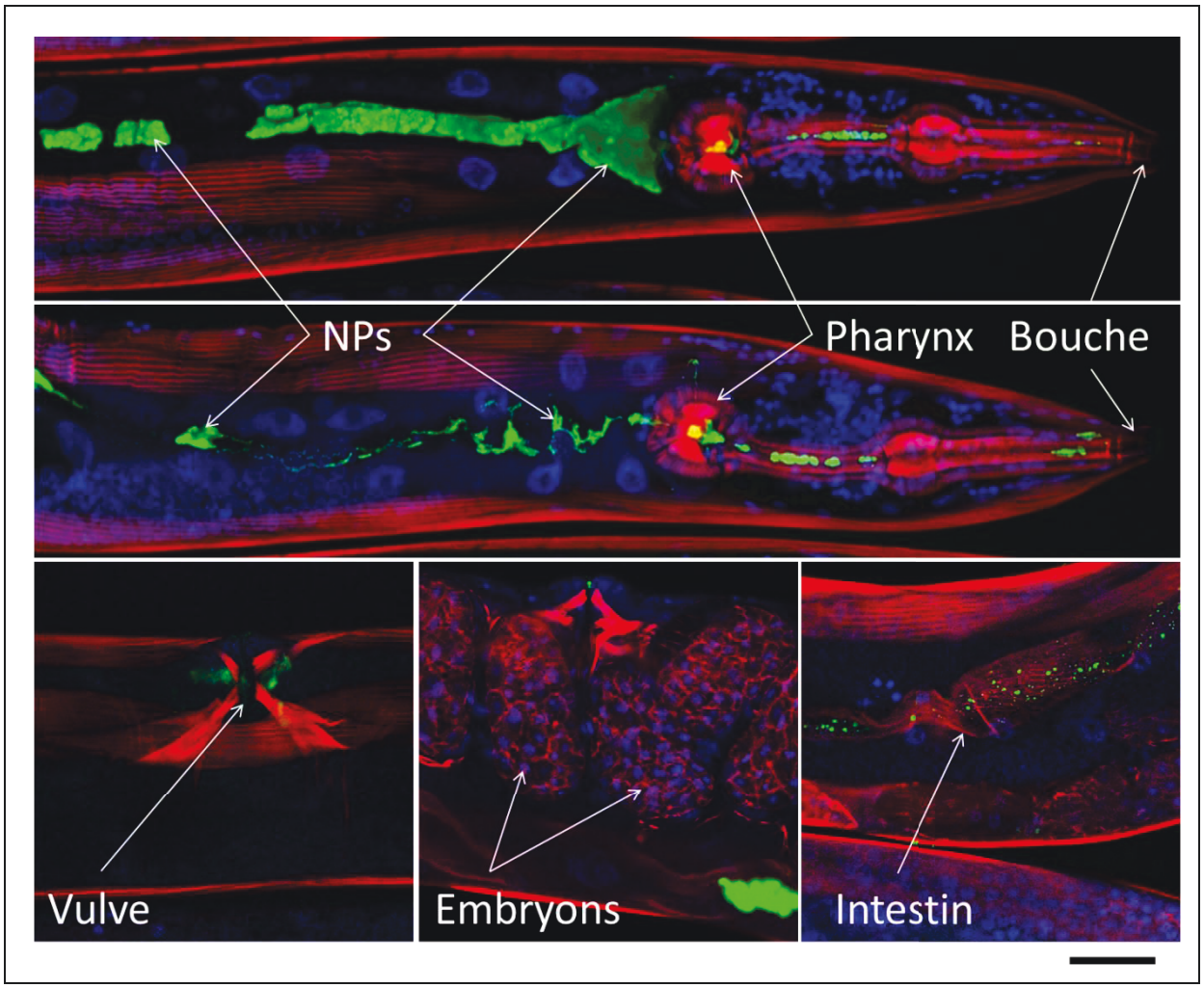


Figure 4 : Imagerie confocale de *C. elegans* exposé à des P 25-APS-FITC (fluorescence verte) pendant 4 h. Les fibres musculaires et le pharynx apparaissent en rouge (phalloïdine-Alexa fluor® 594) et les noyaux cellulaires en bleu (Hoechst^{33342}). Des zooms ont été réalisés sur la vulve, sur les embryons et sur l'intestin (échelle 25 µm).

(i) Les NPs sont retrouvées le long du lumen intestinal

Les NPs sont retrouvées dans les deux bulbes pharyngés et dans l'intestin des *C. elegans*. Elles peuvent être agglutinées ou présentes de manière plus diffuse. D'une manière générale, les NPs sont souvent concentrées dans la partie proximale de l'intestin.

(ii) Les NPs peuvent entrer par la vulve

Des NPs sont également retrouvées au niveau de la vulve des *C. elegans*. Cet orifice est relié à l'utérus dans lequel les embryons sont contenus avant leur expulsion. La vulve est

constituée de quatre muscles disposés en croix qui facilitent la ponte. Les vers pondent entre 4 et 10 embryons à l'heure grâce à la contraction de ces muscles qui sont donc très actifs [14]. Cette activité pourrait être à l'origine du passage des NPs par cet orifice.

(iii) Les NPs ne traversent pas les membranes

Dans tous les vers observés en MC, nous n'avons jamais observé de NPs ayant été internalisées dans les cellules de l'animal. Sur les images présentées, les NPs sont uniquement présentes dans la lumière de l'intestin ou au niveau de la vulve. Il n'y a en effet aucune NPs dans les cellules intestinales ou dans les embryons par exemple. Ces informations sont données avec une résolution de 200 nm et pour affiner nos conclusions, il fut donc nécessaire de passer à une technique mieux résolue : la MET.

1.4. Etude de l'internalisation des nanoparticules par microscopie électronique en transmission

Les techniques précédemment décrites ont permis de mettre en évidence l'ingestion des NPs par *C. elegans*. Elles n'ont en revanche pas permis de montrer une translocation des NPs vers les cellules intestinales ou adjacentes. Afin de vérifier que l'internalisation n'avait pas lieu, nous avons réalisé des observations en MET. La haute résolution a également permis de chercher l'origine de la dilatation avec l'étude de l'état des structures intestinales (microvillosités). Une collaboration entre l'équipe et le Bordeaux Imaging Center (BIC) a en ce sens été initiée. Le BIC s'est récemment équipé d'un appareil de fixation haute pression (HPM 100 Leica) permettant de préparer efficacement des échantillons épais (200 µm) pour l'analyse en MET.

Les *C. elegans* ont été exposés avec des NPs natives et fonctionnalisées (TRITC). L'utilisation de NPs fluorescentes a été utilisée dans un premier temps pour vérifier que les vers sélectionnés les avaient ingérés. La Figure 5 montre des clichés MET de coupes transversales d'un pharynx de ver exposé à des P 25 pendant 4 h. La forme en croix est caractéristique de cet organe. Des NPs sont visibles à l'intérieur du pharynx sous forme de petits agrégats. Aucune d'entre elles n'a cependant été retrouvée en dehors du tractus digestif.

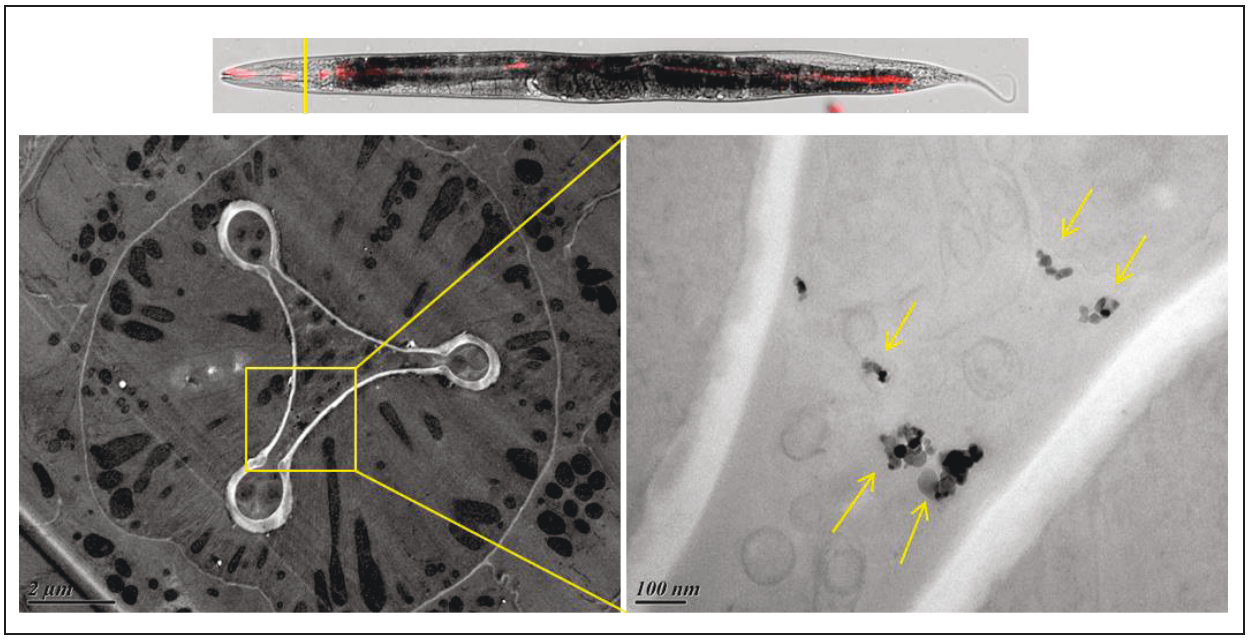


Figure 5 : Observation MET des coupes transversales des *C. elegans* exposées à des P 25-APS-TRITC pendant 4 h. La première image montre la structure en forme de croix caractéristique du pharynx. Le zoom permet de montrer la présence des NPs uniquement dans le tractus digestif.

Par la suite, les *C. elegans* ont été exposés avec des NAs qui s'agrègent moins entre-elles afin de maximiser les chances d'observer une internalisation des NPs. Les clichés visibles sur la Figure 6 sont des coupes longitudinales des *C. elegans* exposés aux NAs à une dose de 2 µg/cm² sans bactéries.

Sur les images, les NPs sont présentes dans le pharynx et l'intestin du ver. Les structures en forme de filaments parallèles (Figure 6 b)) sont des broyeurs (grinders) normalement utilisés pour dégrader la nourriture [5]. Sur les images, les NPs se trouvent au milieu mais ne sont pas en contact avec ces structures.

La Figure 6 c) montre la partie proximale de l'intestin. Il est possible de voir que l'intestin du ver est très dilaté et que cette dilatation n'est pas due à un effet mécanique des NPs, celles-ci ne se trouvant qu'au centre. Une des pistes pouvant expliquer cette dilatation était une altération des tissus intestinaux comme rapporté par *Zhao et al.* [15]. Ces auteurs ont en effet montré que la présence de NPs de TiO_2 pouvait entrainer l'apparition de lésion sur les microvillosités présentes à la surface des cellules intestinales. La Figure 6 d) montre ces structures en forme de filaments parallèles. Sur les images analysées jusqu'à présent, nous n'avons observé aucune lésion ni altération de ces structures. D'autres investigations sont en cours.

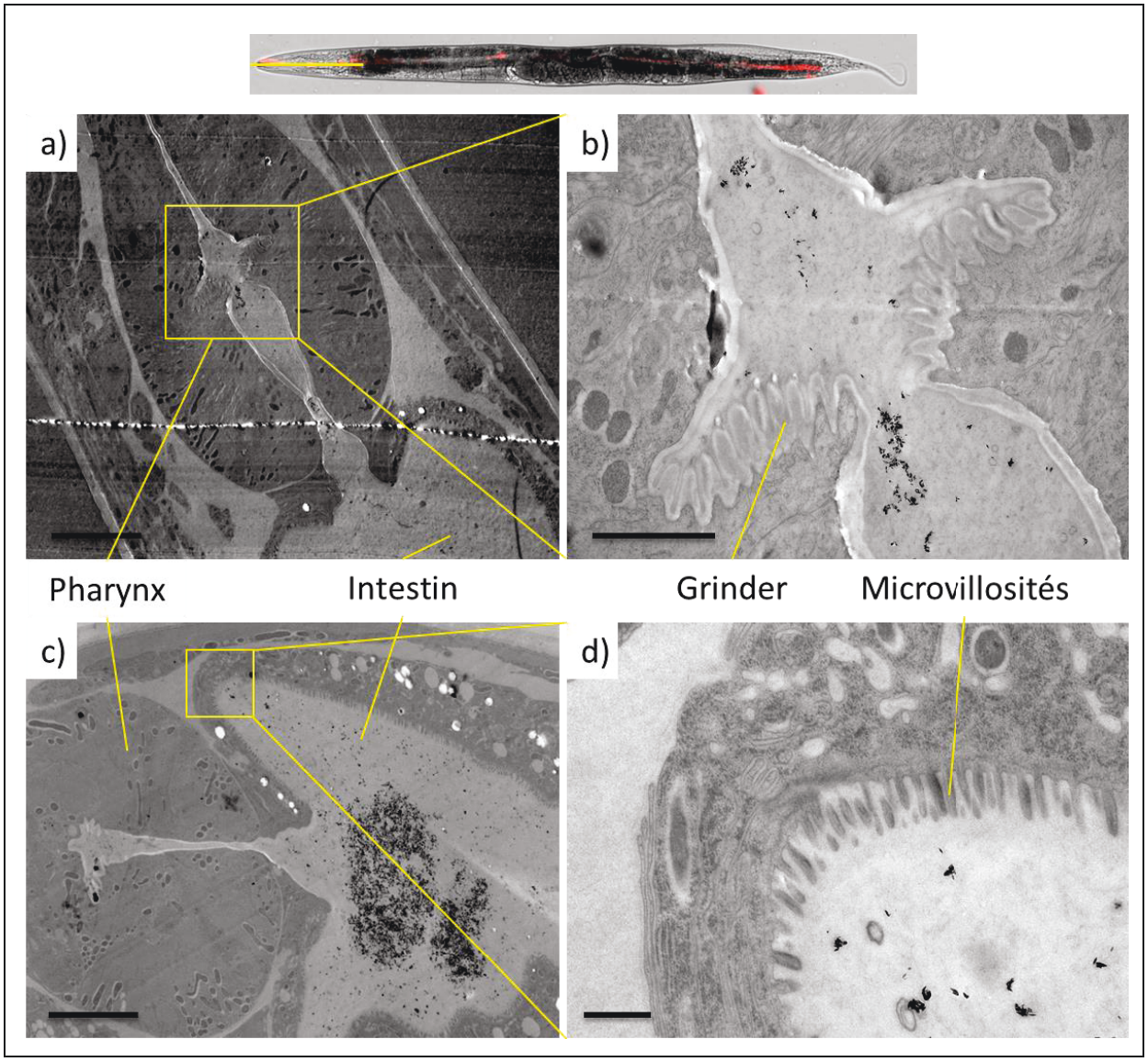


Figure 6 : Coupe longitudinale d'un *C. elegans* adulte exposé à 2 µg/cm² de NAs pendant 4 h sans bactéries avec a) le pharynx et b) le zoom du « grinder » ; c) la partie proximale de l'intestin et d) le zoom sur les microvillosités (échelles 20 µm, 5 µm, 5 µm et 0.5 µm).

2. Caractérisation de *C. elegans* par microanalyse par faisceau d'ions

J'ai montré dans le chapitre 4, que la microanalyse par faisceau d'ions (IBA) pouvait permettre la détection, localisation et quantification des NPs dans les cellules. Les résultats précédemment obtenus au CENBG avaient également permis de montrer une modification de la concentration du calcium intracellulaire [16]. Nous avons donc essayé de transposer ce type d'observation à *C. elegans* qui n'a d'ailleurs fait l'objet que de très rares travaux similaires [17-19]. Pour cela, les vers ont été soumis au même traitement que les cellules avec la

cryofixation / lyophilisation sur les puits PEEK surmontés de polycarbonate. Les vers ont ensuite été observés en MEB pour vérifier que le processus de fixation ne détruisait pas les structures et notamment la cuticule puis analysés par IBA.

2.1. Morphologie externe des *C. elegans*

La morphologie externe a été observée en MEB afin de caractériser l'état physique des vers après cryofixation / lyophilisation. Les analyses MEB, montrées sur la Figure 7, ont été réalisées sur des *C. elegans* fixés sur des puits PEEK après exposition à des P 25-APS-TRITC (2 µg/cm²) pendant 4 h. Les images « électrons secondaires » et « électrons rétrodiffusés » montrent peu d'altérations de la structure externe des vers avec quelques craquelures de l'enveloppe externe.

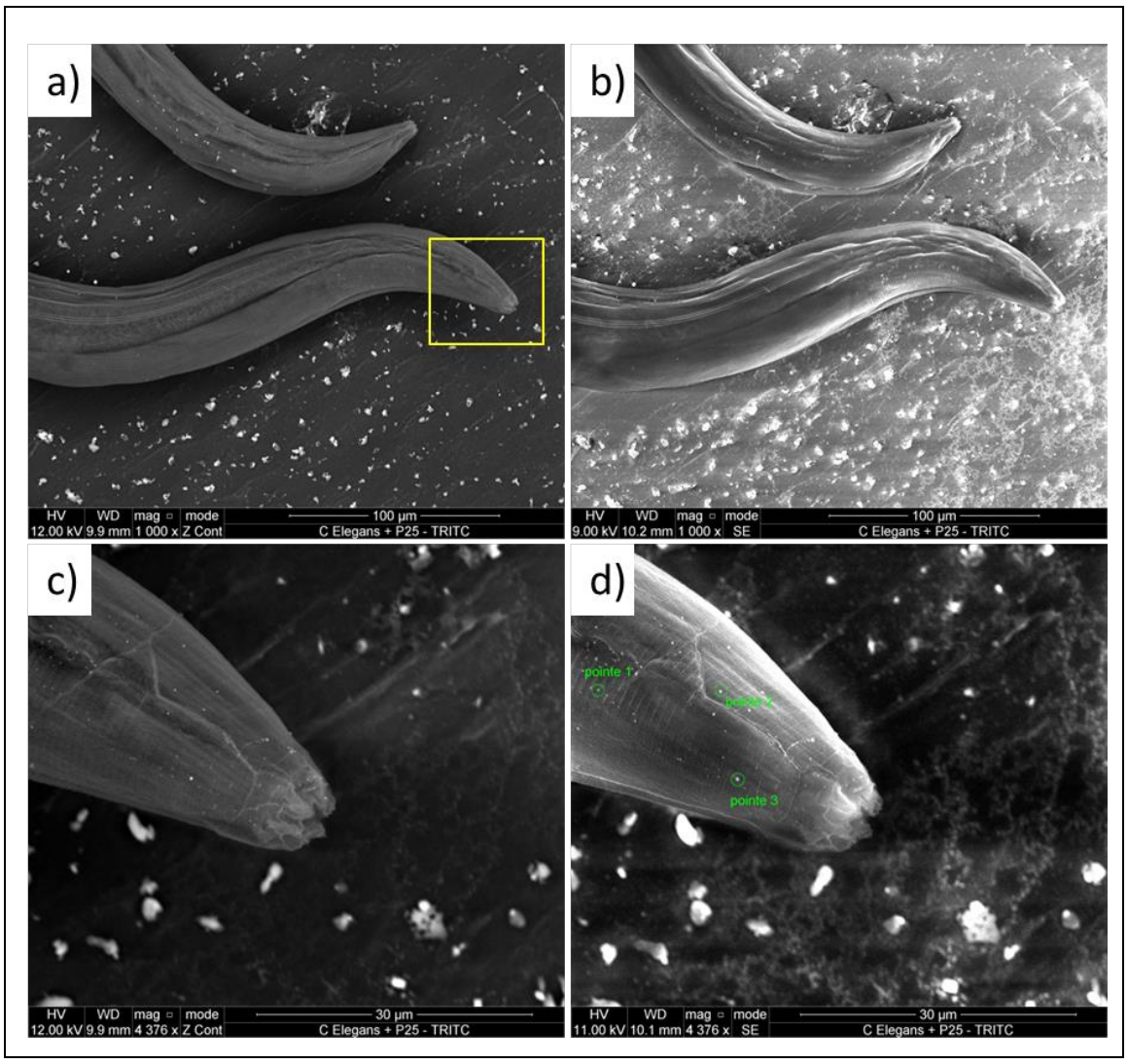


Figure 7 : Clichés de MEB de *C. elegans* exposés à des P 25-APS-TRITC à 2 µg/cm² pendant 4 h puis cryofixés / lyophilisés. a) et et c) sont des images d'électrons rétrodiffusés et b) et d) sont des images électrons secondaires.

Ces images ont été réalisées pour valider la méthode de cryofixation et également afin de vérifier que les NPs observées n'étaient pas collées sur la cuticule (enveloppe externe). Des analyses EDX ont été conduites en même temps. Ces analyses ont montré que les points blancs situés tout autour des vers étaient des précipités de sels (NaCl ou KCl) issus des milieux de culture lyophilisés. Des analyses ciblées sur des petits points visibles sur la Figure 7 d) ont également été réalisées. La présence de titane s'est avérée positive ce qui prouve que les NPs de TiO_2 peuvent venir se « coller » sur la cuticule externe des vers.

2.2. Microanalyse par faisceau d'ions

Les techniques de microanalyse par faisceau d'ions sont utilisées par l'équipe IPCV en routine à l'échelle de la cellule depuis plusieurs années. Un des objectifs du projet « TITANIUMS » était d'appliquer des méthodes d'analyse sur *C. elegans*. L'analyse chimique des vers exposés aux NPs a pu être réalisée pour la première fois mettant ainsi en évidence des distributions caractéristiques des éléments. L'IBA a par ailleurs permis de valider les observations réalisées en microscopie à épi-fluorescence avec la signature chimique du titane. Le phénotype BOW a ensuite été caractérisé. Enfin, des expériences de tomographie ont été réalisées.

2.2.1. Microanalyse par faisceau d'ions sur un *C. elegans* exposé aux nanoparticules

En premier lieu, l'objectif a été de valider la faisabilité de l'IBA sur un organisme comme *C. elegans*. Les protons ont été choisis comme source d'ions afin que l'épaisseur totale des vers (~ 50 µm) puisse être traversée comme mentionné dans le chapitre 3 (1.4.2.1.1). Plusieurs analyses sont nécessaires pour cartographier les vers en entier avec des zones d'analyse larges de 200 µm.

Un exemple de ver exposé aux NPs à une concentration de 2 µg/cm² pendant 4 h en présence de bactéries est montré sur la Figure 8. L'image STIM permet dans un premier temps de montrer les différentes structures internes (pharynx, intestin, embryons).

L'analyse PIXE permet ensuite de caractériser la composition chimique des structures des *C. elegans* mettant évidence des distributions spécifiques. Par exemple, le pharynx est très riche en soufre et sa structure est ainsi visible avec cet élément car elle est très riche en protéines à ponts disulfures (cytokératines). De la même manière, le calcium est

majoritairement présent dans les cellules intestinales de *C. elegans* et est impliqué dans les processus de défection [20]. Enfin, la cartographie du titane révèle une quantité faible de NPs dans le pharynx et au niveau du rectum (flèches noires). Ces résultats concordent avec les précédentes observations réalisées en microscopie optique.

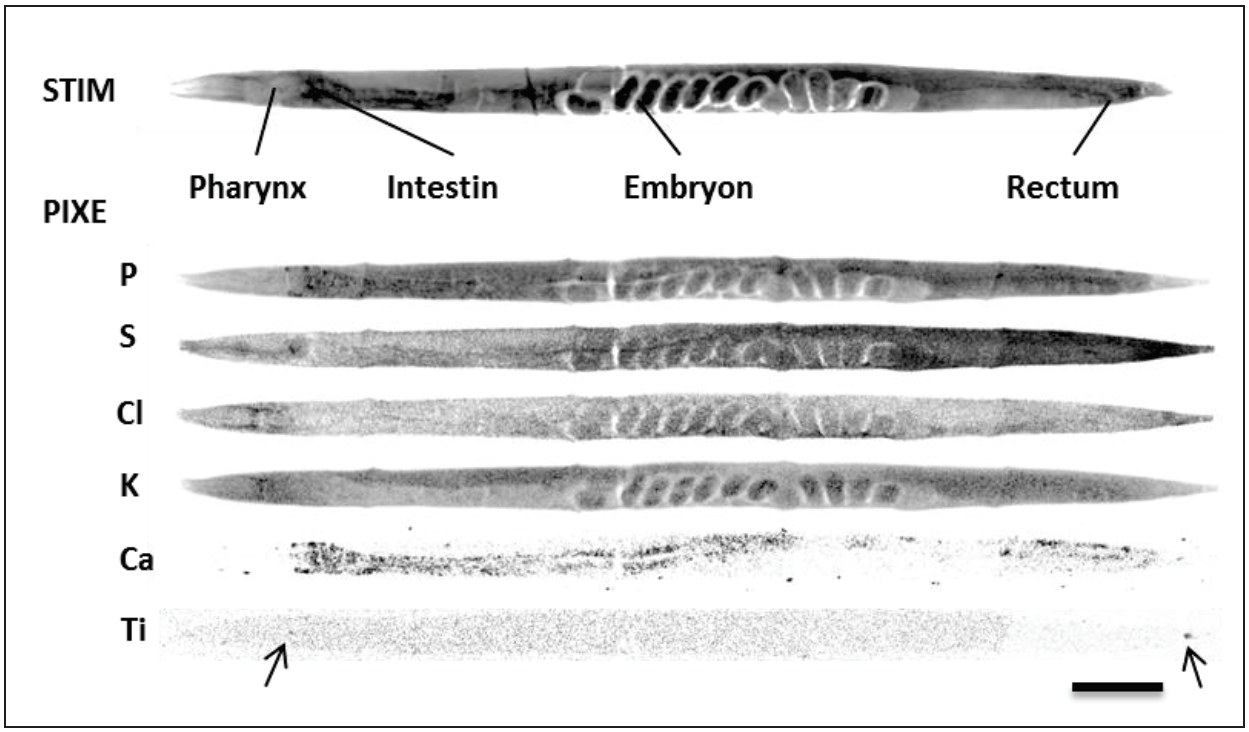


Figure 8 : Image STIM et distributions des éléments phosphore, soufre, chlore, potassium, calcium et titane dans un *C. elegans* adulte exposé à des P 25 natives à 2 µg/cm² avec *E. coli* pendant 4 h (échelle 100 µm).

L'IBA s'est donc avérée particulièrement adaptée pour caractériser les *C. elegans* révélant les structures internes et leur composition chimique avec une résolution de l'ordre du micron. Du fait de l'épaisseur et de la forme cylindrique des vers, la quantification des éléments chimiques est délicate et fait actuellement l'objet de développements spécifiques au sein du groupe par Claire Michelet.

2.2.2. Caractérisation du phénotype BOW

L'expérience a ensuite été renouvelée avec des vers exposés à des P 25 mais cette fois en absence de bactéries. Un ver ayant été exposé 7 h est montré sur la Figure 9. L'analyse de l'image STIM permet de visualiser les anomalies liées au phénotype BOW avec une dilatation importante de l'intestin et une quantité anormale d'embryons non pondus.

L'analyse PIXE a ensuite permis de réaliser les cartographies des éléments chimiques montrant des différences majeures par rapport au ver précédemment montré. D'abord, le phosphore semble suivre la structure de l'intestin et n'est plus réparti de manière homogène. En partant du postulat que les cellules intestinales sont riches en phosphore, cette observation peut s'expliquer par la dilatation de l'intestin et donc la compression de ses cellules. Ce constat est également valable pour le calcium. Ensuite, il y a une accumulation anormale de chlore et de potassium au niveau de l'intestin. Cette observation n'a à ce jour jamais été rapportée et pourrait être en lien direct avec l'apparition du phénotype BOW.

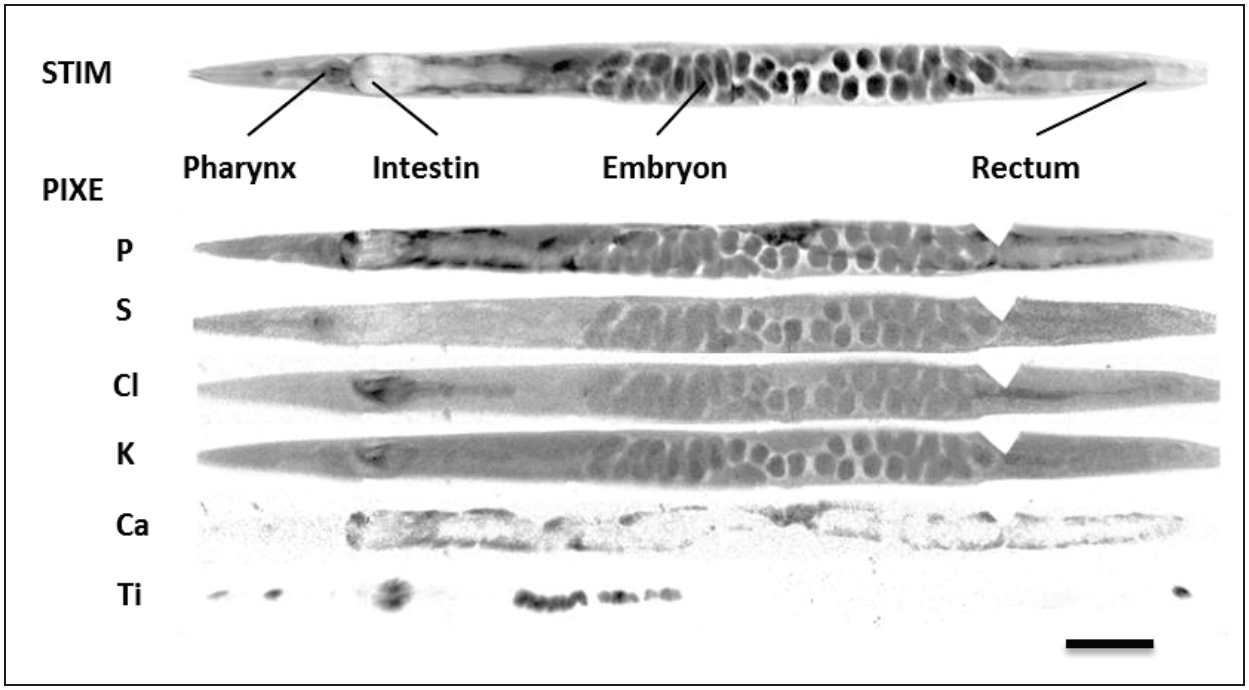


Figure 9 : Image STIM et distributions des éléments phosphore, soufre, chlore, potassium et calcium dans un *C. elegans* adultes exposé à des P 25 natives sans *E. coli* 7 h (échelle 100 µm).

2.2.3. Tomographie par faisceau d'ions

Le développement de l'analyse par faisceau d'ions a également permis de réaliser une expérience originale qui est la tomographie par faisceau d'ions. Ce travail a été réalisé dans les mois précédents mon arrivée dans le groupe en association avec Nuria Gordillot, Stéphane Bourret et Claire Michelet. Les objectifs étaient de :

(i) Tester la faisabilité expérimentale ;

(ii) Vérifier la localisation interne des éléments chimiques, les précédentes images étant des projections 2D ;

(iii) Reconstruire les vers en 3D avec l'imagerie en densité et la distribution des éléments chimiques.

L'expérience a été conduite sur des *C. elegans* exposés à des NPs de TiO_2 P 25 pendant 4 h puis cryofixés /lyophilisés. La reconstruction 3D des vers analysés en STIM et en MEB est montrée sur la Figure 10. L'image montre deux têtes de vers collés d'abord en projection 2D puis sous forme de coupes transversales. Il ne s'agit pas ici de coupes « physiques », seul le faisceau traverse l'échantillon. Les images sont ensuite comparées à l'analyse MEB réalisée sur les mêmes vers. Les deux vers collés sont facilement reconnaissables de la même façon que certains défauts pointés par les flèches bleues. L'image MEB permet également de voir les zones analysées en PIXE (voir ci-après) avec une légère rétractation des tissus (flèches rouges).

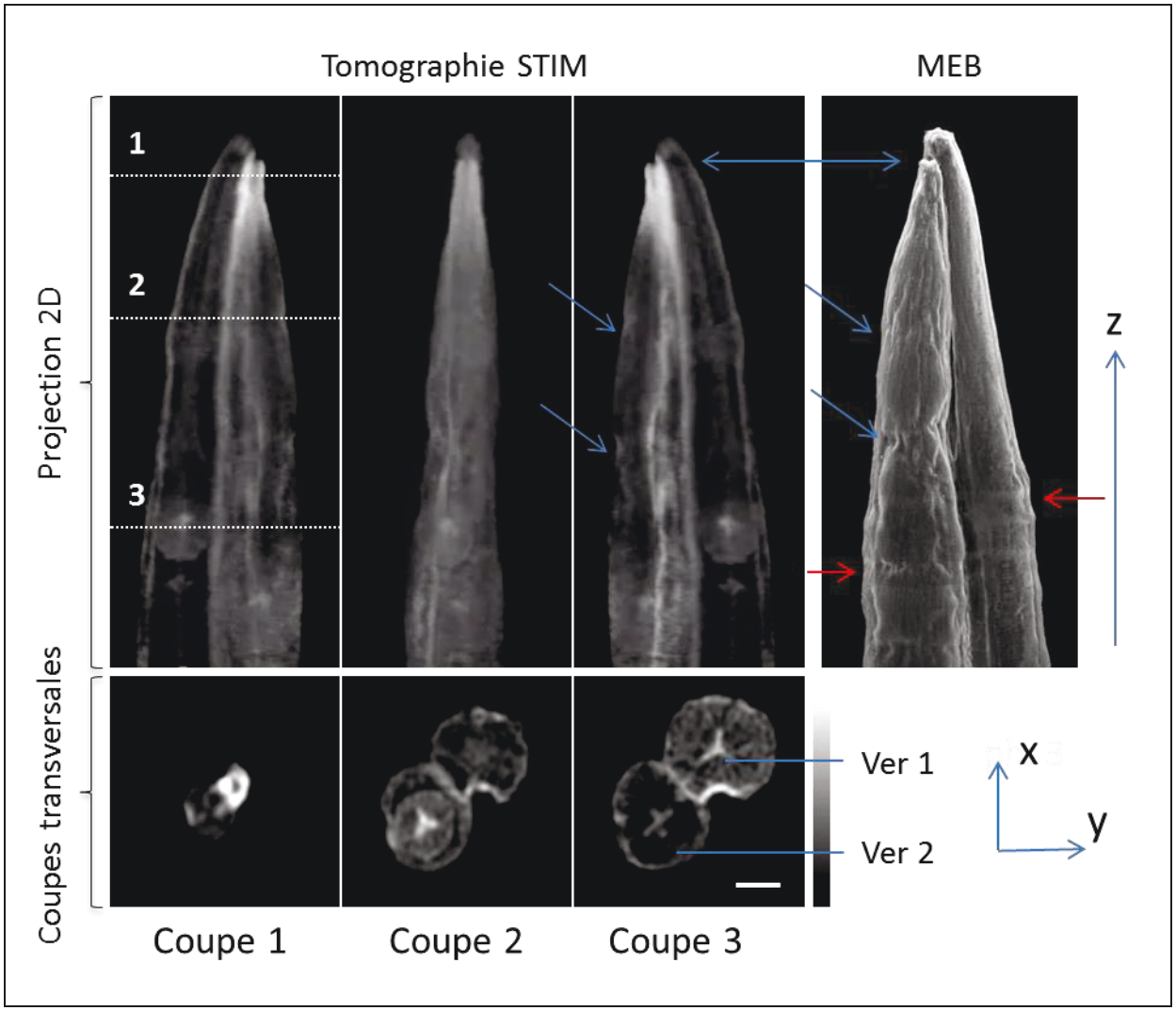


Figure 10 : Tomographie STIM avec les projections 2D de deux vers collés avec les coupes longitudinales selon l'axe z, les trois coupes transversales (axe x, y) et l'image

MEB. Les flèches bleues montrent les défauts permettant de reconnaitre les vers par les deux techniques et les flèches rouges pointent les zones rétractées par l'analyse PIXE.

La STIM permet ainsi de visualiser les structures internes avec un temps d'acquisition de quelques minutes à la manière d'un micro-scanner. Il est ainsi possible de manière non destructive de visualiser les bulbes pharyngés et le lumen en forme de croix.

L'analyse PIXE est ensuite montrée sur la Figure 11.

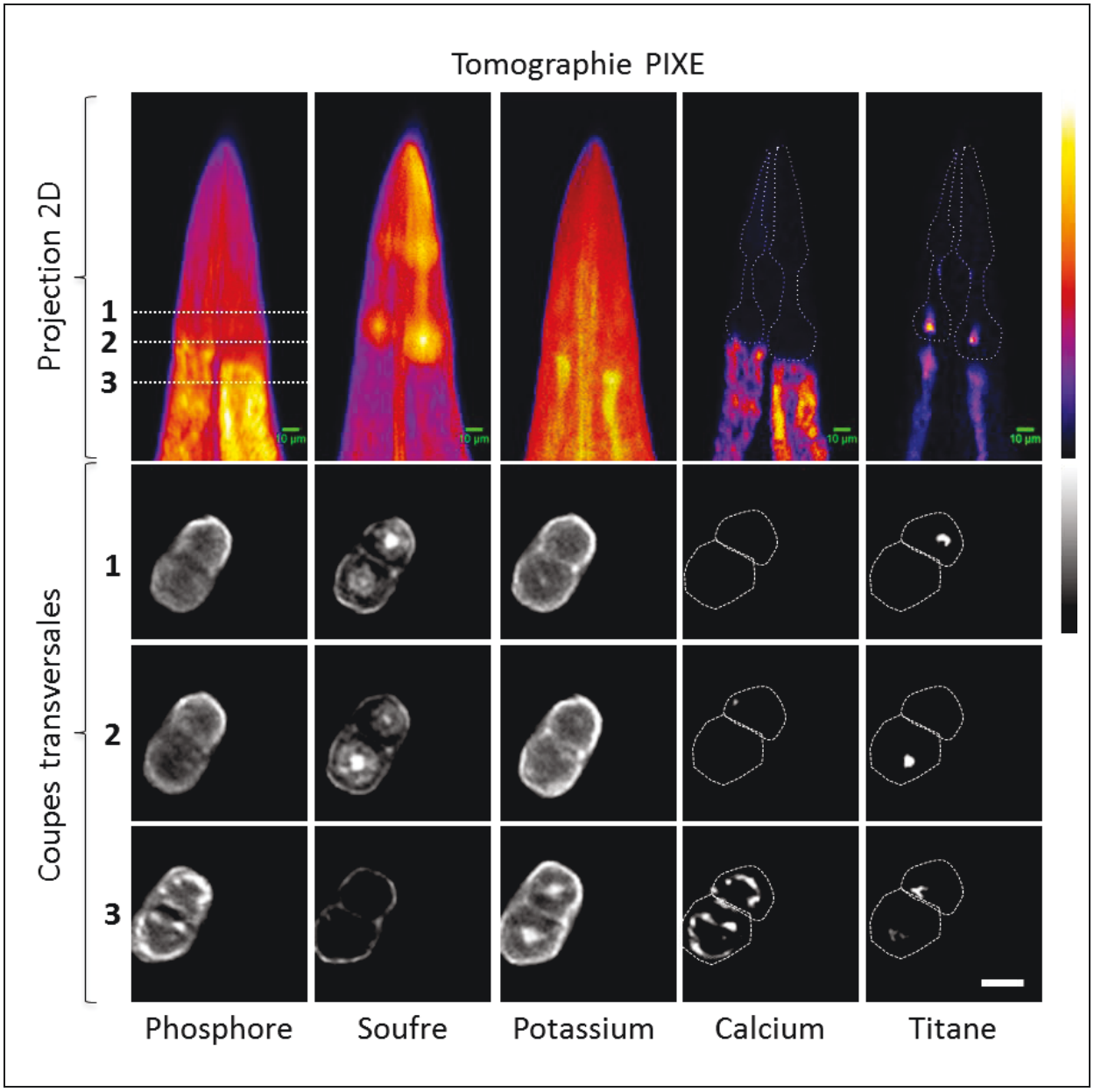


Figure 11 : Tomographie PIXE : projection 2D selon l'axe z et coupes transversales (axe x, y) de deux *C. elegans* collés l'un à l'autre avec la distribution des éléments phosphore, soufre, potassium, calcium et titane obtenue par tomographie (échelle 20 µm).

La projection 2D (selon l'axe z) montre tout d'abord des distributions des éléments chimiques analogues à celles présentées précédemment avec : (i) le pharynx visible avec la distribution du soufre et l'intestin avec celle du le calcium ; (ii) le titane provenant des NPs de TiO_2 présent dans le pharynx et l'intestin des vers et (iii) la présence de potassium dans l'intestin.

Cette projection selon l'axe z ne permet pas de situer les éléments sur la section (x, y) du vers, c'est pourquoi nous avons entrepris de réaliser des enregistrements selon ce plan. Les trois coupes transversales illustrées ici correspondent à trois zones (1, 2 et 3). Le temps d'analyse d'un coupe est de 2 h, c'est pourquoi des zones de rétractation sont visibles en MEB. Les distributions des éléments permettent ainsi de valider la présence de soufre dans le pharynx : elles montrent également une concentration importante dans la cuticule ce qui est logique car le soufre sert à renforcer cette membrane. Les images montrent également la localisation intra-intestinale du potassium et du titane. Enfin, les distributions du phosphore et du calcium permettent de visualiser les cellules intestinales.

Plus généralement, cette méthodologie permet de reconstruire la structure interne des vers via la distribution des éléments chimiques dans n'importe quel compartiment (pharynx, intestin,…) sans détruire l'échantillon.

3. Etude écotoxicologique

Les différentes analyses présentées ont montré que les *C. elegans* ingèrent naturellement les NPs et que celles-ci sont retrouvées dans le lumen du tube digestif. Durant leur passage dans le corps des vers, aucune internalisation n'a été observée. L'étude de la toxicité des NPs sur *C. elegans* s'est donc ensuite orientée vers des études écotoxicologiques mesurant, sur une population donnée, la mortalité, la longueur, le nombre d'embryons et l'apparition du phénotype « BOW ». Les expositions ont été réalisées à deux stades larvaires synchronisés : le stade L1 qui est le plus précoce et le stade L4 qui précède l'âge adulte. Le cycle des *C. elegans* est rappelé sur la Figure 12. La synchronisation consiste à détruire toute une population de vers adultes pour ne garder que les embryons. Les populations qui en découleront seront ainsi constituées de vers ayant tous exactement le même âge.

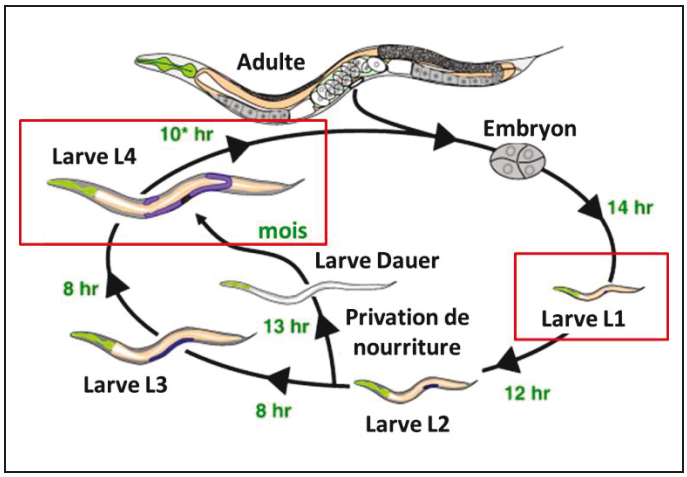


Figure 12 : Cycle de vie de *C. elegans* à 22 °C [21].

Cette étude a été réalisée dans le cadre de l'ANR TITANIUMS par Gladys Saez. Elle est présentée dans ce manuscrit dans le but d'aider à comprendre l'influence des paramètres physico-chimiques des NPs sur leur toxicité *in vivo*.

3.1. Influence de la présence de nanoparticules sur la mortalité des *C. elegans*

La mortalité des *C. elegans* est le premier paramètre qui a été étudié. Des groupes de 30 vers synchronisés au stade L1 et L4 ont été exposés à différentes doses (2 et 30 µg/cm²) de NPs de TiO_2 (P 25, NAs et NFs) à l'état natif ou fonctionnalisées (TRITC) en présence de bactéries. Après 24 h d'exposition, le taux de survie des vers a été mesuré plusieurs fois. Les

statistiques ont ainsi été faites sur 150 vers. Dans chaque série, un groupe témoin n'a pas été exposé aux NPs.

Aucune mortalité n'a été observée pour des *C. elegans* exposés au stade L4. Ce n'est en revanche pas le cas pour les vers exposés au stade L1. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure 13. Les indices 2 et 30 indiquent la dose en µg/cm² et « T » prévient qu'il s'agit de NPs fonctionnalisées TRITC.

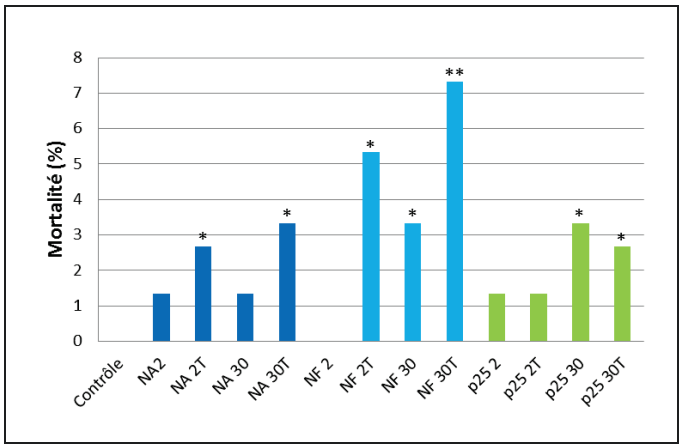


Figure 13 : Pourcentage de mortalité des vers exposés au stade L1 avec différentes NPs natives et fonctionnalisées à 2 et 30 µg/cm² pendant 24 h (* p<0,05 et ** p<0,01).

(i) Rôle de la forme des NPs

Dans les populations exposées au stade L1, certains vers ont été retrouvés morts. Le nombre de vers décédés est nul pour les populations « contrôles » et varie entre 1 et 8 % pour les populations exposées. Si nous nous concentrons dans un premier sur la mortalité liée à la forme de NPs, il est aisé de constater que les NFs ont l'effet le plus néfaste. Il est possible d'attribuer ce résultat à deux facteurs qui sont (i) le très grand rapport de forme et les extrémités pointues de ces NFs et (ii) la surface développée par ces objets qui est 4,4 fois plus élevée que celle des NAs. Sur les graphiques, les étoiles indiquent si les résultats sont significatifs c'est-à-dire qu'il y a * 95 % ou ** 99 % de chance qu'ils ne sont pas dus au hasard.

(ii) Rôle de la fonctionnalisation

Pour les conditions NAs et NFs, la fonctionnalisation augmente la mortalité ce qui montre que celle-ci peut avoir un effet sur la toxicité. Pour les P 25, ce rôle est secondaire. Il est possible d'imputer cela au fait que les P 25 peuvent se présenter sous forme plus ou moins

agrégées et que les éléments volumineux ne sont alors pas ingérés d'autant plus que les nématodes sont exposés en présence de bactéries.

(iii) Effet de la dose

Dans certains cas, la dose a une influence notable sur le taux de mortalité. A l'exception de la condition NFs 2 µg/cm², des vers ont été retrouvés morts dans toutes les conditions. Dans ce cas, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'à cette faible dose les vers ont pu ingérer et altérer les NFs car ceux-ci sont plus fragiles que les NAs dont le réseau 3D cristallisé est plus difficile à casser. Cependant, dès que la dose augmente, le même comportement est retrouvé et les vers n'arrivent plus à gérer aussi bien ces NFs. A une dose de 30 µg/cm², il semble que l'effet sur la mortalité soit du même ordre de grandeur que les autres NPs.

Rappelons que dans tous les cas, ce taux de mortalité, même s'il est non nul, reste très faible. Ces résultats tendent néanmoins à montrer que la présence de NPs est susceptible d'entrainer une toxicité pour les *C. elegans*.

L'ensemble de l'expérience tend à montrer que pour les NPs les mieux individualisées (NAs et NFs), il y a une double conjonction de la dose et de la fonctionnalisation sur la toxicité. En ce qui concerne les P25, il est plus difficile de conclure. La taille de base des NPs est 30 nm mais elles ont tendance à se présenter sous forme d'agrégats de particules plus gros qui peuvent rebuter les vers. Nous travaillons en ce moment à régler ce problème en procédant à la synthèse de NPs de même taille en milieu liquide pour éviter les frittages haute-température observés au moment de la synthèse des P 25. Remarquons ici que c'est plutôt une bonne nouvelle étant donné que le P 25 est la forme la plus utilisée du TiO_2 et donc la plus susceptible de se retrouver dans l'environnement.

3.2. Influence de la présence de NPs sur la longueur des *C. elegans*

Les effets des différentes conditions d'exposition de NPs ont ensuite été étudiés sur la croissance des vers en comparant la taille des vers contrôle à celle des vers exposés. Les mesures ont été réalisées manuellement à l'aide de la microscopie optique. La taille des vers est en effet un indicateur permettant de caractériser un retard de croissance de ces derniers. Les résultats sont montrés sur la Figure 14. Ils ont été représentés sous forme de boîtes à

moustaches qui permettent de montrer la répartition des longueurs de tous les vers et pas seulement la moyenne.

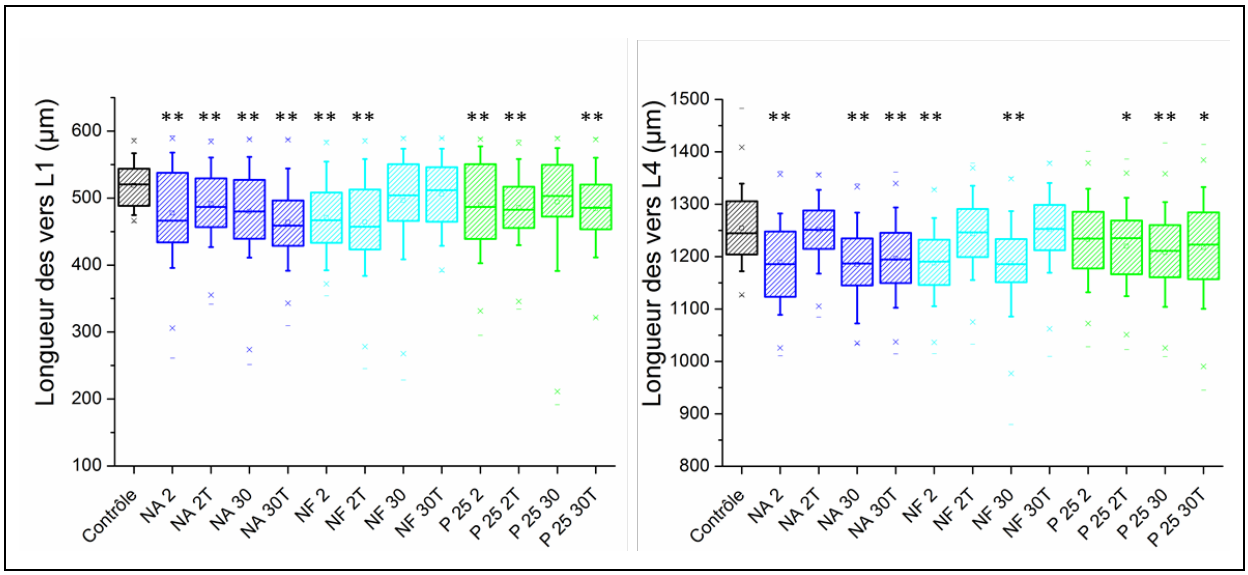


Figure 14 : Longueur mesurée des vers exposés aux stades L1 et L4 avec différentes NPs natives et fonctionnalisées à 2 et 30 µg/cm² pendant 24 h (* p <0,05 et ** p<0,01).

(i) Longueur des L1

Dans les populations exposées au stade L1, il y a eu des retards de croissance dans toutes les conditions. Ce résultat montre tout d'abord que toutes les NPs peuvent avoir un effet sur la croissance des vers et ce quelle que soit l'état de surface et la dose d'exposition (dans l'intervalle étudié). De plus, les résultats sont tous significatifs à l'exception des conditions NF 30, NF 30T et P25 30. Le point commun de ces conditions est la dose élevée. Les P 25 et les NFs sont également les NPs qui ont le plus tendance à l'agrégation. Il se peut donc qu'à partir d'une certaine concentration en NPs, l'agrégation soit telle que les vers ne les ingèrent plus.

(ii) Longueur des L4

Dans les populations exposées au stade L4, des retards de croissance sont également observés dans toutes les conditions. Les conditions pour lesquelles les résultats sont significatifs diffèrent cependant des vers exposés au stade L1. Nous voyons en effet que les conditions où les retards ne sont pas significatifs sont NA 2T, NF 2T, NF 30T et P25 2. Nous n'avons pas encore d'explication pour ces résultats mais il est clair que le stade d'exposition a une influence très importante sur la toxicité des NPs.

En conclusion, des retards de croissance sont observés dans toutes les conditions mais ne sont statistiquement significatifs que dans certaines d'entre-elles. Ces résultats montrent que la présence de NPs dans le milieu des *C. elegans* peut entrainer un ralentissement de leur croissance mais que ni la forme, ni la fonctionnalisation ni la dose ne jouent un rôle prépondérant. D'autres analyses viendront prochainement s'ajouter à ces résultats pour une interprétation plus complète.

3.3. Données sur la dilatation de l'intestin

Parallèlement à l'apparition de l'état BOW qui signale l'apparition d'un stress chez *C. elegans*, nous avons souvent observé une dilatation de l'intestin. Pour quantifier ce type d'évènement, des populations de vers (allant de 80 à 300 vers selon les conditions) ont été exposées aux différentes NPs fonctionnalisées ou non pendant 4 h sans bactéries. Le nombre de nématodes ayant l'intestin dilaté a ensuite été compté manuellement à l'aide de la microscopie optique. Les résultats sont regroupés dans la Figure 15.

Dans tous les cas, il y a eu une augmentation du nombre de vers présentant un intestin dilaté. La quantité de ces vers dilatés varie entre 15 et 55 % et dépend alternativement :

(i) de la morphologie des particules : la dilatation apparait plus souvent lorsque les vers sont exposés aux NFs devant les NAs puis les P 25 où la encore l'effet est le moins important.

(ii) de la dose : dans le cas des NPs synthétisées, l'augmentation de la dose réduit les effets. Dans le cas des P 25, cette tendance n'est pas observée.

(iii) et de la fonctionnalisation : à l'exception de la condition P 25 2T, la fonctionnalisation a systématiquement augmenté la proportion de vers dont l'intestin était dilaté. Si cette exception est considérée comme un artéfact de mesure, ces résultats tendent à montrer que la fonctionnalisation augmente les effets des NPs.

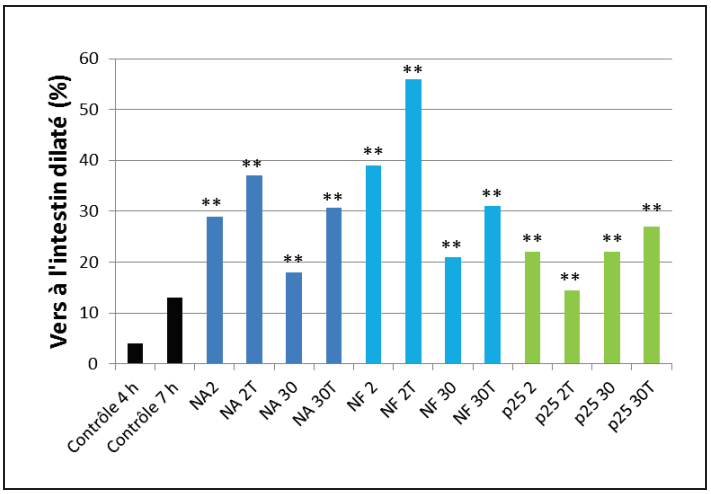


Figure 15 : Pourcentage de vers ayant l'intestin dilaté en fonction des conditions d'exposition des adultes avec différentes NPs natives et fonctionnalisées à 2 et 30 µg/cm² pendant 4 h sur une population de 80 à 300 individus (* p<0,05 et ** p<0,01).

En conclusion, nous avons montré que la présence de NPs déclenchait bien la dilatation de l'intestin des vers. Les propriétés physico-chimiques des NPs influant sur ce phénomène sont cependant encore incertaines et d'autres mesures devront être effectuées pour confirmer ces résultats.

3.4. Récapitulatif des résultats écotoxicologiques

Les résultats concernant la mortalité, le retard de croissance et la dilatation de l'intestin sont regroupés dans le Tableau 2. Cette représentation des résultats permet de se rendre compte de l'hétérogénéité des effets observés.

Les expériences ont ainsi montré que les NPs n'entrainent pas la mort des vers excepté lorsque ceux-ci sont exposés au stade larvaire le plus précoce (L1). Ensuite, la présence de NPs entraine très souvent des retards de croissance des nématodes. Ces retards n'évoluent pas de manière spécifique en fonction de la dose d'exposition ou de la fonctionnalisation. Enfin, la présence de NPs en absence de bactérie déclenche toujours une augmentation de la dilatation de l'intestin des vers après 4 h d'exposition.

NPs	Dose (µg/cm²)	Fluorophore	Mortalité	Diminution de la longueur	Dilatation de l'intestin
P25	2	Non	-	L1**	L4**
		TRITC	-	L1**/L4*	L4**
	30	Non	L1*	L1**/L4**	L4**
		TRITC	L1*	L1**/L4*	L4**
NFs	2	Non	-	L1**/L4**	L4**
		TRITC	L1*	L1**	L4**
	30	Non	L1*	L1**/L4**	L4**
		TRITC	L1**	-	L4**
NAs	2	Non	-	L1**/L4**	L4**
		TRITC	L1*	L1**	L4**
	30	Non	-	L1**/L4**	L4**
		TRITC	L1*	L1**/L4**	L4**

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats toxicologiques obtenus après exposition des *C. elegans* aux différentes NPs fonctionnalisées ou non. Les mentions L1 et L4 apparaissent lorsqu'un effet a été observé à ce stade. Les astérisques indiquent la significativité à 95 % (*) et 99 % (**).

4. Discussion

***C. elegans*, un modèle adapté pour l'écotoxicologie** : Dès les premières expositions des vers, nous avons pu montrer que les vers ingéraient les NPs spontanément. En clair, il n'a pas été nécessaire de mélanger les NPs à leur nourriture de base (bactéries) et nous n'avons pas non plus été contraints de les injecter. En ce sens, cette espèce constitue un bon modèle écotoxicologique permettant de reproduire des situations pouvant se produire dans la nature. Seules les doses sont assez élevées mais pas totalement aberrantes localement comme près de stations d'épuration par exemple (cf. état de l'art). Les vers ont donc ingéré des NPs et leur localisation dans le tractus intestinal a pu être suivie *via* différentes méthodes de microscopie. Les techniques utilisées ont permis de mettre en évidence des zones d'accumulation préférentielles telles que le pharynx, le début de l'intestin ou encore le rectum. Nous avons également pu déterminer que la fonctionnalisation n'avait pas de rôle déterminant dans le comportement des vers vis-à-vis des NPs.

La présence de bactéries dans le milieu est un facteur déterminant : Nous avons observé que l'absence de bactéries entrainait l'apparition du phénotype BOW, résultat par ailleurs connu dans la littérature [8]. Nous avons aussi observé sur les mêmes vers un état intermédiaire qui se caractérise par une dilatation importante de l'intestin du nématode. La dilatation n'a à ce jour été observée que dans le cas d'infections de *C. elegans* exposés à des organismes pathogènes [9, 10, 12] ou après vieillissement [13]. Nous ne pouvons cependant à ce stade que supposer qu'il existe un lien entre ces phénomènes. L'absence de bactéries dans le milieu de nutrition a également eu un impact sur l'ingestion des NPs qui s'est avérée plus importante que lorsque les vers ont le « choix ». Ces observations vont dans le sens de celles de Kiyama *et al*. [6] qui ont attribué ce phénomène à une discrimination volontaire due à une reconnaissance olfactive. Dans ce cas, la dilatation de l'intestin est apparue beaucoup plus tôt : au bout de 4 h au lieu de 7 à 8 h en temps normal. A l'image des résultats de Pluskota *et al.* [22], la présence de NPs a donc accéléré le phénomène.

La dilatation de l'intestin s'accompagne d'une modification de la localisation des éléments chimiques : L'analyse par faisceau d'ion a par ailleurs permis de caractériser l'état de stress associé à la dilatation de l'intestin. Nous avons dans un premier temps reconstruit les images PIXE montrant la localisation des éléments chimiques dans le ver. Ces résultats sont assez proches des données disponibles dans la littérature [17, 18]. De plus, *via* cette analyse chimique, nous avons mis en évidence que la dilatation s'accompagnait d'une augmentation

locale de la concentration en chlore et en potassium dans l'intestin. Nous n'avons cependant pas encore déterminé les causes de ce phénomène mais il pourrait provenir d'une altération des tissus intestinaux à l'image des résultats de Zhao et al. [15]. Notons cependant que les images de MET que nous avons faites n'ont pour le moment pas permis de montrer ces altérations.

Les NPs entrainent des retards de croissance et peuvent provoquer la mort des larves précoces : L'étude écotoxicologique a permis de montrer que la présence de NPs dans le milieu pouvait entrainer la mort des larves précoces. Les mécanismes ne sont cependant pas encore connus. La présence de NPs a également engendré des retards de croissance. L'ensemble des résultats tend à montrer que pour les NPs fabriquées en milieu liquide une même tendance est observée : les NFs sont plus nuisibles que les NAs. Deux explications sont possibles : d'une part une plus grande surface développée par les NFs à quantité massique équivalente de NPs exposées ; d'autre part une plus grande réactivité potentielle des NFs dont la structure n'est pas aussi bien consolidée que celle des NAs.

De façon globales nos résultats vont dans le même sens que ce qui est décrit dans la littérature avec des retards de croissance, une faible mortalité et l'apparition du phénotype BOW [22-26].

Les NPs sont plus toxiques pour les larves précoces : Les résultats montrent que les L1 montrent très souvent de la mortalité et/ou des retards de croissance (dans 75 % des cas étudiés). A l'opposé, les larves exposées au stade L4 n'ont subi aucune mortalité. Les organismes au stade précoce semblent donc plus sensibles à la présence de NPs ce qui n'est pas aberrant puisque ceux-ci n'ont pas encore développé toutes leur défenses immunitaires. Ces observations rappellent simplement que les réponses ne sont pas les mêmes suivant l'âge des sujets exposés. En cas d'étude toxicologique chez l'homme, cette donnée sera donc à prendre en compte.

La concentration en NPs n'influe pas sur les effets observés : Nous avons montré dans l'étude écotoxicologique que dans l'intervalle étudié, la dose d'exposition n'avait pas d'effet direct sur l'intensité des réponses biologiques. Lorsque les NPs sont trop concentrées, elles peuvent en effet s'agréger pour donner des microparticules et se trouver ainsi trop grosses pour être consommées par les vers. Il pourrait donc y avoir un effet de seuil au-delà duquel la toxicité n'augmente pas voire diminue.

Aucune translocation n'a été observée : Les images de microscopie optique et électronique n'ont pas permis de mettre en évidence une internalisation des NPs dans les cellules des *C. elegans*. Qu et al. [27] et Meyer et al. [28] ont montré l'internalisation de quantum dots (CdSe) et de NPs d'argent (fonctionnalisée avec du polyvinylpyrrolidone ou du citrate). Les NPs ont ainsi été retrouvées dans le système reproductif jusque dans la progéniture dans certains cas. Les NPs utilisées sont cependant significativement plus petites avec respectivement 7 et 10 nm de diamètre.

Les NPs choisies pour notre étude sont donc peut être trop grosses pour être internalisées. La nature de la particule peut également être un facteur déterminant si l'internalisation nécessite une reconnaissance chimique. Il se peut enfin que le phénomène soit rare, c'est pourquoi les analyses se poursuivent encore aujourd'hui. L'absence d'internalisation plaide largement en faveur de ces NPs de TiO_2 et notamment des P 25 dont la toxicité se limiterait ainsi à des effets sur l'intestin des vers.

5. Partie expérimentale

5.1. Culture des *C. elegans* et exposition aux NPs

Les *C. elegans* ont été acquis auprès du *CGC* et cultivés sur gélose d'agar NGM en boîtes de pétri (NGM: NaCl (3 $g.L^{-1}$) ; peptone (2.5 $g.L^{-1}$) ; agar (17 $g.L^{-1}$) ; 25 mL KPO_4 (1 M) ; 1 mL $CaCl_2$, 2 H_2O (1 M) ;1 mL $MgSO_4$ (1 M) ; 1 mL cholesterol (5 $mg.mL^{-1}$)) et nourris avec *Escherichia coli* (*E. coli* at 20 °C) [29]. Les NPs de TiO_2 suspendues dans l'eau à une concentration de 1 mg/mL ont subi une ultra-sonification pour détruire au maximum les agrégats avant la mise en contact. Les suspensions sont ensuite étalées sur le gel d'agar avec ou sans bactéries. Les larves aux stades L1 ou L4 sont ajoutées sur le gel et maintenues à 20 °C dans l'obscurité. Les vers exposés sont systématiquement synchronisés à partir de populations d'adultes gravides. La synchronisation sert à éliminer tous les vers et larves vivants pour ne conserver que les embryons qui se développeront simultanément pour donner des vers ayant tous le même âge. Elle est effectuée par dissolution des adultes dans une solution fortement basique (NaOH (10 N), 5 % hypochlorite solution) les embryons étant les seuls à survivre à ce traitement.

5.2. Microscopie optique *in vivo*

Des lames de verre avec des « pads » d'agar de moins de 1 mm d'épaisseur sur la surface sont utilisées comme supports pour les analyses. Les vers sont récupérés manuellement à l'aide d'un « wormpick » puis déposés dans une goutte d'azoture de sodium en solution aqueuse à 1 mM. L'azoture de sodium immobilise le ver pour les observations. Une lamelle est enfin déposée sur la goutte. Les *C. elegans* sont ensuite observés à l'aide du microscope optique décrit dans le chapitre 4.

5.3. Fixation des échantillons

5.3.1. Fixation chimique pour la microscopie confocale

Les nématodes sont mis en présence ou non de nanoparticules de TiO_2 (P 25, NAs et NFs) fonctionnalisées avec du FITC, avec ou sans bactéries pendant 4 ou 24 h selon les analyses souhaitées. L'ensemble des expositions est réalisée avec un étalement des NPs sur le dessus des géloses, à 20 °C et à l'obscurité.

En fin d'exposition, les vers sont récupérés puis fixés dans 5 mL de PFA 3 %-PBS (30 min, 4 °C). Une post-fixation de 2 min. est réalisée dans 5 mL d'acétone à -20 °C. Les vers ainsi fixés sont rincés trois fois dans du PBS puis incubés (2 h, 20 °C) dans 2 mL de solution de marquage (PBS, 10 % Sérum de Veau Fœtal (SVF), 0,1 % Triton X-100, 1/150 Phalloïdine-Alexa fluor 594, 250 ng/mL Hoechst33342). En fin d'incubation, les échantillons sont rincés trois fois dans du PBS avant le montage entre lame (Superfrost Gold Plus) et lamelle dans une goutte de milieu de montage (Prolong Gold Antifade Reagent). Les lames montées sont laissées une nuit à 20 °C pour permettre la polymérisation du milieu de montage puis elles sont conservées à 4 °C. La microscopie confocale a été réalisée au BIC (photonique) à l'aide d'un microscope SP5 Leica DMI6000 inversé.

5.3.2. Fixation physique pour le MEB et l'IBA

Les *C. elegans* subissent le même traitement de cryofixation que les cellules. Les vers sont récupérés manuellement et déposés dans une goutte d'eau sur un puits PEEK recouvert d'un film de polycarbonate. La gouttes est ensuite séchée au maximum puis le puits est rapidement plongé dans l'isopentane refroidi à -120 °C par l'azote liquide. Au bout d'une minute, l'isopentane restant est rapidement évacué avec un papier absorbant puis l'échantillon est placé à -40 °C pour lyophilisation.

5.3.3. Fixation pour la microscopie électronique en transmission

Les *C. elegans* ont été préparés à l'aide d'un appareil de congélation haute pression (HPF) de type HPM 100 (Leica) au BIC (électronique). Le protocole utilisé a été inspiré de la référence [30]. Les vers ont été prélevés et traités avec ou non du lévamisole permettant leur immobilisation puis cryofixés avec le système de cryofixation haute pression (Leica EM-HPM100).

Tous les échantillons ont ensuite été cryo-substitués et inclus en résine dans un automate de contrôle de la température (Leica EM-AFS2). Le processus a été réalisé comme suit : 40 h à -90 °C dans un milieu de cryo-substitution composé de 1 % de tétroxyde d'osmium, 0,5 % acétate d'uranyle, 0,5 % glutaraldéhyde et 1 % d'eau dans l'acétone déshydraté sur tamis moléculaire 3 Å. La température a ensuite été remontée jusqu'à -30 °C avec une pente de 5 °C/h. Après 20 h à -30 °C, trois rinçages à l'acétone déshydratés sont réalisés avant de débuter l'imprégnation en résine EPON 816 (EMS) : 2 h en 1/2 (V/V) et 1/1 et 3 h en 2/1. La température est ensuite remontée jusqu'à température ambiante à raison de 3

°C/h. L'imprégnation en résine pure se fait sur 6 h (3 bains de 2 h) avant mise en polymérisation à l'étuve à 60 °C pour 48 h. Les blocs sont ensuite coupés sur l'ultramicrotome Leica EM-UC7 avec un couteau diamant. Les coupes semi-fines de 1 µm sont collectées sur lame de verre, contrastées au bleu de toluidine et observées au microscope optique. Les coupes ultrafines de 50 nm sont récupérées sur grilles puis observées avec le microscope électronique en transmission.

5.4. Techniques de microscopie

Voir chapitre 4.

5.4.1. Microscopie confocale

La microscopie confocale a été réalisée au Bordeaux Imaging Center (pôle photonique) avec un microscope Leica droit SP8 utilisant deux sources : (i) diode laser (405 nm) et (ii) laser blanc (470-670 nm). Les acquisitions ont été réalisées avec un objectif 40X à huile.

5.5. Etude écotoxicologique

Les études toxicologiques ont été réalisées par Gladys Saez au CENBG. Les stades larvaires L1 et L4 issus d'une population de vers synchronisés sont mis en présence ou non de NPs de TiO_2 à 20 °C, dans l'obscurité pendant 24 h avec les bactéries *E. coli* comme source de nourriture. L'ensemble des expositions est réalisé en milieu gélosé avec un étalement des NPs de TiO_2 (P 25, NAs et NFs) natives ou fonctionnalisées avec le TRITC sur le dessus des géloses. Les solutions de NPs subissent systématiquement une ultra-sonification avant chaque expérimentation et sont déposées aux concentrations de 2 ou 30 µg/cm^2.

Les paramètres de survie et croissance sont étudiés chez les vers de stade larvaire L1 et L4 exposés. La reproduction est étudiée uniquement pour les stades L4 devenus adultes après 24h. La survie est déterminée visuellement à la binoculaire par le nombre de vers vivant et mort sur la gélose. Un vers est considéré comme mort s'il ne réagit pas au stimulus provoqué par l'aiguille de platine qui sert à prélever les vers. Les vers vivants sont placés entre lame et lamelle dans 0.1 M d'azoture de sodium et observés (croissance, fertilité) en MO. La croissance est déterminée en mesurant la longueur des vers à partir d'une image. Les analyses de survie croissance ont été réalisées à l'échelle de l'individu (N = 30, réplicas : 5). Les différences entre les contrôles et vers exposés et la mise en évidence d'effet de forme, de

concentration ou de la fonctionnalisation des NPs ont été analysées par des tests statistiques. Ces tests ont été réalisés par Guillaume Devès comprenant : un test de Krustal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de type « post-hoc » [31]. Les regroupements hiérarchiques des distributions en taille des vers (test HAC) ont été effectués. Le logiciel de statistique *Tanagra 1.4* a enfin été utilisé pour les études de significativité (0.05 et 0.01) [32].

Enfin, les données sur la dilatation des intestins des vers ont été obtenues par comptage manuel après 4 h d'exposition aux différentes NPs fonctionnalisées ou non et sans *E. coli*.

Références

1. Nass, R. and I. Hamza, *The Nematode C. elegans as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters*, in *Current Protocols in Toxicology*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
2. Dengg, M. and J.C.A. van Meel, *Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2004. **50**(3): p. 209-214.
3. Leung, M.C.K., et al., *Caenorhabditis elegans: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology.* Toxicological Sciences, 2008. **106**(1): p. 5-28.
4. Hulme, S.E. and G.M. Whitesides, *Chemistry and the Worm: Caenorhabditis elegans as a Platform for Integrating Chemical and Biological Research.* Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(21): p. 4774-4807.
5. Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. *WormAtlas*. 2002-2012; (ed.s):[http://www.wormatlas.org].
6. Kiyama, Y., K. Miyahara, and Y. Ohshima, *Active uptake of artificial particles in the nematode Caenorhabditis elegans.* Journal of Experimental Biology, 2012. **215**(Pt 7): p. 1178-83.
7. Chen, J. and E.P. Caswell-Chen, *Facultative Vivipary is a Life-History Trait in Caenorhabditis elegans.* Journal of Nematology, 2004. **36**(2): p. 107.
8. Chen, J. and E. Caswell-Chen, *Why Caenorhabditis elegans adults sacrifice their bodies to progeny.* Nematology, 2003. **5**(4): p. 641-645.
9. Mylonakis, E., et al., *Killing of Caenorhabditis elegans by Cryptococcus neoformans as a model of yeast pathogenesis.* Kopek, Benjamin G., 2002. **99**(24): p. 15675-15680.
10. Aballay, A., P. Yorgey, and F.M. Ausubel, *Salmonella typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of Caenorhabditis elegans.* Current biology : CB, 2000. **10**(23): p. 1539-1542.
11. Garsin, D.A., et al., *A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors.* Kopek, Benjamin G., 2001. **98**(19): p. 10892-10897.
12. Tan, M.-W., S. Mahajan-Miklos, and F.M. Ausubel, *Killing of Caenorhabditis elegans by Pseudomonas aeruginosa used to model mammalian bacterial pathogenesis.* Kopek, Benjamin G., 1999. **96**(2): p. 715-720.
13. McGee, M.D., et al., *Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging C. elegans.* Aging Cell, 2011. **10**(4): p. 699-710.
14. Lints, R. and D.H. Hall. *Reproductive system, egglaying apparatus*. 2009; Available from: www.wormatlas.org.
15. Zhao, Y., et al., *The in vivo underlying mechanism for recovery response formation in nano-titanium dioxide exposed Caenorhabditis elegans after transfer to the normal condition.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014. **10**(1): p. 89-98.
16. Simon, M., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity.* Nanotoxicology, 2010: p. 126-140.
17. McColl, G., et al., *Caenorhabditis elegans Maintains Highly Compartmentalized Cellular Distribution of Metals and Steep Concentration Gradients of Manganese.* Spiegelhalter, Coralie, 2012. **7**(2): p. e32685.
18. Gao, Y., et al., *Mapping technique for biodistribution of elements in a model organism, Caenorhabditis elegans, after exposure to copper nanoparticles with microbeam synchrotron radiation X-ray fluorescence.* Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2008. **23**(8): p. 1121-1124.
19. Olendrowitz, C., et al., *Phase-contrast x-ray imaging and tomography of the nematode Caenorhabditis elegans.* Physics in Medicine and Biology, 2012. **57**(16): p. 5309.
20. Teramoto, T. and K. Iwasaki, *Intestinal calcium waves coordinate a behavioral motor program in C. elegans.* Cell Calcium, 2006. **40**(3): p. 319-327.

21. Baylis, H.A. and R.P. Vázquez-Manrique, *Genetic analysis of IP3 and calcium signalling pathways in C. elegans.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2012. **1820**(8): p. 1253-1268.
22. Pluskota, A., et al., *In Caenorhabditis elegans Nanoparticle-Bio-Interactions Become Transparent: Silica-Nanoparticles Induce Reproductive Senescence.* PLoS ONE, 2009. **4**(8): p. e6622.
23. Zhang, W.W., et al. *Reproductive Toxicity of Anatase TiO2 Nanoparticles in Caenorhabditis elegans*. in *Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference on*. 2011.
24. Wu, J., et al., *Toxicity and penetration of TiO2 nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure.* Toxicology Letters, 2009. **191**: p. 1 - 8.
25. Wang, H., R.L. Wick, and B. Xing, *Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al2O3 and TiO2 to the nematode Caenorhabditis elegans.* Environmental Pollution, 2009. **157**(4): p. 1171-1177.
26. Roh, J.-Y., et al., *Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode Caenorhabditis elegans using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints.* Environmental Toxicology and Pharmacology, 2010. **29**(2): p. 167-172.
27. Qu, Y., et al., *Full Assessment of Fate and Physiological Behavior of Quantum Dots Utilizing Caenorhabditis elegans as a Model Organism.* Nano Letters, 2011. **11**(8): p. 3174-3183.
28. Meyer, J.N., et al., *Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in Caenorhabditis elegans.* Aquatic Toxicology, 2010. **100**(2): p. 140-150.
29. Brenner, S., *THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS.* Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
30. Kolotuev, I., Y. Schwab, and M. Labouesse, *A precise and rapid mapping protocol for correlative light and electron microscopy of small invertebrate organisms.* Biology of the Cell, 2010. **102**(2): p. 121-132.
31. Siegel, S. and N.J. Castellan, *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, ed. N. New York. 1988: McGraw-Hill.
32. Rakotomalala, R., *TANAGRA : un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche.* Actes de EGS'2005, 2005. **2**: p. 697.

Conclusions et perspectives

1. Conclusions

Les NPs de TiO_2 sont aujourd'hui de plus en plus présentes dans les objets qui nous entourent. Elles sont notamment fortement impliquées dans les technologies censées protéger l'homme d'agressions extérieures avec les crèmes solaires [1] et la dépollution des eaux [2]. Il existe cependant une inquiétude liée au « nano » et à l'augmentation du rapport surface / volume et de la réactivité qui peut y être associée. C'est ainsi que le TiO_2 a été classé comme produit potentiellement carcinogène par le centre international de recherche sur le cancer (IARC) [3]. Il est donc essentiel d'évaluer la toxicité de ces objets et de comprendre les propriétés physico-chimiques susceptibles d'influer sur celle-ci. De nombreuses études existent à ce jour pointant la difficulté de comprendre ces mécanismes notamment à cause de caractérisations insuffisantes des NPs étudiées.

Le projet ANR-TITANIUMS dans lequel s'est inscrit ce travail de thèse avait pour objectifs principaux de pallier ces difficultés avec le contrôle de toute la chaîne expérimentale de la synthèse des NPs jusqu'à leur évaluation toxicologique. Plus précisément, nos objectifs étaient de : (i) synthétiser et caractériser des NPs de TiO_2 de morphologies contrôlées ; (ii) détecter, localiser et quantifier ces NPs dans les organismes biologiques que sont les cellules en culture et *C. elegans* ; (iii) décrire les interactions qu'il peut y avoir entre eux et identifier des risques de toxicité.

Tout au long de ma thèse, j'ai donc accompagné les NPs de TiO_2 depuis l'autoclave où elles ont été synthétisées jusqu'aux confins des cellules et des organismes de l'étude. J'ai pu ainsi obtenir plusieurs résultats notables.

(i) Trois types de NPs de TiO_2 très différentes :

La première étape de ce travail a été de sélectionner, synthétiser et caractériser des NPs de morphologies contrôlées. L'objectif final était de permettre l'identification des propriétés pouvant influer sur leur toxicité. Notre choix s'est porté sur des P 25 qui sont des NPs commerciales bien connues dans la littérature et donc prises comme éléments de référence, des nano-feuillets enroulés à surface spécifique géante et des nano-aiguilles qui ont une forme allongée et des extrémités pointues. Les propriétés physico-chimiques relatives sont schématisées dans la figure 1.

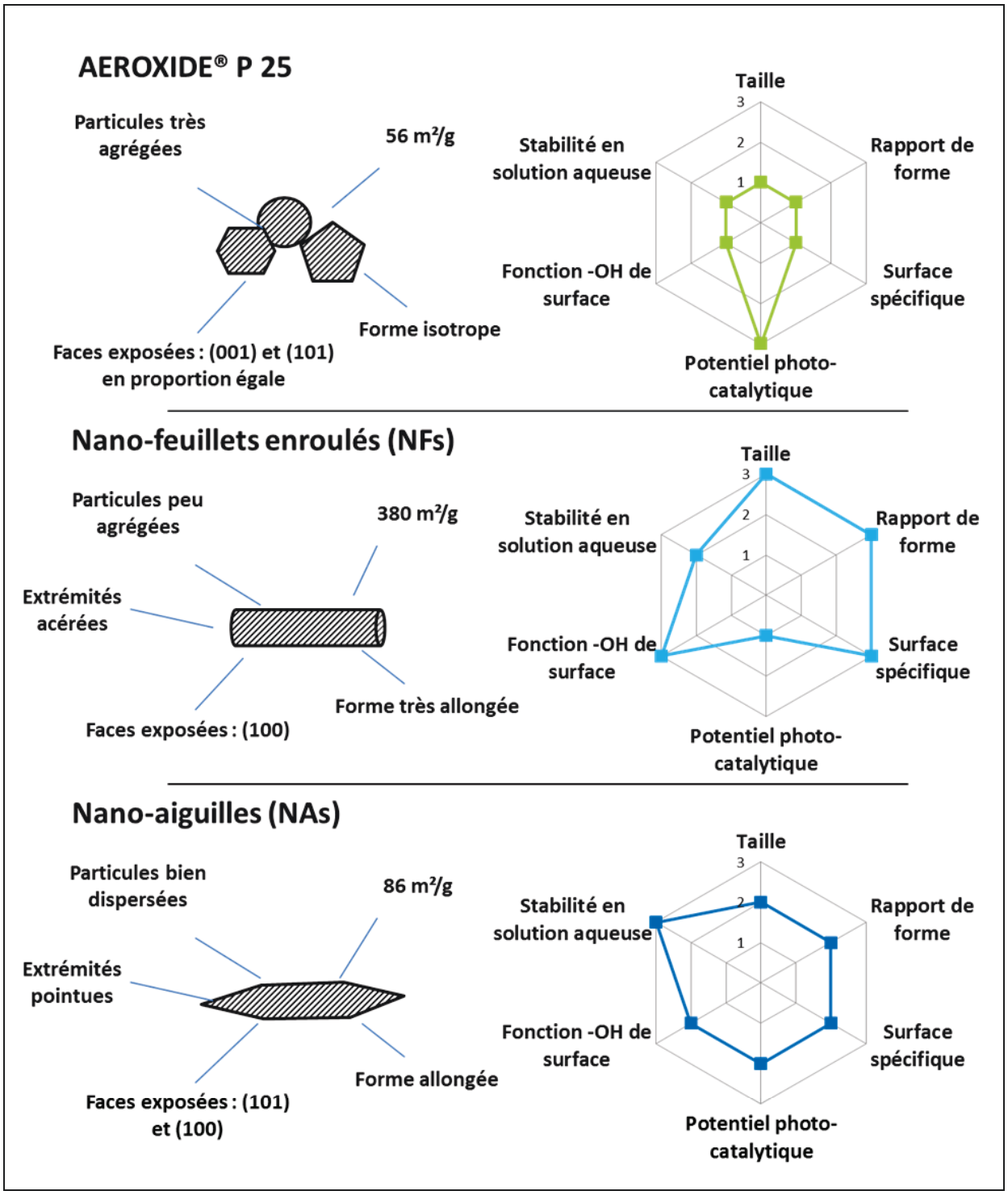


Figure 1 : Schématisation des caractéristiques physico-chimiques des trois types de NPs sélectionnées. Sur les graphiques, les indices de 1 à 3 donnent l'ordre relatif des propriétés associées des trois types de NPs (1 étant le plus faible et 3 le plus fort).

A l'issu de la caractérisation des NPs, des conjectures sur leur toxicité potentielle ont été effectuées sur différents critères :

- la morphologie et la surface spécifique. Ce sont les NFs qui sont les plus à même de présenter une toxicité potentielle pour les cellules et les *C. elegans* avec une forme allongée et une surface supérieure à 350 m^2/g.
- La chimie de surface et la photo-catalyse, ce sont les P 25 puis les NAs qui possèdent une structure cristalline bien définie qui seraient les plus réactives.
- l'étude du comportement en solution, qui montre que les NAs sont stables en solution colloïdale et donc peut-être moins biodisponibles dans le cas des expositions en solution.

(ii) Imagerie : détection, localisation et quantification des NPs dans les cellules et *C. elegans* :

Imagerie dans les cellules : Différentes techniques ont été utilisées pour visualiser les NPs dans les cellules montrant des résultats de plus en plus fins. La fluorescence a permis dans un premier temps d'observer la localisation *in vitro* / *in vivo* des NPs. Ensuite le passage à des techniques plus résolues a permis de (i) **visualiser** la présence des NPs dans des vacuoles et libres dans le cytosol en MET (montrant que l'internalisation de NPs n'est pas spécifique) et (ii) **quantifier** les NPs internalisées à l'échelle de la cellule. Elle a notamment permis de montrer que pour un type cellulaire donné, la dose internalisée variait selon le type de NPs. Nous avons en effet vu que les P 25 et les NFs étaient retrouvés en quantités plus importantes que les NAs pour une même dose d'exposition (2 $\mu g/cm^2$). Cette différence a pu être reliée à leur meilleure stabilité en solution montrée par les mesures de rayon hydrodynamique (DLS). Cet aspect montre que la biodisponibilité des NPs est un facteur clé à prendre en compte pour prévoir les possibles effets néfastes sur l'environnement.

Nous avons enfin montré que la fonctionnalisation n'avait pas d'impact majeur sur l'internalisation des NPs notamment grâce à l'imagerie corrélative (Figure 2). Ce type d'imagerie a pu être développé pendant ma thèse et s'effectue aujourd'hui en routine au laboratoire ouvrant la voie à l'analyse poussée des cellules d'abord *in vitro* / i*n vivo* puis *in situ* grâce notamment à la microanalyse par faisceau d'ions.

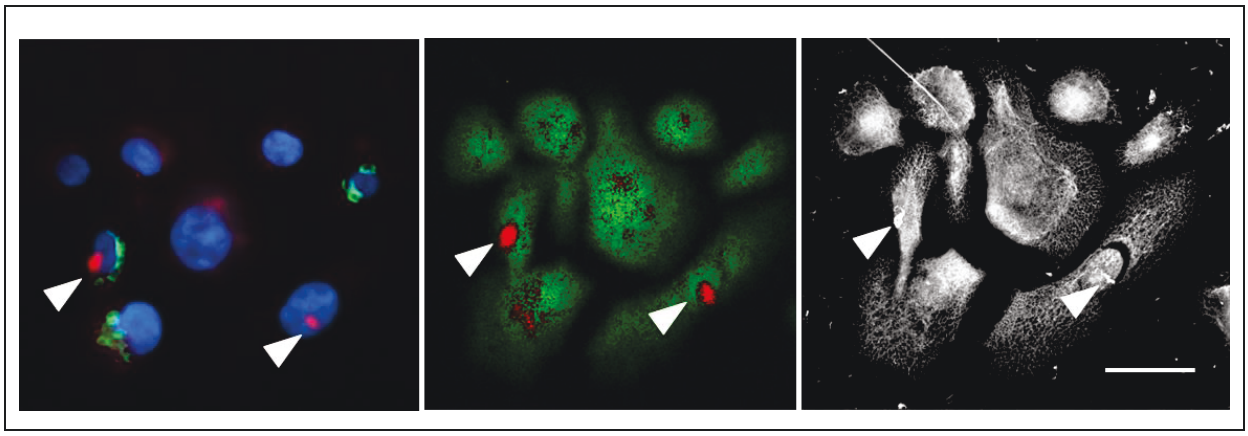


Figure 2 : Imagerie corrélative de cellules kératinocytes exposées aux P 25 fluorescentes (chapitre 4, échelle 40 µm).

Les phénomènes conduisant au passage de ces NPs au travers des membranes plasmiques des cellules restent encore à étudier et feront l'objet d'investigations futures. Différentes méthodologies pourront être utilisées : (i) les voies d'endocytose peuvent être bloquées par un ligand inhibiteur spécifique des membranes plasmiques ne permettant que le passage des NPs par diffusion passive. Il sera alors possible de mesurer la quantité de NPs internalisées uniquement par ce mécanisme et également de déterminer si les NPs peuvent être vacuolisées depuis l'intérieur de la cellule *via* d'autres mécanismes [4]. (ii) Le destin des NPs après internalisation pourra également être investigué avec par exemple l'étude des mécanismes d'exocytose avec l'utilisation de marqueurs spécifiques [5, 6].

Les *C. elegans* : Différentes techniques d'imagerie ont également été utilisées sur *C. elegans* afin de **localiser les NPs** de TiO_2 et observer si celles-ci pouvaient être internalisées dans les cellules intestinales. Les différentes techniques, résumées dans la Figure 3, ont permis de montrer que les NPs sont ingérées par les vers et peuvent également être retrouvées au niveau de la vulve. Nous avons également montré que leur présence pouvait précipiter l'apparition du phénotype BOW en absence de bactéries. Nous n'avons cependant pas encore déterminé les causes de ce phénomène ni observé d'internalisation dans les cellules intestinales. Les observations de vers en MET sont en cours pour apporter des réponses.

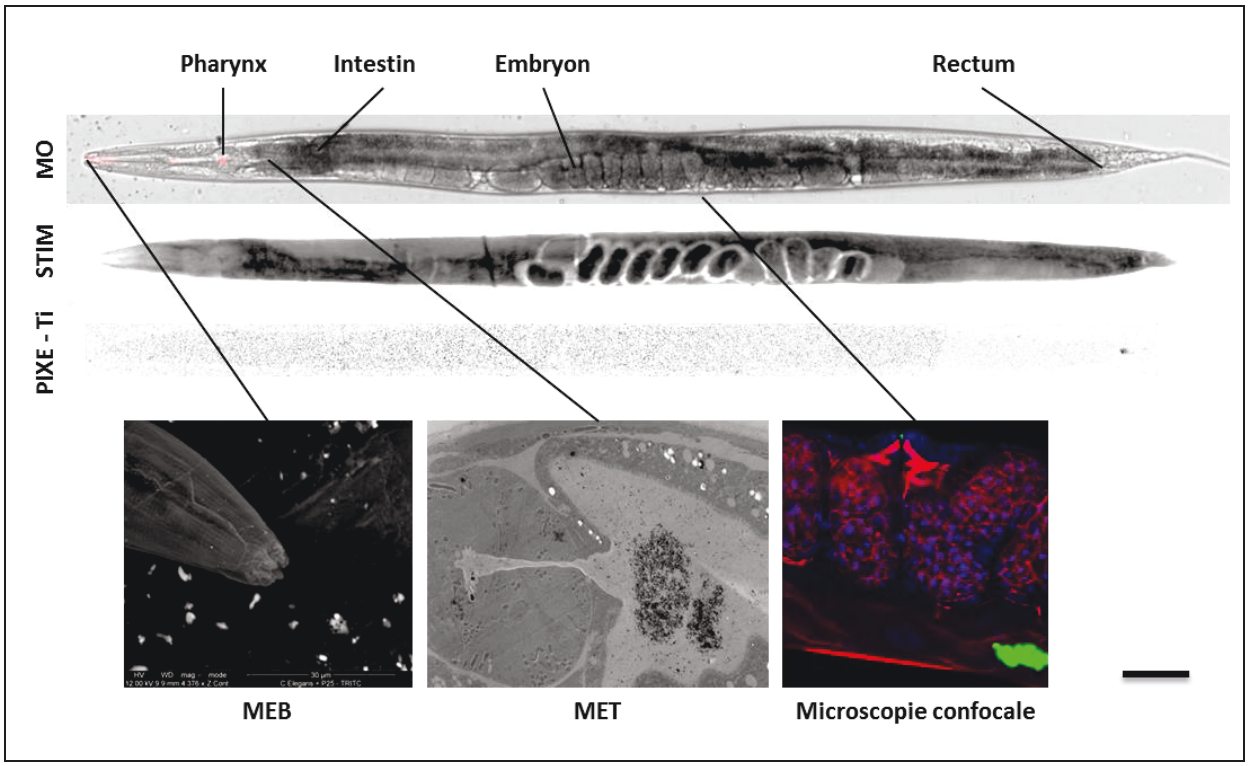


Figure 3 : Différentes techniques d'imagerie effectuées sur *C. elegans* permettant la localisation des NPs de TiO_2 natives et fluorescentes (chapitre 5, échelle 100 µm).

(iii) Toxicité : Interaction des nanoparticules avec le vivant :

Les cellules : La présence de NPs a eu une influence sur la prolifération cellulaire. Les réponses observées dépendent du type de NPs pour une lignée cellulaire donnée. Les NFs sont en effet plus toxiques que les P 25 pour des raisons telles que : (i) leur plus grande surface spécifique ; (ii) la réactivité de surface (présence d'un taux élevé d'hydroxyles de surface) ou encore (iii) leur forme allongée et acérée. La toxicité des NAs ne peut pas être comparée directement car la concentration retrouvée dans les cellules est très inférieure aux autres NPs. Leur biodisponibilité est ainsi moins importante pour les cellules en milieu liquide. En revanche, en cas de libération dans l'environnement, ce type de NPs persistera plus longtemps dans les eaux et sera ainsi plus biodisponible pour les poissons et les organismes filtreurs.

Enfin, la toxicité dans les cellules dépend de la dose d'exposition puisque l'augmentation des concentrations a intensifié les effets dans tous les cas. Les mécanismes conduisant à la baisse de prolifération et à la mort cellulaire sont encore mal définis pour les cellules HUVEC et les HeLa et feront l'objet de recherches futures. Ces recherches pourront

être conduites à l'aide de la microanalyse par faisceau d'ions qui, comme nous l'avons montré, permet de quantifier les éléments chimiques à l'échelle de la cellule unique.

Chez *C. elegans* : Les vers exposés aux NPs les ont ingérés et différents effets ont pu être observés. Lorsque les NPs étaient ajoutées en plus des bactéries, des retards de croissance et de ponte ont été observés et certains vers exposés au stade L1 sont morts. D'un autre côté en absence de bactéries, les NPs ont accéléré l'apparition du phénotype BOW avec comme phénomène avant-coureur la dilatation de l'intestin. Les résultats obtenus manuellement sur des lots de 90-150 vers pourront être étayés par de nouvelles analyses dites « haut-débit ». La cytométrie en flux peut en effet être utilisée pour quantifier certains paramètres de manière statistique avec un grand nombre de vers (plusieurs milliers).

L'hétérogénéité des résultats toxicologiques n'a pas permis de hiérarchiser de manière claire la toxicité des différentes NPs. Nous avons cependant observé quelques tendances telles que :

- les résultats des NAs et des NFs concordent mais sont parfois contredits par les P 25 probablement à cause de leur agrégation.
- Dans le cas des NAs et des NFs, la fonctionnalisation a eu un effet en augmentant la mortalité des larves exposées au stade L1.

L'augmentation de la dose d'exposition n'a pas entrainé une hausse visible de la toxicité des NPs et a même diminué les effets dans le cas de la dilatation de l'intestin. Ce résultat peut s'expliquer de différentes manières : (i) la toxicité des NPs n'est pas dose-dépendante pour les *C. elegans* pour cet intervalle de concentration ; (ii) les NPs s'agrègent lorsque la concentration augmente réduisant ainsi leur toxicité. Cette deuxième hypothèse est schématisée sur la Figure 4. Dans ce cas de figure, la toxicité des NPs serait dose-dépendante jusqu'à un certain seuil où les NPs commenceraient à s'agréger pour donner des microparticules probablement plus bénignes.

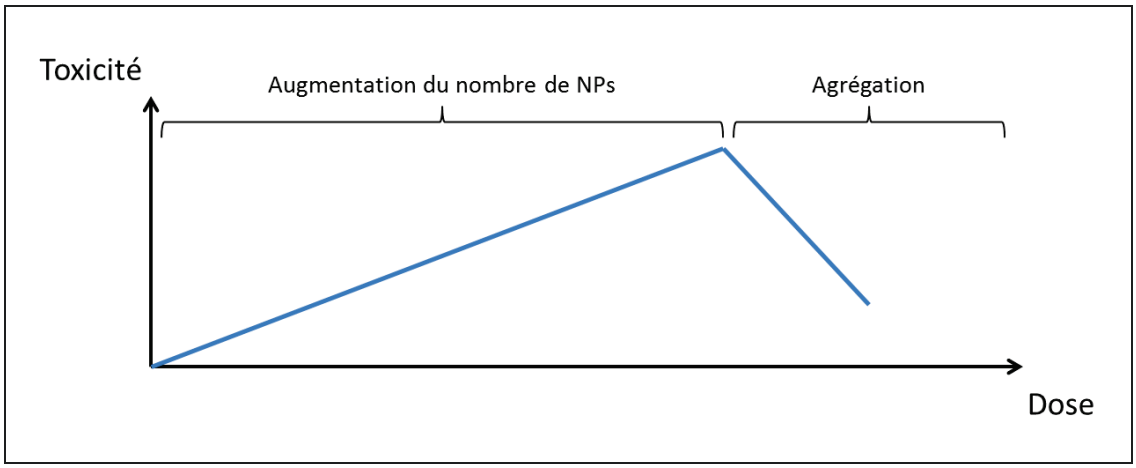


Figure 4 : Evolution possible de la toxicité des particules en fonction de la dose. L'augmentation de la concentration en NPs peut induire leur agrégation et par conséquent la réduction de la toxicité.

2. Perspectives :

Méthodologie ouverte à tout type de nanoparticules et à une toxicologie à l'échelle de la cellule :

La présente étude a nécessité le développement d'une méthodologie permettant l'analyse multimodale d'un seul et même échantillon. Nous avons contrôlé l'ensemble des étapes regroupant la synthèse des NPs, leur caractérisation, la préparation des échantillons biologiques, l'exposition et enfin l'analyse. Les résultats concernent aussi bien l'imagerie que la toxicologie. Les protocoles sont aujourd'hui bien établis et la plupart des techniques peuvent être utilisées en routine.

Cette méthodologie pourra notamment être utilisée avec de nouvelles NPs de TiO_2 de morphologies différentes afin de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques susceptibles d'augmenter leur toxicité. Le choix avisé de la morphologie des NPs permettra d'étudier des propriétés en particulier. L'impact des faces cristallines exposées pourra par exemple être investigué en transposant les travaux de Ye *et al.* [7] qui ont hiérarchisé les faces cristallines de l'anatase selon leur efficacité photo-catalytique. La méthodologie a consisté à synthétiser des NPs présentant une face dominante à hauteur d'au moins 90 %. Les résultats obtenus permettraient alors de déterminer quelles sont les faces les plus toxiques et également de voir si l'ordre est le même que pour la photo-catalyse.

Cette méthodologie pourra également être transposée à n'importe quel type de NPs comme l'oxyde de zinc ou l'oxyde de fer qui ont par ailleurs été synthétisés pendant ma thèse au laboratoire (Figure 5).

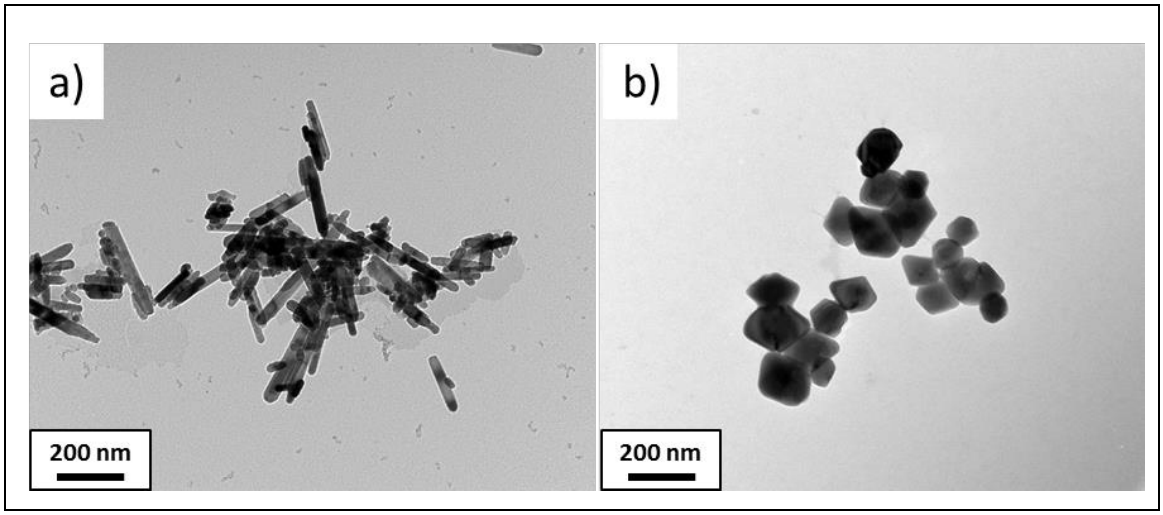


Figure 5 : NPs de a) ZnO sous forme de bâtonnets et b) Fe_2O_3 sous forme de cristaux facettés synthétisées au laboratoire.

Une balance risque / bénéfice à évaluer :

Dans cette étude, nous avons montré que le TiO_2 pouvait dans certains cas être toxique pour des cellules humaines et pour les *C. elegans*. La logique voudrait donc que leur utilisation soit déconseillée voire interdite. Cependant, pour certaines applications, il est peut être intéressant de poser la question de la balance entre le risque et le bénéfice. Dans une récente revue, Krug *et al.* [8] soulève la question suivante: « La toxicité implique-t-elle nécessairement un risque ? ». Dans le cas de la dépollution par exemple, c'est un point essentiel car leur présence peut permettre d'éliminer d'autres espèces chimiques comme l'arsenic ou des micro-organismes (ex : les bactéries) qui sont reconnus comme fortement toxiques. Ces NPs pourraient alors être très bénéfiques. En revanche, dans le cas des crèmes solaires par exemple, les NPs sont utilisées uniquement pour le confort de l'utilisateur. Elles permettent en effet de fabriquer des crèmes moins grasses qui ne laissent pas de marques blanches sur la peau. Dans ce cas, l'apport de la dimension nanométrique au niveau protection est discutable. De la même manière, les peintures peuvent très bien utiliser des microparticules comme pigments. Ce risque peut donc largement être évité dans ces conditions par une restriction aux applications où leur utilisation est indispensable ou fortement bénéfique.

Des particules « bio-responsables » :

L'étude de la toxicité de NPs à morphologies variables est également l'occasion de se poser des questions sur la possibilité de définir des morphologies / faces exposées / tailles / structures plus « bio-responsables » c'est-à-dire présentant une toxicité moins importante. Nous avons pu voir que les NFs sont plus toxiques que les P 25. Ces NPs ont une surface spécifique géante et une morphologie allongée. Ces deux paramètres peuvent être impliqués dans les mécanismes de toxicité. En conséquence, la NP « bio-responsable » est certainement isotrope et présente une surface spécifique modérée.

Les propriétés photo-catalytiques sont au cœur des inquiétudes liées à la présence de NPs dans l'environnement. Les fabricants de crèmes solaires l'ont bien compris et fabriquent déjà des NPs présentant une couche de passivation d'hydroxyde d'aluminium et de polydimethylsiloxane, par exemple [9]. Cette solution permet de conserver les propriétés optiques tout en réduisant la réactivité de surface. Il serait également possible de fabriquer des NPs présentant des faces cristallines dont l'efficacité photo-catalytique serait moindre.

Les propriétés influant sur la toxicité sont encore mal connues mais cette approche pourra clairement permettre de réduire les risques dans les applications nécessitant leur utilisation.

Références

1. Newman, M.D., M. Stotland, and J.I. Ellis, *The safety of nanosized particles in titanium dioxide– and zinc oxide–based sunscreens.* Journal of the American Academy of Dermatology, 2009. **61**(4): p. 685-692.
2. Han, F., et al., *Tailored titanium dioxide photocatalysts for the degradation of organic dyes in wastewater treatment: A review.* Applied Catalysis A: General, 2009. **359**(1–2): p. 25-40.
3. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, in *Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc*, I.A.f.R.o. Cancer, Editor 2010.
4. Kou, L., et al., *The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design.* Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **8**(1): p. 1-10.
5. Sakhtianchi, R., et al., *Exocytosis of nanoparticles from cells: Role in cellular retention and toxicity.* Advances in Colloid and Interface Science, 2013. **201–202**(0): p. 18-29.
6. Life-technologies. *CellLight Reagents Bacman 2.0*. 2014; Available from: http://tools.lifetechnologies.com/.
7. Ye, L., et al., *Synthesis of anatase TiO_2 nanocrystals with {101}, {001} or {010} single facets of 90% level exposure and liquid-phase photocatalytic reduction and oxidation activity orders.* Dar, M. Ibrahim, 2013. **1**(35): p. 10532-10537.
8. Krug, H.F. and P. Wick, *Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge.* Angew. Chem., Int. Ed., 2011. **50**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1260-1278.
9. Labille, J., et al., *Aging of TiO(2) nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment.* Environ Pollut, 2010. **158**: p. 3482 - 3489.

Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées : localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire

Résumé : Les nanoparticules de dioxyde de titane sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux domaines. Elles entrent notamment dans la constitution de produits d'usage courant comme les peintures ou certains produits cosmétiques (crèmes solaires). La taille nanométrique leur confère une réactivité accrue ce qui soulève des inquiétudes sur leur possible toxicité. Des nanoparticules de morphologies contrôlées ont été synthétisées et caractérisées. Elles ont ensuite été introduites dans le milieu de cellules humaines en culture afin d'observer les interactions *in vitro* et identifier les raisons de cette toxicité. L'étude a ensuite été étendue à l'*in vivo* avec un organisme pluricellulaire : le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Les recherches ont été focalisées sur la détection, la localisation et la quantification des nanoparticules à l'échelle de la cellule unique puis dans les nématodes. Les différentes nanoparticules synthétisées ont permis d'identifier les propriétés physico-chimiques susceptibles d'influer sur la toxicité. Les techniques d'analyse par faisceau d'ions ont permis de visualiser voire même de quantifier ces nano-objets à l'échelle de la cellule unique.

Mots clés : Nanoparticules, TiO_2, Toxicité, Culture cellulaire, *C. elegans*, Quantification

---

Synthesis of titanium dioxide nanoparticles with controlled morphology: localization, quantification and toxicological aspects from cells to multi-cellular specimens.

Abstract: Titanium dioxide nanoparticles are nowadays used in numerous domains. They enter in particular in the constitution of every day's products such as paints or cosmetics (sun screen). The nanometer scale gives them a high reactivity which raises worries about their possible toxicity. Nanoparticles with controlled morphologies were synthesized and characterized. They were then introduced in the medium of human cells in cultivation in order to observe *in vitro* interactions and identify the reasons of this toxicity. The study was then extended to *in vivo* with a multi-cellular specimen: the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Researches have been focalized on detection, tracking and quantification of nanoparticles at the scale of single-cells and then in nematodes. The different kinds of synthesized nanoparticles allowed identifying the physico-chemical properties involved in their toxicity. Ion beam analyses were conducted in order to visualize and in some case quantify this nano-objects at the single cell-scale.

Keywords: Nanoparticles, TiO_2, Toxicity, Cell culture, *C. elegans,* Quantification

---

Unités de recherche

Institut de Chimie de la Matière Condensée (ICMCB) - UPR 9048
Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG)-UMR 5797