

**INTERACTION ENTRE DES NANOPARTICULES
MANUFACTUREES ET DES MODELES BIOLOGIQUES**

SOMMAIRE

CHAPITRE IV. INTERACTIONS ENTRE DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES ET DES MODELES BIOLOGIQUES..... 97

INTRODUCTION..... 97

- 1.1 Problématique 97
- 1.2 Synthèse bibliographique..... 100
 - 1.2.1 Les nano-CeO₂ : ont-elles un rôle protecteur ou un effet toxique pour les cellules ?..... 100
 - 1.2.2 Les nanoparticules à base de fer : dans qu'elle mesure leur toxicité est-elle avérée ? 100

A. EFFETS BIOLOGIQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES SUR DES BACTERIES ENVIRONNEMENTALES 103

Résumé étendu des articles 103

1. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity towards *Escherichia Coli* 105

- 1.1 Introduction..... 105
- 1.2 Materials and Methods 106
 - 1.2.1 Nanoparticles..... 106
 - 1.2.2 Size measurement 107
 - 1.2.3 Toxicity assessment 107
 - 1.2.4 Transmission Electron Microscopy 108
 - 1.2.5 X-ray Diffraction..... 108
 - 1.2.6 X-ray Absorption Spectroscopy 108
- 1.3 Results 108
 - 1.3.1 Toxicity assessment 108
 - 1.3.2 Nanoparticles localization 111
 - 1.3.3 Structural modifications of iron-based NPs 113
- 1.4 Discussion 115

B. EFFETS BIOLOGIQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES SUR DES CELLULES HUMAINES 119

Résumé étendu des articles 119

1. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physico-chemical and cyto- genotoxic study 122

- 1.1 Introduction..... 122
- 1.2 Materials and Methods 124
 - 1.2.1 Maghemite nanoparticles and the DMSA coating 124
 - 1.2.2 Normal human fibroblast culture and treatment 124
 - 1.2.3 Nanoparticle size measurement..... 124
 - 1.2.4 Extended X-ray Absorption Fine Structure..... 125
 - 1.2.5 Toxicity assessment 125
 - 1.2.6 Transmission Electron Microscopy analysis..... 126
- 1.3 Results and Discussion..... 126
 - 1.3.1 Interfacial properties and colloidal stability of nano- γ Fe₂O₃ 126
 - 1.3.2 Colloidal stability of NmDMSA in biological media..... 129
 - 1.3.3 Endocytosis of NmDMSA by fibroblasts..... 129
 - 1.3.4 Cytotoxicity and genotoxicity of NmDMSA towards fibroblasts 130
 - 1.3.5 Surface state of NmDMSA in contact with the fibroblasts 132

2. DNA damage generated by surface redox processes of nano-CeO₂ towards human cells	134
2.1 Introduction	134
2.2 Experimental section	135
2.3 Aggregation of nano-CeO ₂ in DMEM culture medium	136
2.4 Internalization of nano-CeO ₂ within fibroblasts	137
2.5 In vitro cyto- and genotoxicity of nano-CeO ₂ towards fibroblasts.....	138
2.6 Size-dependance of the toxicity of nano- versus microparticles	141
2.7 The oxidative stress induced by the surface of nano-CeO ₂	141
C. Bilan du chapitre IV	146
D. Références bibliographiques.....	147

CHAPITRE IV. INTERACTIONS ENTRE DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES ET DES MODELES BIOLOGIQUES

INTRODUCTION

1.1 Problématique

Ce chapitre est consacré à l'étude des effets biologiques des nanoparticules manufacturées sur différents modèles cellulaires (cellules humaines et micro-organismes). Ce travail s'inscrit dans une démarche d'évaluation des risques environnementaux et toxicologiques liée à la production croissante des nano-matériaux (cf. chapitre I). Même si ces risques pouvaient apparaître anecdotiques il y a peu de temps, il existe de plus en plus d'évidences d'un impact biologique néfaste des nanoparticules manufacturées. Il semble que certaines d'entre elles puissent induire un stress oxydatif au niveau du cerveau de poissons (Oberdörster et al., 2004), altérer le comportement et le cytosquelette des cellules humaines (Berry et al., 2003 ; 2004a ; 2004b), engendrer des effets génotoxiques chez les souris (Freitas et al., 2002 ; Sadeghiani et al., 2004) ou encore avoir un pouvoir bactéricide et fongicide (Stoimenov et al., 2002). Mais, comme nous l'avons dit précédemment (cf. chapitre I), les études toxicologiques portant sur les nanoparticules manufacturées sont encore peu nombreuses et les résultats souvent contradictoires ce qui donne lieu à de véritables polémiques entre les chercheurs concernés. Ces divergences viennent du fait que les propriétés physico-chimiques de la surface des nanoparticules ainsi que les conditions d'adressage aux organismes vivants sont mal contrôlées. Pourtant, comme nous le montrerons, l'évolution de ces deux paramètres mérite d'être suivie avec attention lors de l'étude des interactions nanoparticules/cellules.

L'objectif de notre étude est de mieux définir les effets cytotoxiques et génotoxiques des nanoparticules d'oxydes métalliques sur des bactéries et des cellules humaines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques de surface. Une attention particulière a été mise sur la caractérisation des nanoparticules en amont des tests avec les cellules ou bactéries (cf. chapitre II et chapitre III), dès leur mise en suspension dans le milieu extracellulaire et à la fin des tests toxicologiques. Cela a permis d'apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- *Qu'elle est l'évolution de la **stabilité colloïdale** des nanoparticules dans les milieux extracellulaires en fonction de leurs propriétés de surface (fonctionnalisation de la surface, adsorption de protéines...). Cet état d'agrégation/dispersion peut-il affecter **l'adsorption ou l'internalisation des nano-objets sur les cellules** ainsi que les effets biologiques constatés ?*

Des études ont montré que dans les milieux biologiques complexes (pH neutre, riches en sucres, sels, protéines, lipides, enzymes...) la distribution des charges de surface des nano-oxydes est gouvernée par l'adsorption des molécules organiques (Limbach et al., 2005). Cette adsorption entraîne une passivation de la surface ce qui diminue les forces de répulsion entre les nanoparticules et induit une forte agrégation (Limbach et al., 2005 ; Auffan et al., 2006) (Figure IV.1).

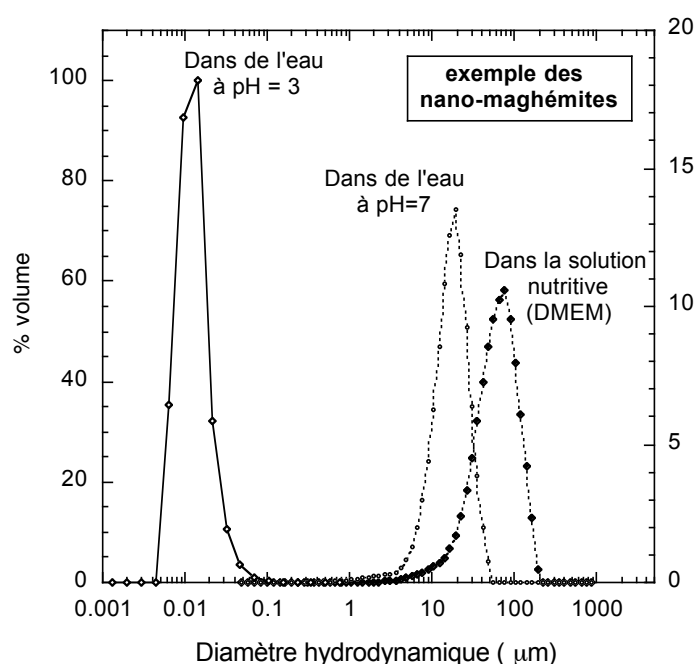


Figure IV. 1 : agrégation des nanoparticules d'oxydes métalliques dans le milieu de culture des cellules humaines (DMEM). Exemple des nano-maghémite.

Mais cette affinité des nanoparticules pour les molécules organiques suppose qu'une forte interaction peut se produire entre les nano-oxydes et les protéines formant des membranes cellulaires. Dans ce cas, les nanoparticules auront une forte affinité pour les membranes cellulaires. Ce contact direct nanoparticules/membranes peut modifier la viscosité membranaire, perturber le métabolisme des cellules ou des bactéries (la respiration), interférer avec les échanges ioniques et électroniques entre les milieux intra et extracellulaires ou encore induire un stress oxydatif.

*- Existe-il une relation entre les réponses **cyto- et génotoxiques** des modèles biologiques et des modifications de **la spéciation des atomes de surface** des nanoparticules ? Cette évolution physico-chimique peut-elle induire un stress oxydatif chez les cellules et des **altérations de l'ADN** ? Existe-il un effet réel de la taille (surface spécifique, réactivité de surface) ?*

En fonction de leur propriétés redox, les oxydes métalliques ne sont pas stables en solution et vont subir des oxydations ou des réductions pouvant engendrer un stress oxydatif pour les cellules (Schoonen et al., 2006). Par définition, un stress oxydatif se produit lorsque les cellules ne contrôlent plus la présence excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Favier et al., 2003). Les ROS sont produits naturellement par des mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme, mais en présence d'agents toxiques, leur production devient excessive et les cellules vont devoir se protéger de cet excès par des systèmes antioxydants (Chaudière et al., 1999 ; Gardès-Albert et al., 2003). Les minéraux peuvent induire un stress oxydatif directement par la génération de ROS (relargage d'ions en solution, présence de défaut cristallin en surface, réactions redox se produisant à la surface...) ou indirectement (par l'oxydation de molécules organiques dans le milieu cellulaire) (Schoonen et al., 2006).

Du fait de leur grande surface spécifique et de la forte réactivité de surface, il est possible que la génération de ROS par les nano-oxydes soient plus importante que pour des oxydes de tailles micrométriques. La génération d'un stress oxydatif a été mise en évidence pour des particules atmosphériques ultrafines et certaines nanoparticules manufacturées (e.g. Hoet et al., 2004 ; Oberdörster et al., 2005 ; Gurr et al., 2005 ; Shvedova et al., 2005 ; Nel et al., 2006 ; Lanone et al., 2006 ; Xia et al., 2006). Cependant, les mécanismes physico-chimiques se produisant à l'interface nanoparticules/cellules et responsables de ce stress oxydatif restent encore mal connus.

Afin de répondre à ces questions, notre étude a concerné quatre types de nano-oxydes métalliques à savoir les nano-maghémites, nano-magnétites, nano-CeO₂ et nZVI. Ces particules présentent l'avantage d'être de taille et de forme similaires mais de nature chimique et d'état d'oxydation différents. Cela nous a permis de comparer les effets biologiques des nanoparticules sur les bactéries et les cellules humaines en fonction de leur physico-chimie de surface. Une synthèse bibliographique des études ayant portées sur les effets biologiques des nano-CeO₂ et des nanoparticules à base de fer est donnée ci-après.

1.2 Synthèse bibliographique

1.2.1 Les nano-CeO₂ : ont-elles un rôle protecteur ou un effet toxique pour les cellules ?

À ce jour, moins d'une dizaine d'études ont porté sur les effets biologiques des nano-CeO₂ et leurs résultats se révèlent très contradictoires. La cytotoxicité de nano-CeO₂ de 20 nm de diamètre a été observée sur des fibroblastes de rongeurs, des cellules mésothéliales et de poumons humains (Limbach et al., 2005 ; Brunner et al. 2006, Lin et al., 2006). Très rapidement, les nano-CeO₂ sont internalisées par les fibroblastes via des vésicules d'endocytose. Il s'agit d'une invagination de la membrane externe qui se resserre pour former des vésicules contenant les nanoparticules (Alberts et al., 1983). Après 3 jours d'incubation avec 30 mg/L de nano-CeO₂, une diminution significative de la viabilité cellulaire de 10 à 25% est observée pour les fibroblastes de souris, de 45 à 60% pour les cellules mésothéliales et de 54% pour des cellules du poumon. Dans ce dernier exemple, la cytotoxicité est liée à un stress oxydatif comme le prouve la forte production de ROS et la diminution de la concentration en glutathion de 40% et α -tocophérol de 88%, deux antioxydants majeurs (Lin et al., 2006). Les auteurs supposent que ces ROS sont générés lors des cycles redox $Ce^{IV} \longrightarrow Ce^{III} \longrightarrow Ce^{IV}$ se produisant en surface des nano-CeO₂ qui entraînent des transferts d'électrons et d'oxygènes importants. Ces cycles ont un intérêt dans les applications catalytiques utilisant des nano-CeO₂ car ils sont à l'origine de la capacité des nano-CeO₂ à stocker et relarguer l'oxygène (Bedrane et al., 2002 ; Kaspar et al., 2003). Mais le lien entre ces transformations redox de la surface et leurs effets biologiques n'a pas été démontré.

A l'opposé, il semble que les nano-CeO₂ peuvent également protéger les cellules d'un stress oxydatif généré par des agents toxiques extérieur (Tarnuzzer et al., 2005 ; Schubert et al., 2006 ; Das et al., 2007). Dans ce cas, les nano-CeO₂ agiraient comme des anti-oxydants qui limiteraient les quantités de ROS disponibles pour induire un stress oxydatif chez les cellules. Il apparaît donc une contradiction majeure entre ces différents travaux.

1.2.2 Les nanoparticules à base de fer : dans quelle mesure leur toxicité est-elle avérée ?

Bien que le fer soit un élément essentiel à la vie, une augmentation de sa concentration en milieu cellulaire peut générer la formation de ROS (Alberts et al., 1983). Or, dans la plupart de leurs applications, les nanoparticules d'oxyde de fer sont en contact avec les cellules voire le milieu intracellulaire. Il est donc probable que les interactions nanoparticules d'oxyde de fer/cellules ne soient pas anodines. C'est notamment le cas des nanoparticules de magnétite dont la toxicité vis-à-vis des cellules humaines a été démontré (Berry et al., 2003 ; 2004). Les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées à des fins biomédicales (Gupta et al., 2005) sont généralement fonctionnalisées en surface via

le greffage de composés organiques (e.g. Kim et al., 2001 ; Goetze et al., 2002 ; Lacava et al., 2002 ; Chunfu et al., 2004 ; Xu et al., 2005 ; Kim et al., 2005). Cette couche organique limite les contacts directs entre le fer des nanoparticules et les composants cellulaires. Comme l'indique la table IV.1, la nature de l'enrobage joue un rôle important dans les effets biologiques des nanoparticules.

Table IV. 1: impacts biologiques des nanoparticules d'oxyde de fer.

Nanoparticules	Diamètre	Types cellulaires	Effets observés	Références
MnFe₂O₄		Injection intrapéritonéale chez des souris	Inflammations dans la cavité péritonéale.	<i>Lacava et al., 1999</i>
γFe₂O₃		Injection intraveineuse dans des souris	Inflammation des poumons qui disparaît avec le temps. (0.2 g/L)	<i>Pereira Garcia et al., 2005</i>
γFe₂O₃ (DMSA)		Cellules nerveuses	Diminution de la capacité de différenciation des cellules nerveuses en présence de nanoparticules enrobées de DMSA. (1 g/L)	<i>Pisanic II et al., 2007</i>
γFe₂O₃ (DMSA, dextran, albumine)		Macrophage de souris Cellules humaines tumorales ovariennes	Internalisation des nanoparticules avec ou sans enrobage de dextran, d'albumine et de DMSA. (1g/L)	<i>Wilhelm et al., 2002 ; 2003</i>
Fe₃O₄		Injection intraveineuse dans des souris	Effets génotoxiques observés après une semaine.	<i>Sadeghiani et al., 2004</i>
Fe₃O₄		Cellules du foie de souris	Pas de toxicité aux doses testées. (0.25 g/L)	<i>Hussain et al., 2005</i>
Fe₃O₄ (PEG, acide folique et lactobionique)		Macrophages de souris Cellules humaines cancéreuses du sein Cellules du foie	Internalisation des nanoparticules avec ou sans enrobage de PEG, d'acide lactobionique ou d'acide folique. (0.2 g/L)	<i>Zhang et al., 2002 ; 2005 ; Kamruzzaman et al., 2007</i>
Fe₃O₄ (dextran, albumine)		Fibroblastes dermiques humains	Internalisation des nanoparticules avec ou sans enrobage. Cytotoxicité des nanoparticules non-enrobées et enrobées de dextran. Augmentation de la prolifération cellulaire en présence de nanoparticules enrobées d'albumine. (0.05 g/L)	<i>Berry et al., 2003 ; 2004a</i>
Fe₃O₄ (transferrine)		Fibroblastes dermiques humains	Pas d'internalisation des nanoparticules enrobées de transferrine. Augmentation de la prolifération cellulaire. (0.05 g/L)	<i>Berry et al., 2004b</i>
Oxyde de fer		Cellules humaines et fibroblastes de rongeurs	Diminution de la viabilité et du contenu en ADN. (7 mg/L)	<i>Brunner et al., 2006</i>
Oxyde de fer (lactoferrine, ceruloplasmine, polyéthylène glycol)		Fibroblastes dermiques humains	Internalisation des nanoparticules non-enrobées et perturbation de l'organisation du cytosquelette. Pas d'internalisation des nanoparticules enrobées de lactoferrine, ceruloplasmine et de PEG. (0.1 g/L)	<i>Gupta et al., 2004 ; 2005</i>

En fonction de leur enrobage, les nanoparticules peuvent être internalisées ou adsorbées en surface des cellules et induire des effets toxiques (Berry et al., 2003 ; 2004b). Elles peuvent également être internalisées et améliorer la prolifération cellulaire (Berry et al., 2004a). L'hétérogénéité des réponses, réside dans le fait que la stabilité de l'enrobage n'est pas suivie lors des études toxicologiques. Si l'enrobage est désorbé lors de l'incubation avec les cellules, un contact direct entre la surface des nanoparticules et les cellules se produit ce qui peut être une source de toxicité. En revanche si l'enrobage est maintenu, c'est la toxicité de l'enrobant généralement choisi pour sa biocompatibilité qui sera analysée.

Ce chapitre est divisé en deux parties correspondant aux effets biologiques potentiels des nanoparticules d'oxydes métalliques sur un modèle biologique environnemental (*Escherichia coli*) (cf. partie IV-A) et un modèle cellulaire humain (fibroblastes dermiques) (cf. partie IV-B). Nous tenterons d'illustrer avec différents couples nanoparticules/cellules comment les propriétés physico-chimiques des nanoparticules influencent les réponses biologiques et quels sont les mécanismes de toxicité potentielle des nanoparticules manufacturées.



A. EFFETS BIOLOGIQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES SUR DES BACTERIES ENVIRONNEMENTALES

Résumé étendu des articles

Cette partie est consacrée à l'étude de l'interaction entre des nanoparticules manufacturées et un modèle de bactérie environnementale, *Escherichia coli*. Un avantage de travailler avec *E.coli* en condition *in vitro* est de pouvoir moduler les conditions de milieux lors de l'adressage des nanoparticules aux cellules. Ainsi, nous avons pu adapter le pH et la FI de la solution nutritive afin de maintenir les nanoparticules dispersées lors de l'interaction avec *E.coli* sans trop s'éloigner des conditions de culture bactérienne. Cela a permis d'intensifier les contacts entre la surface de quatre types de nanoparticules à base de fer (Fe^{II} , Fe^{III} , Fe°) et de cérium et les bactéries. L'objectif a été d'établir les relations existant entre l'écototoxicité potentielle de ces nanoparticules et leur propriétés physico-chimiques de surface en solution.

Nos travaux ont montré une forte affinité entre les nanoparticules et la membrane externe d'*E.coli*. L'adsorption des nanoparticules est certainement contrôlée par des attractions électrostatiques. Mais le résultat le plus intéressant concerne l'étroite relation existant entre la sensibilité à l'oxydation des nanoparticules à base de fer et leur cytotoxicité :

- Les nano-maghémites (Fe^{III} - forme oxydée) : elles sont chimiquement stables au contact d'*E.coli* et n'induisent aucune toxicité significative.

- Les nano-magnétites ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ - forme intermédiaire) : leur surface s'oxyde en maghémite au contact d'*E.coli* via une désorption du Fe^{II} de leur structure. Une cytotoxicité apparaît à partir de 0.7 g/L de Fe_3O_4 .

- Les nZVI (Fe° - forme réduite) : elles sont entièrement oxydées en lépidocrocite (Fe^{III}) et magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$) dans l'eau et au contact d'*E.coli*. Dès l'introduction de 0.07 g/L de Fe° 70% de cytotoxicité apparaît.

Nous avons pu montrer que la diminution de la survie bactérienne était liée à un stress oxydatif des bactéries. Ce stress peut provenir d'une perturbation de l'activité métabolique des bactéries due à l'adsorption des nanoparticules sur la membrane (modification de la viscosité membranaire, altération des échanges ioniques et électroniques à travers la membrane...). Nous présumons également que des ROS puissent être produits par des réactions de type Fenton (réaction chimique toxique produisant des ROS à partir du Fe^{II}), lors de l'oxydation du Fe° ($E_{\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\circ}}=-0.44 \text{ V}$) des nZVI et lors du relargage du Fe^{II} de la magnétite ($E_{\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}}=0.77 \text{ V}$).

Les résultats présentés dans cette partie IV-A ont fait l'objet d'un article soumis à *Environmental Science and Technology* en 2007 qui traite de l'écotoxicité des nano-maghémites, nano-magnétites et nZVI.

Des travaux équivalents ont également porté sur l'écotoxicité des nano-CeO₂ vis-à-vis d'*E.coli*. Cette étude a été effectuée par Antoine Thill et Olivier Spalla (LIONS, CEA Saclay) en collaboration avec le CEREGE et pour laquelle j'ai collaboré en ce qui concerne l'étude de l'évolution structurale des nano-CeO₂. Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans *Environmental Science and Technology* en 2006 (cf. annexe 3).

Thill, A. Zeyons O., Spalla O., Chauvat F., Rose J., Auffan M. Flank A-M. **Cytotoxicity of CeO₂ Nanoparticles for Escherichia coli. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism.** 2006, *Environmental Science and Technology*, 40(19): 6151-6156.

Brièvement, ces résultats ont montré la forte affinité des nano-CeO₂ pour la membrane d'*E.coli* (capacité maximale de rétention par les nano-CeO₂ : 13 mg nano-CeO₂/m² de surface bactérienne). Cette adsorption n'est pas sans conséquence car dès l'introduction de 0,003 g/L de nano-CeO₂, le taux de survie bactérienne diminue de ~50%. Un suivi de l'état redox de la surface des nanoparticules par XANES au seuil du cérium a révélé la réduction du Ce^{IV} en Ce^{III} de la surface des nano-CeO₂ (Eh_{CeIV/CeIII}=1.47 V). Cette réduction se produisant au niveau de la membrane bactérienne est très probablement reliée à l'écotoxicité observée.

Ainsi en termes de mécanismes, il semble exister des similitudes entre cette étude et celle qui concerne l'écotoxicité des nano-oxydes de fer. Dans les deux cas, les effets redox à la surface des nanoparticules semblent être le mécanisme initial induisant directement ou indirectement les effets cytotoxiques. La différence majeure concerne la teneur à laquelle une toxicité apparaît. À taille et forme équivalente, les nano-CeO₂ induisent des effets cytotoxiques pour des doses 10 à 100 fois moins importantes que pour les nZVI et les nano-magnétites.



1. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity towards *Escherichia Coli*

Mélanie Auffan, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Wafa Achouak, LEMIRE, CEA – CNRS – Université de la Méditerranée, Cadarache, France
Jérôme Rose, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Corinne Chanéac, LCMC, CNRS-UPMC, Paris, France
David T. Waite, New South Wales University, Sydney, USA
Armand Masion, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Joseph Woicik, NSLS Brookhaven National Laboratory, New York, USA
Mark R. Wiesner, Duke University, Durham, Caroline du Nord, USA
Bottero Jean-Yves, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France

1.1 Introduction

Accompanying the rapid emergence of nanotechnology and the increasing use of nanoparticles, a new discipline has emerged, that of the nanotoxicology (Oberdörster et al., 2005). Indeed, as with most new technologies and after recent great crisis (GMO, prion and “mad cow disease”) our society requests for more information concerning health and environmental effects. Only few studies have been initiated of the potential toxicity of nanoparticles and it is not clear, on the basis of these limited studies, whether the size of the nanoparticles or their particular surface chemistry is the key determinant of toxicity. Nevertheless, some useful insights into aspects of nanotoxicology have begun to emerge. Firstly, some studies have shown that once dispersed and surface-passivated, nanoparticles can be internalized by cells without inducing any cytotoxic effect (Auffan et al., 2006; Berry et al., 2003; Berry et al., 2004b). Consequently, the fact that nanoparticles are of similar size to biological compounds (e.g. DNA, membrane, proteins) does not appear to be a key element of the toxicity of these particles. Rather, it appears that the chemistry of the nanoparticles (Adams et al., 2006; Brunner et al., 2006) and the physico-chemical reactions that occur at the nanoparticle/cell interface are the key to the biological effect (Thill et al., 2006). In particular, it has been demonstrated that nanoparticles can affect biological targets through generation of reactive oxygen species (ROS) thereby inducing an oxidative stress (Long et al., 2006; Xia et al., 2006). To date however, the causal mechanisms linking the physico-chemical properties of nanoparticles with their biological effects are not well defined. Indeed, further investigations of these mechanisms must be the primary focus of future nanotoxicology studies. It is known that mineral surface may promote the formation of ROS species via different pathways: dissolution and release of metals, presence of structural defects, activation of the immune systems generating secondary cellular ROS and catalysis of the reduction of O₂ via electron transfer (redox) reaction (Schoonen et al., 2006). In this last case, the mineral surface (particularly of minerals containing transition metals such as iron) plays an active role. For instance, it has been demonstrated

that the reaction between Fe^{II} and O_2 is much faster when Fe^{II} ions are adsorbed at the surface of a mineral than when Fe^{II} ions are dissolved (Wehrli et al., 1989). Due to the large specific surface area of nano-sized particles, the rate of surface-mediated reactions such as this will be enhanced. Consequently, it is necessary to determine the underlying mechanisms and key factors responsible for the oxidative stress induced by nanoparticles in order to properly ameliorate risk (Robichaud et al., 2005).

The present work is focused on studies of three iron-based nanoparticles characterized by three different redox states: $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (Fe^{III}), Fe_3O_4 ($\text{Fe}^{\text{II/III}}$) and metallic iron (Fe^0) nanoparticles. These nanoparticles are widely used and studied for a variety of applications ranging from the biomedical to the environmental fields. Fe^0 nanoparticles are used in soil and groundwater decontamination (Zhang, 2003) while the superparamagnetic and adsorbing properties of $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ and Fe_3O_4 nanoparticles permit their use as contrast agents for magnetic resonance imaging and cancer therapy and as nano-adsorbants in water treatment (Gupta and Gupta, 2005b; Wiesner and Bottero, 2007). Following the development of iron-based nanoparticles, preliminary investigations of their potential toxicity towards human health and environment have been undertaken (Berry et al., 2004a; Berry et al., 2003; Berry et al., 2004b; Brunner et al., 2006; Gupta and Gupta, 2005a; Hussain et al., 2005; Pisanic II et al., 2007). While the results are rather inconsistent, they do suggest that iron-based nanoparticles can be toxic in in vitro experiments. Intercomparison between the various studies have been undertaken however is problematic due to differences in the experimental protocols used including purity of particles, cellular strain and conditions under which the nanoparticles are presented to cells. In this paper, we compared the toxic effects associated with Fe_3O_4 , $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ and Fe^0 nanoparticles using gram-negative *Escherichia coli* as the test organism. The objectives were (i) to determine the concentrations at which the nanoparticles suspensions would be toxic as a function of the Fe redox state, and (ii) to characterize from the macroscopic to the atomic scale the physico-chemical mechanisms responsible for this toxicity.

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Nanoparticles

Magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles (*Nmagnet*) were synthesized by precipitation from solutions containing both ferric and ferrous iron with $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}_{\text{total}}]$ of 0.66. Iron cations were distributed into the octahedral (Oh) and tetrahedral (Td) sites according to $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}/[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ (Jolivet et al., 2004). Maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles (*Nmag*) were obtained via oxidation of magnetite nanoparticles under acidic conditions. Oxidation of Fe^{2+} ions is correlated with the migration of cations through the lattice framework creating cationic vacancies in order to keep the charge balance. The iron atoms are distributed into the Oh and Td sites according to $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}/[\text{Fe}_{5/3}^{3+}\text{V}_{1/3}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ (Jolivet et al., 2004).

Transmission electron microscopy and X-ray diffraction measurements have shown that these nanoparticles (*Nmagnet* et *Nmag*) are well crystallized and roughly spherical with a mean coherent diameter of 6 ± 1 nm (Jolivet et al., 2002). The specific surface area was measured at $172\text{ m}^2/\text{g}$ (by adsorption of N_2 following a BET analysis).

The *nZVI* particles were prepared by adding an aqueous solution of 0.16 M NaBH_4 dropwise to a $0.1\text{ M FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution as described by Wang and Zhang (Wang and Zhang, 1997). Ferric ion was reduced and Fe^0 precipitated according to the following reaction: $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} + 3\text{BH}_4^- + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fe}^0 + 3\text{B}(\text{OH})_3 + 10.5\text{H}_2$ (Wang and Zhang, 1997). The Fe^0 particles were washed three times with 10^{-4} M HCl . The obtained-*nZVI* have a specific surface area of $32\text{ m}^2/\text{g}$ (Joo et al., 2005) and an average primary particle size of 50 nm .

1.2.2 Size measurement

The average hydrodynamic size of *Nmag*, *Nmagnet* and *nZVI* as a function of pH were determined by dynamic light scattering using a Nanotracer® (Microtrac, USA) instrument. Particle size was analyzed by suspending nanoparticles in 0.01 M NaCl solution at room temperature and the pH adjusted using solutions of 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH .

1.2.3 Toxicity assessment

Two kinds of *Escherichia coli* strains were used in this study: a wild strain called *E.coli*_{WT} (EC1 Qc1301 MG 1655) and a mutant called *E.coli*_{SodAB} (EC12 Qc 2472) from which superoxide dismutase has been removed (Carlioz and Touati, 1986). Both of these strains were aerobically grown at 30°C for 12h in Luria Bertani medium (LB) containing 5 g/L of yeast extract 10 g/L of bactotripton, and 10 g/L of NaCl. Two antibiotics, kanamycine ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) and chloramphenicol ($25\text{ }\mu\text{g/mL}$), were added to the LB medium of *E.coli*_{SodAB}. The saturated cultures were diluted in fresh LB medium overnight with shaking (at 30°C , 144 rpm). For the survival tests, 1 mL of these bacterial suspensions (containing 10^9 bacteria) were centrifuged (8000 rpm , 4°C , 5 min) and rinsed three times in ultrapure water. Different concentrations of *E.coli*_{WT} and *E.coli*_{SodAB} (from 1.25×10^3 to 5×10^7 bacteria/mL) were incubated with varying amounts of *Nmag*, *Nmagnet* and *nZVI* solutions (from 7 to 700 mg/L of NPs) diluted in ultrapure water at pH 5. Two controls of NP-free bacteria were prepared by incubating both bacterial types for 1h in ultrapure water at physiological pH 7.4 and pH 5. After 1h at 30°C the inoculated bacteria were spread on solid LB-agar plates and were incubated overnight at 30°C . Colonies were counted and compared to the control plates to calculate the percentage of growth inhibition. All treatments were prepared in triplicate and repeated two times. Data were expressed as the mean $\pm$ SD of these experiments. The Student's *t*-test was used for significance testing.

1.2.4 Transmission Electron Microscopy

After incubating with 100 mg/L of NPs, *E.coli* were washed three times in ultrapure water, fixed with 4% glutaraldehyde for 24h at 4°C and post-fixed with osmium at 25°C. Bacteria were then dehydrated in successive ethanol baths and embedded in Epon® resin. Ultrathin sections of 50 nm were examined with a JEOL/JEM-1220 instrument.

1.2.5 X-ray Diffraction

XRD patterns of NPs before and after contact with bacteria were recorded with a PANanalytical X'Pert PRO diffractometer with a Co K α radiation (1.79Å) at 40 kV and 40 mA. A counting time of 25s per 0.05° step was used for the 2 θ range 15-90.

1.2.6 X-ray Absorption Spectroscopy

XAS was used to follow the evolution in crystallographic structure of the three NPs during contact with bacteria. XAS spectra were recorded at room temperature at beamline X23A2 at the National Synchrotron Light Source (NSLS, Brookhaven, USA). Spectra were acquired in transmission mode using a Si(311) monochromator from 100 to 800 eV above the Fe K-edge (7.112 KeV). The spectra are the sum of 3 to 5 scans and the energy was calibrated using reference compounds (iron foil). XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) and EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) spectra were obtained after performing standard procedures for pre-edge subtraction, normalization, polynomial removal and wave vector conversion using the IFEFFIT software package (Ravel and Newville, 2005). XANES and EXAFS spectra were fitted using least-square optimization of linear combination fits (LCF) of model compounds (Fe°, nano-magnetite, nano-maghemite and lepidocrocite). A fit was retained when the residue (r) decreased by at least 20% relative to the previous simulation. The precision of the LCF method was estimated at $\pm 15\%$.

1.3 Results

1.3.1 Toxicity assessment

In order to maximize the interactions between the NPs and bacteria, it is necessary to present well-dispersed iron-based NPs to *E.coli*. Since the point of zero net charge (PZC) of iron oxide and zero valent iron particles are close to physiological pH (pH=7.4), particles typically strongly aggregate in biological medium (Limbach et al., 2005). An indication of the colloidal stability of the three NPs as a function of suspension pH is given in Figure IV.2. For pH lower than 5.4-5.6, the *Nmag* and *nZVI* suspensions are stable with a mean hydrodynamic diameter of 50 $\pm$ 5 nm and 320 $\pm$ 30 nm respectively. The suspension of *Nmagnet* is stable until pH 4.2 with slight aggregation occurring for pH between 4.2

and 5.7. In this range the mean hydrodynamic diameter of *Nmagnet* is 380 ± 40 nm. For pHs above these values, the NPs are strongly destabilized and the mean hydrodynamic diameter of the aggregated assemblages reach 3 to 5 μm . Hence, to ensure that the NPs are fully dispersed during the cytotoxic assays, it was necessary to undertake studies with pH between 5 to 5.5 (grey zone on Figure IV.2). This pH was considered close enough to physiological pH such that minimal disturbance to bacterial metabolism was expected.

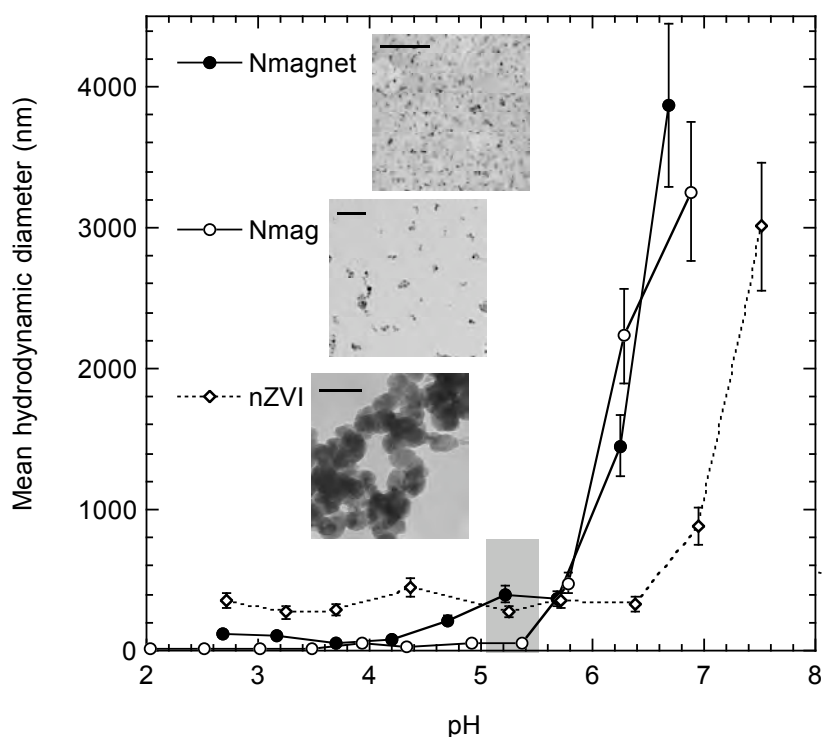


Figure IV. 1 : influence of the pH on the colloidal stability of *Nmag*, *Nmagnet* and *nZVI* (0.01mol/L NaCl, 25°C). Inset pictures: transmission electron micrograph of *Nmag*, *Nmagnet* and *nZVI* before contact with bacteria. Black dash: 90 nm.

The biological effects of well-dispersed iron-based NPs towards *E.coli*_{WT} and *E.coli*_{SodAB} was investigated. Firstly, the potential toxicity due to the NP-free bacterial incubation at pH 5-5.5 during 1h was checked (Figure IV.3). The cytotoxicity assay yielded respectively $85\% \pm 11\%$ and $100\% \pm 20\%$ of survival with respect to *E.coli*_{WT} and *E.coli*_{SodAB} incubated under physiological conditions (pH 7.4). The percentage of survival given in the rest of the study is calculated from the number of bacterial colonies for each NP concentration normalized to the number of bacterial colonies counted for the NP-free control incubated at pH 5. The results of the survival tests for the two *E.coli* strains in the presence of the various NPs are shown in Figure IV.4. In the case of *E.coli*_{WT}, the toxicity increased with dose for *Nmagnet* and *nZVI* whereas *Nmag* gave no evidence of toxicity under the experimental conditions used here. A statistical significant cytotoxicity appears for *Nmagnet* between 350-700

mg/L and for *nZVI* between 7-70 mg/L respectively. An interesting result was the difference in behavior between the two *E.coli* strains upon exposure to the same concentrations of NPs with *E.coli*_{SodAB} found to be more sensitive to the addition of NPs than *E.coli*_{WT} (Figure IV.4). A significant cytotoxicity towards *E.coli*_{SodAB} appears for *Nmag* between 350-700 mg/L, for *Nmagnet* between 175-350 mg/L and for *nZVI* between 7-70 mg/L. These values are lower than previously reported with *E.coli*_{WT} for *Nmag* and *Nmagnet*. In the case of *nZVI*, the cytotoxicity towards *E.coli* is too important to see the sensitivity of the mutant strains compared to the wild strain. To be sure that this toxicity is related to the NPs themselves and not to the presence of residue from the synthesis, the toxicity of the supernatant was evaluated (Figure IV.3). NPs were centrifuged and survival tests were done on the liquid phase. No toxicity of the supernatant of the NPs suspension was observed, confirming that the toxic effect was due to iron-based NPs.

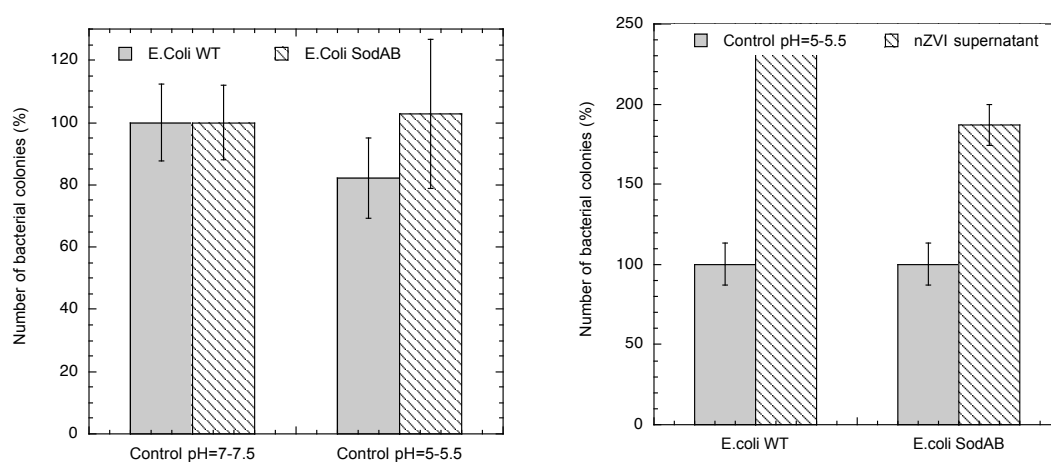


Figure IV. 2 number of colonies of *E.coli*_{WT} and *E.coli*_{SodAB} formed as a function of the pH of the growth medium (left) and formed in the supernatant of *nZVI* suspension (right).

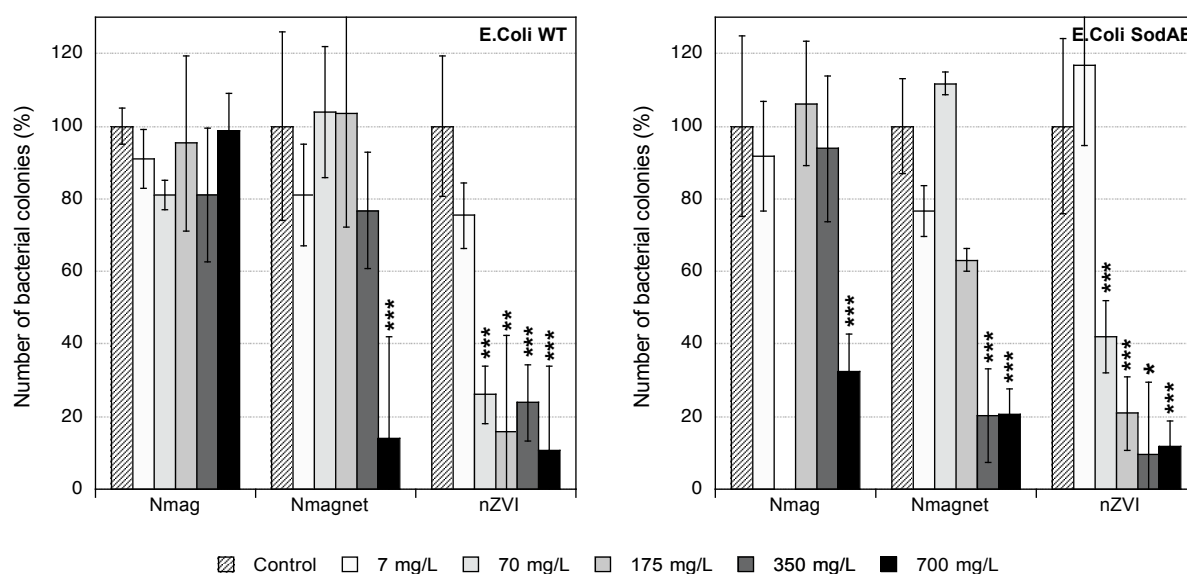


Figure IV. 3 : number of colonies of *E.coli*_{WT} and the *E.coli*_{SodAB} formed on the agar plate as a function of the concentration of NPs (mg/L). Statistical significance: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

1.3.2 Nanoparticles localization

TEM analysis of bacterial thin sections allows direct visualization of morphological changes of *E.coli* due to the presence NPs and/or changes in the shape of NPs after incubation with bacteria. From the TEM pictures (Figure IV.5), *E.coli* is seen to be a moderately sized ($1.5 \times 0.5 \mu\text{m}$) Gram-negative bacillus with a tubular form. The iron-based NPs were clearly visible and distinct from the cellular matrix due to the high electron density of iron. The *E.coli* exterior clearly displays an outer shell of high electronic density corresponding to a layer of NPs adsorbed on the outer membrane of the cell. No evidence of cellular internalization of NPs has been found. Another interesting result is the modification of the shape of *nZVI* after incubation with bacteria. While the primary *nZVI* particles are pseudo-spherical before contact with *E.coli*, they are transformed into lamella structure after 1 h of incubation. No modification of the shape of *Nmag* or *Nmagnet* is revealed by TEM analysis.

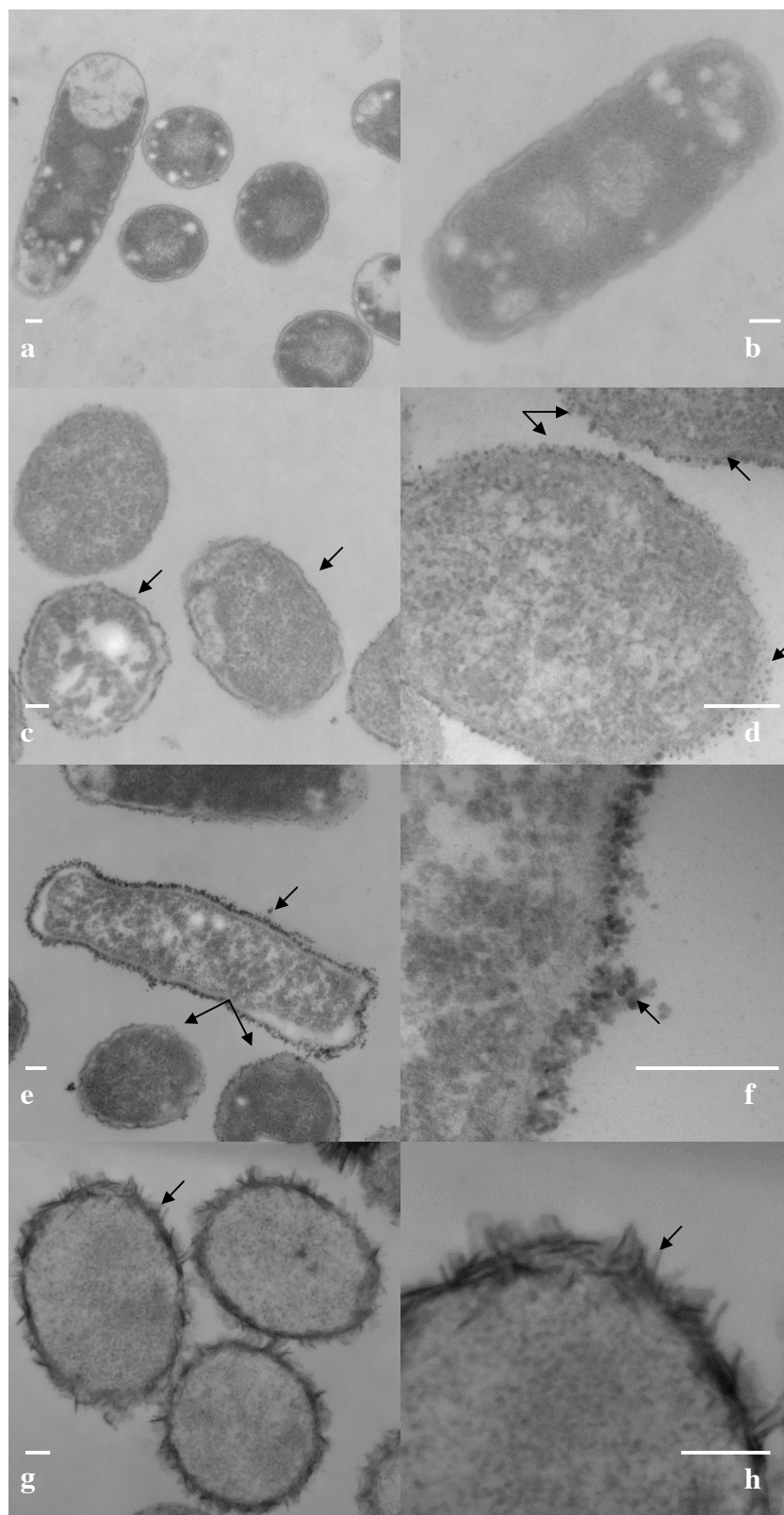


Figure IV. 4 : TEM pictures of *E.coli* ultrathin sections. (a,b) control bacteria incubated in water at pH 5 during 1h. *E.coli* observed after 1h of incubation with 100 mg/L of *Nmag* (c,d), *Nmagnet* (e,f) and *nZVI* (g,h). White dash: 100 nm

1.3.3 Structural modifications of iron-based NPs

Analysis by XRD of *nZVI* after incubation for 1 h in an abiotic solution at pH 5 to 5.5 indicated the appearance of oxy-hydroxide mineral phases. The strong XRD peaks at 16.5° and 31.6° 2θ and peaks at 41.6° and 74.7° 2θ are in agreement with the crystallographic d-spacing of reference standard lepidocrocite (γFeOOH) and magnetite (Fe_3O_4) and/or maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) (Figure IV.6). Because the two spinel phases, Fe_3O_4 and $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, are isostructural, they are indistinguishable in the XRD diagram. To determine the nature of the spinel phase, XAS experiments at the Fe K-edge were performed. XANES data are highly sensitive to the redox and coordination states of iron atoms. Hence the presence of Fe^{II} in Fe_3O_4 and only Fe^{III} in $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ can be discriminated. The differences between the XANES spectra of $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4 and γFeOOH reference compounds with respect to the intensity and the position of the pre-edge and the main edge and the position of the absorption ramp are well understood (Corrias et al., 2000; Manceau and Gates, 1997). Linear combination fits of reference spectra (Figure IV.7) are in close agreement with experimental data. A contribution of 60% of γFeOOH and 38% of Fe_3O_4 was necessary to fit the spectra of *nZVI* in abiotic system. The ratio $\gamma\text{FeOOH}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ decreased in the presence of *E.coli*_{WT} and *E.coli*_{SodAB} for which 21-25% of γFeOOH and 78-82% of Fe_3O_4 were necessary to satisfactorily reproduce the XANES experimental data (Figure IV.5). No significant structural changes were observed whatever the bacterial strain present.

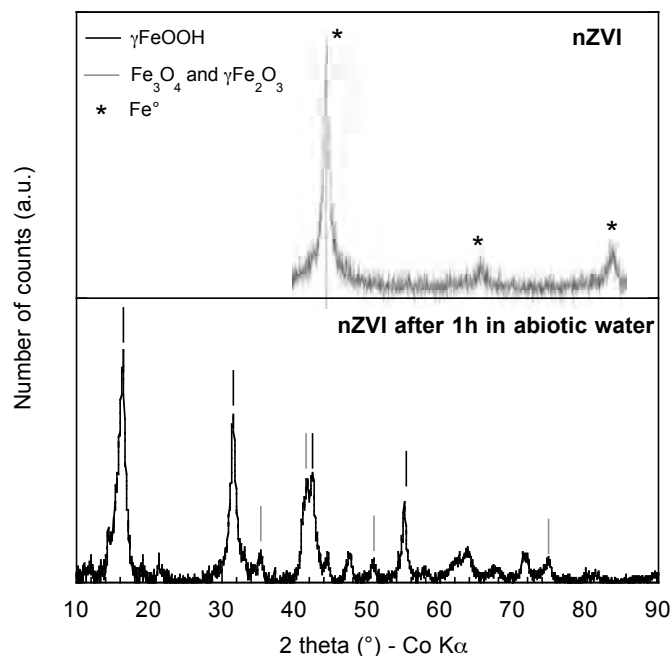


Figure IV. 5 : XRD patterns of *nZVI* before and after 1h of incubation in water at pH =5-5.5.

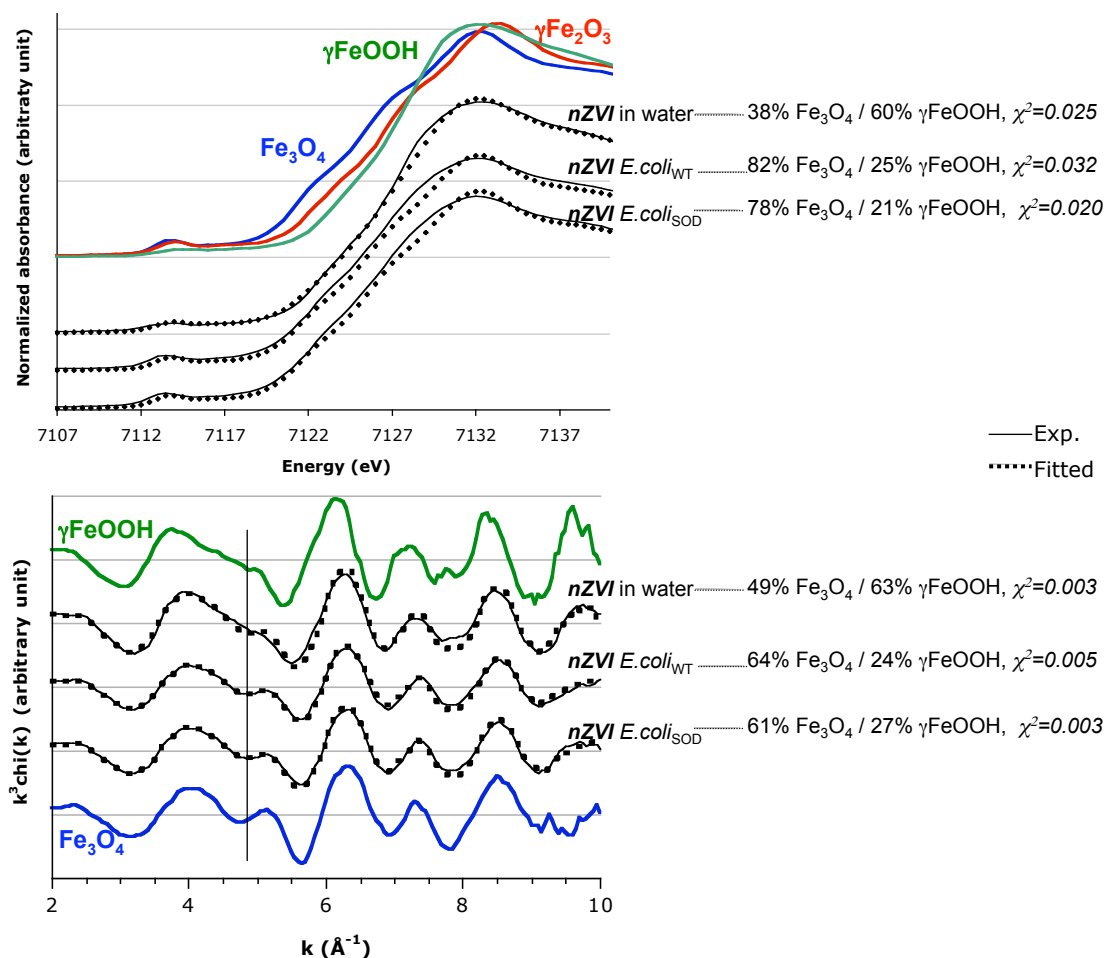


Figure IV. 6 : Fe K-edge XANES and EXAFS spectra of *nZVI* after 1h incubation in water and after contact with *E.coli* compared with data reference compounds. The dotted line is the best fit line to the sample. The results and the quality (χ^2) of the fits are given on the right of each spectrum.

The EXAFS spectra also showed similarities between the references and the spectra of *nZVI* (Figure IV.7) such as the shape of the oscillation between 4 and 5 $\text{\AA}^{-1}$ (for *nZVI* in abiotic water) and the appearance of an oscillation at 5 $\text{\AA}^{-1}$ (for *nZVI* in contact with *E.coli*). A linear combination of γFeOOH and Fe_3O_4 references was used to fit the EXAFS spectra. The EXAFS LCF results are in agreement with the XANES data, with a contribution of 63% of γFeOOH and 49% of magnetite for *nZVI* in water alone and 24-27% of γFeOOH and 61-64% of magnetite for *nZVI* after contact with *E.coli*_{WT} and *E.coli*_{SODAB} (Figure IV.7). These results highlight the strong structural modifications of *nZVI* that occur under abiotic and biotic aerobic conditions and confirm the shape changes of *nZVI* observed by TEM.