

Caractérisation des nanoparticules
manufacturées

SOMMAIRE

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES	33
Introduction.....	33
1. Caractérisation des nanoparticules manufacturées.....	35
1.1 Voies de synthèse	35
1.1.1 Les nano-magnétites et les nano-maghémities	35
1.1.2 Les nanoparticules de Fe ⁰ (nZVI).....	36
1.1.3 Les nano-CeO ₂	36
1.2 Forme, dimension et cristallinité	37
1.3 Stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules	39
1.4 Stabilisation des nano-maghémities à pH neutre et force ionique élevée	41
1.5 Bilan des principales caractéristiques des nanoparticules étudiées.....	43
2. Les modèles biologiques et tests de cyto- génotoxicité.....	44
2.1 <i>Escherichia coli</i>	44
2.1.1 Culture bactérienne	44
2.1.2 Test de survie bactérienne en présence de nanoparticules	45
2.2 Fibroblastes dermiques humains.....	45
2.2.1 Culture cellulaire.....	46
2.2.2 Test de viabilité cellulaire en présence de nanoparticules.....	47
2.3 Toxicologie génétique	47
2.3.1 Rappel sur les altérations possibles du patrimoine génétique	47
2.3.2 Le test d'Ames (ou Mutatest)	49
2.3.3 Le test des micronoyaux (ou Cytokinesis-blocked micronucleus)	50
2.3.4 Le test des Comètes (ou Single cell gel electrophoresis)	51
3. Techniques de caractérisation physico-chimique	53
3.1 Mesures granulométriques en solution.....	53
3.2 Microscopie électronique à transmission (MET)	54
3.3 Diffraction des rayons X (DRX).....	55
3.4 Analyse chimique en solution (ICP-AES)	56
3.5 Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)	56
3.5.1 Principe.....	56
3.5.2 Formalisme EXAFS.....	58
3.5.3 Analyse des données XAS.....	59
3.5.4 Mise en œuvre expérimentale	61
4. Bilan des échantillons et des analyses effectuées.....	62
5. Bilan du chapitre II.....	63
6. Références bibliographiques	64

Introduction

Notre étude a porté sur quatre types de nanoparticules ultrafines, sélectionnées du fait de leur importance dans les applications ou les développements actuels : les **nano-magnétites** ($\text{Fe}_3^{2+/3+}\text{O}_4$), les **nano-maghémites** ($\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3$), les **nanoparticules de Fe°** et les **nano- CeO_2** (Ce^{4+}O_2). Ces nanoparticules sont de dimension et de forme similaires mais de compositions chimiques et propriétés de surface différentes. Afin de caractériser le plus finement possible ces nanoparticules ainsi que l'évolution de leurs propriétés de surface au contact des modèles biologiques, plusieurs techniques ont été utilisées, chacune agissant à une échelle particulière (Figure II.1).

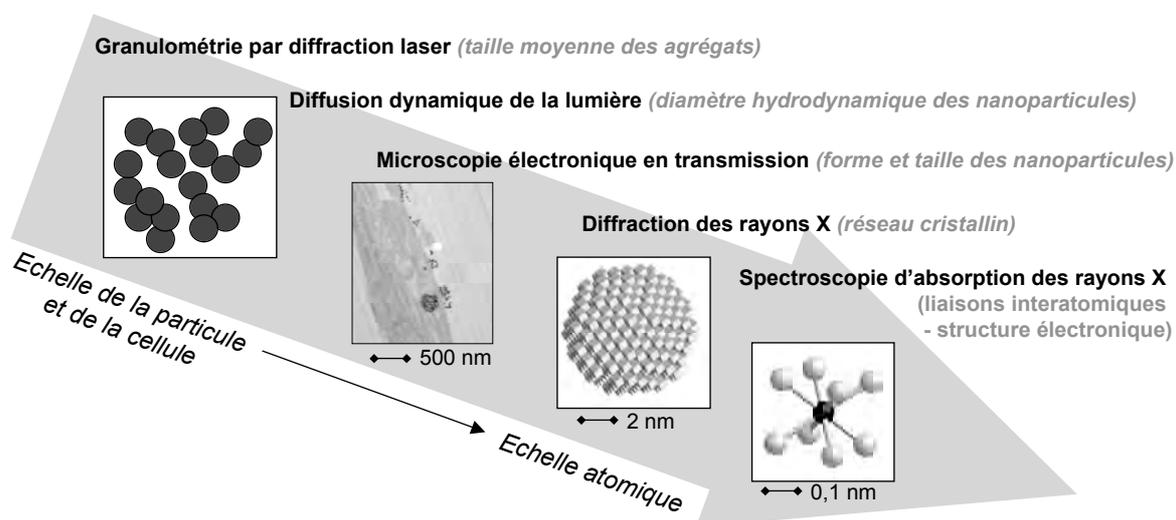


Figure II. 1 : techniques employées pour la caractérisation physico-chimique des nanoparticules manufacturées.

L'étude de l'impact biologique des nanoparticules manufacturées a été menée en **condition *in vitro***. Cette approche toxicologique *in vitro* est la plus adaptée à la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires. Cela a permis de définir au mieux l'environnement des cellules cibles, d'examiner leurs modifications après incubation avec les nanoparticules et de déterminer le devenir des nanoparticules après leur mise en contact. Deux modèles biologiques ont été choisis. Le premier est *Escherichia Coli*, une bactérie environnementale qui se retrouve dans toutes les étapes de la chaîne alimentaire. Elle est donc susceptible d'interagir directement avec des nanoparticules disséminées dans l'environnement et d'être une voie d'entrée de ces dernières dans les organismes vivants. Le deuxième modèle biologique est une lignée de cellules humaines, les **fibroblastes dermiques**. Dans ce cas, un accent a été mis sur l'étude de la génotoxicité potentielle des nanoparticules. Cette approche s'est révélée essentielle puisque la détermination des facteurs pouvant interagir avec le patrimoine

génétique des cellules est nécessaire dans la prévention des risques à long terme pour l'homme comme le vieillissement cellulaire et/ou tissulaire prématuré et les cancers. Les primo cultures de fibroblastes sont donc des cellules de choix puisque la plupart des tests de toxicologie génétique ont été validés sur ce modèle non-transformé.

La première partie de ce chapitre a pour objet de donner une description détaillée des nanoparticules choisies pour cette étude (origine, dimension, stabilité en suspension...). Dans la deuxième partie seront présentés les deux types cellulaires sélectionnés, ainsi que les tests de cytotoxicité et de génotoxicité mis en œuvre. Enfin, nous ferons une rapide description des techniques de caractérisation physico-chimique utilisées. Une attention toute particulière sera portée sur la spectroscopie d'absorption des rayons X qui est une sonde chimique à l'échelle atomique basée sur le rayonnement synchrotron.



1.1 Voies de synthèse

La synthèse des nanoparticules manufacturées de taille, de forme et de cristallinité contrôlées a longtemps été un challenge scientifique et technologique. Les voies de synthèse physique classiques ne permettant pas de contrôler la taille des particules d'oxydes dans une gamme nanométrique, les voies chimiques en milieu aqueux se sont révélées les plus efficaces (Costa, 2001). En contrôlant le type de sels utilisés (chlorures, sulfates, nitrates...), le pH et la force ionique (FI) du milieu, il est possible d'obtenir des nanoparticules de taille, de forme et de cristallinité contrôlées. Dans le langage des nanotechnologies, cette approche est qualifiée de « top down » (de la macroparticule vers la nanoparticule) par opposition à l'approche « bottom up » (de l'atome vers la nanoparticule). Les voies de synthèse utilisées pour la fabrication des nanoparticules étudiées sont explicitées ci-dessous.

1.1.1 Les nano-magnétites et les nano-maghémities

Les nano-oxydes de fer ont été synthétisés par le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée (LCMC, Université Pierre et Marie Curie, France). Les **nano-magnétites** sont obtenues par coprécipitation d'ions Fe^{3+} et Fe^{2+} en milieu aqueux ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) avec un rapport $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}_{\text{Total}}$ de 0.66 (Jolivet et al., 2002 ; 2003). La magnétite est un oxyde de Fe^{3+} et Fe^{2+} possédant une structure spinelle inverse (Figure II.2). Elle se compose d'un réseau cubique à face centrée (CFC) d'atomes d'oxygène qui délimitent des sites tétraédriques (Td) et octaédriques (Oh) dans lequel se logent les atomes de fer selon la formule suivante : $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ (Cornell et Schwertmann, 1996, Jolivet et al., 2002 ; 2003). À cause de la présence de Fe^{2+} dans leur structure, les nano-magnétites sont très sensibles à l'oxydation. Il est donc important que pendant leur synthèse et leur stockage, des conditions anaérobiques strictes soient respectées.

Les **nano-maghémities** peuvent être considérées comme des nano-magnétites oxydées. Leur synthèse débute par la synthèse de nano-magnétites qui vont ensuite « mûrir » dans des conditions contrôlées (Prodan et al., 1999 ; Jolivet et al., 2002 ; 2003). En jouant sur l'oxygénation ou l'acidité du milieu, les ions Fe^{2+} vont s'oxyder puis diffuser vers la phase aqueuse. Des lacunes cationiques se créent afin que la balance des charges soit respectée. Cette réaction s'écrit de la manière suivante :

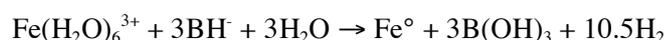


Les nano-maghémities sont donc des oxydes de Fe^{3+} qui dérivent de la structure spinelle inverse de la magnétite mais en diffèrent par l'absence de Fe^{2+} et la présence de lacunes au sein de son réseau cristallin (Figure II.2). Elles se composent d'atomes de fer répartis entre des sites tétraédriques (Td) et octaédriques (Oh) selon la formule suivante : $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}_{5/3}^{3+}\text{V}_{1/3}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ (Cornell et Schwertmann, 1996 ; Garcell et al., 1998 ; Tronc et al., 2000 ; Belin et al., 2001, Brice-profeta et al., 2005). Il est à

noter que la lente oxydation des nano-magnétites en milieu acide ne modifie pas la taille des particules (Jolivet et al., 2003). De plus, contrairement aux nano-magnétites, les nano-maghémites possèdent une grande stabilité chimique en solution. Cette stabilité couplée à la structure spinelle, leurs confèrent une symétrie importante qui facilite l'étude de certains phénomènes structuraux (cf. chapitre III).

1.1.2 Les nanoparticules de Fe° (nZVI)

Les nZVI (zero valent iron nanoparticle) étudiées ont été fournies par l'université de New South Wales (Australie). Elles sont synthétisées par précipitation réductive de 0.1M de FeCl₃ avec 0.16M de NaBH₄. L'équation de la réaction est la suivante (Joo et al., 2004 ; 2005 ; Wang et al., 1997) :



Ces nanoparticules sont constituées d'atomes de fer engageant chacun 8 liaisons avec 8 autres atomes de fer (Figure II.2). Une fois synthétisées, les nZVI sont lavées trois fois dans 10⁻⁴ mol/L de HCl puis stockées à pH acide. Comme les nano-magnétites, les nZVI sont très sensibles à l'oxydation et doivent être conservées sous atmosphère d'azote gazeux (N₂).

1.1.3 Les nano-CeO₂

Ces nanoparticules ont été fournies par la société Rhodia par l'intermédiaire du Laboratoire Interdisciplinaire de l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire (LIONS, Saclay, France). La synthèse s'effectue à pH acide par précipitation de sels de Ce⁴⁺(NO₃)₄ (Spalla et al., 1993 ; 1997). On obtient ainsi des nano-cristallites de cerianite ayant une structure cristalline cubique (Figure II.2) et pour formule chimique : CeO₂(HNO₃)_{0,5}(H₂O)₄. Comme les nano-maghémites, les nano-CeO₂ sont stockées à pH acide et seront chimiquement stables en solution.

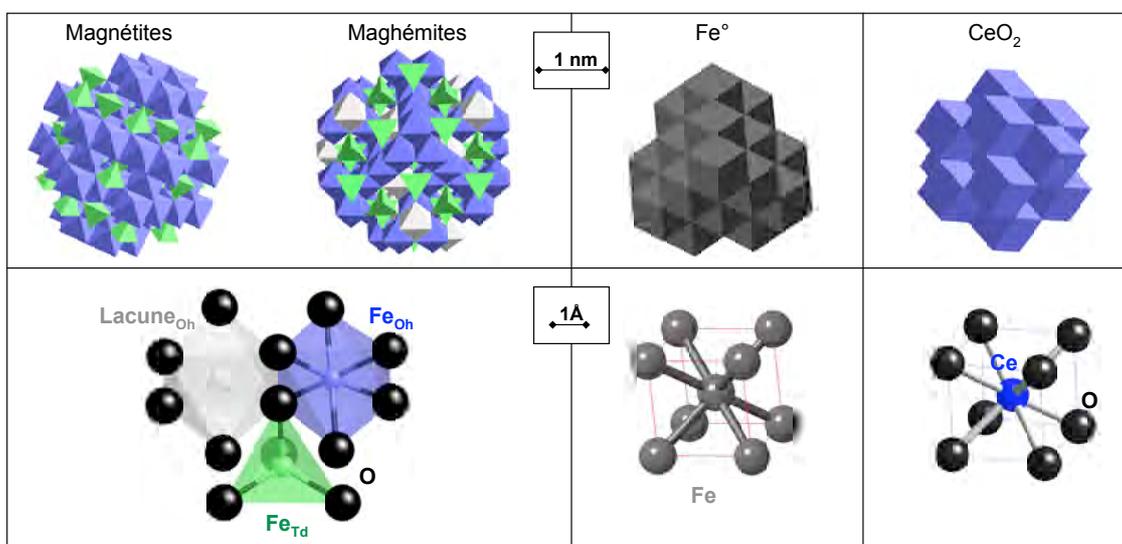


Figure II. 2 : structure cristalline des nanoparticules étudiées.

1.2 **Forme, dimension et cristallinité**

Les nano-magnétites et les nano-maghémities. Elles sont de forme sphérique avec un diamètre moyen entre 5 et 6 nm (Figure II.3). La diffraction des rayons X a permis de confirmer leur nature cristalline, la position des 3 principaux pics de diffraction étant respectivement similaire à celle d'une magnétite et d'une maghémite de référence (Figure II.4). La surface spécifique des nano-maghémities a été mesurée à 174 m²/g par adsorption de N₂ suivi d'une analyse BET (Brunnauer, Emmet, Teller).

La distribution des diamètres hydrodynamiques (D_H) des nano-maghémities dans la solution-mère (pH=2,1) est monomodale (centrée sur un seul pic) avec une taille moyenne de 10-20 nm. En revanche, la distribution des D_H dans la suspension initiale des nano-magnétites (pH=2,4) est bimodale (Figure II.5). En nombre de particules, une importante fraction des nano-magnétites a un D_H centré sur 20 nm, mais des agrégats de 150 nm environ sont également présents. La présence de particules unitaires de 150 nm est à exclure car elles n'apparaissent pas au MET.

Les nZVI. Des études ont montré que ces nanoparticules avaient une structure et une chimie différentes entre le cœur et la surface (Nurmi et al., 2005). La majeure partie des particules est constituée de Fe⁰, mais une fraction de la surface est constituée d'oxydes de fer et de bore. La surface spécifique de ces nZVI a été estimée à 32 m²/g par adsorption de N₂ suivi d'une analyse BET (Joo et al., 2005). La taille moyenne des cristallites est comprise entre 1 et 200 nm avec une dimension moyenne centrée sur 50 nm (Figure II.3). Leurs D_H dans la solution-mère présentent également une large distribution entre 100 et 400 nm (Figure II.5). Les nZVI sont donc légèrement déstabilisées au sein même de leur solution-mère.

Les nano-CeO₂. À l'inverse des nZVI, la suspension de nano-CeO₂ présente une distribution des D_H étroite avec une taille moyenne de 10 nm (Figure II.5). Leur nature cristalline (la cérianite) a été vérifiée par diffraction des rayons X (Figure II.4). Elles sont de forme ellipsoïdale avec un diamètre de 7 nm environ (Figure II.3). Leur surface spécifique est estimée à 400 m²/g par l'analyse de la limite de Porod obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles (Spalla et al., 1993 ; 1997)

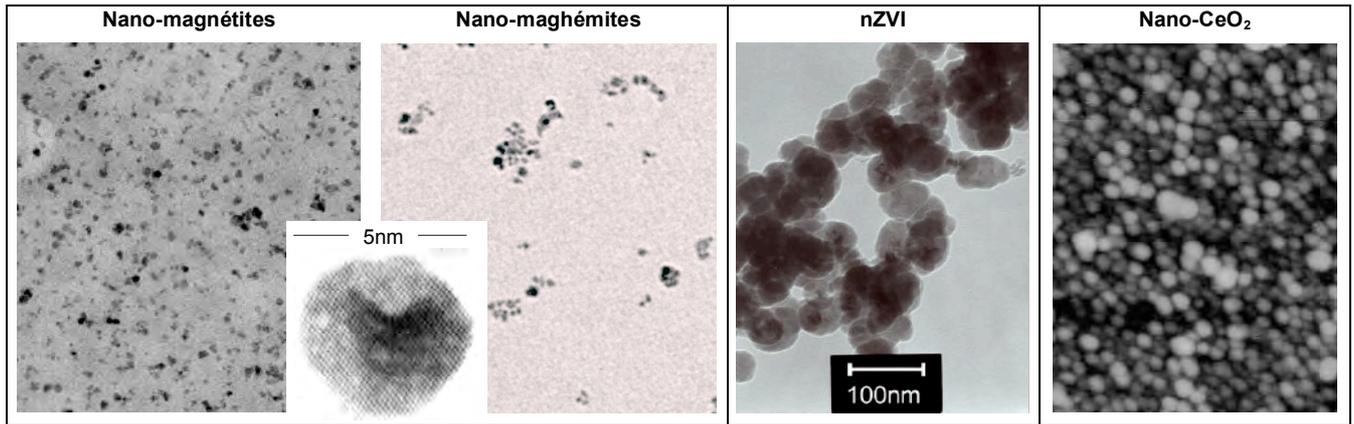


Figure II. 3 : observation microscopique des nanoparticules étudiées.

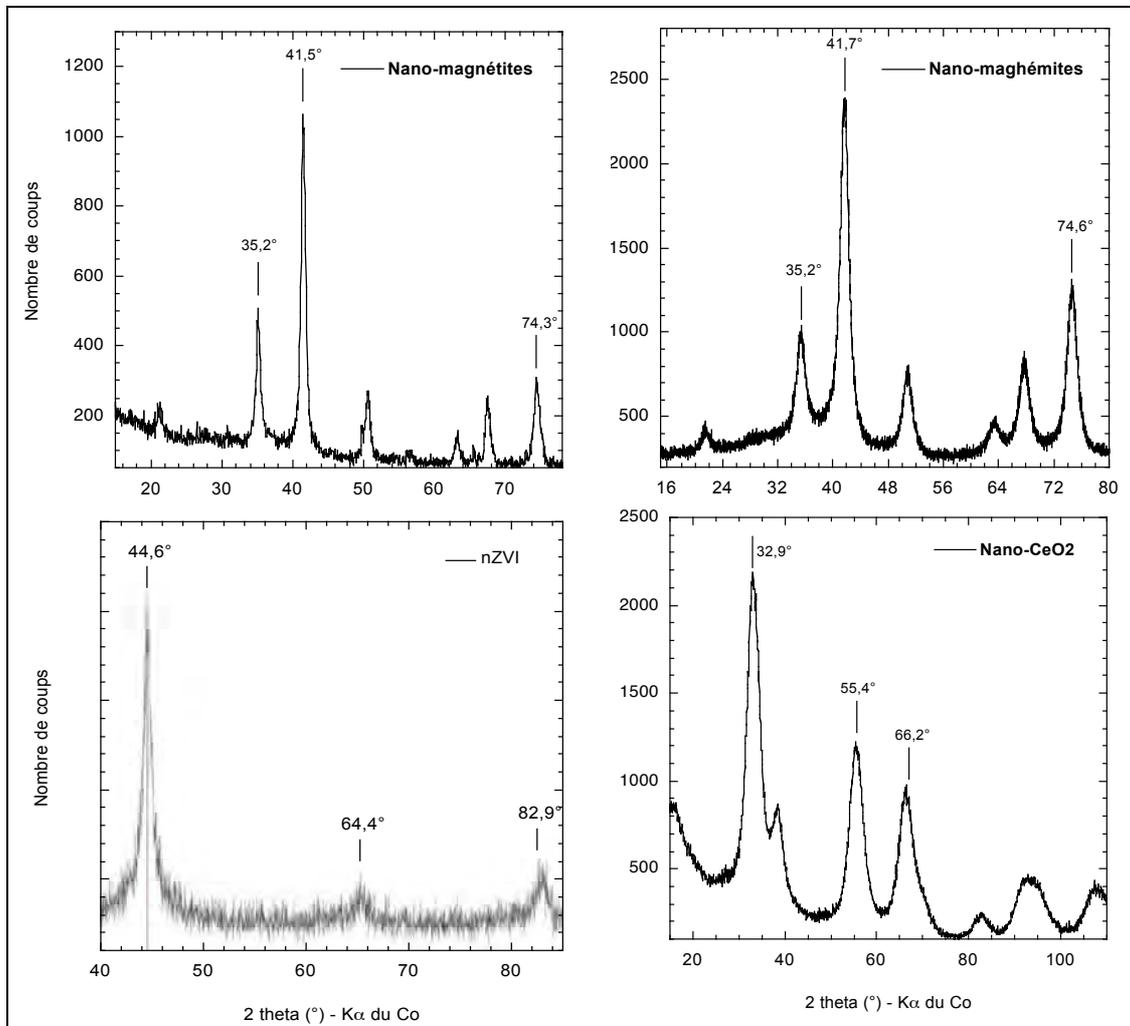


Figure II. 4 : diffractogramme des nanoparticules étudiées et position des pics de diffraction des minéraux de référence.

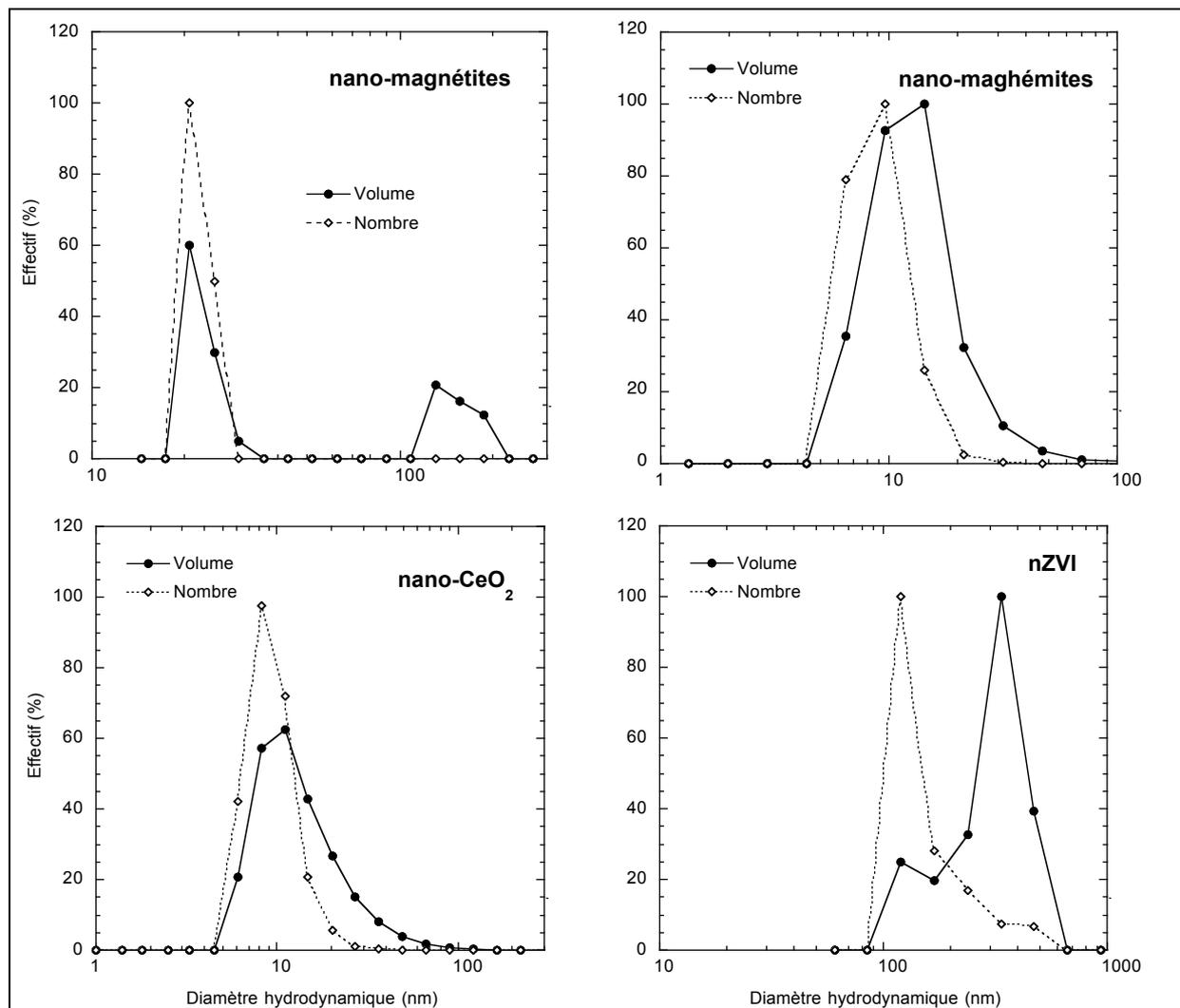


Figure II. 5 : diamètres hydrodynamiques des nanoparticules dans leur solution-mère mesurés par diffusion dynamique de la lumière.

1.3 Stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules

En fonction du pH et de la force ionique (FI) du milieu, les suspensions de nanoparticules dérites précédemment seront déstabilisées et les nanoparticules auront tendance à s'aggréger. C'est pourquoi, nous avons suivi la stabilité colloïdale des nanoparticules afin de déterminer l'état d'aggrégation. dispersion dans lequel nous allons les adresser aux cellules ou bactéries. Les cultures de cellules humaines lors de tests de toxicité se déroulent dans des solutions dont le pH est proche de 7 et des forces ioniques supérieures à 0.2 mol/L (cf partie II.2). Il est donc probable que les nanoparticules s'aggrègent. Dans le cas des cultures bactériennes, il est possible de moduler leur environnement aqueux mais le pH doit rester le plus proche possible du pH physiologique. Nous devons donc déterminer les conditions limites de stabilité colloïdale des différentes nanoparticules en termes de pH et de concentration en sels. Trois sels ont été choisis pour cette étude, NaCl, KCl et CaCl₂ car ce sont les plus abondants dans les milieux biologiques.

Dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution du diamètre hydrodynamique (D_H) en fonction du pH de la solution pour l'ensemble des nanoparticules étudiées. La Figure II.6 récapitule les résultats obtenus pour une force ionique très faible de 10^{-3} mol/L de NaCl. Il apparaît très clairement que les quatre types de nanoparticules s'agrègent, lorsque le pH de la solution atteint 6-7 soit un pH physiologique. Ceci est dû au fait que le point de charge nulle (PCN) de ces particules est compris entre pH 6.1 et 8 (Garcell et al., 1998 ; Roger et al., 1989 ; Jarlbring et al., 2005, Spalla et al., 1993). Le PCN est défini comme la valeur de pH pour laquelle la surface des particules est neutre. Dans ce cas, les forces de répulsion entre les particules sont trop faibles pour s'apposer à l'aggrégation. Les plus sensibles à la hausse du pH sont les nano-magnétites. Jusqu'à $\text{pH} < 4,7$, elles sont stables avec un D_H moyen ne dépassant pas les 150 nm. En revanche dès $\text{pH} > 4,7$, une très forte agrégation se produit. Les nano-maghémites et les nano- CeO_2 ont une gamme de stabilité plus grande que les nano-magnétites. Jusqu'à $\text{pH} = 5,2-5,7$, leurs D_H moyens ne dépassent pas les 30-40 nm. Mais au-delà de ce pH, l'aggrégation est très forte et la taille moyenne des agrégats atteint 2,5 à 3 μm . Les nZVI sont les nanoparticules dont la déstabilisation se produit au pH le plus élevé. Elles sont stables jusqu'à $\text{pH} = 6.4$ avec un D_H de 400 nm en moyenne.

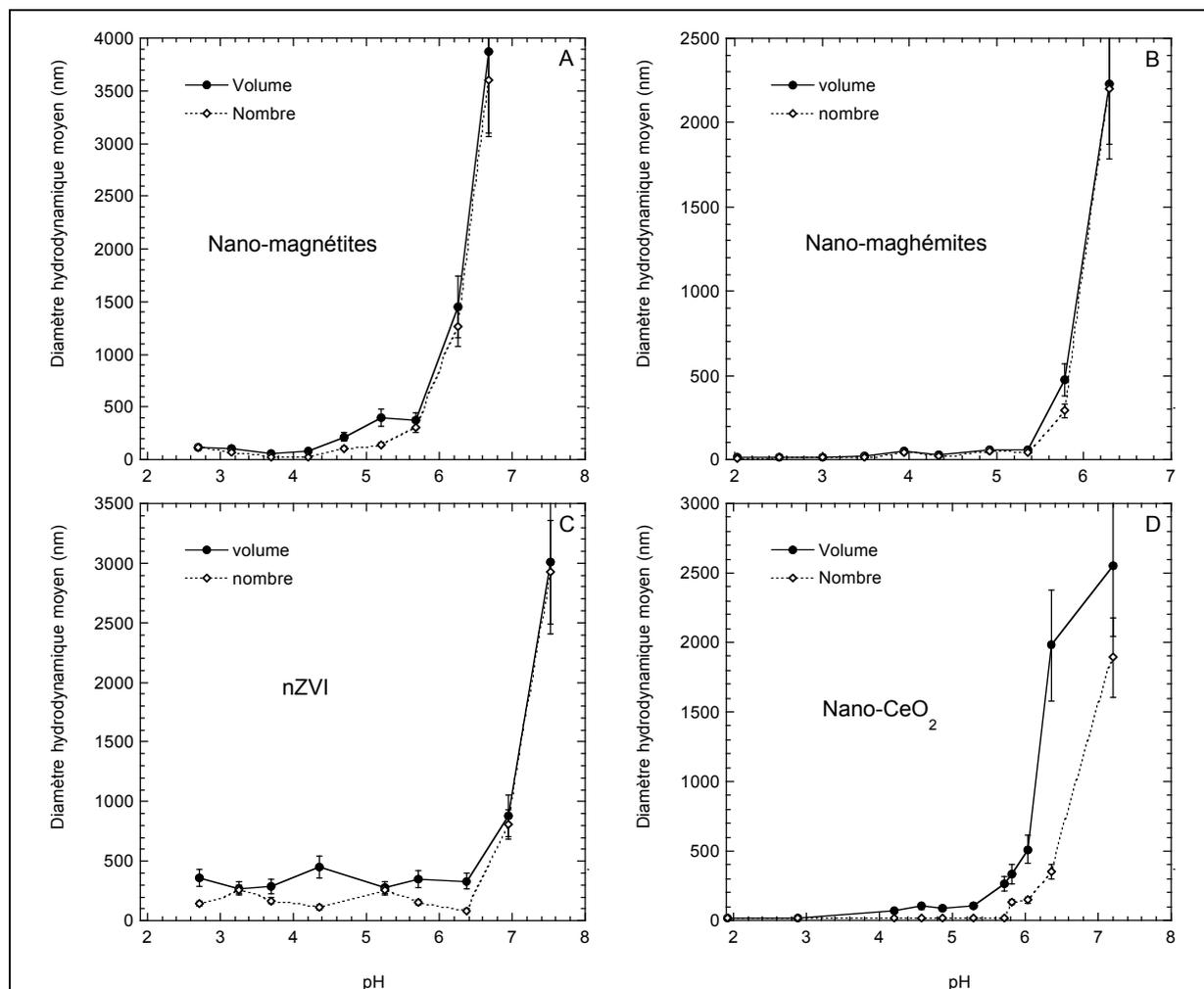


Figure II. 6 : stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction du pH ($\text{FI} = 10^{-3}$ mol/L de NaCl).

Puis nous avons suivi la stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction de la force ionique (FI) de la solution. Le pH a été fixé à pH 4,5 afin que les nanoparticules soient dispersées au début de l'expérience. La concentration en sels pour laquelle les forces de répulsion entre les particules s'annulent et où les particules s'aggrègent est définie comme la concentration critique de coagulation (CCC). Les CCC pour les nano-magnétites, nano-maghémities et nZVI sont données ci-dessous (Table II.1). Dans les trois cas, la CCC du CaCl_2 est plus basse que celle de sels monovalents comme le KCl ou le NaCl. Les nano-magnétites semblent plus sensibles à la présence de ces trois sels dans la solution que les nano-maghémities. De même que pour les résultats précédents concernant le pH, les nZVI tolèrent des FI plus élevées que les autres nanoparticules. Concernant les nano- CeO_2 , des études ont montré qu'elles étaient stables jusqu'à une FI très élevée (0,5 mol/L) (Spalla et al., 1993).

Table II. 1 : concentrations critique de coagulation pour les nanoparticules étudiées (pH=4.5)

	NaCl (mol/L)	KCl (mol/L)	CaCl ₂ (mol/L)
Nano-magnétites	0,01	0,025	0,0025
Nano-maghémities	0,04	0,04	0,025
nZVI	0,06	0,1	0,025

Nous venons de montrer qu'il est difficile de maintenir les nanoparticules manufacturées dispersées dans des conditions de pH ou FI proches de celles des milieux biologiques. Ceci est principalement lié à leur charge de surface et leur PCN proche du pH environnemental ou physiologique. Ainsi, lorsque les nanoparticules seront adressées aux cellules ou aux bactéries, elles le seront sous forme d'agrégats. Afin d'étudier l'effet de cette agrégation sur les effets biologiques des nanoparticules manufacturées, nous avons tenté de maintenir certaines nanoparticules dispersées dans les milieux extracellulaires. Pour cela, nous avons modifié leurs propriétés de surface en les enrobant de molécules organiques.

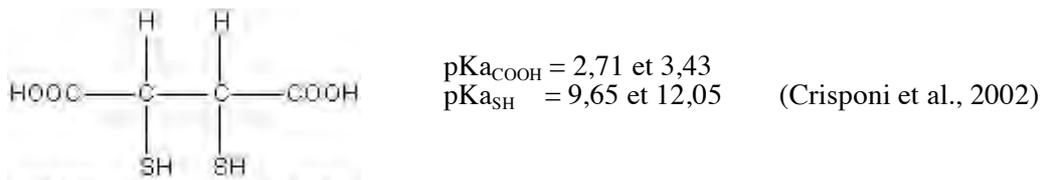
1.4 Stabilisation des nano-maghémities à pH neutre et force ionique élevée

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler avec les nano-maghémities car ce sont les plus stables d'un point de vue structural ce qui facilite le suivi de leurs propriétés de surface. De plus, les nano-maghémities sont couramment utilisées dans les applications biomédicales avec des molécules greffées à la surface.

Un moyen de limiter l'agrégation des nano-maghémities consiste à créer artificiellement des charges négatives à leur surface afin de générer des forces de répulsion suffisantes entre les nanoparticules pour les maintenir dispersées dans le milieu extracellulaire. Pour cela les nano-maghémities ont été enrobées d'un composé organique anionique à pH neutre : l'acide 2,3-

dimercaptosuccinique (DMSA). Dans la suite de cette étude les nano-maghémite enrobées de DMSA seront appelées NmDMSA.

Cet enrobant a été choisi pour deux raisons principales. Tout d'abord c'est un composé qui est non-toxique. Le DMSA est notamment utilisé depuis une quarantaine d'année comme antidote lors des intoxications accidentelles ou chroniques aux métaux ou métalloïdes toxiques (arsenic, cadmium, mercure, plomb...) (Domingo et al., 1994 ; Flora et al., 1997 ; Crisponi et al., 2002 ; Kramer et al., 2003). Deuxièmement, pour sa grande affinité pour la surface des oxydes de fer grâce à ses deux fonctions thiols (-SH).



Le protocole d'enrobage des nano-maghémite avec le DMSA a été adapté d'après Fauconnier et al. (1997). L'enrobage consiste à alcaliniser jusqu'à pH=11 une solution acide contenant un rapport molaire DMSA/ Fe_{Total} bien défini (9%). Successivement, les deux groupements -COOH puis une des fonctions -SH se déprotonent et s'adsorbent à la surface des nano-maghémite. À la fin de cette alcalinisation, les nano-maghémite sont bien dispersées ($D_{\text{H}} = 40 \pm 5$ nm) et le restent lors de l'acidification jusqu'à pH=7. Après l'enrobage, le DMSA est adsorbé via les groupements -SH sur la surface et ce sont les groupements -COO⁻ qui donne la charge négative aux nano-maghémite (Fauconnier et al., 1997 ; 1999). Par spectroscopie d'absorption des rayons X au seuil K du fer, nous avons mis en évidence (i) la chimisorption du DMSA par l'intermédiaire de liaison Fe-S à $3,25 \pm 0,02 \text{ \AA}$ (cf. chapitre IV) (Auffan et al., 2006) et (ii) que ces liaisons chimiques fortes étaient stables lors de la mise en suspension des NmDMSA dans les milieux biologiques.

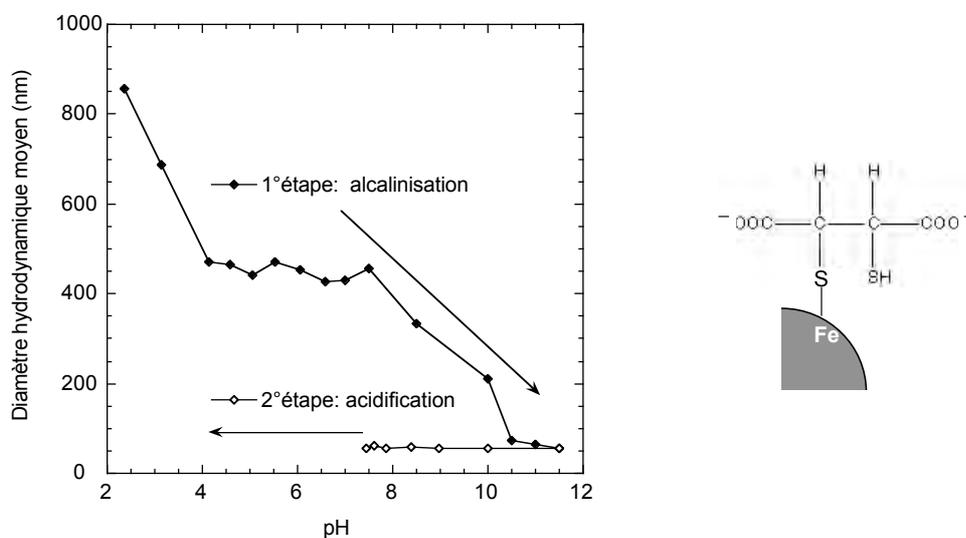


Figure II. 7 : évolution du diamètre de nano-maghémite lors de l'enrobage avec le DMSA.

Le rôle du DMSA dans la stabilisation des nano-maghémites est flagrant. Comme le montre la Figure II.7, alors que les nano-maghémites forment des agrégats de plus de $3 \mu\text{m}$ à $\text{pH}=7$, les NmDMSA sont stables et leur D_H moyen est de $40 \pm 5 \text{ nm}$. Cette gamme de stabilité est large et s'étend de $\text{pH}=3$ à 11 (Figure II.8). De même, alors que les maghémites étaient fortement déstabilisées pour une concentration en NaCl de $0,04 \text{ mol/L}$, les NmDMSA seront stables jusqu'à $0,25 \text{ mol/L}$ de NaCl (Figure II.8).

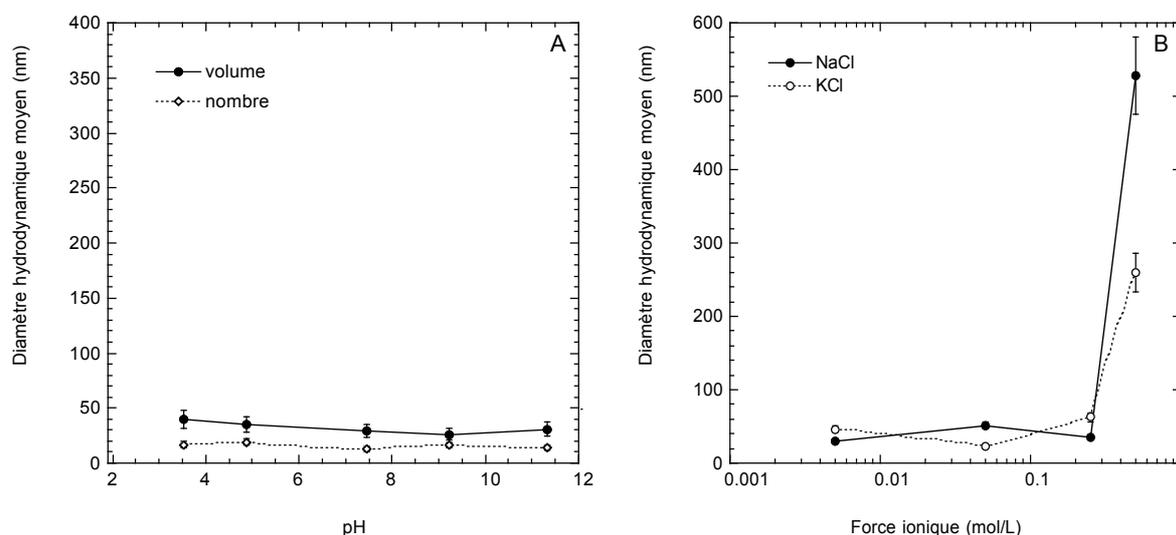


Figure II. 8 : stabilité colloïdale des nano-maghémites enrobées de DMSA (A) en fonction du pH pour une force ionique de 10^{-3} mol/L de NaCl et (B) en fonction de la concentration en sels à $\text{pH}=7.4$.

1.5 Bilan des principales caractéristiques des nanoparticules étudiées

La table II.2 résume les principales caractéristiques des nanoparticules étudiées.

Table II. 2 : récapitulatif des principales caractéristiques des nanoparticules manufacturées étudiées.

	Nano-magnétites	Nano-maghémites	Nm DMSA	Nano-CeO ₂	nZVI
Forme	Pseudo-sphérique	Pseudo-sphérique	Pseudo-sphérique	Pseudo-sphérique	Pseudo-sphérique
Nature cristalline	Fe ₃ ^{2+/3+} O ₄	Fe ₂ ³⁺ O ₃	Fe ₂ ³⁺ O ₃	Ce ⁴⁺ O ₂	Fe ⁰ + oxyde de Fe, B
Etat d'oxydation	Fe ²⁺ et Fe ³⁺	Fe ³⁺	Fe ³⁺	Ce ⁴⁺	Fe ⁰
Diamètre réel	5-7 nm	5-7 nm	5-7 nm	7 nm	~50 nm (1-200 nm)
Diam. Hydrodyn.	20 – 50 nm	10-20 nm	35-45 nm	30-40 nm	100-400 nm
Conditions de stabilité	pH < 4.7 FI < 0,01 mol/L	pH < 5.2 FI < 0,04 mol/L	3 < pH < 11 FI < 0,25 mol/L	pH < 5.7 FI < 0,5 mol/L	pH < 6.4 FI < 0,06 mol/L
Surface Spécifique	170 m ² /g	174 m ² /g	174 m ² /g	400 m ² /g	32 m ² /g



2. Les modèles biologiques et tests de cyto- génotoxicité

2.1 Escherichia coli

Escherichia Coli est un bacille gram-négatif de la famille des entérobactéries. C'est un hôte commun de la microflore intestinale des mammifères et oiseaux. Hormis l'intérêt que présente *E.Coli* dans la problématique de l'impact environnemental des nanoparticules, cette bactérie possède également de nombreux avantages dans les études toxicologiques *in vitro*. Le principal avantage de *E.Coli* réside dans la possibilité d'isoler une souche et de la cultiver afin de produire une population génétiquement uniforme et distincte. Sur les 3000 gènes que comporte *E.Coli* plus de la moitié ont pu être localisée avec précision sur le chromosome. C'est pourquoi de nombreuses souches génétiquement distinctes sont disponibles. Dans notre étude, nous avons choisi de travailler avec deux souches : une souche dite « **sauvage (WT)** » ne présentant pas de spécificité particulière (EC1 Qc 1301 MG 1655) et une souche dite « **mutante (SOD-AB)** » **déficiente en superoxyde dismutase** (EC12 Qc 2472). Cette métalloprotéine joue un grand rôle dans les systèmes de défense contre les radicaux libres et le stress oxydatif (Carlioz et al., 1986 ; Chaudière et al., 1999 ; Gardes-albert et al., 2003). La souche SOD-AB de *E.Coli* sera donc plus sensible que la souche WT à un stress oxydatif généré par un agent toxique potentiel comme les nanoparticules.

2.1.1 Culture bactérienne

La croissance de *E.Coli* s'effectue en contidion aérobie à 37°C dans le milieu Luria Bertani (LB). Le LB est composé de 10 g/L de bactotryptone, de 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl dans de l'eau ultrapure. Avant toute utilisation, le LB est stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C. La seule différence dans la culture des souches mutantes et sauvages concerne la présence de deux antibiotiques dans le cas de SOD-AB (kanamycine, chloramphénicol). Au bout de 12h de culture, la suspension concentrée de *E.Coli* est diluée dans du LB frais et stockée à 30°C dans des erlenmeyers sous agitation (144 rpm). Après une nuit de croissance, les bactéries sont rincées avec de l'eau ultrapure puis utilisées pour les tests bactériologiques.

La culture de *E.Coli* présente deux avantages. Tout d'abord, c'est une bactérie à croissance cellulaire rapide. Il est possible d'obtenir en quelques heures une masse importante de cellules. Ceci présente un intérêt indéniable dans notre étude car les analyses physico-chimiques sont consommatrices d'une très grande quantité de matériel biologique. Le deuxième avantage de *E.Coli* concerne la simplicité du milieu de culture. Le milieu de culture optimum pour *E.Coli* est le LB. Mais cette bactérie peut également être cultivée pendant quelques minutes dans un milieu beaucoup plus pauvre. La composition de ce milieu peut être définie afin de moduler les propriétés de surface des nanoparticules.

2.1.2 Test de survie bactérienne en présence de nanoparticules

La mortalité bactérienne a été évaluée par la méthode de dilutions/étalements, qui permet de quantifier l'aptitude des bactéries à se revivifier sur un milieu solide. Le milieu gélosé nutritif utilisé est du LB-agar. 100 μ L de dilutions successives des suspensions bactériennes ayant incubées ou non avec les nanoparticules sont encencés sur la gélose nutritive (Figure II.9). Après incubation pendant 24h à 37°C, les bactéries capables de former des colonies sont comptées au facteur de dilution où il est possible de les dénombrer.

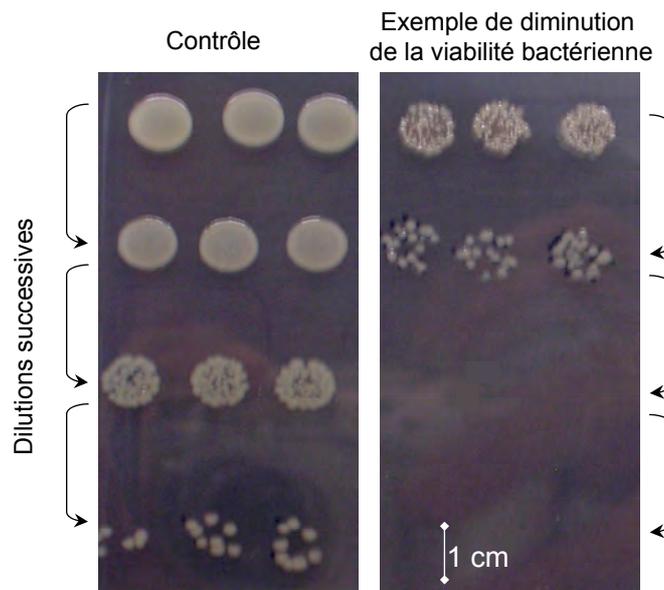


Figure II. 9 : colonies bactériennes poussant sur le milieu nutritif solide.

2.2 Fibroblastes dermiques humains

Les fibroblastes sont des cellules issues du tissu conjonctif (derme, cartilage...). Elles se caractérisent par un aspect fusiforme étoilé et par une sécrétion intense de macromolécules organiques, de protéines et de polysaccharides. Ces cellules sont fréquemment utilisées dans les études biomédicales car leur culture en laboratoire est relativement simple à mettre en œuvre et leur prolifération rapide.

Les fibroblastes étudiés sont des cellules issues de primocultures de tissus humains normaux qui ne sont pas transformées contrairement à certaines lignées de cellules immortalisées. De plus ces cellules ne sont pas spécifiques d'un tissu ou d'un organe et sont donc bien adaptées aux travaux de cytotoxicité et génotoxicité initiaux.

2.2.1 Culture cellulaire

Les fibroblastes sont mis en culture à partir des prépuces d'enfants et de nouveau-nés obtenus après circoncision. Les échantillons cutanés sont rincés dans du PBS. Le derme est ensuite découpé en morceaux de 0.5-1mm³ avant d'être déposé dans des boîtes de pétri (100 mm de diamètre) et recouvert de milieu de culture. Les primo-cultures sont ensuite incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Le milieu utilisé pour la culture des fibroblastes est du DMEM (Dubelcco Modified Eagle Medium) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, de 2 mM de L-glutamine, de 1 mM de pyruvate de sodium et 10 µg/mL de pénicilline/streptomycine afin d'éviter une éventuelle contamination bactérienne. Ce milieu contient de l'eau, des sels organiques, des sources de carbone et d'énergie (glucose), des sources d'azote (acides aminés) et des facteurs de croissance (vitamines, acides gras). Le pH est maintenu aux environs de 7.4 par un système tampon. La composition globale du DMEM complémenté est présentée dans la Figure II.10. Une description plus précise a été obtenue par RMN du ¹³C (cf. annexe 2).

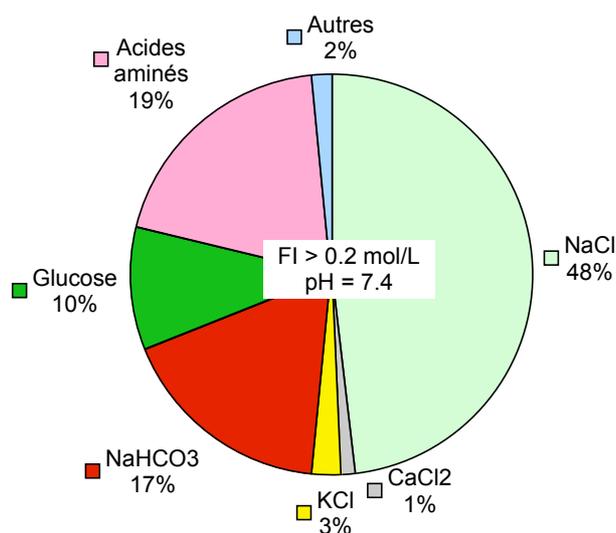


Figure II. 10 : composition du DMEM complémenté (% molaire).

In vitro, les fibroblastes prolifèrent dans des récipients en verre ou en plastique sur lesquels elles adhèrent fortement aux parois grâce aux protéines d'adhérence qu'elles secrètent. Afin de repiquer des cellules confluentes ou de les décoller de leur support en vue d'analyses bio-physico-chimiques, la trypsine est utilisée. Pour les tests de cyto- et de génotoxicité, le nombre de repiquage des cellules d'une boîte à une autre au moyen de la trypsine n'a jamais dépassé 6 décolllements/repiquages.

2.2.2 Test de viabilité cellulaire en présence de nanoparticules

La viabilité des fibroblastes a été mesurée à partir d'un test basé sur l'activité métabolique des cellules (Hoper et al., 1997). Il s'agit d'une mesure colorimétrique basée sur la réduction des sels de tétrazolium ou WST-1 (incolore) par une enzyme mitochondriale, la succinate-tétrazolium reductase (Figure II.11). Sous l'action de cette enzyme, on obtient un dérivé formazan (jaune) dosé par spectrophotométrie. Plus cette activité enzymatique mitochondriale est importante, plus les cellules sont considérées comme actives et plus la réduction du tétrazolium sera intense.

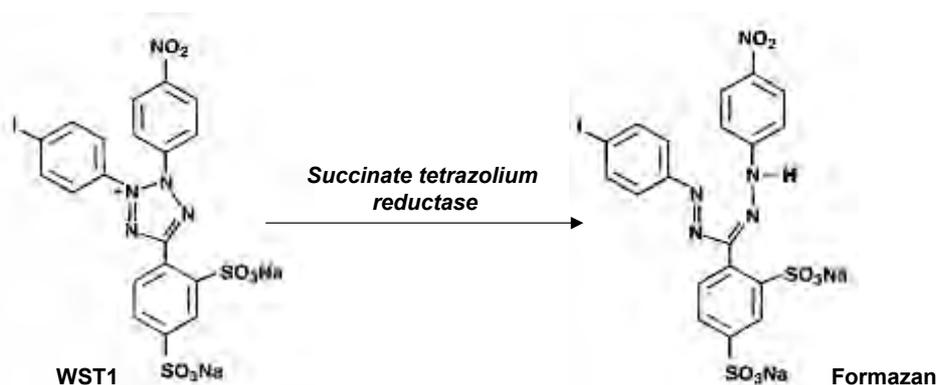


Figure II. 11 : principe du test WST-1.

Le protocole du test WST-1 est le suivant. Les fibroblastes sont mis en culture pendant une nuit dans des plaques à 96 puits (20000 cellules/puits). L'addition de plusieurs concentrations de nanoparticules et des substances témoins est alors réalisée et l'incubation a lieu pendant 2h, 4h, 6h, 24h et 48h à 37°C sous 5% de CO₂. Une fois l'incubation terminée, les cellules sont rincées avec du PBS puis elles incubent 30 min avec 50 µL de WST-1 (concentration non-communiquée par le fournisseur). L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Multiskan RC, Labsystems). Afin d'évaluer la significativité statistique de nos résultats un traitement des données est effectué avec le test de Student (t-test).

2.3 Toxicologie génétique

2.3.1 Rappel sur les altérations possibles du patrimoine génétique

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est la molécule-clé de la toxicologie génétique. C'est le support moléculaire de l'information génétique. Il se situe dans le noyau des cellules eucaryotes, dans la matrice des mitochondries ainsi que dans le cytoplasme des cellules procaryotes. L'ADN constitue le génome, mais également le support de l'hérédité car il se transmet en totalité lors de la division des cellules somatiques, ou partiellement lors de la réduction méiotique conduisant à la formation des

gamètes. Trois niveaux de structures sont attribués à l'ADN : structure primaire (séquence de nucléotides ou de bases désoxyribonucléiques), structure secondaire (configuration des nucléotides au sein de la double hélice) et la structure tertiaire (état de l'ADN au cours de la réplication, la transcription, sous forme de chromosome ou chromatine) (Figure II.12).

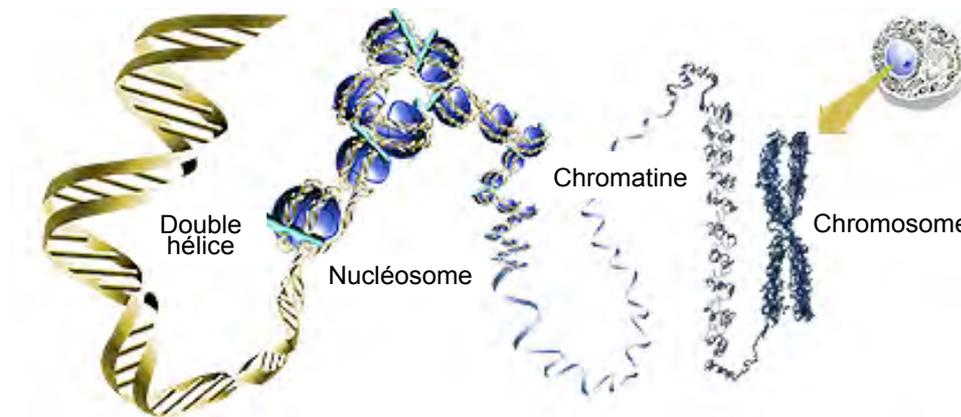


Figure II. 12 : de l'ADN au chromosome. (<http://membres.lycos.fr/coursgenetique>)

L'ADN étant le support moléculaire de l'information génétique, cette macromolécule doit être stable pour que le patrimoine génétique soit correctement maintenu et transmis. Cependant, l'ADN a une structure dynamique sujette à des erreurs spontanées ou à des lésions induites par des agents physico-chimiques génotoxiques. Les trois niveaux de structure de l'ADN jouent un rôle dans l'apparition des lésions puis des mutations. Les trois degrés d'altération de l'ADN sont les suivants :

Lésions primaires de l'ADN (effets génotoxiques). Elles correspondent à des ruptures de liaisons covalentes (cassures de brins) ou à la formation de liaisons covalentes (génération d'adduits, alkylations de bases, pontages inter ou intra brins).

Mutations géniques (effets mutagènes). Si les liaisons primaires de l'ADN font l'objet d'une mauvaise réparation, il apparaît des mutations du patrimoine génétique transmissibles au cours de la division cellulaire. Ces mutations consistent en des délétions, insertions ou mutations d'une ou de quelques paires de bases au sein d'une séquence nucléotidiques. Les mutations impliquant souvent une seule paire de bases sont qualifiées de mutations géniques. Si des dizaines ou milliers de bases sont impliquées, on parlera de mutations chromosomiques de structure.

Mutations chromosomiques (effets clastogènes). Un certain nombre de lésions primaires de l'ADN engage les deux brins de la molécule d'ADN (ex : pontages interbrins). La mise en œuvre des processus de réparation de ces lésions est plus problématique car il n'existe pas de brin matrice natif sur la molécule d'ADN concernée par la lésion. Ces lésions et leurs prises en charge par les systèmes

de réparations de l'ADN conduisent fréquemment à des cassures double-brin de la molécule d'ADN. Ces phénomènes s'accompagnent souvent de délétions importantes (plusieurs dizaines de kilobases) et de phénomènes d'inversion et de translocation. Il s'agit alors de mutations chromosomiques de structure.

Mutations génomiques (effets aneugènes). Elles concernent les modifications chromosomiques de nombre. En général, ces anomalies ne sont pas consécutives à des interactions moléculaires au niveau de l'ADN mais à des lésions sur des protéines qui participent à l'établissement et au fonctionnement de l'appareil mitotique ou sur d'autres protéines impliquées dans les étapes clés du cycle cellulaire.

Compte tenu de la diversité des anomalies susceptibles d'être induites au niveau du patrimoine génétique, nous avons choisi de travailler avec trois tests de génotoxicité complémentaires, sensibles aux différents degrés d'altération de l'ADN (Figure II.13). Il s'agit du test d'Ames (sensibles aux mutations géniques), des micronoyaux (détecte les anomalies chromosomiques de nombre et de structure) et des comètes (détecte les lésions primaires de l'ADN).

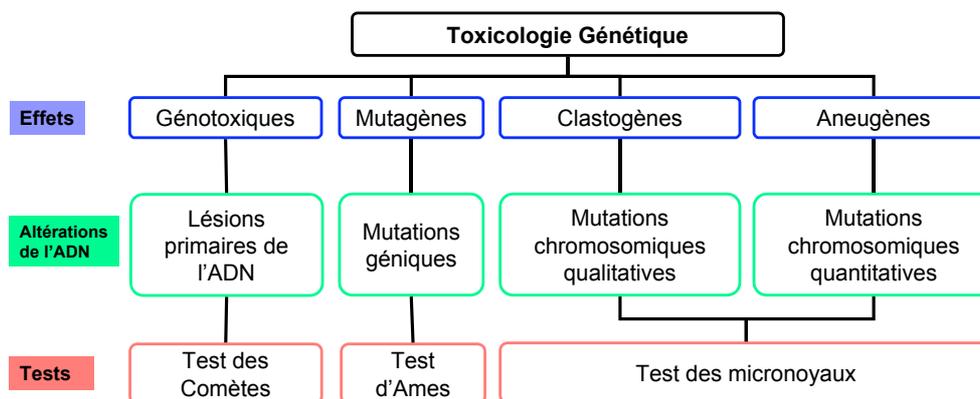
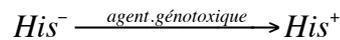


Figure II. 13 : tests de génotoxicité effectués en fonction des altérations possibles de l'ADN en termes de lésions primaires, de mutations géniques, chromosomiques et génomiques.

2.3.2 Le test d'Ames (ou Mutatest)

Le test d'Ames consiste à examiner si un agent physico-chimique est capable d'induire des mutations géniques spécifiques chez différentes souches de *Salmonella Typhimurium* (Ames et al., 1975; De Meo et al., 1996; De Meo et al., 1988; Maron and Ames, 1983; Pelissier et al., 1996). Ces souches sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine (*His*). Cette mutation rend les souches *His*⁻ incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence faible, ces mutations *His*⁻ réversent spontanément vers *His*⁺ et les cellules retrouvent ainsi leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de

réversion peut augmenter en exposant les bactéries His^- à des agents mutagènes. Le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses His^+ .



Bien que le test d'Ames ait pour support biologique des bactéries, il permet d'appréhender le potentiel mutagène d'agents physiques ou chimiques vis-à-vis de l'homme. Chez l'Homme, la majorité des substances sont détoxifiées par métabolisation et rapidement éliminées. Les systèmes enzymatiques qui interviennent dans ces réactions se situent principalement au niveau du foie et exigent des cofacteurs (oxygène et NADPH). Dans le test d'Ames, ce métabolisme humain est mimé par addition, dans le milieu de culture des souches de *Salmonella Thiphymurium* d'un homogénat de foie de rat précédemment induit (S9) et des cofacteurs nécessaires (Mix). Grâce au S9Mix, l'effet du métabolisme humain est simulé en termes de bioactivation et de détoxification des xénobiotiques. Les souches de *Salmonella thiphymurium* ayant été rendues hypersensibles aux agents génotoxiques, sa sensibilité est importante. Il trouve donc naturellement sa place au sein d'une batterie de tests permettant de déterminer les anomalies génétiques sur cellules eucaryotes.

2.3.3 Le test des micronoyaux (ou Cytokinesis-blocked micronucleus)

Contrairement au test d'Ames, le test des micronoyaux (CBMN) est directement réalisé sur des cellules eucaryotes humaines. Lors d'une lésion de l'ADN induisant directement ou non une cassure double-brin de la molécule d'ADN, un fragment chromosomique acentrique et un chromosome cassé apparaissent. Le fragment chromosomique acentrique ne peut alors pas migrer correctement avec l'un des deux lots de chromosomes-fils à la mitose et forme un micronoyau (MN). En outre, des dysfonctionnements de l'appareil mitotique au cours de la répartition des deux lots de chromosome-fils est susceptible d'induire des pertes de chromosomes entiers formant également des MN. Le principe de ce test est de quantifier le nombre de MN présent après une mitose dans des fibroblastes binucléés (Kirsch-Volders et al., 2003 ; Albertini et al., 2000 ; Kirsch-Volders et al., 2006 ; Fenech et al., 2007). Les fibroblastes binucléés sont obtenus par blocage de la division cytoplasmique avec la cytochalasine B. Puis une coloration du cytosquelette avec de la Phalloïdine TRITC (rouge) et des noyaux et MN au DAPI (bleu) est effectuée. Grâce à cette coloration, il est possible de quantifier le nombre de cellules binucléés et le nombre de MN qu'elles contiennent. Le déroulement du test CBMN et des clichés obtenus au microscope à fluorescence après coloration des fibroblastes sont donnés dans la Figure II.14.

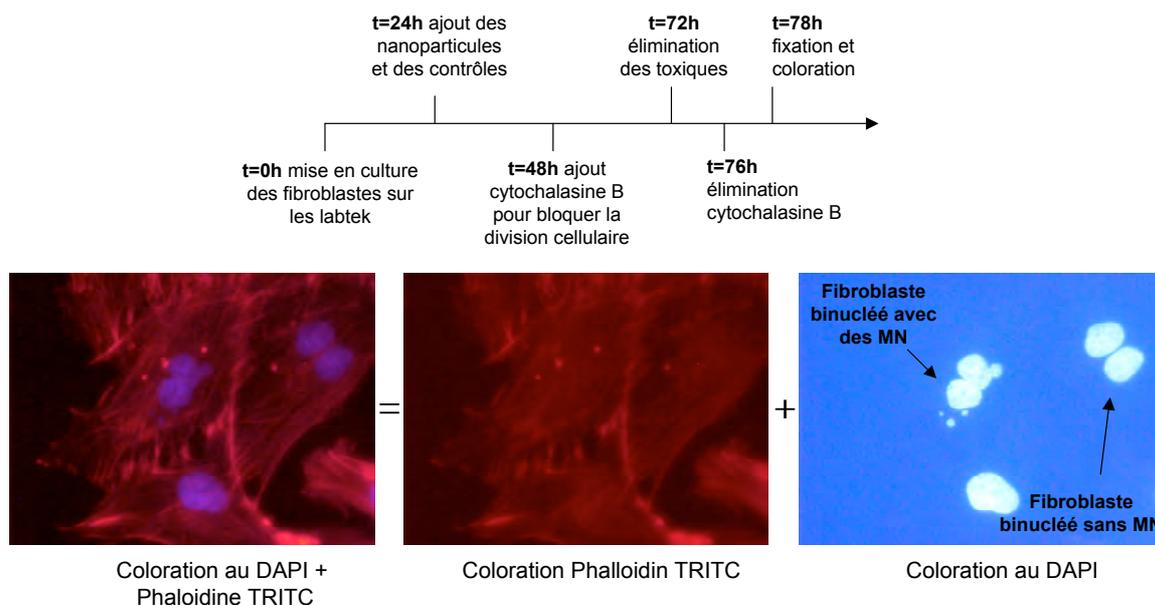


Figure II. 14 : fibroblastes binucléées avec ou sans micronoyaux observées au microscope à fluorescence après coloration.

2.3.4 Le test des Comètes (ou Single cell gel electrophoresis)

Les deux tests précédents permettent de détecter les lésions ayant généré une mutation (stade final). Le test des comètes (SCGE) quantifie directement les altérations primaires de l'ADN (stade initial). Cette technique microélectrophorétique permet de visualiser et de quantifier les cassures d'ADN (simples et doubles) pouvant être induites par des agents physiques ou chimiques toxiques sur les fibroblastes (Singh et al., 1988 ; Jean et al., 2000 ; De Meo et al., 1991 ; Alapetite, 1998).

Le principe est de mesurer le déplacement de fragment d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge. En effet, une courte électrophorèse (25V, 300 mA, 20 min) permet la migration vers l'anode de l'ADN chargé négativement. Les fragments de petite taille migrant plus rapidement que l'ADN intact donnent un aspect de "comètes" aux cellules dont l'ADN présente un certain nombre de cassures simple et/ou double brin. L'ADN intact quant à lui ne migre pas et la cellule apparaît sous forme d'une sphère de 25-35 µm de diamètre environ (Figure II.15).

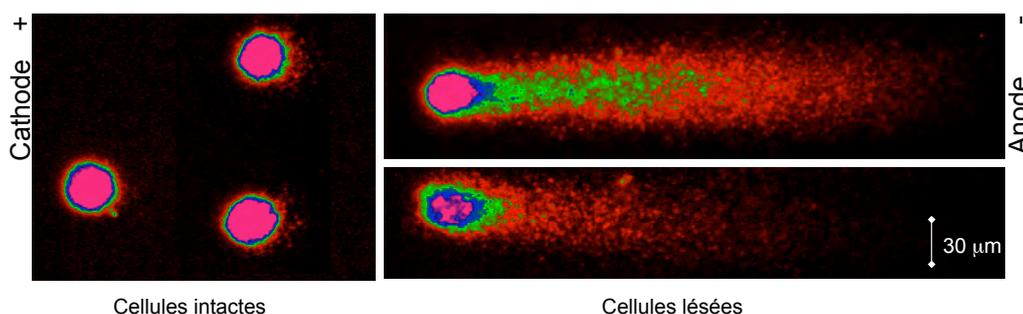


Figure II. 15 : cellules intactes et lésées observées au microscope à fluorescence (x250) lors du test des Comètes.

Le paramètre utilisé dans ce test est «l'Olive Tail Moment» (OTM, exprimé en % d'ADN par μm). C'est le produit du pourcentage d'ADN réparti dans la queue de la comète par la distance tête-queue (Olive et al., 1990). Plus les lésions d'ADN sont importantes, plus les fragments seront abondants et migreront loin et plus l'OTM sera élevé. Ce test analysant les cellules individuelles, l'analyse statistique des OTM montre une grande hétérogénéité. Il est donc nécessaire de raisonner sur les fréquences de distribution des OTM (Bauer 1998) et d'utiliser la fonction χ^2 qui présente une asymétrie pour une réponse faible et une distribution tendant vers la loi normale pour une réponse forte. Ainsi, il est possible de calculer le degré de liberté « n » de cette fonction non linéaire (également appelé OTM χ^2) qui est un paramètre quantitatif du niveau d'altération de l'ADN.



3. Techniques de caractérisation physico-chimique

3.1 Mesures granulométriques en solution

Les techniques de mesures granulométriques en solution donnent accès au diamètre hydrodynamique des nanoparticules ou de leurs agrégats, c'est-à-dire le diamètre de la particule et de sa couche de solvatation.

Granulométrie par diffraction et diffusion laser. L'appareil utilisé est le granulomètre laser Mastersizer S commercialisé par la société Malvern. L'appareil se compose d'une source laser He-Ne de 4 mW et de longueur d'onde 0,633 nm. Le principe consiste à éclairer par un faisceau laser les particules en suspension. La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de déterminer la taille des particules ou des agrégats. Ainsi les particules de grosses tailles dévient une quantité importante de lumière sur des angles faibles par rapport à l'axe de propagation et les petites particules au contraire dévient de faibles quantités de lumière sur des angles plus larges. L'intensité diffractée et diffusée est mesurée par 42 détecteurs placés selon une progression géométrique d'angle par rapport au trajet optique direct. La gamme des diamètres mesurables s'étend de 0,1 μm à 1 mm.

Spectroscopie de corrélation de photon (PCS). Les mesures de PCS ont été effectuées avec le banc de diffusion BI-9000 AT (Brookhaven) pour les échantillons dilués. La gamme des diamètres mesurables s'étend de 3 nm à 3 μm . Cette technique mesure des fluctuations de l'intensité en fonction du temps qui apparaissent lorsque les particules sont soumises au mouvement brownien (agitation thermique des particules). L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet la détermination d'une distribution du coefficient de diffusion des particules qui sont converties en distribution de taille à l'aide de l'équation de Stokes- Einstein :

$$\langle D \rangle = \frac{kT}{6\pi\eta \langle R \rangle}$$

Avec : $\langle D \rangle$: coefficient de diffusion

$\langle R \rangle$: rayon hydrodynamique

k : constante de Boltzmann

T : température

η : viscosité

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière sont effectuées à un angle de 90°. Il est donc nécessaire que les échantillons soient suffisamment dilués afin d'éviter les phénomènes de diffusion multiple.

La diffusion de la lumière par la méthode de référence contrôlée (RC). Ces mesures ont été effectuées avec le dispositif Nanotracc 250 (Microtracc). Comme la PCS, elle permet une analyse granulométrique dans une gamme de 3nm à 3 μ m mais sur des échantillons concentrés. Cette méthode repose sur la détermination, par effet Doppler, de la vitesse de particules lorsqu'elles sont soumises au mouvement brownien. Le signal est amené par une fibre optique. La lumière qui arrive à l'embout de la sonde est diffusée par les particules (se trouvant jusqu'à 100 μ m de la sonde) dont le mouvement brownien modifie la fréquence de l'onde. La lumière est aussi réfléchiée sans modification de fréquence à l'interface entre l'embout et la suspension, cette composante s'appelle la référence contrôlée (RC). Les rayons optiques, modifié et invariant, émanant de la sonde forment une modulation de fréquence. La lumière diffusée étant collectée proche de l'interface ce qui minimise l'effet de diffusion multiple et permet de travailler dans des solutions concentrées.

3.2 Microscopie électronique à transmission (MET)

Cette technique a été utilisée afin de déterminer la taille réelle et la forme des nanoparticules et de les localiser après inoculations dans le milieu biologique. Comme son nom l'indique, les images MET sont obtenues par observation des électrons transmis au travers d'un échantillon. L'appareil utilisé est un JEOL/JEM-1220. Le faisceau d'électron est fourni par une pointe métallique en tungstène (cathode) soumise à un champ électrique intense puis accéléré et collimaté par des anodes. La différence de potentiel entre la cathode et la dernière anode définit la tension d'accélération des électrons (80 kV pour nos observations). Pour permettre la focalisation ainsi que les réglages de la taille du faisceau, ce dernier traverse une série de lentilles et de diaphragmes appelée système condenseur. La MET est adaptée à l'étude des nano-systèmes puisque la résolution spatiale est de 2 Å.

Pour que le faisceau d'électron puisse traverser l'échantillon, ce dernier doit être suffisamment fin. Pour cela, les échantillons contenant du matériel biologique sont inclus dans une résine et coupés à l'ultramicrotome. Les échantillons sont d'abord fixés puis déshydratés. Le but est de créer artificiellement une réticulation de la matière vivante afin de rendre les molécules insolubles dans l'eau et les solvants organiques et de bloquer les systèmes enzymatiques pour éviter toutes modifications ultérieures des cellules. Pour cela, les échantillons sont fixés avec du glutaraldéhyde (1,5 %) avant d'être post-fixé dans de l'acide osmique (1 %). Puis ils sont inclus dans une résine élaborée à partir d'éther glycérique (EPON 812) et de catalyseurs de la polymérisation : le méthyl nadic anhydride (MNA), le dodécényl succinic anhydride (DDSA) et le 2,4,6-tri(diméthylaminométhyl)phénol (DMP 30). Une fois le bloc de résine consolidé, l'échantillon est coupé en tranches de 500 à 800 Å. Dans ce cas, les fibroblastes et les bactéries sont coupés transversalement ou longitudinalement ce qui permet une observation fine du milieu intracellulaire.

3.3 Diffraction des rayons X (DRX)

La DRX a permis de déterminer la nature cristalline et la dimension du domaine cristallin (ou domaine cohérent) des nanoparticules étudiées. Cette technique, basée sur la loi de Bragg, révèle les phases cristallisées d'un échantillon. En effet, les composés cristallins ont la propriété de diffracter suivant des angles et des intensités spécifiques. Par comparaison avec une base de données de produits de référence, les phases cristallisées à plus de 5% massiques sont identifiées. Les mesures ont été effectuées au CEREGE avec un diffractomètre PANalytical X'Pert PRO équipé d'une anti-cathode de cobalt ($\lambda_{K\alpha}=1,79\text{\AA}$) à 40 kV et 40 mA. Les échantillons préalablement broyés au mortier en agathe sont déposés sur une pastille en silicium et analysés dans un domaine angulaire compris entre 15° et 120°. Deux types de spectres ont été réalisés avec des temps de comptage différents : durée de 3h (0,05° par pas, temps de comptage 25s), durée de 65h (0,05° par pas et une vitesse de détecteur de 0,027°/min).

À partir de la formule de Scherrer et de la largeur à mi-hauteur des pics les plus intenses, il est possible d'estimer la taille moyenne du domaine cristallisé des nanoparticules :

$$T = 0.9\lambda/\beta \cos \theta$$

Avec T (nm) : dimension apparente du domaine de diffraction cohérent mesuré dans la direction perpendiculaire au plan (hkl).

λ (nm) : longueur d'onde de la radiation, soit 0,179 nm K_{α} du Cobalt.

β (rad) : largeur à mi-hauteur du pic de la phase analysée.

θ (rad) : angle de diffraction correspondant au plan (hkl) considéré.

Remarque : La formule de Scherrer est applicable pour des cristallites de taille comprise entre 10 et 150 nm avec une précision de 20%. Ainsi, les résultats obtenus pour les nanoparticules de taille inférieure à 10 nm seront utilisés uniquement à titre indicatif.

De plus, certains pics de diffraction sélectionnés ont fait l'objet de calculs théoriques par affinement Rietveld (Rietveld, 1969) à l'aide du programme Fullprof (Rodriguez-Carvajal, 2005). La méthode consiste à recalculer théoriquement un diagramme de diffraction en utilisant comme variables des caractéristiques instrumentales (résolution du diffractomètre) et des paramètres structuraux (paramètres de maille, coordonnées atomiques, taux d'occupation des sites cristallographiques...). L'affinement Rietveld nous a permis de déterminer le taux d'occupation et la nature des éléments occupants certains sites cristallographiques en surface des nanoparticules.

3.4 Analyse chimique en solution (ICP-AES)

Cette technique a été utilisée lors de l'étude de la rétention de l'arsenic par les nanomagnhémites. La concentration en arsenic des surnageants récupérés après centrifugation (10000 rpm) ou ultracentrifugation (90000 rpm) sont analysés en spectrométrie d'émission atomique à source plasma (ICP-AES) avec le spectromètre Jobin Yvon J38 du CEREGE. La solution est nébulisée dans un plasma à 6000°C. Les éléments ionisés émettent un rayonnement caractéristique dont on mesure l'intensité (raie de l'arsenic 189 nm). Les concentrations sont déterminées en comparant les intensités mesurées avec celles obtenues lors de l'établissement des courbes d'étalonnage. Les étalons utilisés pour la droite de calibration sont des standards externes de marques SPEXCERTIPRED titrés à 1000 mg/L.

3.5 Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)

Cette technique permet de déterminer la spéciation d'un élément (ex : arsenic, fer et cérium) présent dans nos échantillons solides ou liquides. C'est une sonde chimique locale qui renseigne sur l'environnement atomique de l'élément cible (i.e. distances, natures et nombre des atomes voisins présents sur un rayon de 4-5Å) et sur son degré d'oxydation (e.g. Koningsberger et al., 1988).

3.5.1 Principe

La XAS correspond à l'excitation des électrons de niveau de cœur provoqué par l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ (avec h la constante de Plank et ν la fréquence du photon). La méthode consiste à mesurer le coefficient d'absorption des rayons X (μ) d'un échantillon en fonction de l'énergie du rayonnement incident (E). Cette absorbance est définie par la loi de Beer-Lambert à partir des intensités des faisceaux incidents (I_0) et transmis (I_t) et de l'épaisseur de l'échantillon (x) :

$$\mu(E).x = \ln(I_0/I_t)$$

Pour des systèmes où l'élément excité est majoritaire, le mode de détection utilisé est la transmission. Le coefficient d'absorption total de l'échantillon se calcule à l'aide de l'équation précédente. En revanche pour des systèmes où l'élément excité est minoritaire, le mode de détection utilisé est la fluorescence X, l'intensité d'un pic de référence étant directement proportionnelle à l'absorption de l'élément sélectionné au seuil considéré. Le coefficient d'absorption de cet élément est alors calculé par l'équation suivante.

$$\mu(E) = \ln(I_f/I_0) \text{ avec } I_f \text{ l'intensité de fluorescence}$$

Selon l'énergie du photon incident, différents processus physiques conduisent à différentes structures sur le spectre d'absorption des rayons X. La figure II.16 représente un spectre d'absorption enregistré au seuil K de l'arsenic et les différents processus mis en jeu. Un spectre d'absorption est généralement décrit en trois parties :

La région du préseuil. Dans cette zone, l'énergie du photon incident (E) est inférieure à l'énergie d'ionisation (E_0 , niveau de Fermi) et ne permet pas l'excitation des électrons de l'élément étudié. En transmission, le coefficient d'absorption provient des autres éléments de l'échantillon et décroît de façon monotone. En fluorescence, le coefficient d'absorption de l'élément au seuil considéré est proche de 0. Cette région, notée $\mu_0(E)$, correspond au fond continu et est considérée comme la ligne de base.

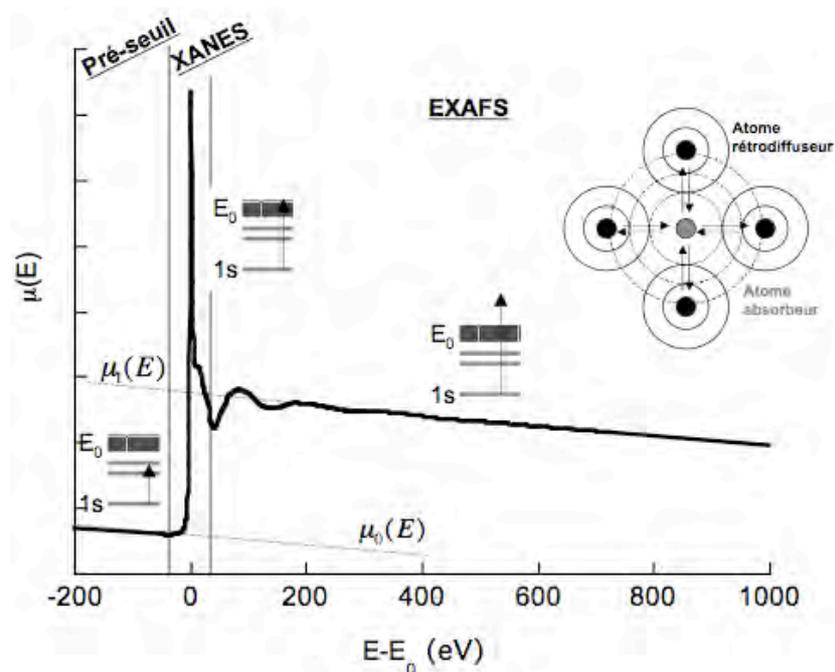


Figure II. 16 : spectre XAS de As_2O_3 enregistré au seuil K de l'arsenic.

La région du seuil ou XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). Cette zone s'étend jusqu'à 50 eV après le seuil et renseigne sur le degré d'oxydation et la symétrie de l'atome cible. Pour E inférieur mais proche de E_0 , l'électron passe de son état fondamental à un état électronique excité juste en dessous de l'énergie de Fermi. Cette énergie peut être suffisante pour qu'un électron transite vers les premiers niveaux vides ou partiellement remplis. Ce phénomène peut se traduire par l'apparition d'un prépic avant le seuil. Pour $E_0 < E < E_0 + 50eV$, l'électron est éjecté vers le continuum avec une énergie cinétique faible et un libre parcours moyen (distance parcourue sans perte d'énergie) très grand. Le photoélectron est alors impliqué dans de nombreux phénomènes de diffusion multiple avec les atomes voisins. Ces structures près du seuil renseignent sur la **coordinnance** de l'atome cible. Enfin la position du seuil renseigne directement sur le **degré d'oxydation** de l'atome absorbeur.

La région EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure). Dans cette zone $E_0 + 50eV < E < E_0 + 1000eV$ et l'électron de cœur est éjecté vers les états du continuum. L'énergie cinétique étant importante et le libre parcours moyen plus faible, le photoélectron est essentiellement impliqué dans des phénomènes de diffusion simple avec les atomes voisins. Le spectre d'absorption présente deux composantes : une fonction lentement décroissante notée $\mu_1(E)$ et une fonction oscillante autour de $\mu_1(E)$. L'onde qui est associée à ces photoélectrons va être rétrodiffusée par les atomes de la sphère de coordination de l'atome central et interfère avec l'onde émergente. Cela donne lieu aux oscillations EXAFS dont l'étude permet de caractériser la **nature** et le **nombre** des voisins de l'atome cible, les **distances absorbeur-voisins** et le **désordre structural** au sein d'un échantillon.

3.5.2 Formalisme EXAFS

L'équation EXAFS dans le formalisme d'onde sphérique de diffusion simple (i.e. seuls les trajets aller-retour de l'électron de l'atome absorbeur vers chacun de ses voisins sont pris en compte) s'écrit :

$$\chi(k) = - \sum_{i=1}^N \frac{N_i S_0^2}{k R_i} |f_i(\theta, k, R_i)| e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{-2R_i/\lambda(k)} \sin(2kR_i + \phi_i(k) + 2\delta_c(k))$$

Avec: k : module du vecteur d'onde du photoélectron défini par $k = \sqrt{(h\nu - E_0)2m_e/h^2}$ avec m_e la masse de l'électron, $h\nu$ l'énergie du photon incident et E_0 l'énergie d'ionisation de l'élément absorbant.

$|f_i(\theta, k, R_i)|$: fonction d'amplitude de rétrodiffusion de l'atome i selon l'angle θ par rapport à la direction de l'onde incidente.

N_i : nombre de voisins de type i .

R_i : distance atome absorbeur – atome voisin.

σ_i : facteur Debye-Waller comprenant les termes de désordre structural (distribution des distance) et de désordre dynamique (agitation thermique).

$\lambda(k)$: libre parcours moyen du photoelectron éjecté.

S_0^2 : terme lié aux effets multi-électroniques.

$\delta_c(k)$: fonction de déphasage induite par la traversée du potentiel de l'atome central.

$\phi_i(k)$: fonction de déphasage de l'atome rétrodiffuseur.

Dans cette équation, la fonction sinus traduit l'interférence entre l'onde incidente et l'onde rétrodiffusée. Chaque paire atomique (ou chemin de diffusion simple) engendrant une sinusoïde

intervient dans l'équation par l'intermédiaire du signe somme. La fréquence des oscillations dépend de la distance interatomique et de la nature des voisins. L'amplitude des oscillations est liée au nombre de voisin, à leur distance et à leur nature et à la densité électronique de l'élément rétrodiffuseur. Plus la densité électronique sera forte, plus son amplitude de rétrodiffusion sera grande.

3.5.3 Analyse des données XAS

L'enregistrement d'un signal en absorption des rayons X ne donne pas directement accès aux spectres XANES et EXAFS. Une étape préliminaire de normalisation (pour le XANES) et également d'extraction (pour l'EXAFS) est nécessaire. Ce traitement ainsi que l'affinement des spectres EXAFS a été réalisé à l'aide des logiciels « EXAFS pour le mac » de Michalowicz (Michalowicz, 1991 ; Michalowicz, 1997) et IFEFFIT de Newville (Ankudinov et al., 1998 et Newville, 2001). La figure suivante (Figure II.17) présente l'organigramme de la procédure de traitement et d'affinement des spectres XAS.

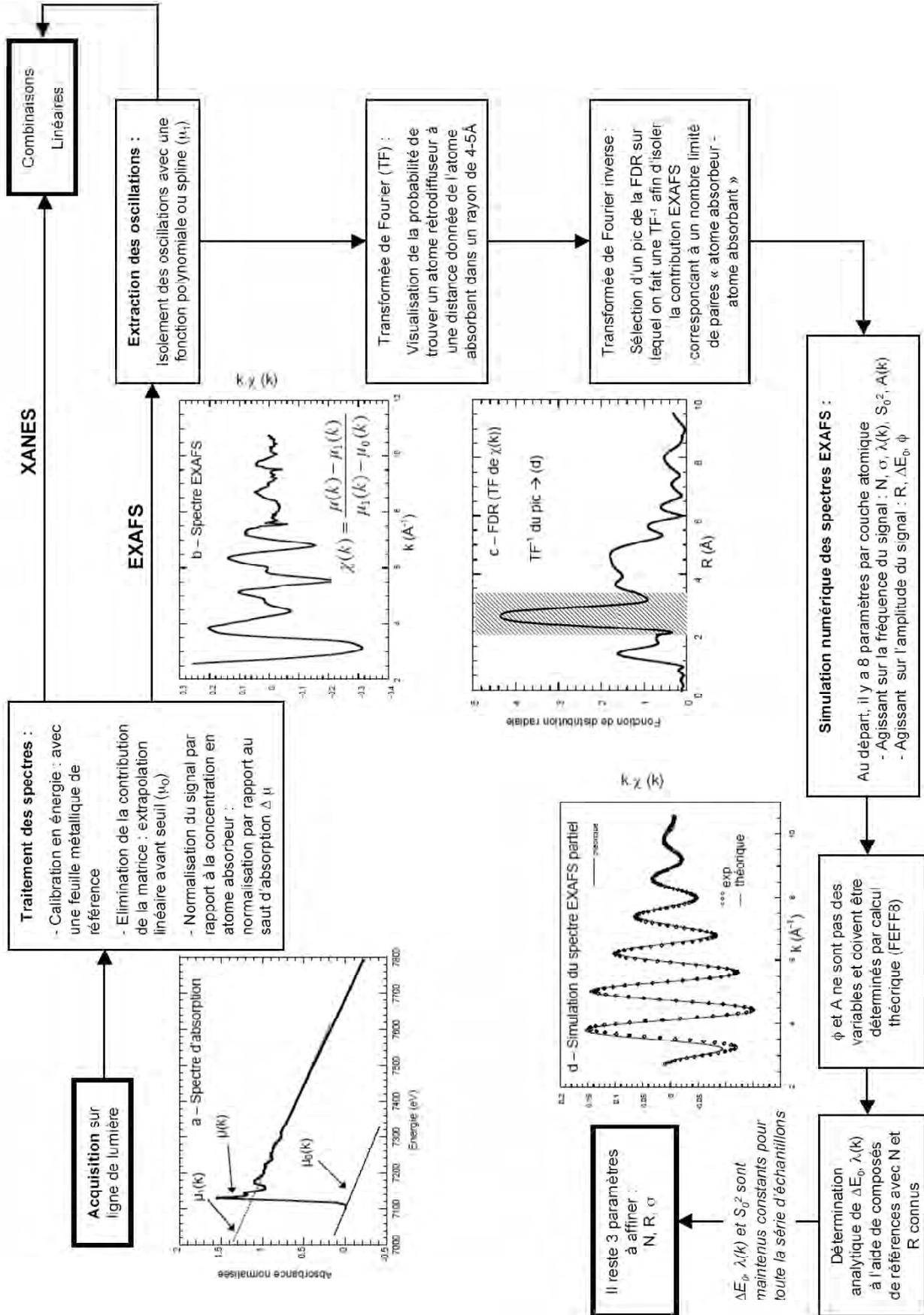


Figure II. 17 : organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS.

3.5.4 Mise en œuvre expérimentale

• Le rayonnement synchrotron

La mesure du coefficient d'absorption est le plus souvent réalisée avec un rayonnement synchrotron car elle nécessite un flux de photon incident important, dont l'énergie peut varier de manière continue sur un large domaine énergétique. Le rayonnement synchrotron est la radiation électromagnétique émise par des électrons circulants à des vitesses quasi-relativistes (1 à 6 GeV). Les électrons circulent dans un anneau de stockage. Un rayonnement X très brillant est émis lorsque ces particules sont déviées sous l'influence d'un champ magnétique. Les propriétés du rayonnement synchrotron dépendent principalement du courant et de l'énergie du faisceau d'électrons dans l'anneau de stockage ainsi que des dispositifs d'insertion.

• Les lignes de lumière

Une ligne de lumière dédiée à l'absorption X est principalement composée d'un monochromateur (sélectionnant une longueur d'onde dans le spectre continu du rayonnement synchrotron selon la loi de Bragg), de miroirs (rejetant les longueurs d'onde harmoniques), de fentes (limitant la taille du faisceau) et des détecteurs (mesurant les intensités I_0 , I_t et I_f) (Figure II.18).

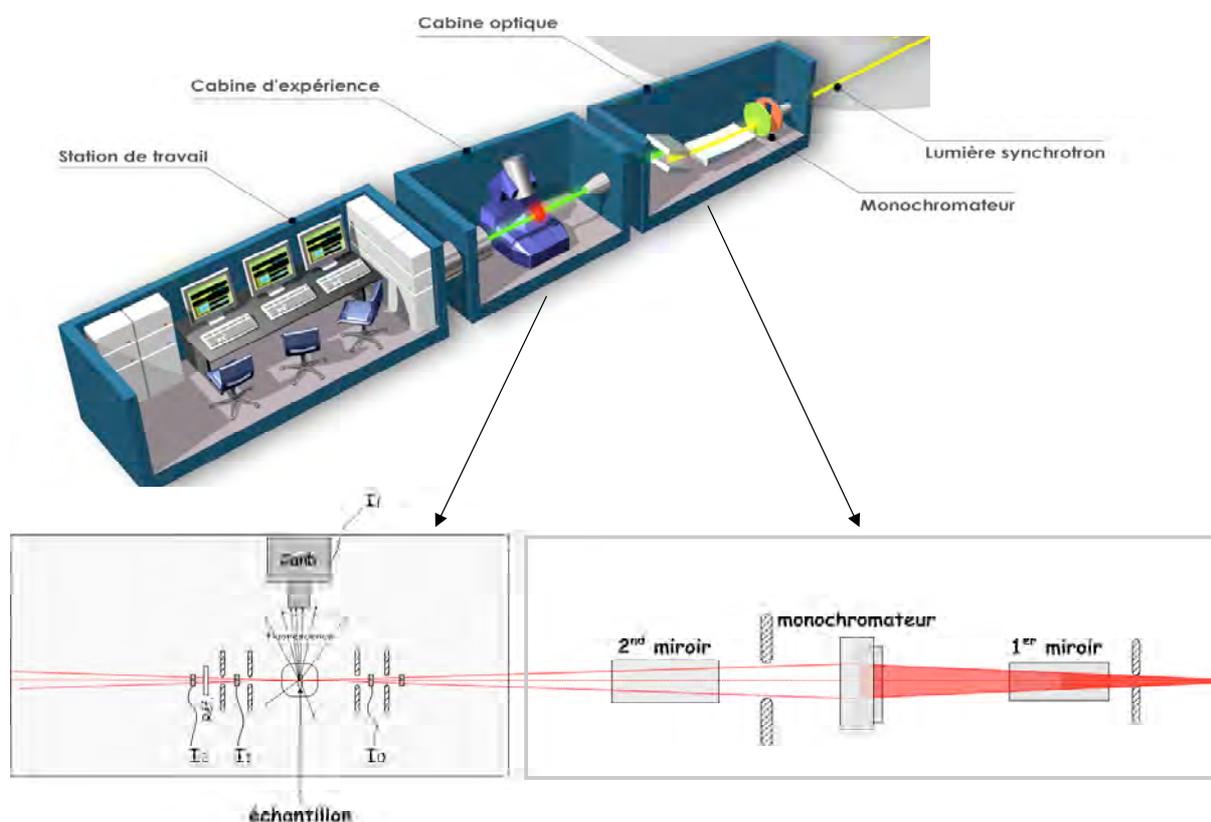


Figure II. 18 : schéma simplifié d'une ligne de lumière dédiée à la XAS (ex: du montage de la ligne FAME de l'ESRF) (www.esrf.fr et www.synchrotron-soleil.fr).

Au cours de ces travaux, des spectres XAS ont été enregistrés à différents seuils d'absorption et sur différentes lignes de lumières, chacune ayant leur propre spécificité (Table II.2).

Table II. 3 : lignes de lumière utilisées.

Ligne de lumière	Synchrotron	Seuils d'absorption	Spécificité
FAME	ESRF, Grenoble	K de l'As L ₂ , L ₃ du Ce	Analyse d'échantillons dilués
XAFS 11.1	ELETTRA, Trieste, Italie	K du Fe	Analyse d'échantillons concentrés
X23A2	NSLS, Brookhaven, USA	K du Fe	Analyse d'échantillons concentrés
LUCIA	SLS, Viligen, Suisse	L ₂ , L ₃ du Ce K du S	Analyse d'éléments de basse énergie

4. Bilan des échantillons et des analyses effectuées

Dans le Tableau II.4, nous avons reporté l'ensemble des échantillons étudiés au cours de ce travail ainsi que les méthodes analytiques déployées.

Table II. 4 : bilan des analyses physico-chimiques et toxicologiques effectuées sur les échantillons.

	Nano-maghémities	Nano-maghémities enrobées de DMSA	Nano-magnétites	nZVI	Nano-CeO ₂
DRX	N – As		N	N	N
MET	N – EC	N – F	N – EC	N – EC	N – EC – F
PCS	N – As	N	N	N	N
ICP-AES seuil As	As				
XAS seuil de As	As				
XAS seuil du Fer	N – EC	N – EC – F	N – EC	N – EC	
XAS seuil du Ce					N – EC – F
Test de survie bactérienne	EC	EC	EC	EC	EC
Test de viabilité (WST1)		F			F
Test des comètes (SCGEA)		F			F
Test des micronoyaux (CBMN)		F			F

N : nanoparticules seules

F : nanoparticules + fibroblastes

As : nanoparticules + Arsenic

EC : nanoparticules + *E. Coli*

5. Bilan du chapitre II

Ce deuxième chapitre a présenté les différentes nanoparticules d'oxydes métalliques, cellules et techniques utilisées afin d'étudier les relations existant entre les propriétés de surface des nanoparticules manufacturées ultrafines et les réponses biologiques.

❖ Dans un premier temps, nos travaux seront axés sur la **caractérisation physico-chimique fine** des nanoparticules et de leur **réactivité en solution**.

Plusieurs techniques de caractérisation seront utilisées : la *DRX* (nature cristalline et degré de cristallinité), la *MET* (forme et taille réelle) et des *mesures granulométriques par diffraction et diffusion laser* (stabilité colloïdale en suspension). La réactivité de surface des nano-oxydes sera suivie en termes de capacité d'adsorption de métalloïdes (*dosage par ICP-AES*) et de différenciation des sites de surface (*XAS au seuil de l'arsenic*).

❖ Dans un deuxième temps, nous étudierons les interactions nanoparticules/cellules cibles (fibroblastes dermiques humains et deux souches d'*Escherichia coli*) à l'aide **d'une approche physico-chimique et toxicologique**.

L'état de dispersion des nanoparticules lors de la mise en suspension dans le milieu cellulaire sera contrôlé (par *modification de la charge de surface et/ou enrobage avec des molécules organiques*) et défini (*PCS*). Les interactions nanoparticules/cellules seront suivies à l'échelle microscopique (*MET*) et atomique (*XAS au seuil du fer et du cérium*).

L'effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire sera étudié en termes d'activité métabolique mitochondriale (*WST-1*) pour les fibroblastes dermiques humains et de capacité à former des colonies bactériennes pour *E.coli*. Concernant la génotoxicité, les techniques mises en œuvre permettront de couvrir le champ des altérations de l'ADN : lésions primaires (*test des comètes*), mutations géniques (*test d'Ames*), chromosomiques et génomiques (*test des micronoyaux*).



6. Références bibliographiques

Alapetite, C., 1998. Sensibilité individuelle aux radiations et réparation de l'ADN: apport du test des comètes. *Cancer Radiother.*, 2: 534-540.

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutat. Res.*, 463: 111-172.

Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6): 347.

Ankudinov, A.L., Ravel, B., Rehr, J.J. and Conradson, S.D., 1998. Real space multiple scattering calculation and interpretation of X-ray absorption near-edge structure. *Phys. Rev. B*, 58(12): 7565-76.

Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., DeMeo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J.L., Botta, A., Wiesner, M.R. and Bottero, J.Y., 2006. In Vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical and Cyto-Genotoxicological Study. *Environ. Sci. Technol.*, 40(14): 4367-4373.

Belin, T., Guigue-Millot, N., Caillot, T., Aymes, D. and Niepce, J.C., 2002. Influence of Grain Size, Oxygen Stoichiometry, and Synthesis Conditions on the $[\gamma]$ -Fe₂O₃ Vacancies Ordering and Lattice Parameters. *Journal of Solid State Chemistry*, 163(2): 459.

Brice-Profeta, S., Arrio, M.A., Tronc, E., Menguy, N., Letard, I., Cartier dit Moulin, C., Nogues, M., Chaneac, C., Jolivet, J.P. and Saintavit, P., 2005. Magnetic order in $[\gamma]$ -Fe₂O₃ nanoparticles: a XMCD study. *J. Magn. Magn. Mater.*, 288: 354.

Carlioz, A. and Touati, D., 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.*, 5(3): 623-630.

Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10): 949.

Cornell, R.M. and Schwertmann, U., 1996. The iron oxide: structure, properties reactions, occurrence and uses, Germany.

Costa, P., 2001. Nano-matériaux, Structure et élaboration. *Techniques de l'ingénieur*, MB.

Crisponi, G., Diaz, A., Nurchi, V.M., Pivetta, T. and Tapia Estevez, M.J., 2002. Equilibrium study on Cd(II) and Zn(II) chelates of mercapto carboxylic acids. *Polyhedron*, 21(14-15): 1319.

De Meo, M., Laget, M., Di Giorgio, C., Guiraud, H., Botta, A., Castegnaro, M. and Dumenil, G., 1996. Optimization of the Salmonella/mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 340(2-3): 51.

De Meo, M.P., Laget, M., Botta, A. and Dumenil, G., 1988. The Ames test: a micromethod for detecting urinary mutagens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(3): 246.

De Méo, M., Laget, M., Castegnaro, M. and Duménil, G., 1991. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat. Res.*, 260: 295.

- Domingo, J.L., 1995. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*, 9(2): 105.
- Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J. and Pons, J.N., 1999. Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 83(1-3): 233.
- Fauconnier, N., Pons, J.N., Roger, J. and Bee, A., 1997. Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid. *Journal of Colloid and Interface Science*, 194(2): 427.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2: 1084-1104.
- Flora, S.J.S., Pant, B.P., Tripathi, N., Kannan, G.M. and Jaiswal, D.K., 1997. Therapeutic efficacy of a few diester of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid during sub-chronic arsenic intoxication in rats. *J. Occu. Health*, 39: 119-123.
- Garcell, L., Morales, M.P., Andres-Verges, M., Tartaj, P. and Serna, C.J., 1998. Interfacial and Rheological Characteristics of Maghemite Aqueous Suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 205(2): 470.
- Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Mécanismes biochimiques*: 91-96.
- Hoper, J., 1997. Spectrophotometric in vivo determination of local mitochondrial metabolism by use of a tetrazolium salt. *Physiol.Meas.*, 18: 61-66.
- Jarlbring, M., Gunneriusson, L., Hussmann, B. and Forsling, W., 2005. Surface complex characteristics of synthetic maghemite and hematite in aqueous suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285(1): 212.
- Jean, S., De Méo, M., Sabatier, A.S., Laget, M., Hubaud, J.C., Verrando, P. and Duménil, G., 2000. Evaluation of sunscreen protection in human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using the alkaline comet assay. *Photochem. Photobiol.*, 74: 417.
- Jolivet, J.-P., Tronc, E. and Chaneac, C., 2002. Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites. *Comptes Rendus Chimie*, 5(10): 659-664.
- Jolivet, J.P., Chanéac, C. and Tronc, E., 2003. Iron oxide chemistry, from molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.*: 481-487.
- Joo, S.H., Feitz, A.J., Sedlak, D.L. and Waite, T.D., 2005. Quantification of the Oxidizing Capacity of Nanoparticulate Zero-Valent Iron. *Environ. Sci. Technol.*, 39(5): 1263-1268.
- Joo, S.H., Feitz, A.J. and Waite, T.D., 2004. Oxidative Degradation of the Carbothioate Herbicide, Molinate, Using Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environ. Sci. Technol.*, 38(7): 2242-2247.
- Kirsch-Volders, M., Mateuca, R.A., Roelants, M., Tremp, A., Zeiger, E., Bonassi, S., Holland, N., Chang, W.P., Aka, P.V., De Boeck, M., Godderis, L., Haufroid, V., Ishikawa, H., Laffon, B., Marcos, R., Migliore, L., Norppa, H., Teixeira, J.P., Zijno, A. and Fenech, M., 2006. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 15: 1038-1042.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, 540: 153-163.

- Kramer, H.J., Mensikova, V., Backer, A., Meyer-Lehnert, H. and Gonick, H.C., 2003. Interaction of dimercaptosuccinic acid (DMSA) with angiotensin II on calcium mobilization in vascular smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 65(10): 1741.
- Kroningsberger, D.C. and Prins, R., 1988. Principles, applications, techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES. *Chemical Analysis A*, 92.
- Maron, D.M. and Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4): 173.
- Michalowicz, A., 1991. EXAFS pour le MAC. *Logiciels pour la Chimie*: 102-103.
- Michalowicz, A., 1997. Exafs pour le MAC: a new version of an EXAFS data analysis code for the Macintosh. *J. Phys.*, IV(C2): 235.
- Newville, M., 2001. IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting. *Journal of Synchrotron Radiation*, 8(2): 322-324.
- Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Baer, D.R., Amonette, J.E., Pecher, K., Wang, C., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L. and Driessen, M.D., 2005. Characterization and Properties of Metallic Iron Nanoparticles: Spectroscopy, Electrochemistry, and Kinetics. *Environ. Sci. Technol.*, 39(5): 1221-1230.
- Pelissier, A.L., uffaut, F., De Meo, M.P. and Botta, A., 1996. Le test d'Ames: Application aux urines de fumeurs. *La Revue de Medecine Interne*, 17(8): 635.
- Prodan, D., Channes, C., Tronc, E., Jolivet, J.P., Cherkaour, R., Ezzir, A., Nogues, M. and Dormann, J.L., 1999. Adsorption phenomena and magnetic properties of $[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3]$ nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 203(1-3): 63-65.
- Rietveld, H., 1969. A profile refinement method for nuclear and magnetic structure. *J. Appl. Cryst.*, 2: 65-71.
- Rodriguez-Carvajal, J., 2005. Fullprof suite program. Laboratoire Léon Brillouin.
- Roger, J., Pons, J.N. and Massart, R., 1989. Behaviour of aqueous ferrofluids in presence of aminoacids. *Eur. j. solid state inorg. chem.*, 26: 475-488.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low level DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 175: 184.
- Spalla, O. and Cabane, B., 1993. Growth of colloidal aggregates through polymer bridging. *Coll. Polym. Sci.*, 271: 357-371.
- Spalla, O. and Kékicheff, P., 1997. Adhesion between oxide nanoparticles: influence of surface complexation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 192: 43-65.
- Tronc, E., Ezzir, A., Cherkaoui, R., Chaneac, C., Nogues, M., Kachkachi, H., Fiorani, D., Testa, A.M., Greneche, J.M. and Jolivet, J.P., 2000. Surface-related properties of $[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3]$ nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 221(1-2): 63-79.
- Wang, C.-b. and Zhang, W.-x., 1997. Synthesing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TOE and POBs. *Environ. Sci. Technol.*, 31(7).