HAL
open science

NANOPARTICULES D'OXYDES MÉTALLIQUES : RELATIONS ENTRE LA RÉACTIVITE DE SURFACE ET DES RÉPONSES BIOLOGIQUES

Melanie Auffan

To cite this version:

Melanie Auffan. NANOPARTICULES D'OXYDES MÉTALLIQUES : RELATIONS ENTRE LA RÉACTIVITE DE SURFACE ET DES RÉPONSES BIOLOGIQUES. Physique [physics]. Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2007. Français. NNT : . tel-00308503v2

HAL Id: tel-00308503

https://theses.hal.science/tel-00308503v2

Submitted on 19 Dec 2008

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

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

UNIVERSITÉ PAUL CÉZANNE AIX-MARSEILLE III

N° : 2007AIX30074

NANOPARTICULES D'OXYDES MÉTALLIQUES : RELATIONS ENTRE LA RÉACTIVITE DE SURFACE ET DES RÉPONSES BIOLOGIQUES

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ Paul CÉZANNE

Faculté des Sciences et Techniques

Discipline : Géosciences de l'Environnement

Présentée et soutenue publiquement par

Mélanie AUFFAN

Le 7 novembre 2007

JURY

M. Georges CALAS	Professeur, Université Paris VI	Rapporteur
M. Thierry HEULIN	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
Mme Hélène BUDZINSKI	Directeur de Recherche, CNRS	Examinateur
M. Laurent CHARLET	Professeur, Université de Grenoble I	Examinateur
M. Jean-Yves BOTTERO	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de thèse
M. Jérôme ROSE	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de thèse
M. Alain BOTTA	Professeur, Université Aix-Marseille II	Invité
M. Mark R. WIESNER	Professeur, Duke University, USA	Invité

ANNÉE : 2007

AVANT-PROPOS

Ce mémoire marque l'aboutissement de trois années passionnantes de travail et de rencontres. Cet avant-propos est l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont suivi, de prés ou de loin, pour leur soutien moral ou technique, leurs encouragements et leurs conseils.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour l'attention qu'ils ont prêté à mon travail : Georges CALAS et Thierry HEULIN qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse et Hélène BUDZINSKI, Laurent CHARLET, Alain BOTTA et Mark WIESNER qui ont assuré l'examen attentif de mes travaux.

Mes sincères remerciements iront à mes directeurs de thèse, Jean-Yves BOTTERO et Jérôme ROSE. Quelle équipe de choc ! Pendant 3 ans, ils ont rivalisé de qualités humaines et de compétences scientifiques. Grâce à leur confiance et leur soutien, j'ai osé me lancer dans de nouvelles directions comme la toxicologie et les techniques synchrotrons. À leurs cotés, tout semble possible.

Jérôme, c'est grâce à toi que j'ai fait mes 'premiers pas' au CEREGE. Dès le premier jour, tu m'as fait partager ta passion pour la recherche. Ton enthousiasme et ta bonne humeur sont un réel bonheur. Tu m'as permis de découvrir le monde de l'absorption X dans lequel j'ai fait d'étonnantes rencontres. Avec beaucoup de patience, tu m'as donné les clefs nécessaires pour enregistrer, traiter et interpréter aux mieux le signal EXAFS et je t'en remercie. *Ça mérite bien un gâteau au chocolat…*

Jean-Yves, malgré vos nombreuses fonctions, vous avez toujours été trés disponible et attentif à mes travaux dans les moindres détails. Votre vision de la recherche m'a permis à de nombreuses reprises de prendre du recul sur mon sujet. J'ai beaucoup appris à vos cotés, et ça ne concerne pas uniquement la physico-chimie des interfaces *mais aussi le rugby et la chanson française de 1960 !*

Vous resterez tous les deux, l'une des rencontres les plus marquantes de cette thèse. J'associe également à ces remerciements vos familles respectives qui m'ont si chaleureusement accueillie lors d'occasions plus ou moins studieuses.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mark WIESNER de Duke university (USA). Ce sujet de recherche n'aurait certainement pas vu le jour si rapidement sans son aide précieuse. Toutes les discussions et réunions que nous avons eu m'ont permis de positionner mes travaux dans un contexte international. C'est très privilégié et avec beaucoup d'impatience que j'attends de débuter mon post-doc dans son équipe. À suivre…

Mes vifs remerciements vont également aux biologistes, médecins, pharmaciens qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires. Je commencerai par Wafa ACHOUAK du LEMIRe (Cadarache) et Alain BOTTA du LBME (Hôpital de la Timone, Marseille) qui m'ont fait confiance en laissant une 'casseuse de cailloux' envahir leurs laboratoires. Puis Michel DE MEO et Thierry ORSIERE qui m'ont initiée aux tests d'Ames, des Comètes *(de l'espace !)* et des Micronoyaux ce qui n'était pas une mince affaire. Enfin, c'est grâce à l'aide précieuse de Céline, Laetitia et Marie-Anne que j'ai pu apprendre les bases de la culture des fibroblastes et d'*Escherichia Coli*. Merci à tous.

Que Corinne CHANEAC et Jean-Pierre JOLIVET (LCMC, Paris) reçoivent ici toute ma gratitude. Leur grande expérience dans la synthèse et la caractérisation des nanoparticules et les discussions que nous avons pu avoir ont été très enrichissantes. Corinne, merci d'avoir si bien gérée mes demandes toujours « urgentes » de nanoparticules. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau, peut être au détour d'un musée ou d'un restaurant américain ! Merci également aux LIONS (CEA, Saclay) : Antoine THILL et Olivier SPALLA. Grâce à vous j'ai pu me lancer dans l'étude des nanoparticles de cérium. Je suis sûre qu'elles ont encore de nombreux secrets à nous révéler. Bonne chance à Ophélie pour la suite.

Je ne voudrais surtout pas oublier les 'local contact' des lignes synchrotron sur lesquelles j'ai eu la chance de travailler. En commençant par la *Fame team* : Jean-Louis HAZEMANN, Olivier PROUX, Denis TESTEMALE, Hervé PALENCHER. J'espère ne pas avoir encore pris mon dernier café à l'ESRF ! La *Lucia team* délocalisée pour un temps chez les suisses : Anne-Marie FLANK, Delphine VANTELON, Pierre LAGARDE. Je vous souhaite un bon déménagement et un bon retour en France. Luca OLIVI et Valérie BRIOIS de la ligne *XAS 11.1* d'ELETTRA. Grâce à vous les restaurants de Bassovizza n'ont plus aucun secret pour nous, enfin presque… Sans les développements continuels de vos lignes respectives et votre grande disponibilité, nous n'aurions jamais pu enregistrer des spectres d'aussi bonne qualité.

Je remercie également tous les collègues de l'équipe SE3D qui m'ont aidé par leur expertise technique, leurs conseils avisés et leur soutien au quotidien : Armand, Daniel, Isabelle, Jean-Marie, Jean-Paul, Jérôme L., Stéphane, Sylvie… qu'ils m'excusent de ne pouvoir tous les citer. J'ai une pensée particulière pour mes relecteurs de dernières minutes, Emmanuel et Olivier, votre aide a été précieuse. Une mention spéciale va à mes 'co-bureaux' et amis : Voisine et Momo (alias Perrine et Mohamed) *sans oublier Georges C. et notre poteau*. Merci d'avoir supporté mes monologues devant mon ordinateur, mon humour à répétition, mes chansons entêtantes *(« petit oiseau si tu n'as pas d'aile… », héhé ça marche à tous les coups !)*. Vous avez fait preuve d'une grande patience. J'ai également une pensée pour les 'djeuns' que j'ai eu la chance d'encadrer, Laetitia et Maxime.

C'est avec beaucoup de nostalgie, que j'en viens à remercier tous mes amis doctorants et ex-doctorants: Agnès (et Bibou), Anne (la fausse brune), Barbara, le p'tit Clément, Guillaume 'de Chabanon', Irène, Julie (viva Penta!), Laetitia, Lise (RDV en californie), Mag (l'autre blonde), Marwen, Olivier, PH (blard et al.), Priscillaaa Pouschaaat, Sir adrien, Véro et sa demi-pizza, Yannick… Un grand merci à Julie d'avoir partagée son appart avec moi pendant les dernières semaines de ma thèse. Voilà une belle équipe qui me fait déjà regretter mes années passées au CEREGE. Je lève mon verre bien haut pour vous !

Enfin, je remercie ma famille et mes amis de longue date Jipé, Hélène, Lolo, Gaby et Jean. Vous êtes tous dans mon cœur. J'espère que mon emploi du temps continuera de vous faire rire car ce n'est pas près de se calmer… Je vous attends en Caroline du Nord. Une mention spéciale ira à mes parents qui m'ont supporté *(dans tous les sens du terme !)* pendant toutes mes études. Tout ce travail, je vous le dois.

Mélanie

Aix-en-Provence, Novembre 2007

Aux miens

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. INTRODUCTION – ENJEUX ET RISQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES 5
Préambule 5
1. Enjeux des nanotechnologies en Recherche & Développement 8
1.1 Le marché des nanotechnologies 8
1.2 Les nanoparticules et la santé 9
1.3 Les nanotechnologies environnementales 10
2. Risques pour l'Homme et l'Environnement 13
2.1 Voies de relargage dans l'environnement et d'entrée dans l'organisme 13
2.2 Comportement unique vis-à-vis du vivant 14
2.3 Premières études contradictoires 15
2.4 Notre approche de l'étude des effets biologiques des nanoparticules d'oxydes métalliques 16
3. Toutes les nanoparticules manufacturées sont-elles uniques ? 18
3.1 Un rapport surface /volume élevé 18
3.2 Minimisation de l'énergie de surface 20
4. Bilan du chapite I 22
5. Références bibliographiques 24

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-maghémites 35
1.1.2 Les nanoparticules de Fe° (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-maghémites à pH neutre et force ionique elevée 41
1.5 Bilan des principales cararctéristiques des nanoparticules étudiées 43
2. Les modèles biologiques et tests de cyto- génotoxicité 44
2.1 *Escherichia coli* 44
2.1.1 Culture bactériene 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

CHAPITRE III. REACTIVITE DE SURFACE DES NANOPARTICULES ULTRAFINES – L'EFFET 'NANO' 71
Résumé étendu de l'article 71
1. Enhanced adsorption of arsenic onto maghemites : As^{III} as a probe of the surface structure and heterogeneity 74
1.1 Introduction 74
1.2 Experimental section 76
1.2.1 Maghemite nanoparticles 76
1.2.2 Sorption experiments 77
1.2.3 Powder X-ray Diffraction 77
1.2.4 X-ray absorption experiments 77
1.3 Results and discussion 78
1.3.1 Adsorption of As^{III} onto *Nmag* 78
1.3.2 Arsenite adsorption sites as function of the surface coverage 79
1.3.3 Specificity of the arsenite adsorption mechanisms on ultrafine nanomaghemite. 84
1.4 Conclusion 88
2. Bilan du chapitre III 89
3. Références bibliographiques 90

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-CeO_2 : 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- genotoxical 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-γFe_2O_3 126
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-CeO_2 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 V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 159
1. Conclusion 159
1.1 Compréhension de la réactivité des nano-oxydes de fer et leur capacité de rétention de polluants inorganiques (exemple de l'arsenic) 159
1.2 Étude des effets biologiques des nanoparticules manufacturées sur des modèles cellulaires humains et environnementaux 160
2. Perspectives 163

ANNEXES 165

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
BET : Brunnauer, Emmet, Teller
CBMN : Cytokinesis-blocked micronucleus
CCC : Concentration critique de coagulation
CFC : Cubique face centrée
D_H : Diamètre hydrodynamique
DLS : Dynamic light scattering
DMEM : Dubelcco's modified eagle medium
DMSA : acide dimercaptosuccinique
DRX : Diffraction des rayons X
E.coli : Escherichia coli
EXAFS : Extended X-ray absorption fine structure
FI : Force ionique
His : Histidine
ICP-AES : Inductively coupled plasma absorption emission spectroscopy
LB : Luria Bertani
MET : Microscopie élecetronique en transmission
MN : Micronoyaux
nano-CeO_2 : nanoparticules d'oxyde de cérium
nC60 : agrégat de nanoparticules de carbone
Nmag : Nano-maghémites
Nmagnet : Nano-magnétites
NmDMSA : nano-maghémites enrobées de DMSA
NPs : Nanoparticules
nZVI : nanoparticules de fer métal
Oh : Octaédrique
OTM : Olive tail moment
PCN : Point de charge nulle
PCS : Photon correlation spectroscopy
SCGE : Single cell gel electrophoresis
SOD : Superoxyde dismutase
SSA : Specific surface area
Td : Tétrahédrique
XANES : X-ray absorption near edge structure
XAS : X-ray absorption spectroscopy
ZVI : Zero valent iron

LISTE DES TABLES

Table I. 1 : applications visées par l'utilisation de nanomatériaux, entreprises concernées et estimation de la production mondiale actuelle (adapté d'après affset, 2006)..... 8
Table II. 1 : concentrations critique de coagulation pour les nanoparticules étudiées (pH=4.5) 41
Table II. 2 : récapitulatif des principales caractéristiques des nanoparticules manufacturées étudiées. 43
Table II. 3 : lignes de lumière utilisées. 62
Table II. 4 : bilan des analyses physico-chimiques et toxicologiques effectuées sur les échantillons. . 62
Table III. 1 : comparison between the As^{III} adsorption efficiency of ***Nmag*** obtained in this study using ICP-AES with that of previously reported data. 75
Table III. 2 : structural parameters deduced from the EXAFS analysis at the As K-edge. 83
Table IV. 1: impacts biologiques des nanoparticules d'oxyde de fer. 101
Table IV. 2 : structural parameters deduced from EXAFS analysis for NmDMSA and uncoated nano-γFe_2O_3..... 128
Table IV. 3 : complete results of the genotoxicity of NmDMSA in normal human fibroblasts by the comet assay..... 132

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1 : schéma illustrant la fonctionnalisation des nano-oxydes de fer et leur reconnaissance par des cellules cibles (d'après Gupta et al., 2005) 10
Figure I. 2 : différentes utilisations des nanoparticules manufacturées dans les applications environnementales. 10
Figure I. 3 : effet de la taille des particules d'oxyde de fer sur leur capacité de rétention de l'arsenic trivalent par unité de masse (d'après Yean et al., 2005) 12
Figure I. 4 : différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme. 14
Figure I. 5 : approche de l'étude des effets biologiques liés aux nanoparticules manufacturées utilisée dans ce travail 16
Figure I. 6 : fraction d'atomes se situant dans la couche de surface et sub-surface (0.5 nm d'épaisseur) d'une particule en fonction de son diamètre 18
Figure I. 7 : comparaison entre l'énergie totale d'une nanoparticule et d'une microparticule 19
Figure I. 8 : enthalpies de formation ($\Delta H_f°$) des polymorphes de TiO_2 en fonction de la surface spécifique et structure d'une nanoparticule d'anatase de 5 nm de diamètre (adapté d'après Banfield et al., 1998 ; Banfield et Navrotsky, 2001) 20
Figure I. 9 : effet de la taille des particules d'oxyde de fer sur leur capacité de rétention de l'arsenic trivalent par unité de surface (d'après Yean et al., 2005). 21
Figure II. 1 : techniques employées pour la caractérisation physico-chimique des nanoparticules manufacturées 33
Figure II. 2 : structure cristalline des nanoparticules étudiées. 36
Figure II. 3 : observation microscopique des nanoparticules étudiées. 38
Figure II. 4 : diffractogramme des nanoparticules étudiées et position des pics de diffraction des minéraux de référence. 38
Figure II. 5 : diamètres hydrodynamiques des nanoparticules dans leur solution-mère mesurés par diffusion dynamique de la lumière. 39
Figure II. 6 : stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction du pH (FI = 10^{-3} mol/L de NaCl). 40
Figure II. 7 : évolution du diamètre de nano-maghémites lors de l'enrobage avec le DMSA. 42
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 pH=7.4. 43
Figure II. 9 : colonies bactériennes poussant sur le milieu nutritif solide. 45
Figure II. 10 : composition du DMEM complémenté (% molaire). 46
Figure II. 11 : principe du test WST-1. 47
Figure II. 12 : de l'ADN au chromosome. (http://membres.lycos.fr/coursgenetique) 48
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. 49
Figure II. 14 : fibroblastes binucléées avec ou sans micronoyaux observées au microscope à fluorescence après coloration. 51
Figure II. 15 : cellules intactes et lésées observées au microscope à fluorescence (x250) lors du test des Comètes. 51
Figure II. 16 : spectre XAS de As_2O_3 enregistré au seuil K de l'arsenic. 57
Figure II. 17 : organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS. 60
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-oleil.fr). 61
Figure III. 1 : schéma représentant les mécanismes d'adsorption de l'As^{III} à la surface des nano-maghémites. Ces interprétations sont basées sur des informations structurales obtenues par DRX et XAS 72
Figure III. 2 : évolution de la pression en surface d'une particule lors de l'adsorption d'une monochouche d'arsenic (de 0.5nm d'épaisseur) en fonction du diamètre de la particule 73

Figure III. 3 : scheme representing the crystalline structure of maghemite (γ-Fe_2O_3) and the atomic arrangement of the iron tetrahedral (Fe_{Td}) and octahedral (Fe_{Oh}) at the surface (plane (111)) as a function of the size of the particles (based on the study of Brice-Profeta et al. (2005)) 76
Figure III. 4 : adsorption isotherm of As^{III} onto ***Nmag***. C_{ads}: concentration of As adsorbed at the ***Nmag*** surface. Dark curve: logarithmic fit. pH = 7 ± 0.2, 0.01 M NaCl, [***Nmag***] = 30 mg/L, 22-25°C..... 78
Figure III. 5 : (A) X-ray diffraction patterns of ***Nmag*** as a function of As surface coverage. (B) Theoretical evolution of XRD $\{111\}$ normalized peak area of standard maghemite as a function of the level of occupancy of the tetrahedral A site with [Fe_{Td}] (dotted line) or As (solid line), compare with experimental values 80
Figure III. 6 : (A) $As^{III}/As^{(III+V)}$ ratio in function of the exposition time under X-ray beam obtained by linear combination of XANES spectra of As_2O_3 and As_2O_5. Dotted lines: linear fitting, ●: dissolved As_2O_3, Δ:***Nmag***As10, : ***Nmag***As100. (B) EXAFS spectra (As K-edge) of ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100: experimental data (solid line) and simulation (dotted line). 82
Figure III. 7 : assumed equilibrium energy shape of the particles (based on a Kossel model) and structure of the three main lattice planes at the surface of ***Nmag***. This figure gives an estimation of the coordination number of [Fe_{Td}] in the octahedral ring. Red square: $1nm^2$..... 86
Figure III. 8 : structure of the three main lattice planes at the surface of ***Nmag***. This figure gives an estimation of the coordination number of [Fe_{Td}] on the B trimer 86
Figure III. 9 : scheme representing the adsorption mechanisms of As^{III} at the ***Nmag*** surface based on the structural information derived from the XRD and As K-edge XAS analyses. 87
Figure IV. 1 : agrégation des nanoparticules d'oxydes métalliques dans le milieu de culture des cellules humaines (DMEM). Exemple des nano-maghémites 98
Figure IV. 2 : 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. 109
Figure IV. 3 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). 110
Figure IV. 4 : 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. 110
Figure IV. 5 : 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..... 112
Figure IV. 6 : XRD patterns of ***nZVI*** before and after 1h of incubation in water at pH =5-5.5. 113
Figure IV. 7 : 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. ... 114
Figure IV. 8 : Fe K-edge XANES spectra of ***Nmagnet*** and ***Nmag*** 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. ... 115
Figure IV. 9 : evolution of the mean hydrodynamic diameter of nano-γFe_2O_3 during the two-stage DMSA coating process. [nano-γFe_2O_3] = 20 mg/L..... 127
Figure IV. 10 : EXAFS Fe K-edge spectra and their corresponding Fourier transform for uncoated nano-γFe_2O_3 and NmDMSA calculated with and without Fe-S shell..... 128
Figure IV. 11 : stability of the NmDMSA suspension in the abiotic supplemented DMEM (o) and a supernatant of a 24h cell culture (●). Contact time: 48 h. 129
Figure IV. 12 : TEM pictures of human fibroblasts incubated with 0.1 g/L of NmDMSA during 2h (b) and 24h (c). (a) Control fibroblasts. Thin surface layer of NmDMSA and endocytosis vacuoles containing aggregates of different size are visible..... 130

Figure IV. 13 : fibroblasts viability over a 48h period determined by the WST-1 assay and statistical significance (t-test) of the assay. A : decreased mitochondrial activity ; B : increased mitochondrial activity. Statistical significance : ns : no significant ; * : P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** : P<0.001. 131
Figure IV. 14 : box-and-Whisker plots of OTM values for the comet assay experiments. The graphs display the 25th and 75th percentiles (lower and upper sides of boxes), the 5th and 95th percentiles (error bars), the lowest and highest OTM values (black circles), the median (black line), and the mean (dashed line). 132
Figure IV. 15 : (a) raw EXAFS (Fe K-edge) and (b) their corresponding Fourier transform of NmDMSA before and after contacting fibroblasts. $R_{3/1}$ and $R_{3/2}$ corresponds to the difference between the spectra (3) and (1) and (3) and (2) respectively. Residue calculation formula: $R = \sum (y_i^a - y_i^b)^2 / (y_i^a)^2$ 133
Figure IV. 16 : colloidal stability of nano-CeO_2 in the DMEM as a function of their concentration in solution. The aggregation diameter distribution in DMEM is given for two nano-CeO_2 concentrations..... 137
Figure IV. 17 : transmission electron microscopy imaging of (A) human fibroblasts and (B-C) human fibroblasts incubated with 0.6 g/L of nano-CeO_2 during 24h. Surface layer of nanoparticles and endocytosis vacuoles (arrows) are visible. Dark dash : 200 nm 138
Figure IV. 18 : effect of the nano-CeO_2 treatment on the fibroblasts viability over a 48h period determined by the WST-1 assay. The statistical significance is determined by the Student's *t* test (***: *P*<0.001) 139
Figure IV. 19 : CBMN assay on human dermal fibroblasts exposed to nano-CeO_2 for 48h. Vehicle consisted in the addition of 0.5% milli-Q water. ***: *P*<0.001. ns : non-significant 140
Figure IV. 20 : genotoxicity of nano-CeO_2 estimated via the comet assay. Fibroblasts were incubated with different concentrations of nano-CeO_2 for 2h at 37°C and SSB were immediately quantified after the contact period using alkaline comet assay..... 140
Figure IV. 21 : comparison of the genotoxicity induced by nano-CeO_2 and micro-CeO_2 estimated via the comet assays. The results are expressed per mass (A) and surface area units (B). 141
Figure IV. 22 : effect of pre-incubation of fibroblasts with L-ergothioneine (4mM at 37°C for 2h) prior to exposure to 0.06, 0.6 and 1 g/L of nano-CeO_2 for 2h (fine line) on the comet assay results. Thick line: incubation with nano-CeO_2 without pre-incubation with ERT..... 142
Figure IV. 23 : experimental XANES spectra at the Ce L_3-edge of pure nano-CeO_2, nano-CeO_2 incubating with an abiotic culture medium (DMEM) and with fibroblasts during 24h. [nano-CeO_2] = 0.6 g/L. LC: linear combination of XANES spectra of nano-CeO_2 (Ce^{4+}) and Ce^{3+} oxalate. 143
Figure IV. 24 : hypothesis for the genotoxic and cytotoxic mechanisms of nano-CeO_2 in human fibroblasts. 145

CHAPITRE I. INTRODUCTION

ENJEUX ET RISQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES

SOMMAIRE

CHAPITRE I. INTRODUCTION – ENJEUX ET RISQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES 5
Préambule 5
1. Enjeux des nanotechnologies en Recherche & Développement 8
1.1 Le marché des nanotechnologies 8
1.2 Les nanoparticules et la santé 9
1.3 Les nanotechnologies environnementales 10
2. Risques pour l'Homme et l'Environnement 13
2.1 Voies de relargage dans l'environnement et d'entrée dans l'organisme 13
2.2 Comportement unique vis-à-vis du vivant 14
2.3 Premières études contradictoires 15
2.4 Notre approche de l'étude des effets biologiques des nanoparticules d'oxydes métalliques 16
3. Toutes les nanoparticules manufacturées sont-elles uniques ? 18
3.1 Un rapport surface /volume élevé 18
3.2 Minimisation de l'énergie de surface 20
4. Bilan du chapite I 22
5. Références bibliographiques 24

CHAPITRE I. INTRODUCTION – ENJEUX ET RISQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES

Préambule

Dans l'ensemble des pays industrialisés, on assiste à un essor considérable des nanosciences et nanotechnologies. Elles consistent à construire, comprendre et contrôler la fonctionnalité d'objets de tailles comprises entre 1 et 100 nm. L'intérêt scientifique et commercial que représente les nano-matériaux aujourd'hui illustrent l'énorme défi lancé en 1959 par le prix Nobel de physique Richard Feynman : « *il y a plein de place en bas de l'échelle... lorsque nous aurons quelques contrôles sur l'arrangement des atomes à une petite échelle, nous découvrirons que la matière possède des propriétés énormément plus étendue et qu'avec nous pourrons réaliser beaucoup plus de choses* » (Feynman, 1959). C'est en 1985, avec la découverte des nanoparticules de carbone que le terme « nanoparticules » est né. Avant cette date, les nanoparticules existaient déjà mais elles portaient le nom de colloïdes ou de polycations (Krueger, 1979 ; Tronc et al., 1982 ; Jolivet et al., 1985). Historiquement les fullerènes (C60) sont donc les premières à avoir été synthétisées (fullerènes, C60) par H. Kroto (Université de Sussex), R. Curl et R. Smalley (Université de Rice, Houston), ce qui leur valût le prix Nobel de chimie en 1996 (Liu et al., 1986 ; Smalley et al., 1998). Depuis, les nanoparticules manufacturées envahissent notre quotidien. En plus des applications pour l'électronique, l'informatique et les télécommunications (Kruis et al., 1998 ; Kwok et al., 2002), les nanotechnologies se retrouvent dans des domaines aussi variés que la médecine et les cosmétiques (Gupta et al., 2005 ; Emerich et al., 2006), l'environnement et l'énergie (Wei-xian et al., 2003 ; Bottero et al., 2006), l'agroalimentaire ou les transports (Pereira et al., 2007). Il est prévu que la production mondiale de nanoparticules manufacturées progressera de manière fulgurante ces prochaines années. Le marché mondial des produits finis liés aux nanotechnologies devrait atteindre 950 milliards de dollars en 2010 (Affset, 2006). Certains considèrent même l'avènement des nanotechnologies comme la « révolution industrielle » du XXI^{éme} siècle (Rocco et al., 2001).

L'enthousiasme pour cette nouvelle percée technologique génère une course scientifique et commerciale à l'échelle mondiale. Mais se pose alors la question de l'impact environnemental et toxicologique : *les nanotechnologies émergent-elles comme un développement durable au service de l'environnement ou comme une nouvelle source de toxicité ?* (Wiesner et al., 2006) En effet, les nanoparticules manufacturées sont porteuses d'espoirs et d'attentes et notamment dans le domaine environnemental (Bottero et al., 2006). Elles sont utilisées sous forme de membranes de filtration

nano-poreuses (Bailey et al., 2000 ; Jones et al., 2001 ; Cortalezzi et al., 2002), de catalyseurs (Rostovshchikova et al., 2005 ; Wang et al., 2006 ; Maiti et al., 2007) ou de nano-adsorbants (Hu et al., 2005 ; Banerjee et al., 2007) pour le contrôle de la pollution de l'eau et de la qualité de l'air, la dépollution des eaux souterraines ou encore le traitement de l'eau potable. Mais les nanoparticules manufacturées sont également porteuses de polémiques et de craintes. En effet, si elles sont disséminées par un usage normal ou accidentel dans l'environnement, des questions se posent sur leur l'impact vis-à-vis de l'Homme et des Ecosystèmes (Wiesner et al., 2006 ; Moore, 2006). Des analogies entre les nanoparticules manufacturées et les particules atmosphériques ultrafines (Agius et al., 1995) ou les particules naturelles comme l'amiante (Manning et al., 2002), font que ces risques ne sont pas seulement hypothétiques mais qu'ils demandent à être étudiés, ne serait-ce que par simple principe de précaution. Actuellement, nos connaissances sur la toxicité des nanoparticules manufacturées demeurent assez limitées du fait du manque de recul que l'on a sur cette technologie naissante, du faible nombre d'études toxicologiques et des résultats souvent contradictoires qu'elles exposent. C'est pourquoi, il est indispensable d'étudier, en parallèle avec les recherches fondamentales et appliquées portant sur les propriétés et les applications des nanotechnologies, l'impact éventuel de ces nouveaux objets.

Cette préoccupation sur l'impact environnemental et toxicologique des nanotechnologies est récente (Wiesner et al., 2006 ; Moore, 2006). C'est en 2002, que les premiers débats se tiennent entre des groupes 'écologistes' et des chercheurs ou industriels liés aux nanotechnologies. Brièvement, de nombreuses voix s'élèvent pour que les risques environnementaux et toxicologiques liés aux nanotechnologies soient étudiés afin d'accompagner leur développement fulgurant (ETC group, 2002). Ces craintes du public avaient été anticipées puisque dès 2001 s'était déroulé à Houston (Texas, USA) dans le cadre d'une collaboration franco-américaine (CEREGE/Université de Rice/Consulat de France à Houston) le premièr atelier sur le thème « Nanoparticules et Environnement ». Le but était de définir les améliorations qu'apporteraient les nanoparticules dans le domaine environnemental mais également d'appréhender les problèmes potentiels que génèrerait l'introduction des nanoparticules dans l'Environnement. En 2003 le premier programme français pluridisciplinaire (physique, chimie, biologie et toxicologie) concernant cette problématique a été financé par l'ACI-FNS (ANR) « ECCOdyn ». Les objectifs étaient de comprendre les mécanismes de toxicité, biodégradation et bioaccumulation des nanoparticules manufacturées. C'est dans le cadre de ce programme que nos travaux ont débuté.

Cette thèse a nécessité une approche multidisciplinaire associant physico-chimie, microbiologie et toxicologie humaine. Nos travaux ont abordé dans un premier temps la caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface et de la réactivité des nanoparticules d'oxydes métalliques en solution, en termes de stabilité colloïdale (cf. chapitre II) et d'affinité vis-à-vis des métaux (cf. chapitre

III). La réactivité de surface est définie comme étant le nombre d'atomes adsorbés par unité de surface. Il faut savoir que la réactivité d'oxydes de tailles nanométriques diffèrent fortement des mêmes oxydes de taille micro ou millimétriques, laissant supposer que les mécanismes d'adsorption diffèrent en fonction de la taille (cf. chapitre I.3). Afin de comprendre les raisons d'une telle différence, la réactivité de surface des nano-oxydes a été étudiée en termes de différenciation des sites de surface et de capacité d'adsorption de métalloïdes (ex : adsorption de l'arsenic à la surface de nanoparticules de maghémite). Comme nous le verrons cette étape est indispensable pour comprendre le comportement des nanoparticules vis-à-vis des organismes vivants.

Dans un deuxième temps, les effets biologiques des nanoparticules d'oxydes métalliques ont été étudiés (cf. chapitre IV). Il est important de préciser qu'il ne s'agit pas d'une étude des risques liés aux nanoparticules manufacturées. Par définition, une étude des risques couvre à la fois les sources de toxicité, les voies d'expositions, les effets toxicologiques et l'estimation des risques encourus (Robichaud et al., 2005). Notre étude s'est restreinte à l'impact écotoxicologique et (géno)toxicologique des nanoparticules d'oxydes métalliques sur des bactéries environnementales et des cellules humaines. De plus, nous avons suivi l'évolution de la structure des nanoparticules d'oxydes métalliques dans la cellule ou la bactérie.

Remarque : ces travaux ayant fait l'objet de publications dans des revues internationales, ce manuscrit sera rédigé en français et en anglais.

❖ ❖ ❖

1. Enjeux des nanotechnologies en Recherche & Développement

1.1 Le marché des nanotechnologies

Les nanosciences et les nanotechnologies constituent un champ de recherche et de développement pluridisciplinaire en pleine croissance sur l'ensemble des continents. De nombreuses études sur le développement des nanotechnologies estiment que le taux moyen de croissance annuel entre 2005 et 2010 sera de 2,7% en termes de tonnage et de 9,5% en valeur (Affset, 2006).

Deux grandes familles de nanomatériaux co-existent : les nanoparticules utilisées sous forme dispersée (ex : fluide magnétique) et les nanomatériaux au sens strict c'est-à-dire des matériaux denses ou poreux incorporant des nanoparticules dans leur structure (ex : membranes nanostructurées). En 2010, la consommation globale de nanomatériaux devrait représenter 10 millions de tonnes dont 50% de matériaux organiques non-polymères, 15% de nanomatériaux métalliques et 15% de nano-oxydes (Affset, 2006). Même si actuellement peu de types de nanomatériaux sont en phase de production industrielle, il est prévu que dès 2010-2014 les nanotechnologies fassent partie du quotidien. La table suivante récapitule de façon non exhaustive les applications utilisant des nanomatériaux et donne des informations sur le niveau de production et les perspectives d'évolution (Table I.1).

Table I. 1 : applications visées par l'utilisation de nanomatériaux, entreprises concernées et estimation de la production mondiale actuelle (adapté d'après affset, 2006).

Secteurs	Applications visées	Fabricants-Utilisateurs	Production (2010)
Agro-alimentaire	Revêtement imperméable Membranes pour le traitement de liquides alimentaires Marquage pour traçabilité	Laiteries, vins	
Automobile	Revêtement auto lubrifiant, anti-rayure et anticorrosion Pneu vert, Pot catalytique Vitrage autonettoyant, hydrophobe, athermique	Rhodia, Michelin Saint-Gobain, Hutchinson Renault, Arcelor	Oxydes de Ce, Ti Nanotube de C
Chimie	Catalyseur pour chimie sélective Photocatalyse pour production de H_2	Rhodia, Arkéma	
Cosmétiques	Anti-UV, anti-vieillissement Antibactérien	L'Oréal, BASF DGTec	Oxydes de Ti, Zn, Fe **10^3 t/an**
Électronique	Matériau isolant Polissage de wafers et disques durs Polymère nanostructuré pour électronique souple	Alliance, Croles Baikowski Arkéma, iNanov	Nanotube de C, oxydes de Ti, Zn, Fe, Ce **10^2 t/an**
Énergie	Pile à combustible, Éclairage à basse consommation Allègement de structure pour éolien Cristaux photoniques pour panneaux solaires	Toshiba, Arkéma, DGTec, Kodak, Phillips	
Environnement	Traitement de pollutions Traitement de l'eau potable	Orelis TAMI, Suez	Fe°, oxydes d'Al, Fe **10^2 t/an**
Santé, pharmacie	Délivrance ciblée de médicaments Réparation et implants	Arkéma Biometrix, DGTec	nC60, quantum dots, oxyde de Fe **1 t/an**
Textile, habillement	Antibactérien, retard au feu, filtres UV et IR Tissu indéfroissable et antisalissure	DGTec, Rhodia Nano-Tex	

Parmi tous les types de nanomatériaux disponibles, notre étude s'est restreinte à quatre nanoparticules à savoir des nano-oxydes (Fe_3O_4, γ-Fe_2O_3, CeO_2) et des nanoparticules métalliques (Fe°) pour leur importance dans le développement actuel des nanotechnologies. Alors que les nano-oxydes de cérium sont principalement utilisés pour la catalyse chimique et l'électronique (Flitzani et al., 2001), les nano-oxydes de fer sont eux associés à des applications biomédicales et environnementales (Gupta at al., 2005 ; Ngomsik et al., 2005). Enfin, les nanoparticules métalliques de fer sont étudiées et commencent à être employées pour la dépollution des eaux souterraines et des sols contaminés (Wei-Xian et al., 2003). Les domaines de recherche et de développement utilisant ces types de nanoparticules manufacturées sont détaillés ci-après.

1.2 Les nanoparticules et la santé

Opérant à des échelles identiques, il est naturel que les nanotechnologies rencontrent les sciences du vivant pour former ce que l'on appelle les « nanobiotechnologies ». Les principaux champs d'investigation concernent la recherche pharmaceutique et médicale : vectorisation des médicaments par des nanoparticules magnétiques (Sahoo et al., 2003), activation à volonté de nano-médicaments par un champ magnétique (Kreuter et al., 2001), destruction de tumeurs par chauffage de nanoparticules (Brannon-Peppas et al, 2004), création d'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (Fahlvik et al., 1993 ; Corot et al., 2006). Les nanoparticules les plus utilisées dans ce domaine sont les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (magnétite, maghémite) (Gupta et al., 2005 ; Halbreich et al., 1998).

Dans ces applications biomédicales, la taille et les propriétés physico-chimiques des nano-oxydes de fer sont importantes car cela peut fortement affecter le temps de résidences des nanoparticules dans le sang et leur biodisponibilité (Gupta et al., 2005). Par exemple, les nanoparticules de taille comprise entre 10 et 100 nm auront un temps de résidence optimal dans la circulation sanguine alors que les particules de 200 nm ou inférieures à 10 nm seront retenues par la rate ou le système rénal respectivement (Oberdorster et al., 2005). D'autre part, une fois dans l'organisme, des protéines contenues dans le sang vont s'adsorber à la surface des nanoparticules. Cette adsorption est à l'origine de retrait des nanoparticules de la circulation sanguine par le système réticuloendothélial (Gupta et al., 2005). Généralement, afin de limiter l'adsorption de protéines et de prolonger le temps de résidence des particules dans les organismes, les nano-oxydes de fer sont enrobées de molécules organiques (polyéthylène glycol, poloxamines, dextran, transferrine...) (Kim et al., 2001 ; Goetze et al., 2002 ; Lacava et al., 2002 ; Chunfu et al., 2004 ; Xu et al., 2005). Cet enrobage a pour but de fonctionnaliser les nano-oxydes afin de les rendre reconnaissables par les cellules cibles uniquement (Figure I.1). Ainsi, il a été démontré sur des rats, que des nanoparticules magnétiques étaient capables de délivrer des substances médicamenteuses directement dans des tumeurs cérébrales (Kreuter et al., 2005).

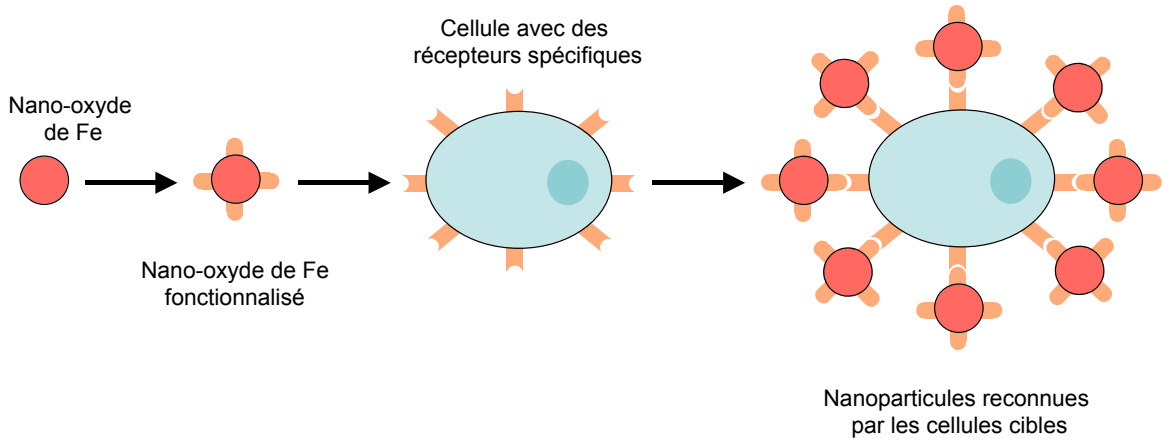


Figure I. 1 : schéma illustrant la fonctionnalisation des nano-oxydes de fer et leur reconnaissance par des cellules cibles (d'après Gupta et al., 2005)

1.3 Les nanotechnologies environnementales

Dans le domaine environnemental, les nanoparticules manufacturées sont des objets prometteurs capables d'apporter des solutions à un grand nombre de problèmes comme la dépollution des eaux profondes (Lowry et al., 2004) et des sols (Wei-xian et al., 2003), le traitement des eaux de consommation (Ngomsik et al., 2005), le contrôle de la pollution (Riu et al., 2006) ou encore le recyclage des déchets. Dans ces applications, les nanoparticules sont utilisées en tant que membranes nanostructurées, catalyseurs ou nano-adsorbants (Figure I.2).

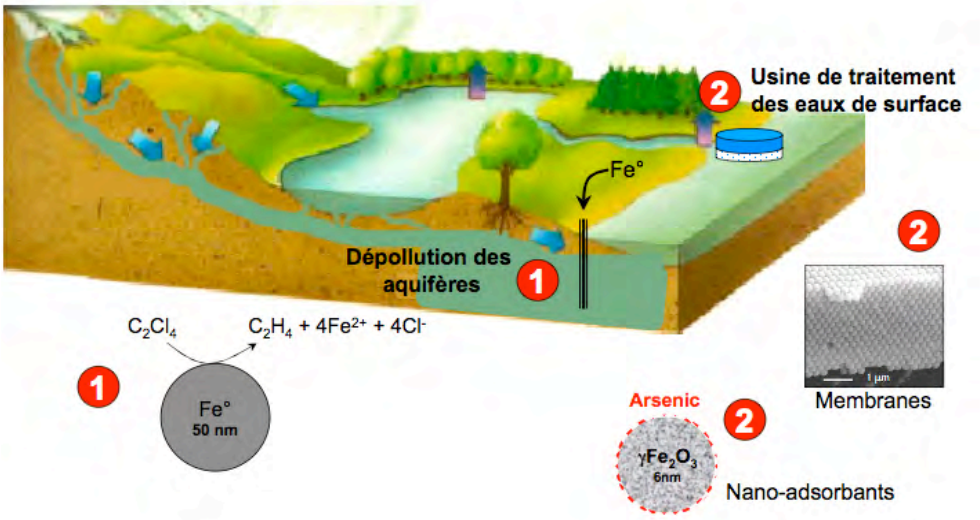


Figure I. 2 : différentes utilisations des nanoparticules manufacturées dans les applications environnementales.

Mais les nanoparticules ne sont pas nouvelles dans les applications environnementales et sont antérieures à la mode 'nano'. Par exemple, depuis plusieurs dizaines d'années, le procédé de traitement de l'eau potable le plus efficace et le moins coûteux est le procédé de coagulation-floculation. Il est basé sur l'utilisation de nanoparticules d'aluminium et de fer de 2 à 2,5 nm de diamètre obtenues par précipitation de sels d'aluminium (Al_{13}) et de fer (Fe_{24}) qui sont bien caractérisées (Bottero et al., 1980 ; 1982 ; 1993 ; 1994). On parlait alors de polymères ou de polycations ou encore de colloïdes. Des membranes de nano-filtration à base de polymères existent elles aussi depuis plusieurs d'années (ex : membrane Nafion™). Mais avec l'émergence des nanotechnologies dans les années 1990 on a cherché à fabriquer des membranes de nano-filtration réactives à base de nanoparticules (ex : membrane alumoxane™ et ferroxane™) (Bailey et al., 2000 ; Jones et al., 2001 ; Rose et al., 2002 ; Cortalezzi et al., 2002 ; 2003). La porosité de ces membranes n'excédant pas 20 à 30 nm, elles sont capables de bloquer la majorité des agents pathogènes comme les bactéries ou les virus qui constituent actuellement un problème majeur dans le domaine du traitement de l'eau. De plus, grâce à l'affinité des oxydes de Fe et d'Al pour les polluants métalliques, ces derniers pourront s'adsorber sur la membrane et fabriquer ainsi des membranes de nano-filtration réactives.

Les nanoparticules sont également utilisées sous forme de suspensions liquides pour la dépollution des eaux profondes (Wei-Xian et al., 2003 ; Lowry et al., 2004). C'est le cas des nanoparticules de fer métal qui sont injectées dans des aquifères situés en sous-sols de sites pollués américains (Gavaskar et al., 2005). Grâce à leurs propriétés catalytiques, elles convertissent certains contaminants organiques (composés chlorés, pesticides...) en composés non toxiques (Choe et al., 2000 ; Kanel et al., 2005 ; Liu et al., 2005). Les suspensions de nano-oxydes de fer sont également étudiées pour le traitement des eaux de surface et des effluents (Hu et al., 2005 ; Uheida et al., 2006). Dans ce cas, ce sont les propriétés nano-adsorbantes et superparamagnétiques qui sont mises en valeur. Le cas des nano-adsorbants a particulièrement retenu notre attention au cours de cette thèse. Ce sujet a fait l'objet d'un chapitre dans un livre publié en 2007 :

Auffan M., Shipley H.J., Yean S., Kan A.T., Tomson M., Rose J., Bottero J-Y.
Nanomaterials as adsorbents, 2007, in Environmental nanotechnology – applications and impacts of nanomaterials ed. M.R. Wiesner and J-Y. Bottero, pp 371-392.

Ce chapitre (cf. annexe 1) a pour vocation de montrer les intérêts de l'utilisation de nanoparticules magnétiques et carbonées dans les retraits de polluants organiques ou inorganiques en solution.

- **Nano-adsorbants dans le traitement de l'eau : le cas des nano-oxydes de fer**

Les oxydes de fer sont une voie prometteuse dans ce domaine du fait (i) de leur forte affinité pour les polluants organiques et inorganiques (ii) de leur superparamagnétisme (Al-badleh et al.,

2003 ; Johnson et al., 2005 ; Stipp et al., 2002). Grâce à leurs propriétés magnétiques, les particules d'oxydes de fer ayant adsorbées les polluants peuvent être retirées des eaux polluées, régénérées et réutilisées ce qui permet de limiter la génération de déchets secondaires (Ngomsik et al., 2005). Des techniques utilisant des microparticules d'oxydes de fer magnétiques ont déjà fait leurs preuves dans ce domaine, mais des avantages indéniables peuvent être apportés par l'utilisation de nano-oxydes de fer. En effet, pour une même masse de particules, des nanoparticules de magnétite de 10 nm de diamètre peuvent retenir à leur surface 90 à 600 fois plus d'arsenic que des particules 300 nm et 1 μm (Figure I.3) (Yean et al., 2005 ; Mayo et al., 2007). Cette forte capacité de rétention de l'arsenic à la surface des nano-oxydes de fer sera d'ailleurs étudiée en termes de réactivité de surface dans le chapitre III.

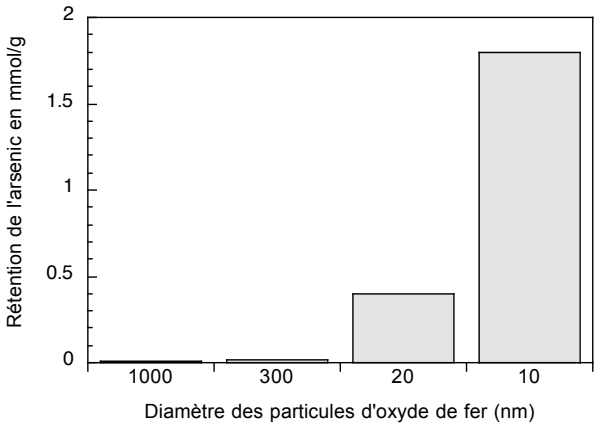


Figure I. 3 : effet de la taille des particules d'oxyde de fer sur leur capacité de rétention de l'arsenic trivalent par unité de masse (d'après Yean et al., 2005).

De plus, par analogie avec le domaine biomédical, les nano-oxydes de fer peuvent être fonctionnalisés afin de les rendre spécifique à certains polluants (in)organiques (Liu et al., 1999 ; Yamaura et al., 2002 ; Huang et al., 2003). Par exemple, les nano-magnétites fonctionnalisées avec de l'acide polyacrylique (Liao et al., 2003) auront une plus grande affinité pour les cations de gros poids moléculaires, alors qu'une fonctionnalisation avec de la D-glucosamine augmentera les cinétiques d'adsorption des ions cobalt et cuivre (Chang et al, 2005 ; Chang et al., 2006).

Même si la quantité de nanoparticules manufacturées mises sur le marché reste encore limitée, les nanoparticules commencent à quitter le cercle des laboratoires de recherche et entrent dans la phase de développement industriel. Il est donc possible qu'elles se retrouvent dans l'environnement et qu'elles interagissent avec les organismes vivants. On ne peut donc pas faire l'impasse d'une étude de leurs impacts sur l'Homme et sur l'Environnement. Les paramètres pouvant être à l'origine d'un risque écotoxicologique potentiel seront présentés dans la partie suivante.

❖ ❖ ❖

2. Risques pour l'Homme et l'Environnement

2.1 Voies de relargage dans l'environnement et d'entrée dans l'organisme

Actuellement, les connaissances sont très pauvres sur la mise en circulation des nanoparticules manufacturées dans l'environnement. Leur relargage peut s'effectuer sous forme de poussières ou de suspension liquide au moment de leur fabrication, par l'abrasion ou l'altération des structures qui les maintiennent (ex : usure mécanique), par la libération de préparation liquide ou visqueuse (ex : crème solaire appliquée sur la peau), par rejet d'effluents liquides ou gazeux par les installations de production ou de traitement. A ce jour, il n'existe ni préconisation ni suivi pour la prise en compte des risques que peuvent poser les déchets comportant des nanoparticules.

Les données disponibles ne permettent pas non plus d'estimer la population qui pourra être potentiellement exposée durant la fabrication, la mise en œuvre et l'usage des nanoparticules. Un rapport britannique estime qu'en 2015, 1500 fois plus de travailleurs qu'en 2004 seront exposés aux nanoparticules lors de leur production et de leurs utilisations industrielles (Health and Safety Executive, 2004). L'exposition des consommateurs va également croître rapidement, soit par une utilisation explicite de nanoparticules (ex : fluides magnétiques) soit par l'altération des matériaux incluant des nanoparticules sans que le consommateur soit averti (ex : crème solaire).

Pourtant, il existe plusieurs voies d'entrée potentielle des nanoparticules manufacturées dans les organismes vivants. Le système respiratoire est généralement la première venant à l'esprit du fait de l'analogie avec les particules atmosphériques ultrafines. Mais d'autres voies d'exposition comme l'ingestion (système gastro-intestinal), la voie cutanée (système dermique) et les injections de nanoparticules dans la circulation sanguine sont également à prendre en considération compte tenu des modes d'utilisations des nanoparticules manufacturées (Figure I.4). Chaque voie présente habituellement une barrière à cette pénétration (ex : la rate ou les reins). Des études ont montré que les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, se distribuer dans l'organisme et s'accumuler dans certains organes, principalement lors des expositions respiratoire ou digestive (Oberdörster et al, 2005).

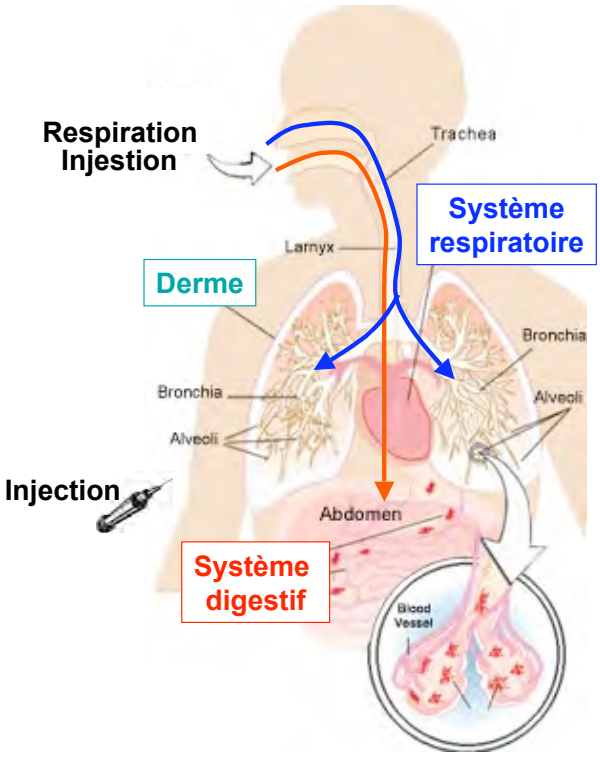


Figure I. 4 : différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme.

2.2 Comportement unique vis-à-vis du vivant

Actuellement, on connaît encore peu de choses sur d'éventuelles interactions non maîtrisées entre des nanoparticules manufacturées et les organismes vivants. Pourtant, certaines de leurs caractéristiques les distinguent fortement des matériaux macroscopiques et rendent leur comportement unique vis-à-vis du vivant.

La taille nanométrique. Les nanoparticules se situent à une échelle moléculaire comprise entre celle d'une molécule d'ADN de 2.5 nm de large et celle d'un globule rouge humain de 800 nm de diamètre. Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. Cette propriété est très étudiée en médecine et pharmacologie car elle permet d'utiliser les nanoparticules comme vecteurs de médicaments vers des cellules cibles. Le corollaire est que des nanoparticules indésirables pourraient se retrouver distribuées un peu partout dans les organismes et atteindre les ramifications les plus profondes des voies respiratoires, franchir les barrières épithéliales ou encore passer dans la circulation sanguine.

La surface spécifique. La surface spécifique est la surface totale de la particule normalisée par la masse. Ainsi, une particule de 10 nm de diamètre aura une surface spécifique 10 fois plus importante qu'une nanoparticule de 300 nm de diamètre. Cela représente une surface disponible 10

fois plus grande à masse égale pour interagir avec les membranes, les molécules biologiques ou les organites cellulaires. Des études ont révélé le rôle de la surface spécifique dans la toxicité des particules (Oberdörster et al., 2000). Par exemple l'instillation chez des rats de particules de TiO_2 de 20 nm entraîne une réponse inflammatoire plus importante que celle induite par la même masse de particules de TiO_2 de 250 nm de diamètre.

La réactivité de surface. Comme nous le verrons dans le chapitre III, certaines nanoparticules présentent une réactivité de surface beaucoup plus importante que des particules micrométriques. Il est donc possible que les contacts nanoparticules/composants biologiques soient plus intenses par unité de surface. Des études ont évalué le rôle de la réactivité de surface lors de l'instillation de particules de 20 et 250 nm chez des rats (Oberdörster et al., 2000). Lorsque les résultats sont exprimés par unité de surface spécifique, les deux tailles de TiO_2 induisent exactement les mêmes effets inflammatoires. Ces effets similaires montrent que la réactivité de surface dans le cas des nanoparticules de titane n'est pas un paramètre de toxicité prépondérant.

Ces trois propriétés sont spécifiques aux nanoparticules manufacturées. Mais d'autres paramètres communs aux nano- et microparticules comme la forme, la composition chimique, la structure cristalline, la pureté, la stabilité colloïdale doivent également être prises en compte lors de l'étude des d'interactions entre les nanoparticules manufacturées et les composants biologiques.

2.3 Premières études contradictoires

Les recherches concernant l'impact des nanoparticules sur l'environnement et leur toxicité sont encore peu nombreuses et pourtant leurs résultats se révèlent très contradictoires. Ces divergences résultent d'une part de l'absence de normes sur les protocoles utilisés et d'autre part d'un mauvais contrôle des propriétés physico-chimiques de surface des nanoparticules.

L'exemple d'études toxicologiques menées sur des nanoparticules de carbone illustre bien ce problème. Des études récentes indiquent que les nC60 peuvent être toxiques pour les poissons (Oberdöster et al., 2004), pour les rats (Warheit et al., 2004), pour les cellules humaines (Sayes et al., 2004) et pour les cultures bactériennes (Fortner et al., 2005). Au contraire, aucune toxicité n'a été révélée sur les poissons par Andrievsky et al. (2004) ni sur les rat par Huczko et al. (2001). Il existe donc une grande incertitude sur la toxicité des nC60. Ces résultats contradictoires s'expliquent par l'absence de contrôle des propriétés physico-chimiques des suspensions de nC60 en amont des tests toxicologiques. Dans cet exemple, le paramètre essentiel qui n'est pas pris en compte est la composition chimique de la solution contenant les nC60. En effet, les nanoparticules de carbone étant réputées hydrophobes et non chargées, différents solvants organiques sont utilisés afin de les mettre en

suspension (ex : THF, toluène). Or ces solvants ne sont pas tous égaux en terme de toxicité. En effet, Oberdörster et al. (2004) en utilisant le solvant THF ont montré un effet toxique des nC60 sur des poissons, alors que Andrievsky et al. (2004) avec des nC60 préparés à partir de toluène, n'a observé aucune toxicité. Ainsi, des questions restent en suspens concernant la part de toxicité provenant du solvant ou de la présence de résidus de la synthèse/séparation en surface des nanoparticules, de celle provenant réellement des nanoparticules de carbone.

Ces résultats montrent qu'il est prématuré de condamner les nanoparticules sur la base d'études de toxicité encore peu nombreuses et souvent contradictoires. Mais qu'il est surtout important de caractériser finement les propriétés physico-chimiques de nanoparticules avant toutes études toxicologiques.

2.4 Notre approche de l'étude des effets biologiques des nanoparticules d'oxydes métalliques

Le caractère original de notre étude réside dans le couplage d'une approche physico-chimique et cyto-génotoxicologique des interactions nanoparticules/cellules. Cette approche peut être schématisée avec la figure suivante (Figure I.5).

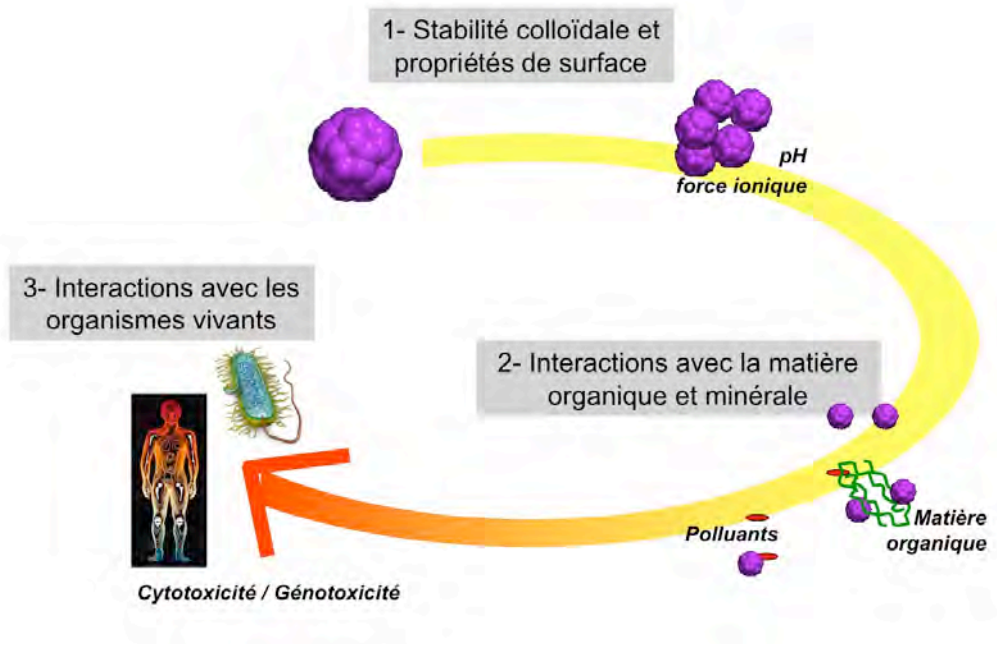


Figure I. 5 : approche de l'étude des effets biologiques liés aux nanoparticules manufacturées utilisée dans ce travail.

Grâce à cette double approche, nous avons pu contrôler les propriétés physico-chimiques des nanoparticules en amont des tests toxicologiques (propriétés de surface, nature, stabilité colloïdale...). Une fois cette étape essentielle franchit, nous avons étudié leurs effets cytotoxiques et génotoxiques potentiels sur des bactéries environnementales et des cellules humaines. Enfin, une dernière étape de caractérisation physico-chimique des nanoparticules à la fin des tests toxicologiques nous a permis de suivre les transformations structurales des nanoparticules au contact des milieux de culture cellulaire et des cellules cibles. Ainsi, nous avons pu corréler les réponses biologiques des cellules cibles à une évolution physico-chimique des nanoparticules afin de comprendre et d'identifier les mécanismes de toxicité.

❖ ❖ ❖

3. Toutes les nanoparticules manufacturées sont-elles uniques ?

L'engouement pour les nanotechnologies et les nanoparticules vient du fait qu'elles possèdent des propriétés uniques par rapport aux matériaux macroscopiques de même nature. Un exemple de minéraux dont le comportement change fortement entre l'échelle macroscopique et nanométrique est le cas de l'or. L'or est connu pour être inaltérable, ses propriétés chimiques lui conférant une résistance exceptionnelle à l'oxydation. L'or macroscopique ne permet donc pas de catalyser des réactions chimiques. Mais à l'échelle du nanomètre, l'or peut devenir extrêmement réactif. Il est montré que des nanoparticules d'or inférieures à 5nm de diamètre deviennent de très bons catalyseurs (Chiang et al., 2006 ; Wang et al., 2006). Mais des questions se posent sur l'origine de ces changements de propriétés à l'échelle nanométrique. Nous tenterons de donner quelques éléments de réponse dans les paragraphes suivants.

3.1 Un rapport surface /volume élevé

Les nanoparticules sont définies comme étant des particules dont au moins une direction de l'espace à une dimension comprise entre 1 et 100 nm. Dans cette gamme de taille, la principale caractéristique est un rapport surface / volume très élevé. Comme le montre la figure I.6, plus la taille d'une particule diminue plus le nombre d'atomes se trouvant en surface ou sub-surface augmente. Cette importante fraction d'atomes en surface va avoir pour conséquence de modifier significativement les propriétés atomiques, électroniques, physico-chimiques et également la réactivité des nanomatériaux par rapport aux mêmes matériaux mais de taille micrométrique.

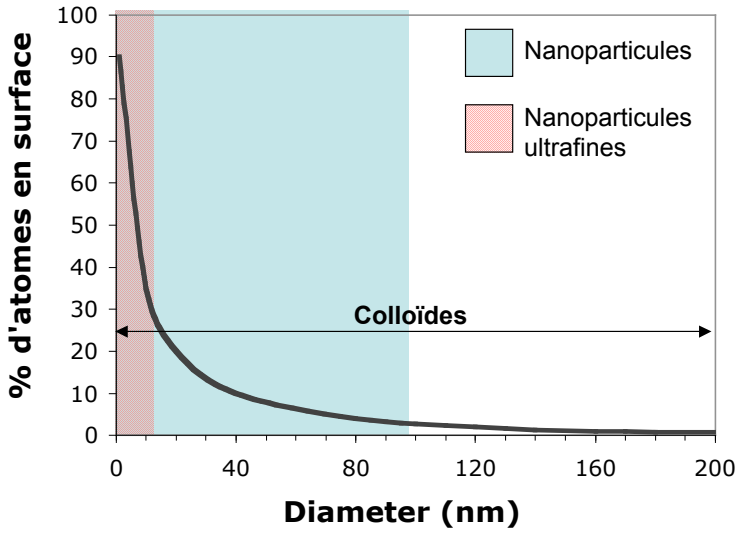


Figure I. 6 : fraction d'atomes se situant dans la couche de surface et sub-surface (0.5 nm d'épaisseur) d'une particule en fonction de son diamètre.

Cependant, ces effets de surface vont surtout être prépondérants dans le cas de nanoparticules inférieures à 10 nm (Figure I.6). Nous estimons qu'une particule de 6 nm de diamètre aura environ 40% de ces atomes en surface. C'est pourquoi lors de cette thèse nous avons restreint la définition d'une nanoparticules à celle de « **nanoparticules ultrafines** » dont le diamètre est compris entre 1 et 10 nm. Dans ce cas, l'effet de la surface sur la particule sera encore plus exacerbé ce qui va avoir des conséquences sur la réactivité des nano-systèmes.

En effet, si on regarde la structure à l'échelle atomique d'un cristal, chaque atome situé au cœur du cristal à un degré de coordination optimal alors que les atomes situés en surface ont un degré de coordination qui n'est pas complet. En surface, la balance des charges n'est donc pas équilibrée ce qui va générer une énergie en surface d'intensité supérieure à l'énergie de la couche de sub-surface ou du cœur du cristal (Figure I.7).

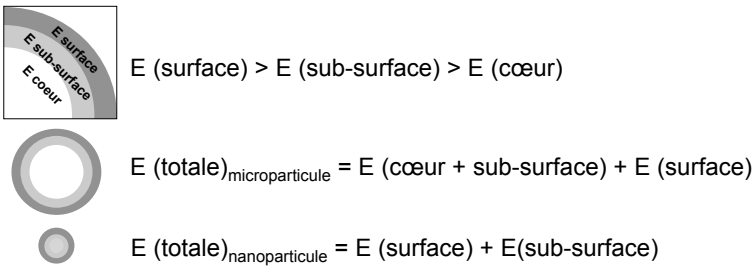


Figure I. 7 : comparaison entre l'énergie totale d'une nanoparticule et d'une microparticule

La pression de surface va également jouer un rôle important sur les nanoparticules. En effet, toute surface exerce une pression P sur sa particule, donnée par la relation suivante :

$$P = 2\gamma / r$$

γ étant la tension de surface et r le rayon d'une particule sphérique (Navrotsky, 2001). Dans le cas de microparticules, cette pression est dissipée dans les premières mailles de surface et n'a qu'une influence limitée sur la structure et réactivité des particules. En revanche, dans le cas des nanoparticules ultrafines, les conséquences de cette pression de surface sont des modifications des paramètres cristallins et/ou des distances interatomiques en surface pouvant modifier fortement la réactivité des nanoparticules et même les sites de surface. Dans le cas de nanoparticules d'anatase de 6 nm de diamètre, il a été démontré que le paramètre de maille diminuait de 0.007 à 0.08 Å à cause de cette forte pression de surface (Cheng et al., 1993). Cette pression de surface a été estimée à 10-45 kbar pour des particules de 2 nm de diamètre (Banfield et Navrotsky, 2001).

La coordination non-optimale des atomes et la forte pression en surface engendrent un excès d'énergie en surface des nanoparticules ultrafines. D'un point de vue thermodynamique, les nanoparticules seront considérées comme métastables par comparaison avec des macrocristaux. Tout système tendant toujours vers un équilibre thermodynamique, elles vont subir des modifications structurales afin d'évacuer leur excès d'énergie. Cette minimisation de l'énergie libre de surface est très fortement reliée à la stabilité des phases cristallines, à la morphologie des nanoparticules, à la croissance cristalline et à la réactivité des nanoparticules avec leur environnement (Banfield et Navrotsky, 2001).

3.2 Minimisation de l'énergie de surface

Une nanoparticule cristallisée à trois voies possibles pour minimiser son énergie de surface : un changement de phase cristalline, un réarrangement atomique de sa surface, la croissance cristalline (adsorption d'ions ou agrégation).

Changement de phase cristalline. En fonction de la taille des particules, certaines phases cristallines seront plus stables que d'autres. Tel est le cas de l'oxyde de titane (TiO_2) qui possède plusieurs structures polymorphes : rutile, anatase, brookite... (Zhang et al., 1998) Pour des diamètres inférieurs à 14-15 nm, l'anatase (phase la moins symétrique) sera la phase la plus stable alors que pour les particules de plus grande taille ce sera le rutile (phase bien ordonnée) (Figure I.8)

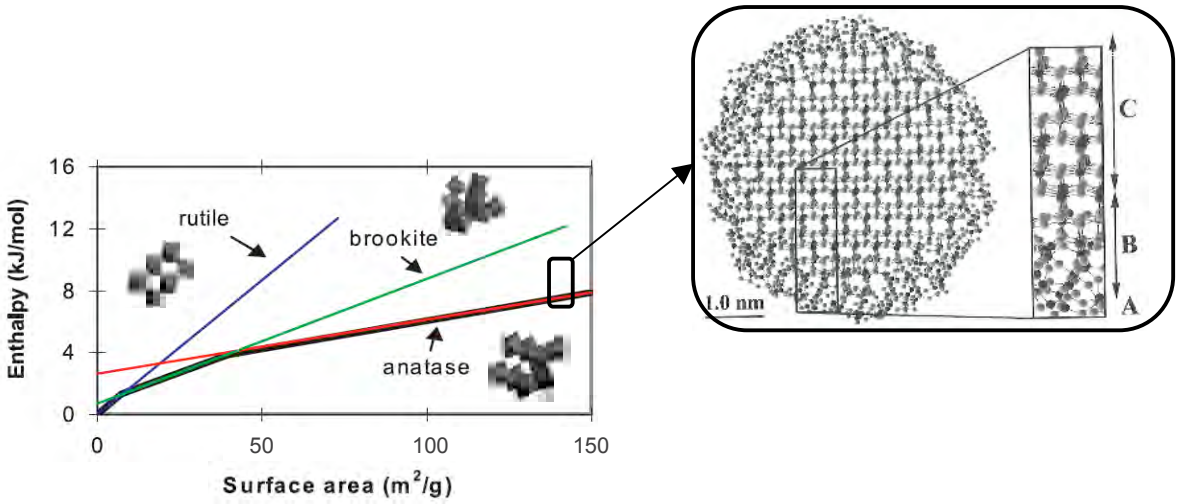


Figure I. 8 : enthalpies de formation ($\Delta H_f°$) des polymorphes de TiO_2 en fonction de la surface spécifique et structure d'une nanoparticule d'anatase de 5 nm de diamètre (adapté d'après Banfield et al., 1998 ; Banfield et Navrotsky, 2001).

Réarrangement atomique de la surface. La diminution de l'énergie de surface peut avoir pour conséquence une désorganisation du niveau de surface. Dans le cas de nanoparticules de CdS, alors que le cadmium possède une symétrie tétraédrique au cœur du matériau, il va se retrouver en symétrie octaédrique en surface (Chemseddine et al., 1997). Un autre exemple est celui des nanoparticules d'anatase de 5 nm de diamètre (Figure I.8) pour lesquelles la couche de surface apparaît très désorganisée à l'inverse du cœur de la particule qui conserve la structure de l'anatase. Ces informations ont été obtenues par modélisation en dynamique moléculaire (Banfield et Zhang, 2001).

Croissance cristalline - adsorption - agrégation. Un des paramètres gouvernant la croissance cristalline ou les mécanismes de sorption est la minimisation de l'énergie de surface (Zhang et al., 1999). Ainsi, la réactivité des nanoparticules vis-à-vis des polluants pourra être supérieure à celle des particules de grande taille. Cela a été montré lors de l'adsorption d'arsenic en surface de nanoparticules de magnétite (Yean et al., 2005). Ils ont pu mettre en évidence que la quantité d'arsenic adsorbée par nm^2 de surface était de 11 atomes/nm^2 pour des nanoparticules ultrafines de 10 nm de diamètre contre 2 à 3 atomes/nm^2 pour des particules de 1 μm à 20 nm de diamètre (Figure I.9).

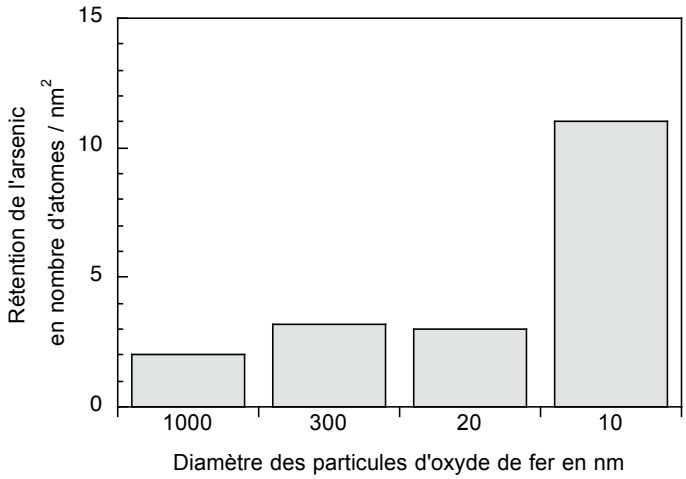


Figure I. 9 : effet de la taille des particules d'oxyde de fer sur leur capacité de rétention de l'arsenic trivalent par unité de surface (d'après Yean et al., 2005).

Cette énorme capacité d'adsorption par unité de surface pour des nanoparticules ultrafines laisse supposer que les mécanismes d'adsorption sont différents à la surface des nanoparticules. Cette réactivité de surface des nano-oxydes de fer vis-à-vis des ions en solution sera discutée dans le chapitre III en terme de différenciation des sites de surface et de capacité d'adsorption de l'arsenic trivalent.

❖ ❖ ❖

4. Bilan du chapite I

Ce premier chapitre a permis de situer la thèse dans le contexte actuel des nanotechnologies, c'est-à-dire à mi-chemin entre une nouvelle révolution technologique et une nouvelle source de toxicité. C'est dans cet esprit que nos travaux ont été menés. Pour cela la suite de ce manuscrit va suivre les deux axes suivants:

❖ La compréhension des propriétés de surface et de la réactivité des nanoparticules ultrafines avec leur environnement. Cette réactivité de surface jouera un rôle important dans les applications environnementales (ex : dépollution des eaux de surface et des déchets liquides) mais également lors de l'interaction des nanoparticules avec les organismes vivants.

❖ L'étude des effets biologiques des nanoparticules manufacturées sur l'Homme et l'Environnement. Afin d'obtenir des réponses en termes de mécanismes potentiellement toxiques, les nanoparticules étudiées (nano-oxydes : Fe_3O_4, γ-Fe_2O_3, CeO_2 ; nanoparticules métalliques : Fe°) seront finement caractérisées. Puis nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

Comment évoluent les **propriétés physico-chimiques** des nanoparticules (stabilité colloïdale, cristallinité, propriétés de surface, spéciation des atomes de surface) dans les **milieux cellulaires et biologiques** ?

Peut-on corréler les **mécanismes physico-chimiques** et les réponses **cyto- et génotoxiques** ?

❖ ❖ ❖

5. Références bibliographiques

Afsset, 2006. Les nanomateriaux. effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. n°2005-010

Agius, R. and Oberdorster, G., 1995. Airborne pollutants and acute health effects. The Lancet, 345(8952): 799.

Al-Abadleh, H.A. and Grassian, V.H., 2003. Oxide surfaces as environmental interfaces. Surface Science Reports, 52(3-4): 63.

Auffan, M., Shipley, H., Yean, S., Kan, A.T., Tomson, M., Rose, J. and Bottero, J.Y., 2007. Nanomaterials as adsorbant, in Environmental nanotechnology - applications and impacts of nano-materials, New York.

Bailey, D.A., Jones, C.D., Barron, A.R. and Wiesner, M.R., 2000. Characterization of alumoxane-derived ceramic membranes. Journal of Membrane Science, 176(1): 1.

Banerjee, S.S. and Chen, D.-H., 2007. Fast removal of copper ions by gum arabic modified magnetic nano-adsorbent. Journal of Hazardous Materials, 147(3): 792.

Banfield, J.F. and Navrotsky, A., 2001. Nanoparticles and the environment. Reviews in mineralogy and geochemistry. Geochimica et Cosmochimica Acta, 67, Washington DC, 1753 pp.

Bottero, J.Y., Arnaud, M., Villieras, F., Michot, L., De Donato, P. and François, M., 1993. Surface and textural heterogeneity of fresh hydrous ferric oxides in water and in dry state. Journal of Colloids and Interface Science., 159: 45-52.

Bottero, J.Y., Cases, J.M., Fiessinger, F. and Poirier, J.E., 1980. Studies of hydrolyzed aluminum chloride solutions. 1. Nature of aluminum species and composition of aqueous solutions. Journal of Physical Chemistry, 84(22): 2933–2937.

Bottero, J.Y., Manceau, A., Villieras, F. and Tchoubar, D., 1994. Structure and mechanisms of formation of FeOOH(Cl) polycations. Langmuir, 10(1): 316-320.

Bottero, J.Y., Rose, J. and Wiesner, M.R., 2006. Nanotechnologies: tools for sustainability in a new wave of water treatment processes. Integrated Environmental Assessment and Management, 2(4): 391-395.

Bottero, J.Y., Tchoubar, D., Cases, J.M. and Fiessinger, F., 1982. Investigation of the hydrolysis of aqueous solutions of aluminum chloride. 2. Nature and structure by small-angle x-ray scattering. Journal of Physical Chemistry, 86(18): 3667-3673.

Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J.O., 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 56(11): 1649.

Chang, Y.-C., Chang, S.-W. and Chen, D.-H., 2006. Magnetic chitosan nanoparticles: Studies on chitosan binding and adsorption of Co(II) ions. Reactive and Functional Polymers, In Press, Corrected Proof.

Chang, Y.-C. and Chen, D.-H., 2005. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. Journal of Colloid and Interface Science, 283(2): 446.

Chemseddine, A., Fieber-Edmann, M., Holub-Krappe, E. and Boulmaaz, S., 1997. EXAFS study of functionnalized nanoclusters and nanocluster assemblies. Z. Phys D, 40: 566-569.

Cheng, B.P., Kong, J., Luo, J. and Dong, Y., 1993. Relation of structure stability and Debye temperature to crystal size of nanometer sized TiO2 powders. Material Science Progress, 7: 240-243.

Chiang, C.-W., Wang, A. and Mou, C.-Y., 2006. CO oxidation catalyzed by gold nanoparticles confined in mesoporous aluminosilicate Al-SBA-15: Pretreatment methods. Catalysis Today, 117(1-3): 220.

Choe, S., Chang, Y.-Y., Hwang, K.-Y. and Khim, J., 2000. Kinetics of reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron. Chemosphere, 41(8): 1307.

Chunfu, Z., Jinquan, C., Duanzhi, Y., Yongxian, W., Yanlin, F. and Jiaju, T., 2004. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. Applied Radiation and Isotopes, 61(6): 1255.

Corot, C., Robert, P., Idee, J.-M. and Port, M., 2006. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. Advanced Drug Delivery Reviews, 58(14): 1471.

Cortalezzi, M.M., Rose, J., Barron, A.R. and Wiesner, M.R., 2002b. Characteristics of ultrafiltration ceramic membranes derived from alumoxane nanoparticles. Journal of Membrane Science, 205(1-2): 33.

Cortalezzi, M.M., Rose, J., Wells, G.F., Bottero, J.-Y., Barron, A.R. and Wiesner, M.R., 2003. Ceramic membranes derived from ferroxane nanoparticles: a new route for the fabrication of iron oxide ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science, 227(1-2): 207.

Emerich, D.F. and Thanos, C.G., 2006. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. Biomolecular Engineering, 23(4): 171.

ETC group, 2002. No small matter! Nanotech particles penetrate living cells and accumulate in animal organs. Communiqué(76).

Fahlvik, A.K. and Klaveness, J., 1993. Iron-oxides as MR Imaging contrast agents. Journal of magnetic resonance imaging, 3(1): 187-194.

Feynman, R., december 29, 1959. There's plenty of room at the bottom. speech presented at the annual meeting of the American Physical Society.

Flytzani-Stephanopoulos, M., 2001. Nanostructured cerium oxide "ecocatalysts". MRS Bulletin, 26: 885-889.

Fortner, J.D., Lyon, D.Y., Sayes, C.M., Boyd, A.M., Falkner, J.C., Hotze, M., Alemany, L.B., Tao, Y., Guo, W., Ausman, K.D., Colvin, V. and Hugues, J.B., 2005. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. Environmental Science & Technologie, 39: 4307-4316.

Gavaskar, A., Tatar, L. and Condit, W., 2005. Cost and performance report: nanoscale zero-valent ion technologies for source remediation. CR-05-007-ENV, Naval facilities engineering command, Port Hueneme.

Goetze, T., Gansau, C., Buske, N., Roeder, M., Gornert, P. and Bahr, M., 2002. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252: 399.

Gupta, A.K. and Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 26(18): 3995.

Halbreich, A., Roger, J., Pons, J.N., Gelwerth, D., DaSilva, M.F., Roudier, M. and Bacri, J.C., 1998. Biomedical applications of maghemite ferrofluid. Biochimie, 80: 379-390.

Hu, J., Chen, G. and Lo, I.M.C., 2005. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. Water Research, 39(18): 4528.

Huang, S.-H., Liao, M.-H. and Chen, D.-H., 2003. Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. Separation and Purification Technology, In Press, Corrected Proof.

Huczko, M.M. and Lange, H., 2001. Carbon nanotubes: experimental evidence of null risk of skin irritation and allergy. Fullerene Science Technologie, 9: 247-250.

Johnson, D.B. and Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. Science of The Total Environment, 338(1-2): 3.

Jolivet, J.P., Gzara, M., Mazieres, J. and Lefebvre, J., 1985. Physicochemical study of aggregation in silver colloids. Journal of Colloid and Interface Science, 107(2): 429.

Jones, C.D., Fidalgo, M., Wiesner, M.R. and Barron, A.R., 2001. Alumina ultrafiltration membranes derived from carboxylate-alumoxane nanoparticles. Journal of Membrane Science, 193(2): 175.

Kanel, S.R., Manning, B., Charlet, L. and Choi, H., 2005. Removal of Arsenic(III) from Groundwater by Nanoscale Zero-Valent Iron. Environmental Science & Technologie, 39(5): 1291-1298.

Kim, D., El-Shall, H., Dennis, D. and Morey, T., 2005. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. Colloid Surface B, 40(2): 83.

Kreuter, J., 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. Advanced Drug Delivery Reviews, 47(1): 65.

Kreuter, J., 2005. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. International Congress Series, 1277: 85.

Krueger, D.A., 1979. Theoretical estimates of equilibrium chain lengths in magnetic colloids. Journal of Colloid and Interface Science, 70(3): 558.

Kruis, F.E., Fissan, H. and Peled, A., 1998. Synthesis of nanoparticles in the gas phase for electronic, optical and magnetic applications--a review. Journal of Aerosol Science, 29(5-6): 511.

Kwok, K.S. and Ellenbogen, J.C., 2002. Moletronics: future electronics. Materials Today, 5(2): 28.

Lacava, L.M., Lacava, Z.G.M., Azevedo, R.B., Chaves, S.B., Garcia, V.A.P., Silva, O., Pelegrini, F., Buske, N., Gansau, C., Da Silva, M.F. and Morais, P.C., 2002. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252: 367.

Liao, M.-H., Wu, K.-Y. and Chen, D.-H., 2003. Fast removal of basic dyes by a novel magntic nano-adsorbent. chemistry Letters, 32(6): 488-489.

Liu, T., Guo, L., Tao, Y., Hu, T.D., Xie, Y.N. and Zhang, J., 1999. Bondlength alternation of nanoparticles Fe2O3 coated with organic surfactants probed by EXAFS. Nanostructured Materials, 11(8): 1329.

Liu, Y., Choi, H., Dionysiou, D. and Lowry, G.V., 2005. Trichloroethene Hydrodechlorination in Water by Highly Disordered Monometallic Nanoiron. Chemistry of Materials, 17(21): 5315.

Liu, Y., O'Brien, S.C., Zhang, Q., Heath, J.R., Tittel, F.K., Curl, R.F., Kroto, H.W. and Smalley, R.E., 1986. Negative carbon cluster ion beams: New evidence for the special nature of C60. Chemical Physics Letters, 126(2): 215.

Lowry, G.V. and Johnson, K.M., 2004. Congener-Specific Dechlorination of Dissolved PCBs by Microscale and Nanoscale Zerovalent Iron in a Water/Methanol Solution. Environmental Science & Technologie, 38(19): 5208-5216.

Maiti, A., Gee, R.H., Maxwell, R. and Saab, A.P., 2007. Hydrogen catalysis and scavenging action of Pd-POSS nanoparticles. Chemical Physics Letters, 440(4-6): 244.

Manning, C.B., Vallyathan, V. and Mossman, B.T., 2002. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. International Immunopharmacology, 2(2-3): 191.

Mayo, J.T., Yavuz, C., Yean, S., Cong, L., Shipley, H., Yu, W., Falkner, J., Kan, A., Tomson, M. and Colvin, V.L., 2007. The effect of nanocrystalline magnetite size on arsenic removal. Science and Technology of Advanced Materials, 8(1-2): 71.

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environment International, 32(8): 967.

Ngomsik, A.-F., Bee, A., Draye, M., Cote, G. and Cabuil, V., 2005. Magnetic nano- and microparticles for metal removal and environmental applications: a review. Comptes Rendus Chimie, 8(6-7): 963.

Oberdörster, E., 2004. Manufactured nanomaterials (fullerene, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. Environmental Health Perspective, 112: 1058-1062.

Oberdörster, G., 2000. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 358(1775): 2719.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives, 113(7).

Pereira de Abreu, D.A., Paseiro Losada, P., Angulo, I. and Cruz, J.M., 2007. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. European Polymer Journal, 43(6): 2229.

Riu, J., Maroto, A. and Rius, F.X., 2006. Nanosensors in environmental analysis. Talanta, 69(2): 288.

Robichaud, C.O., Tanzil, D., Weilenmann, U. and Wiesner, M.R., 2005. Relative Risk Analysis of Several Manufactured Nanomaterials: An Insurance Industry Context. Environmental Science & Technologie, 39(22): 8985-8994.

Rocco, M.C., 2001. International strategy for nanotechnology research and development. Journal of Nanoparticle Research, 3(5-6): 353-360.

Rose, J., Cortalezzi-Fidalgo, M.M., Moustier, S., Magnetto, C., Jones, C.D., Barron, A.R., Wiesner, M.R. and Bottero, J.Y., 2002. Synthesis and Characterization of Carboxylate-FeOOH Nanoparticles (Ferroxanes) and Ferroxane-Derived Ceramics. Chem. Mater., 14(2): 621-628.

Rostovshchikova, T.N., Smirnov, V.V., Kozhevin, V.M., Yavsin, D.A., Zabelin, M.A., Yassievich, I.N. and Gurevich, S.A., 2005. New size effect in the catalysis by interacting copper nanoparticles. Applied Catalysis A: General, 296(1): 70.

Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discovery Today, 8(24): 1112.

Sayes, C.M. and Colvin, V., 2004. The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes. Nano Letter, 4: 1881-1887.

Smalley, R.E. and Yakobson, B.I., 1998. The future of the fullerenes. Solid State Communications, 107(11): 597.

Stipp, S.L.S., Hansen, M., Kristensen, R., Hochella, J.M.F., Bennedsen, L., Dideriksen, K., Balic-Zunic, T., Leonard, D. and Mathieu, H.J., 2002. Behaviour of Fe-oxides relevant to contaminant uptake in the environment. Chemical Geology, 190(1-4): 321.

Tronc, E., Jolivet, J.P. and Massart, R., 1982. Defect spinel structure in iron oxide colloids. Materials Research Bulletin, 17(11): 1365.

Uheida, A., Salazar-Alvarez, G., Bjorkman, E., Yu, Z. and Muhammed, M., 2006. Fe3O4 and [gamma]-Fe2O3 nanoparticles for the adsorption of Co2+ from aqueous solution. Journal of Colloid and Interface Science, In Press, Corrected Proof.

Wang, C.-T. and Ro, S.-H., 2006. Surface nature of nanoparticle gold/iron oxide aerogel catalysts. Journal of Non-Crystalline Solids, 352(1): 35.

Wareight, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A. and Webb, T.R., 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicology Science, 77(1): 117-125.

Wei-xian, Z., 2003. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. J. Nanoparticle Research, V5(3): 323.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V. and Alvarez, P.J.J., 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. Environmental Science & Technologie, 40(14): 4337-4445.

Xu, X.Q., Shen, H., Xu, J.R., Xu, J., Li, X.J. and Xiong, X.M., 2005. Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. Applied Surface Science, 252(2): 494.

Yamaura, M., Camilo, R.L. and Felinto, M.C.F.C., 2002. Synthesis and performance of organic-coated magnetite particles. Journal of Alloys and Compounds, 344(1-2): 152.

Yean, S., Cong, L., Yavuz, C.T., Mayo, J.T., Yu, W.W., Kan, A.T., Colvin, V.L. and Tomson, M.B., 2005. Effect of magnetic particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenate. Journal of Material Research, 20: 3255-3264.

Zhang, H. and Banfield, J.F., 1998. Thermodynamic analysis of phase stability of nanocristalline titania. Journal of Material Chemistry, 8: 2073-2076.

Zhang, H., Penn, R.L., Hamers, R.J. and Banfield, J.F., 1999. Enhanced Adsorption of Molecules on Surfaces of Nanocrystalline Particles. Journal of Physical Chemistry B, 103(22): 4656.

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

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-maghémites 35
1.1.2 Les nanoparticules de Fe° (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-maghémites à pH neutre et force ionique elevée 41
1.5 Bilan des principales cararctéristiques des nanoparticules étudiées 43
2. Les modèles biologiques et tests de cyto- génotoxicité **44**
2.1 *Escherichia coli* 44
2.1.1 Culture bactériene 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**

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

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** ($Fe_3^{2+/3+}O_4$), les **nano-maghémites** ($Fe_2^{3+}O_3$), 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).

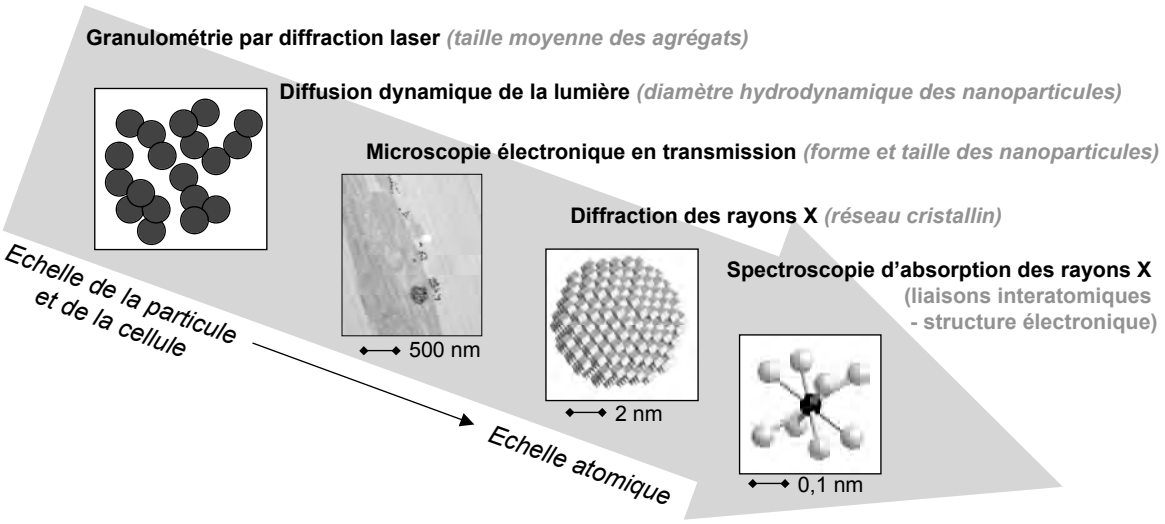


Figure II. 1 : techniques employées pour la caractérisation physico-chimique des nanoparticules manufacturées.

L'étude de l'impact biologique des nanoparticules manufacturées a été menée en **condition *in vitro***. Cette approche toxicologique *in vitro* est la plus adpatée 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 selectionnés, 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. Caractérisation des nanoparticules manufacturées

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-maghémites

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 ($FeCl_3,6H_2O$ et $FeCl_2,4H_2O$) avec un rapport Fe^{3+}/Fe_{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 : $[Fe^{3+}]_{Td}[Fe^{3+}Fe^{2+}]_{Oh}O_4$ (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-maghémites** 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 acqueuse. Des lacunes cationiques se créent afin que la balance des charges soit respectée. Cette réaction s'écrit de la manière suivante :

$$[Fe^{3+}]_{Td}[Fe^{3+}Fe^{2+}]_{Oh}O_4 + 2H^+ \rightarrow 0.75\ [Fe^{3+}]_{Td}[Fe_{5/3}{}^{3+}V_{1/3}]_{Oh}O_4 + Fe^{2+} + H_2O$$

Les nano-maghémites 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 tétrahédriques (Td) et octahédriques (Oh) selon la formule suivante : $[Fe^{3+}]_{Td}[Fe_{5/3}{}^{3+}V_{1/3}]_{Oh}O_4$ (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 $FeCl_3$ avec 0.16M de $NaBH_4$. L'équation de la réaction est la suivante (Joo et al., 2004 ; 2005 ; Wang et al., 1997) :

$$Fe(H_2O)_6^{3+} + 3BH^- + 3H_2O \rightarrow Fe° + 3B(OH)_3 + 10.5H_2$$

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 (N_2).

1.1.3 Les nano-CeO_2

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 $Ce^{4+}(NO_3^-)_4$ (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 : $CeO_2(HNO_3)_{0.5}(H_2O)_4$ Comme les nano-maghémites, les nano-CeO_2 sont stockées à pH acide et seront chimiquement stables en solution.

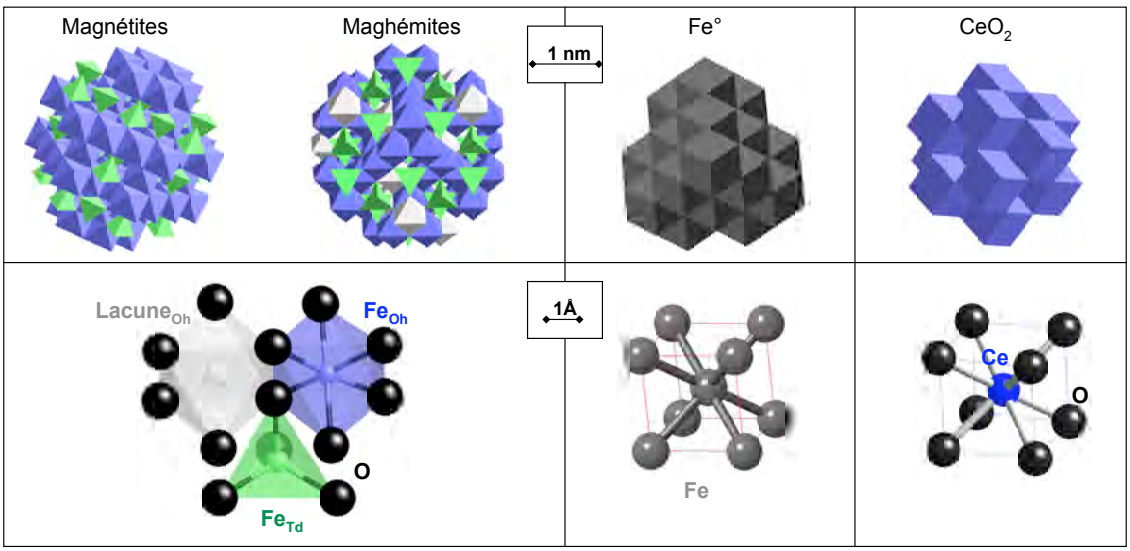


Figure II. 2 : structure cristalline des nanoparticules étudiées.

1.2 Forme, dimension et cristallinité

Les nano-magnétites et les nano-maghémites. 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-maghémites a été mesurée à 174 m^2/g par adsorption de N_2 suivi d'une analyse BET (Brunnauer, Emmet, Teller).

La distribution des diamètres hydrodynamiques (D_H) des nano-maghémites 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'apparraissent 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 Fe°, 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 m^2/g par adsorption de N_2 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-CeO_2. À l'inverse des nZVI, la suspension de nano-CeO_2 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 m^2/g par l'analyse de la limite de Porod obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles (Spalla et al., 1993 ; 1997)

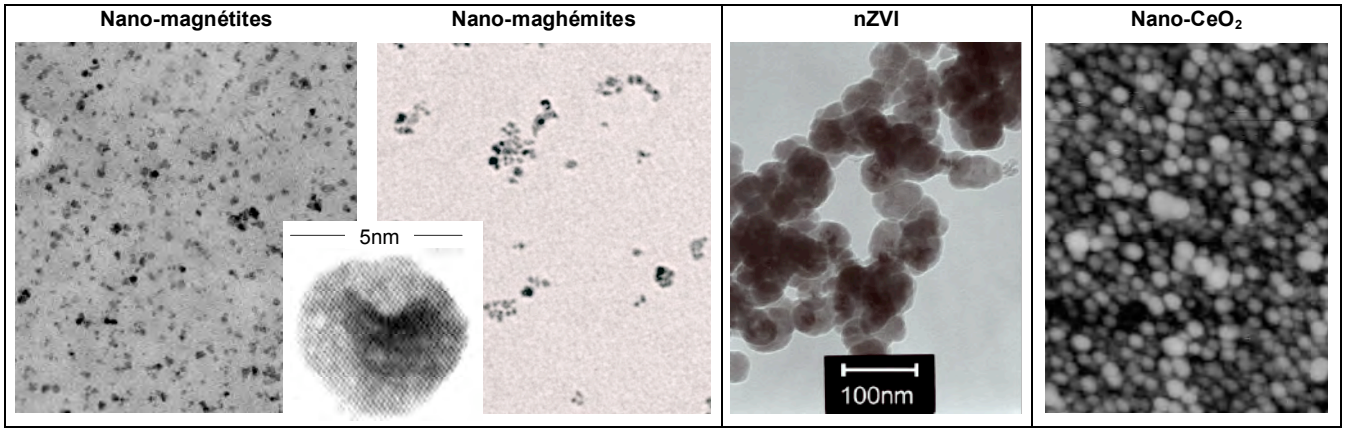


Figure II. 3 : observation microscopique des nanoparticules étudiées.

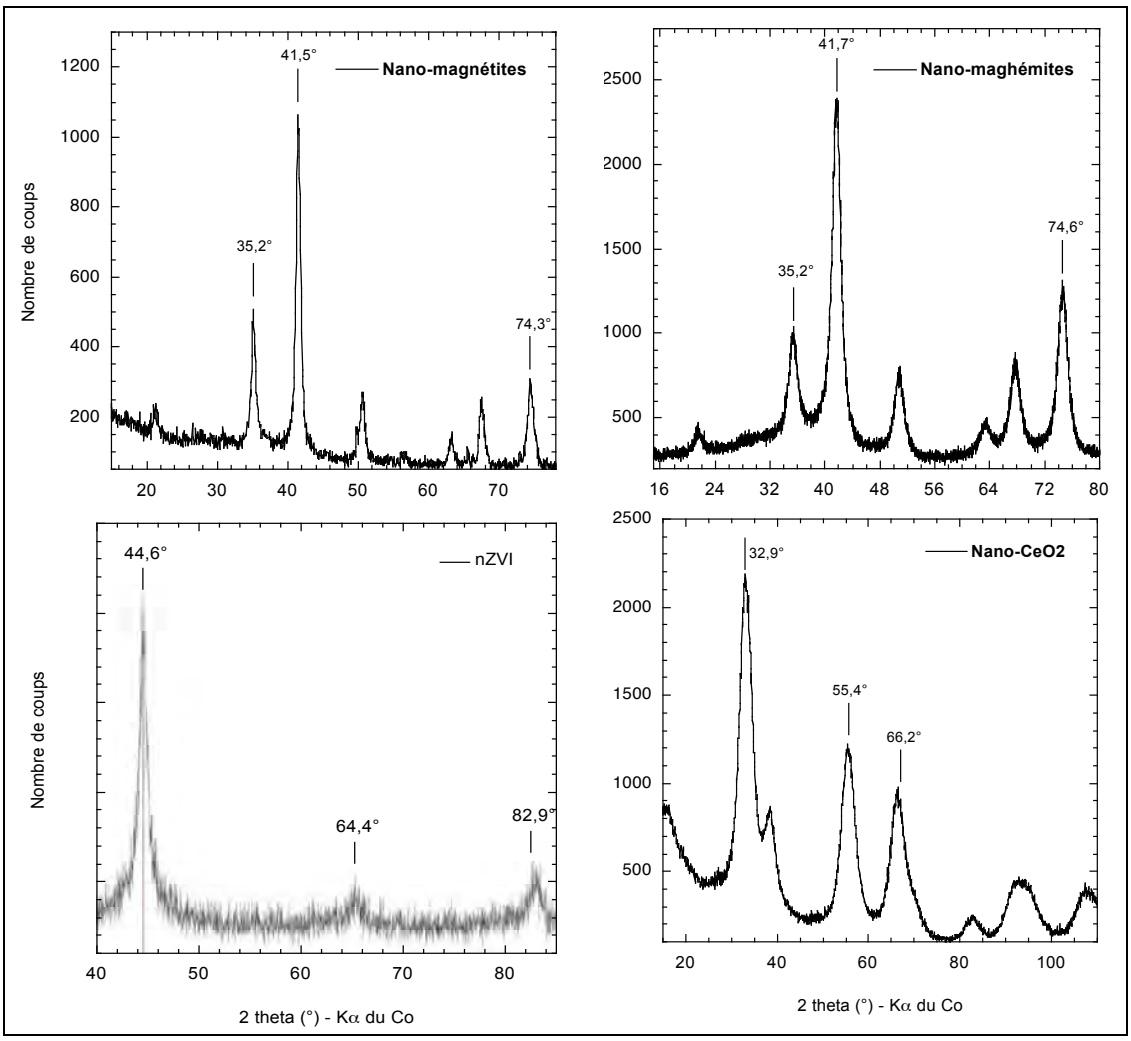


Figure II. 4 : diffractogramme des nanoparticules étudiées et position des pics de diffraction des minéraux de référence.

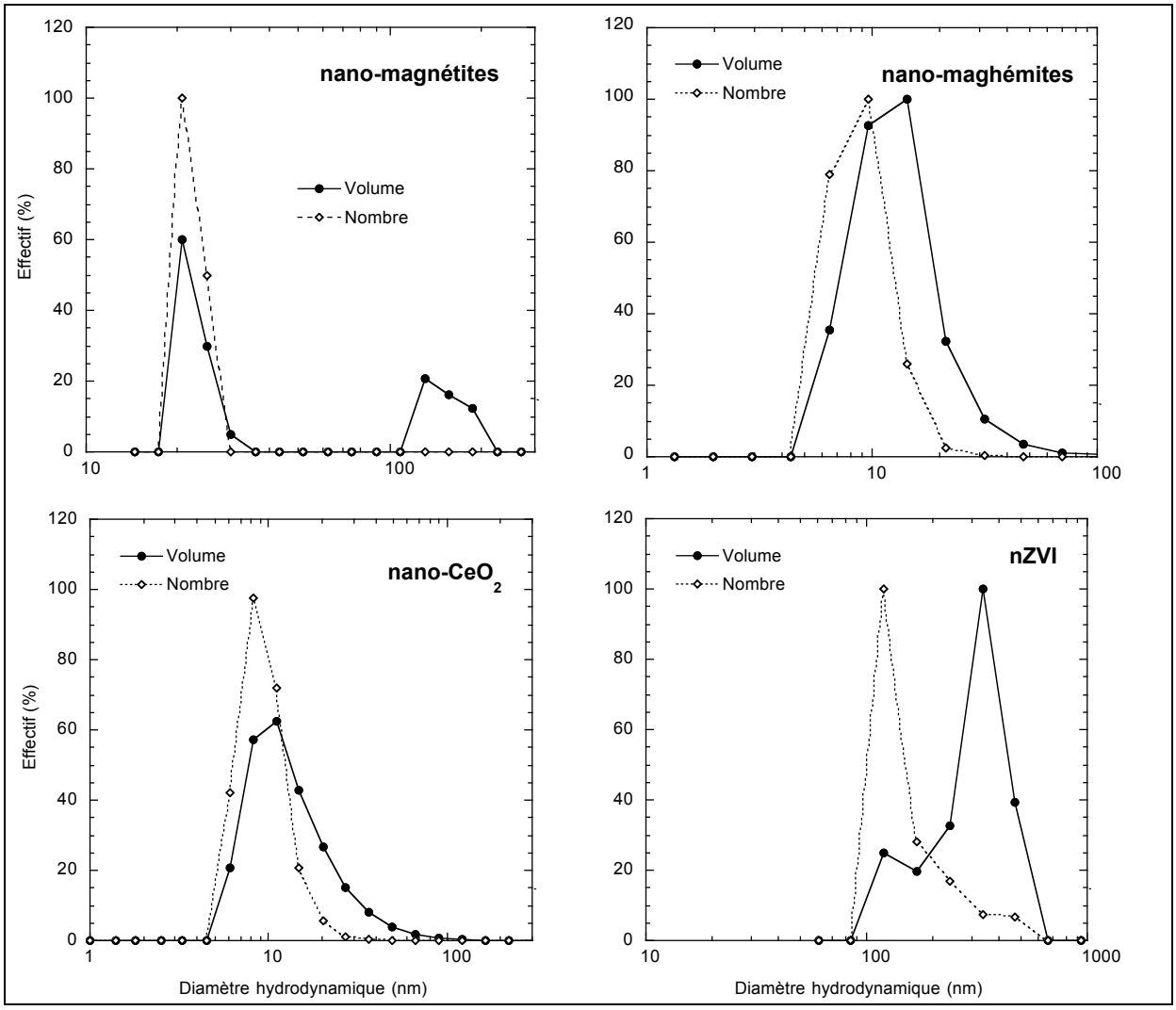


Figure II. 5 : diamètres hydrodynamiques des nanoparticules dans leur solution-mère mesurés par diffusion dynamique de la lumière.

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 propable que les nanoparticules s'aggrègent. Dans le cas des cultures bactériennes, il est possible de moduler leur environement 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 $CaCl_2$ 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 pH<4,7, elles sont stables avec un D_H moyen ne dépassant pas les 150 nm. En revanche dès 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 pH=5,2-5,7, leurs D_H moyens ne dépassent pas les 30-40 nm. Mais au-delà de ce pH, l'agrégation 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 pH=6.4 avec un D_H de 400 nm en moyenne.

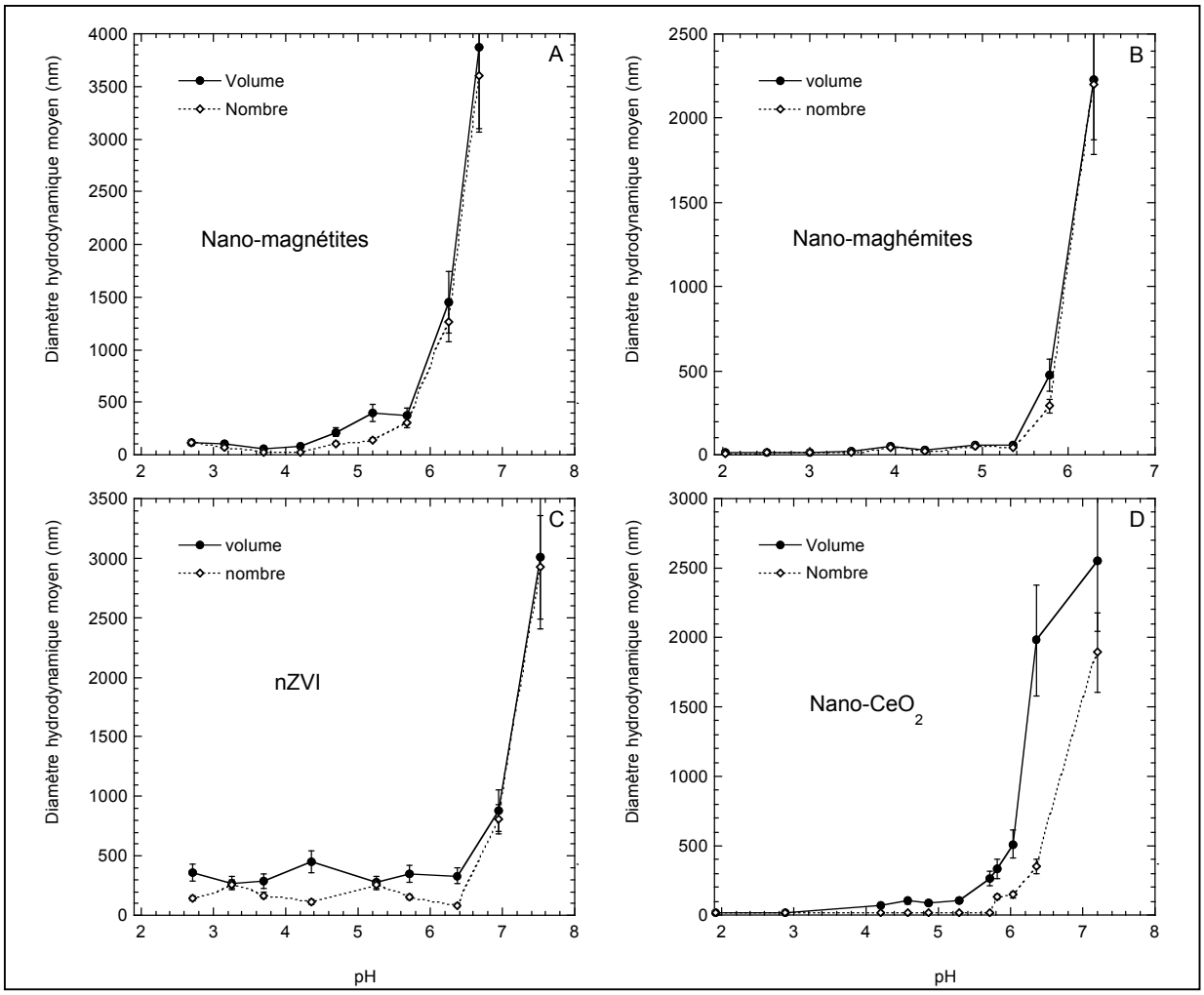


Figure II. 6 : stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction du pH (FI = 10^{-3} mol/L de NaCl).

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-maghémites 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-maghémites. De même que pour les résutats 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-maghémites	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 enrobants de molécules organiques.

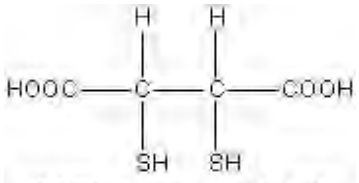
1.4 Stabilisation des nano-maghémites à pH neutre et force ionique elevée

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler avec les nano-maghémites 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-maghémites sont couramment utilisées dans les applications biomédicales avec des molécules greffées à la surface.

Un moyen de limiter l'agrégation des nano-maghémites 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-maghémites ont été enrobées d'un composé organique anionique à pH neutre : l'acide 2,3-

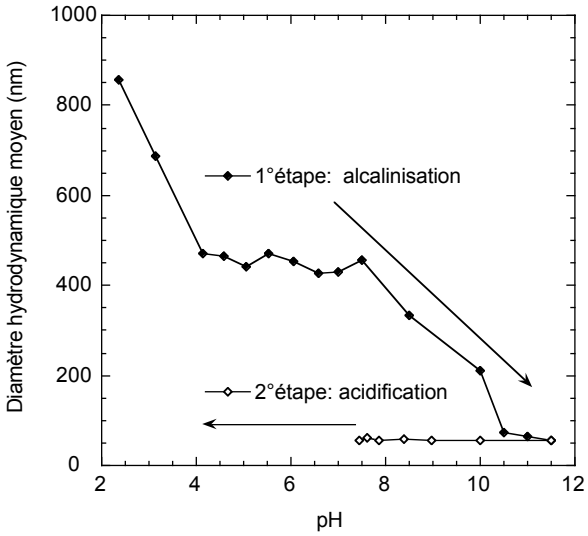
dimercaptosuccinique (DMSA). Dans la suite de cette étude les nano-maghémites enrobées de DMSA seront appelées NmDMSA.

Cet enrobant a été choisi pour deux raisons principales. Tout d'abord c'est un composé qui est non-toxique. Le DMSA est notament 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).



pKa_{COOH} = 2,71 et 3,43
pKa_{SH} = 9,65 et 12,05 (Crisponi et al., 2002)

Le protocole d'enrobage des nano-maghémites avec le DMSA a été adpaté 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-maghémites. À la fin de cette alcalinisation, les nano-maghémites sont bien dispersées (D_H = 40±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-maghémites (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±0,02Å (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.



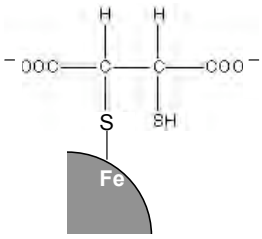


Figure II. 7 : évolution du diamètre de nano-maghémites lors de l'enrobage avec le DMSA.

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 aggrégats de plus de 3 µm à pH=7, les NmDMSA sont stables et leur D_H moyen est de 40±5 nm. Cette gamme de stabilité est large et s'étend de pH=3 à 11 (Figure II.8). De même, alors que les maghémites étaient fortement déstabilisées pour une concentration en NaCl de 0,04 mol/L, les NmDMSA seront stables jusqu'à 0,25 mol/L de NaCl (Figure II.8).

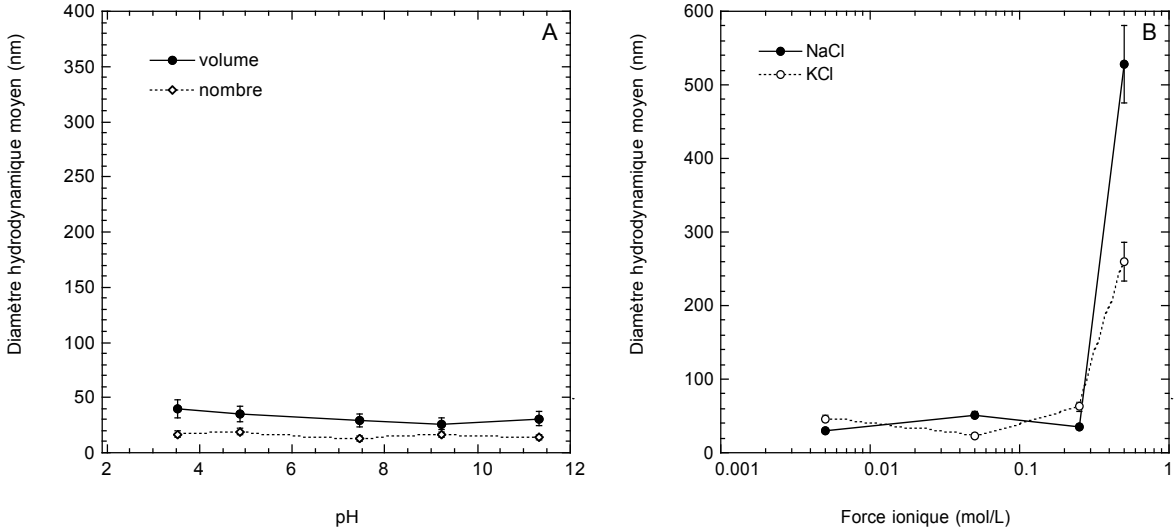


Figure II. 8 : stabilité colloïdale des nano-maghémites enrobées de DMSA (A) en fonction du pH pour une force ionique de 10^{-3} mol/L de NaCl et (B) en fonction de la concentration en sels à pH=7.4.

1.5 Bilan des principales cararctéristiques des nanoparticules étudiées

La table II.2 résume les principales caractérisques 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° + oxyde de Fe, B
Etat d'oxydation	Fe^{2+} et Fe^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{3+}	Ce^{4+}	Fe°
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 bactériene

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, chloramphénycol). 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 interêt 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 µL de dilutions successives des suspensions bactériennes ayant incubées ou non avec les nanoparticules sont encemencés 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.

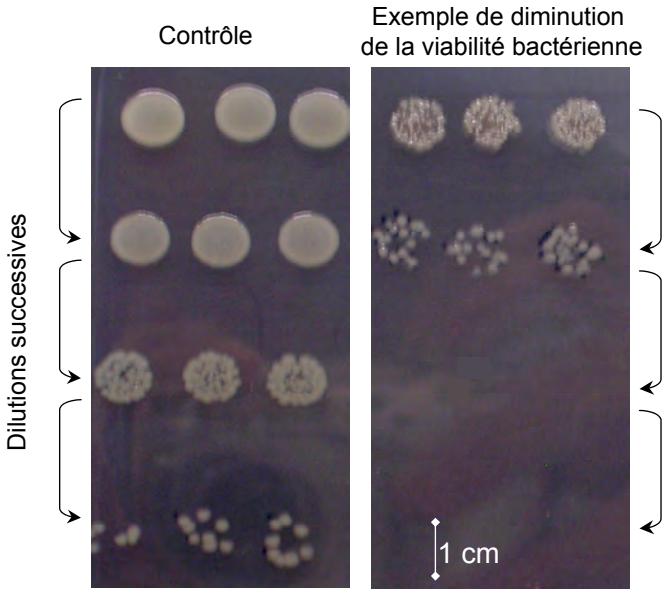


Figure II. 9 : colonies bactériennes poussant sur le milieu nutritif solide.

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 découpés en morceaux de 0.5-1mm^3 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 CO_2.

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/streptomicine 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 ^{13}C (cf. annexe 2).

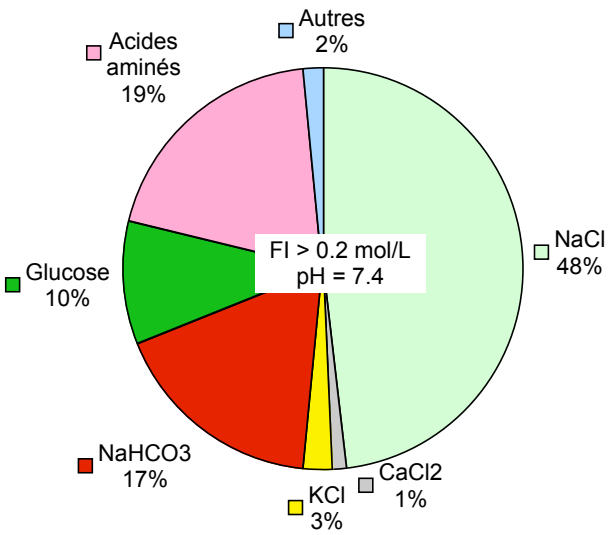


Figure II. 10 : composition du DMEM complémenté (% molaire).

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 boite à une autre au moyen de la trypsine n'a jamais dépassé 6 décollements/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-tetrazolium 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.

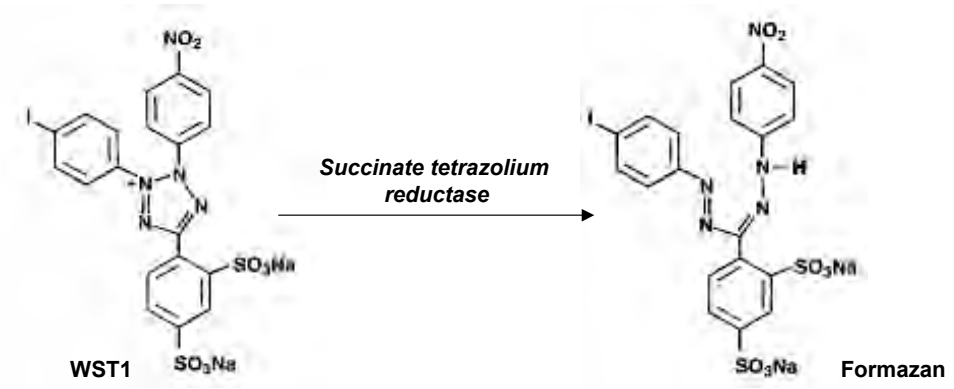


Figure II. 11 : principe du test WST-1.

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 CO_2. 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).

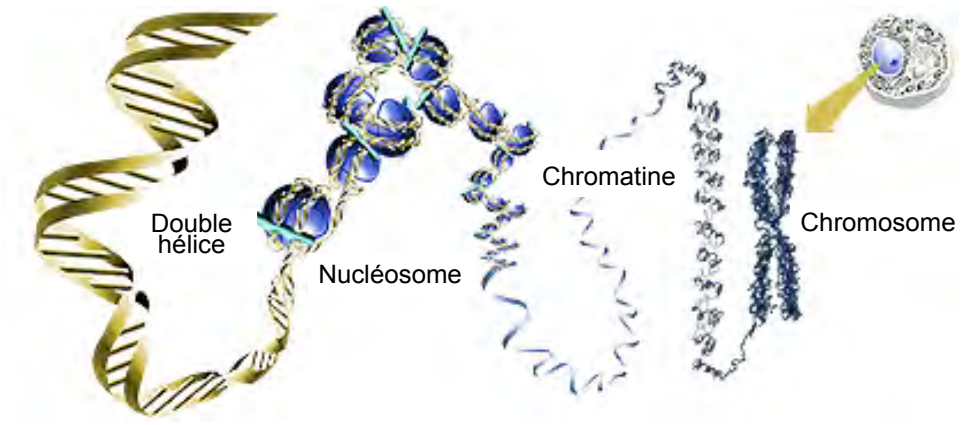


Figure II. 12 : de l'ADN au chromosome. (http://membres.lycos.fr/coursgenetique)

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).

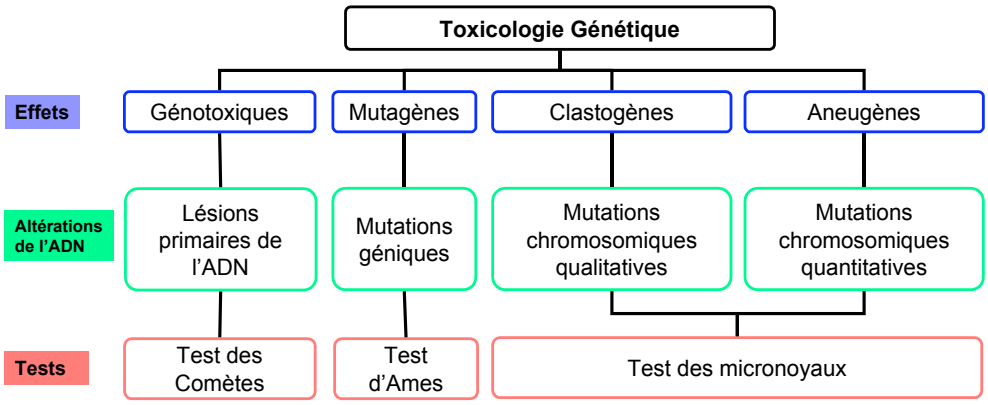


Figure II. 13 : tests de génotoxicité effectués en fonction des altérations possibles de l'ADN en termes de lésions primaires, de mutations géniques, chromosomiques et génomiques.

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^+.

$$His^- \xrightarrow{agent.génotoxique} His^+$$

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 précédemmment 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 binuclées sont obtenus par blocage de la division cytoplasmique avec la cytochalasine B. Puis une coloration du cytosquelette avec de la Phalloidine 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 binuclées 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.

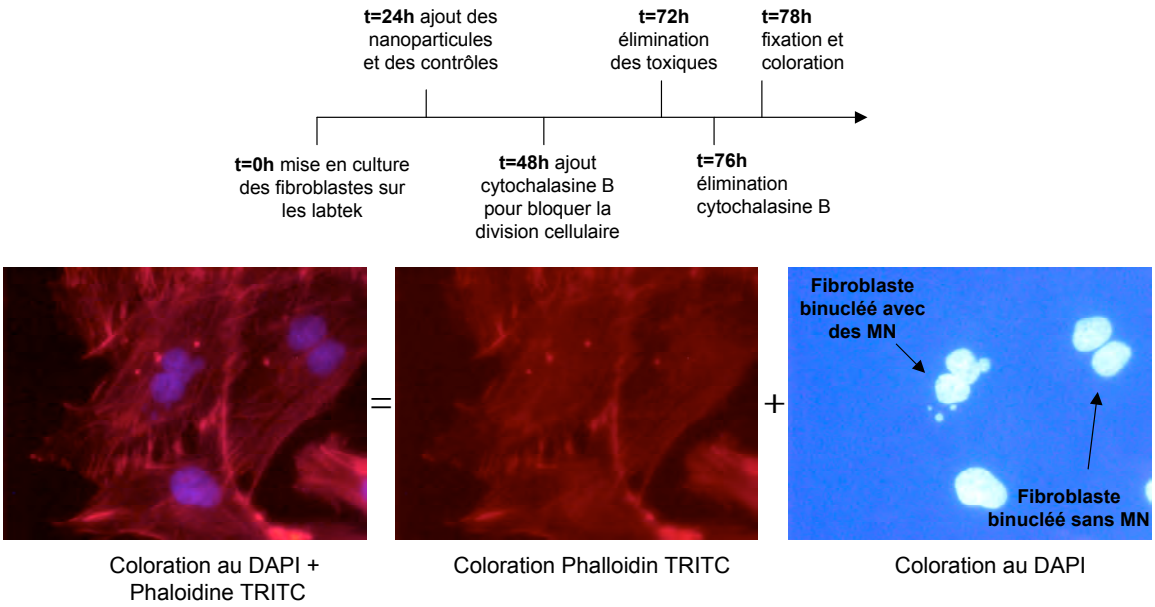


Figure II. 14 : fibroblastes binucléées avec ou sans micronoyaux observées au microscope à fluorescence après coloration.

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 visualier 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).

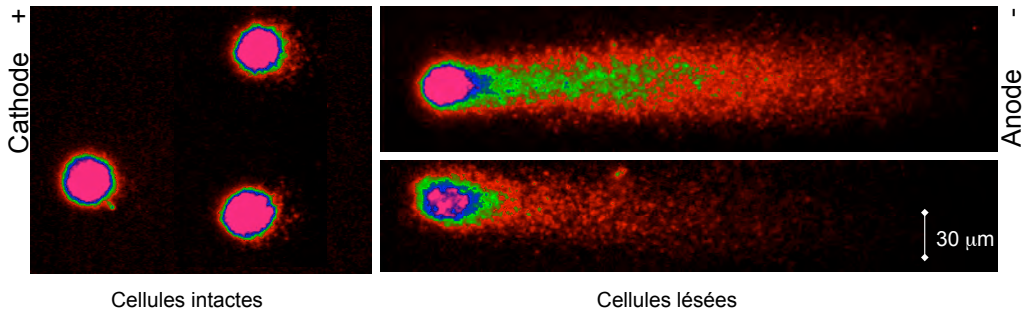


Figure II. 15 : cellules intactes et lésées observées au microscope à fluorescence (x250) lors du test des Comètes.

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 cœfficient de diffusion des particules qui sont converties en distribution de taille à l'aide de l'équation de Stockes- Einstein :

$$< D >= \frac{kT}{6\pi\eta < R >}$$

Avec : <D> : coefficient de diffusion

<R> : 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 Nanotrac 250 (Microtrac). Comme la PCS, elle permet une analyse granulométrique dans une gamme de 3nm à 3μm 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 100μm de la sonde) dont le mouvement brownien modifie la fréquence de l'onde. La lumière est aussi réfléchie 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 dodeceny1 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 ($\lambda_{K\alpha}$=1,79Å) 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 cristalographiques...). 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 nano-maghémites. 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 $h\upsilon$ (avec h la constante de Plank et υ 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) :

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

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 considété. 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_O, 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.

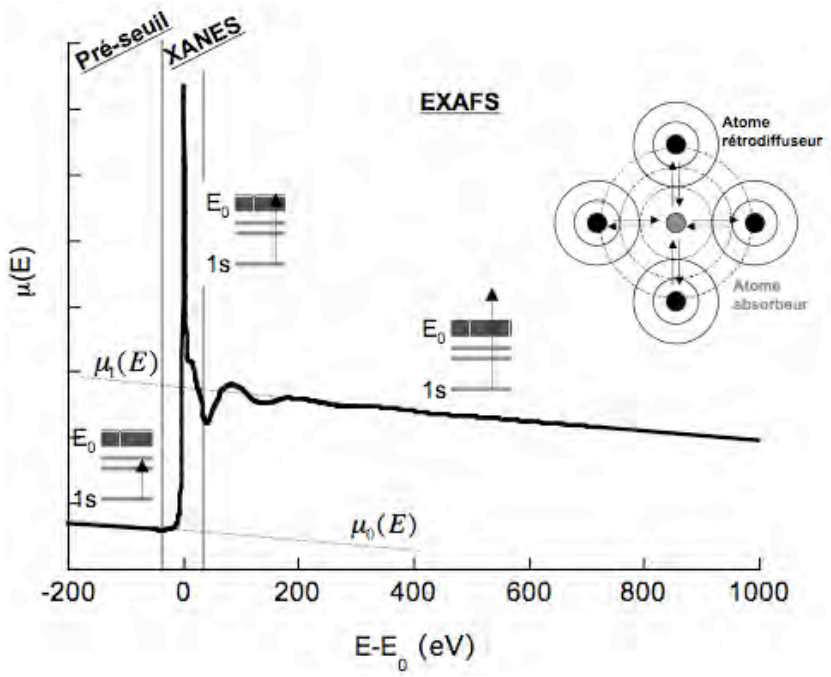


Figure II. 16 : spectre XAS de As_2O_3 enregistré au seuil K de l'arsenic.

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_O, 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 prés du seuil renseignent sur la **coordinance** 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 rétrodiffuséé 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 aborbeur-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 :

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

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

$\left| f_i(\theta, k, R_i) \right|$: fonction d'amplitude de rétrodiffusion de l'atome i selon l'angle θ par rapport a 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.

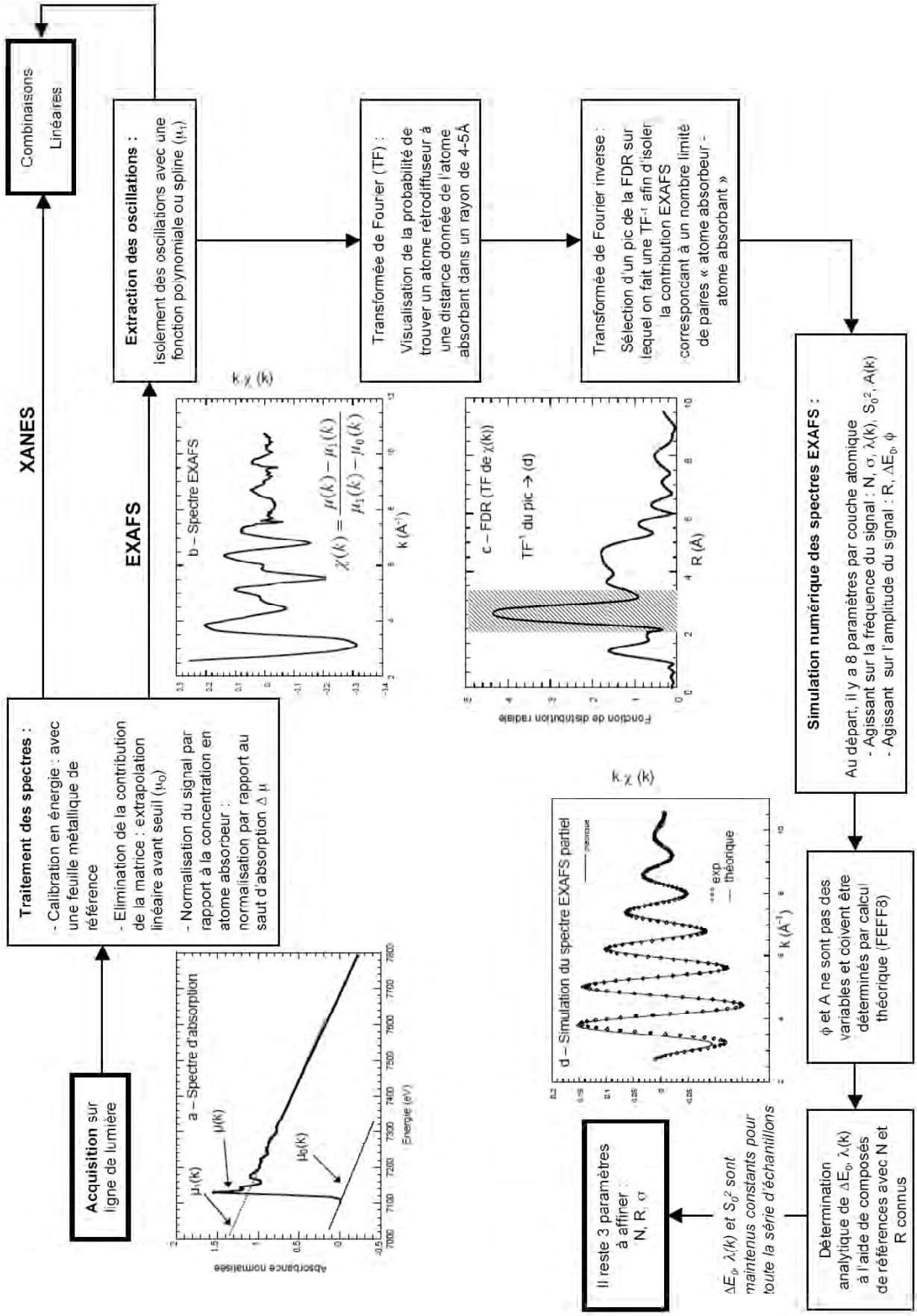


Figure II. 17 : organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS.

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).

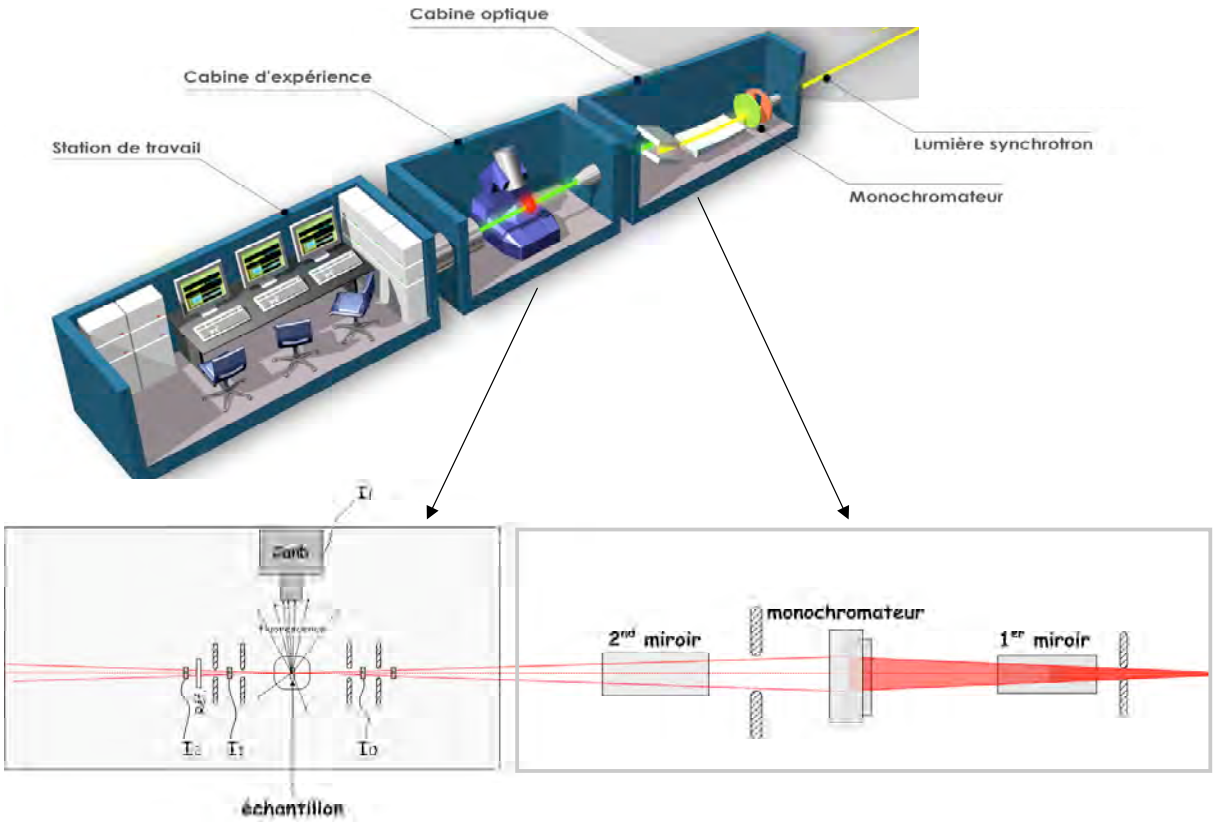


Figure II. 18 : schéma simplifié d'une ligne de lumière dédiée à la XAS (ex: du montage de la ligne FAME de l'ESRF) (www.esrf.fr et www.synchrotron-soleil.fr).

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 énérgie

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-maghémites	Nano-maghémites 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 indivuelle 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-Genotoxical 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 Sainctavit, 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, propertiesn reactions, occurence 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. Especes reactives 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]-Fe2O3 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]-Fe2O3 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).

CHAPITRE III. REACTIVITE DE SURFACE DES NANOPARTICULES ULTRAFINES

- L'EFFET 'NANO' -

SOMMAIRE

CHAPITRE III. REACTIVITE DE SURFACE DES NANOPARTICULES ULTRAFINES – L'EFFET 'NANO' **71**
Résumé étendu de l'article **71**
1. Enhanced adsorption of arsenic onto maghemites : As^{III} as a probe of the surface structure and heterogeneity **74**
1.1 Introduction 74
1.2 Experimental section 76
1.2.1 Maghemite nanoparticles 76
1.2.2 Sorption experiments 77
1.2.3 Powder X-ray Diffraction 77
1.2.4 X-ray absorption experiments 77
1.3 Results and discussion 78
1.3.1 Adsorption of As^{III} onto *Nmag* 78
1.3.2 Arsenite adsorption sites as function of the surface coverage 79
1.3.3 Specificity of the arsenite adsorption mechanisms on ultrafine nanomaghemite. 84
1.4 Conclusion 88
2. Bilan du chapitre III **89**
3. Références bibliographiques **90**

CHAPITRE III. REACTIVITE DE SURFACE DES NANOPARTICULES ULTRAFINES – L'EFFET 'NANO'

Résumé étendu de l'article

Ce chapitre est consacré à la compréhension des propriétés de surface et de la réactivité des nanoparticules d'oxyde avec leur environnement. Comme nous l'avons montré dans le chapitre I, un des intérêts de l'utilisation des nanoparticules manufacturées dans les applications environnementales réside dans leur forte capacité de rétention de polluants. Des nano-oxydes de fer de 6nm de diamètre, peuvent retenir 10 fois plus d'ions en surface que des particules de 300 nm. Ceci est lié en partie à leur importante surface spécifique. Mais il serait réducteur d'expliquer cette capacité d'adsorption à la simple augmentation de la suface spécifique. En effet, un deuxième paramètre à prendre en compte est la forte réactivité de surface des nanoparticules (*i.e.* la capacité d'adsorption par nm^2 de surface).

Le cœur de ce chapitre est centré sur la réactivité de surface de nanoparticules d'oxydes de fer de diamètre inférieur à 10 nm. Cette problématique a vu le jour avec des études récentes révélant que bien que des oxydes de fer de taille microscopique retenaient en moyenne 1 à 4 atomes par nm^2 (Al-Abadleh et al., 2003 ; Sigg et al., 2000), des nano-magnétites ou nano-maghémites de 10 nm de diamètre pouvaient retenir jusqu'à 10 As^{III}/nm^2 (Yean et al., 2005), 13 As^{V}/nm^2 (Yean et al., 2005) ou encore 22 à 34 Co^{II}/nm^2 (Uheida et al., 2006). Ces études laissent supposer que les mécanismes d'adsorption à la surface de nanoparticules sont différents des mécanismes « classiques » se produisant à la surface de microparticules. Mais la nature de ces mécanismes et l'origine de cet effet 'nano' reste encore mal connu. L'objectif de ce chapitre a été de les identifier.

Pour cela, notre attention s'est portée sur les nano-maghémites qui présentent l'avantage d'être chimiquement stables en solution et d'avoir une structure spinelle symétrique qui facilite la compréhension des mécanismes structuraux se produisant en surface. L'arsenic trivalent a été choisi pour sonder la surface des nano-maghémites du fait de sa forte affinité pour la surface des oxydes de fer. Bien que l'adsorption de l'arsenic par les oxydes soit largement documentée dans littérature (*e.g.* Manceau et al., 1994 ; Waychunas et al., 1995 ; Wilkie et al. 1996 ; Manning et al., 1998 ; Roddick et al., 2001 ; Randall et al., 2001 ; Deliyanni et al., 2002) peu d'études ont concerné son adsorption à la surface de nanoparticules ultrafines. Pourtant, comme l'illustrera ce chapitre, nous ne pouvons pas faire un simple transfert des connaissances sur les réactions se produisant à l'interface microparticules/solution vers celles se produisant à l'interface nanoparticules/solution.

Nos travaux ont mis en évidence deux paramètres expliquant l'effet 'nano' à l'origine de la grande capacité d'adsorption de l'arsenic par les nano-oxydes de fer. Le premier est lié à une modification structurale de la surface des particules lorsque la taille diminue. Le deuxième est en étroite relation avec les propriétés thermodynamiques des nano-systèmes.

Des études ont montré que lorque la taille des particules de maghémite diminue la structure atomique de la surface est modifiée. Alors que les microparticules de maghémite ont une surface composée d'octaèdres et de tétraàdres de fer, les nano-maghémites ont une surface préférentiellement octaédriques (Brice-Profeta et al., 2005). Il existe alors à la surface des nano-maghémites des sites lacunaires tétrahédriques. Cette modification structurale de la surface crée ainsi des sites d'adsorption potentiels « peu classiques » à la surface des nano-maghémites. Nous avons pu montrer que lors de son adsorption, l'As^{III} comblait ces lacunes tétraédriques. Deux sites d'adsorption ont été mis en évidence par XAS au seuil de l'As : (i) un site situé en surface d'un cycle constitué de plusieurs octaèdres de fer et (ii) un site en surface d'un trimère d'octaèdres de fer (Figure III.1).

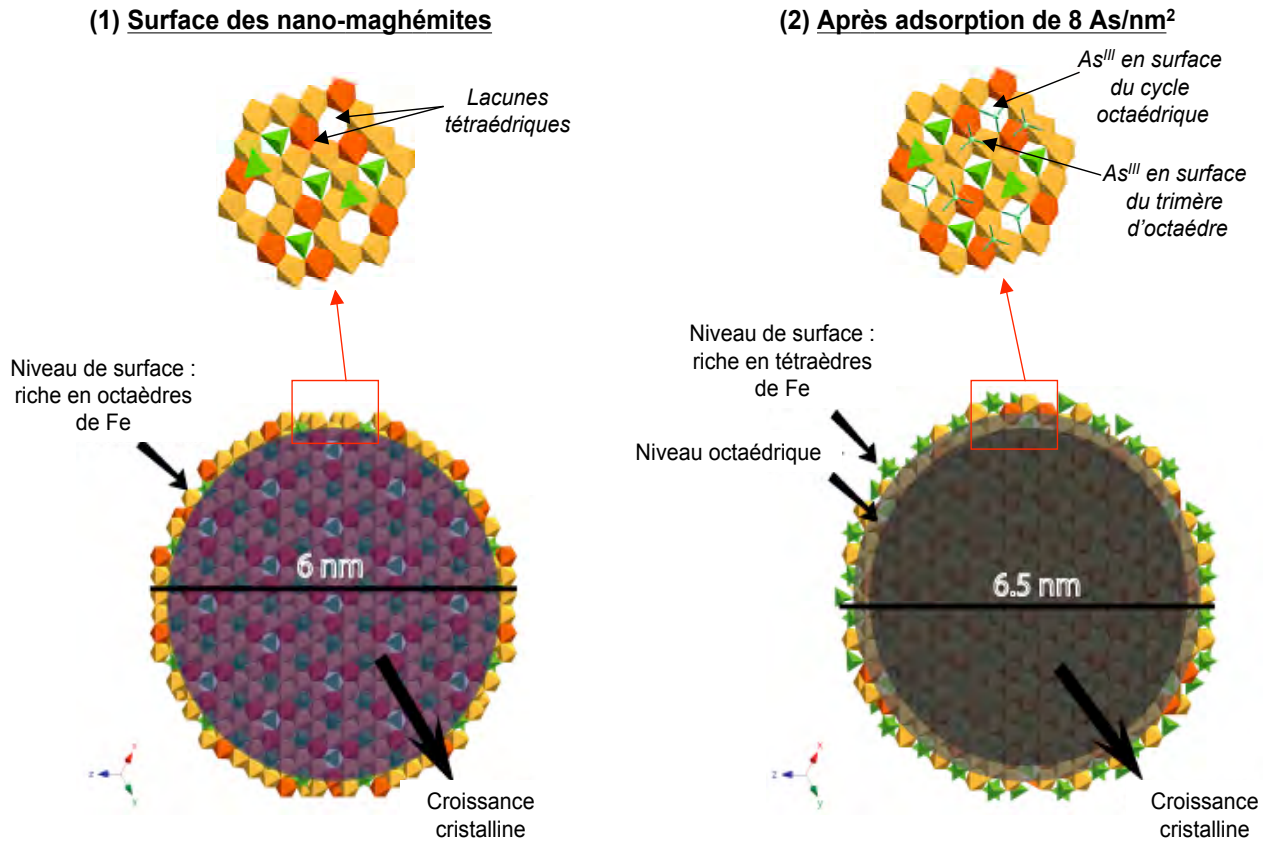


Figure III. 1 : schéma représentant les mécanismes d'adsorption de l'As^{III} à la surface des nano-maghémites. Ces interprétations sont basées sur des informations structurales obtenues par DRX et XAS.

D'autre part, il est acquis que le moteur principal de l'adsorption sur des nanoparticules d'oxyde est la diminution de l'énergie de surface. Ce phénomène est bien connu dans le cas de la croissance cristalline. Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, l'énergie de surface d'une particule est inversement proportionnelle à sa taille ($P = 2\gamma/r$). Les cristaux vont croître par adsorption d'ions sur des sites réactifs ce qui augmente leur diamètre, diminue l'énergie du système et stabilise thermodynamiquement les cristallites. L'adsorption d'ions en surface des nanoparticules va avoir le même effet de stabilisation thermodynamique des nanoparticules.

La saturation de la surface de particules avec une couche de polyhèdres d'As^{III}, engendre une augmentation de la taille des particules de 0,5 nm. Cette évolution de la taille diminuera seulement de 2% la pression en surface de particules de 20 nm contre 8-10% dans le cas des nano-maghémites de 6 nm. Ceci est illustré par la Figure III.2, montrant la variation de la pression de surface des particules en fonction de leurs diamètres. Ainsi, l'adsorption de 8 As^{III}/nm^2, c'est-à-dire une couche dense où les cations d'As^{III} se placent en position cristallographique sur les sites tétraédriques vacants des nano-maghémites, augmente significativement la taille des particules. Ce mécanisme induit une meilleure stabilité thermodynamique des particules et s'apparente fortement à un mécanisme de croissance cristalline.

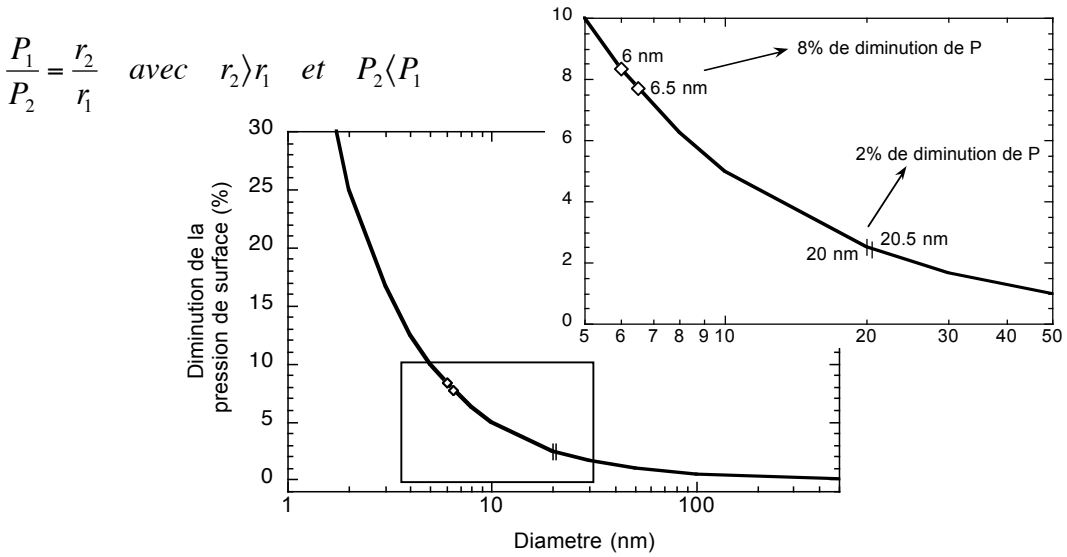


Figure III. 2 : évolution de la pression en surface d'une particule lors de l'adsorption d'une monochouche d'arsenic (de 0.5nm d'épaisseur) en fonction du diamètre de la particule.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article accepté dans *Langmuir* en 2007. Cet article est présenté dans la partie suivante.

❖ ❖ ❖

1. Enhanced adsorption of arsenic onto maghemites nanoparticles : As^{III} as a probe of the surface structure and heterogeneity

Mélanie Auffan, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Jérôme Rose, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Olivier Proux, LGIT, CNRS-Université Joseph Fourier, St Martin d'Hères, France
Daniel Borschneck, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Perrine Chaurand, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Armand Masion, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Jean-Louis Hazemann, Institut Néel, Grenoble, France
Corinne Chanéac, LCMC, CNRS-UPMC, Paris, France
Jean-Pierre Jolivet, LCMC, CNRS-UPMC, Paris, France
Mark R. Wiesner, Duke University, Durham, Caroline du Nord, USA
Alexander VanGeen, Columbia University, Palisades, New York, USA
Bottero Jean-Yves, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France

Abstract. When normalized per unit of surface area, the quantity of arsenic adsorbed at the maghemite surface remains constant for particles between 300 and 20 nm. But nanoparticles smaller than 20 nm exhibit enhanced adsorption capacity. The origin of this observed size-dependence for adsorption or "nano-effect" is unclear. Arsenic was chosen as a probe of the surface structure to explore adsorption mechanisms occurring at the surface of maghemite nanoparticles (6nm). Two factors contributing to the enhanced reactivity of nano-scale maghemites were determined. The first is related to a size-dependent structural modification of the surface of particles and the decrease of the occupancy of the tetrahedral site that leaves vacant, highly reactive adsorption sites. In particular there is a site localized in a six-membered iron octahedral ring. This site is the only one for which an oxidation of As^{III} occurs. The second factor relates to the thermodynamics of a decrease of the surface free energy. The high density of As adsorbed at the saturation of the surface can be related to crystal growth.

1.1 Introduction

Nanomaterials and the nanotechnologies they inspire present potential new solutions to major environmental issues (Bottero et al., 2006; Zhang, 2003) as well as uncertainties surrounding impacts of these materials on the environment and human health (Brayner et al., 2006; Maynard et al., 2006; Wiesner et al., 2006; Xia et al., 2006). These opportunities and uncertainties are derived from intriguing differences between the behavior of materials when they are present in bulk and when they are present as nano-scale objects. Nanoparticles are often characterized by a greater reactivity due to their elevated surface/volume ratio. For example, 40% or more of the atoms making up a nanoparticle are present on the surface of particles smaller than than 20 nm in diameter (Banfield and Navrotsky,

2001). A true nano-scale effect may also be anticipated as distances between functional groups and facets on nanoparticle surface decrease and quantum effects become important. To date, such nano-scale effects have not been elucidated for the case of metal adsorption or complexation as a function of nanoparticle size. Such differences in reactivity might be exploited to improve surface-based reactions in engineered systems as water treatment and soil remediation. Removal of arsenic from water is one such example and the quantity of arsenic adsorbed per gram of magnetite (Fe_3O_4) has been observed to increase from 0.02 to 0.39 mmol/g as particles size decreases from 300 to 20nm (Yean et al., 2005). Much of this ten-fold increase of adsorption capacity for the smaller magnetite particles can be attributed to the increase of specific surface area (SSA) with decreasing size of the particles. However, the comparison of adsorbed quantity per mass of adsorbent reveals nothing about the chemical reactivity and a true "nano-scale effect". When expressed per unit of surface area, magnetite particles of 300 and 20 nm are observed to adsorb similar amounts of As (i.e. ~6 µmol/m^2 = 3.5 As/nm^2) suggesting similar adsorption mechanisms. Surprisingly, for particles smaller than 20 nm, the adsorption capacity increases and magnetite of 11 nm in diameter adsorbs 3 times more As per nm^2 (~18 µmol/m^2= 10.9 As/nm^2) than does 20 nm-diameter magnetite (Table III.1) (Yean et al., 2005).

Table III. 1 : comparison between the As^{III} adsorption efficiency of ***Nmag*** obtained in this study using ICP-AES with that of previously reported data.

Mineral	Size (nm)	SSA (m^2/g)	Cads max mmol/g	Cads max µmol/m^2	Cads max arsenic/nm^2
Nmag	6	174	2.3±0.2	13.4±1.0	8.1±0.5
Magnetite	~1000	0.9	0.003	3.1	1.9
(Gimenez et al., 2007 ; Yean et al., 2005)	300	4	0.02	5.6	3.4
	20	60	0.39	6.4	3.9
	11	99	1.80	18.2	10.9
Hydrous Ferric Oxide		200	0.37	1.8	1.1
(Wilkie and Hering, 1996)		600	1.34	2.2	1.3
Goethite		2	0.005	2.5	1.5
(Gimenez et al., 2007 ; Lenoble et al., 2002)		39	0.29	7.5	4.5

These observations lead to two key questions: i) why is there a change in adsorption behavior for very small nanoparticles ? and ii) is this change linked to modifications of the surface structure ? To answer these questions, the adsorption mechanisms at the surface of nanoparticles below 10 nm must be rigorously characterized, studying the adsorption sites and the surface structure from the macroscopic to the atomic scale. The current study focuses on arsenic adsorption processes at the surface of one type of manufactured nano-spheres that is widely used and studied: nano-maghemite (γ-Fe_2O_3, referred to as ***Nmag***) with a mean diameter of 6 nm (Jolivet et al., 2004a; Tronc et al., 2000; Turro et al., 2002). Stimulated by the high affinity of arsenic for iron (hydr)oxides and the worldwide problem of arsenic in drinking water (Casiot et al., 2005; VanGeen et al., 2004), arsenic was chosen as a probe for surface adsorption mechanisms. ***Nmag*** was selected as the adsorbent for this study because these particles have the advantage of being composed of only Fe^{3+} and are stable under ambient

conditions. Moreover, they are isotropic, well crystallized and their highly symmetric spinel structure facilitates the examination of surface structure during the adsorption processes. To precisely determine the arsenic adsorption mechanisms at different scales, a panel of techniques of structural characterization was used such as X-ray diffraction, infrared and X-ray absorption spectroscopy.

1.2 Experimental section

1.2.1 Maghemite nanoparticles

The 6 nm ***Nmag*** were synthesized at Paris VI university (LCMC) by coprecipitation of Fe^{3+} and Fe^{2+} ions (Tronc et al., 2000). At the stoechiometry $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0.5$ crystallization of magnetite (Fe_3O_4) with an inverse spinel phase is quasi-immediate at room temperature. Then, because of their high instability against oxidation, the magnetite nanoparticles are transformed into maghemite (γFe_2O_3) by desorption of Fe^{2+} ions and creation of vacancies. Iron atoms are distributed into the tetrahedral (Td = A site) and octahedral (Oh = B site) sites according to ($[Fe^{3+}]_A[Fe_{5/3}{}^{3+}V_{1/3}]_BO_4$) where V stand for vacancies in the octahedral sub-lattice (Figure III.3) (Tronc et al., 2000). Based on a 6 nm diameter and a pseudo-spherical shape, the theoretical specific surface area (SSA) of this material is calculated to be 204 m^2/g. This is in reasonable agreement with the measured value of 172 m^2/g determined by N_2 adsorption and a BET analysis where the difference between calculated and measured values is attributed to heterogeneity and partial aggregation of ***Nmag*** during the N_2 adsorption experiment (especially at pH close to the ZPC).

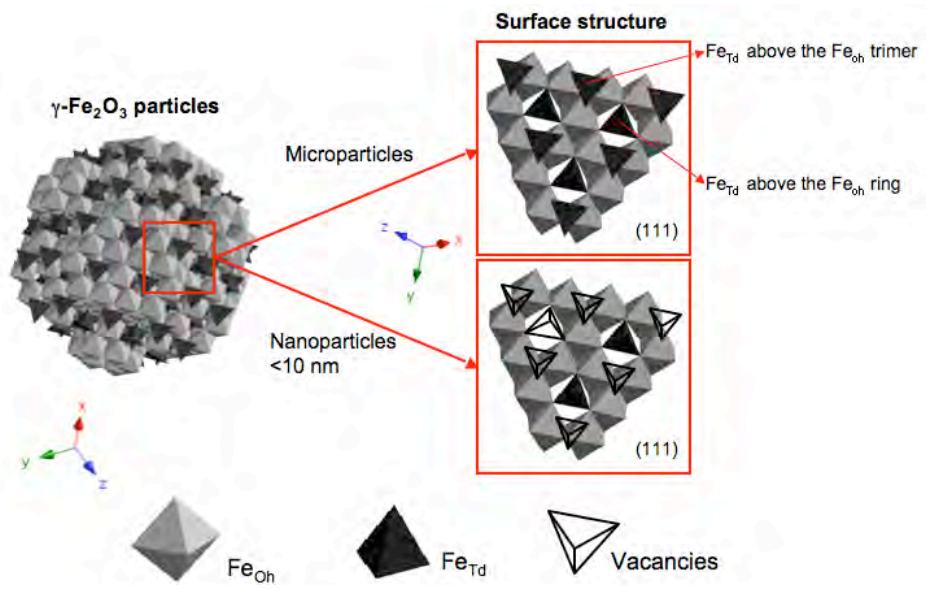


Figure III. 3 : scheme representing the crystalline structure of maghemite (γ-Fe_2O_3) and the atomic arrangement of the iron tetrahedral (Fe_{Td}) and octahedral (Fe_{Oh}) at the surface (plane (111)) as a function of the size of the particles (based on the study of Brice-Profeta et al. (2005))

1.2.2 Sorption experiments

Adsorption studies were performed by mixing 30 mg/L ***Nmag*** with different amounts of 0.013 mol/L $NaAsO_2$ solution in 20mL flasks. All samples were prepared in 0.01 mol/L NaCl solution at room temperature (22-25°C) and throughout the experiment the pH was adjusted at 7 ± 0.2 using standard acid (0.1 mol/L HCl) and base (0.1 mol/L NaOH) solutions. Sorption isotherm was obtained by varying the initial As concentration from 0.1 to 6.5 mmol/L. After 24h at pH 7 ± 0.2, ***Nmag*** were aggregated since their PZC is around 6.1 and 7.6 (Garcell et al., 1998; Jarlbring et al., 2005) and can be removed from solution by centrifugation during 2 hours at 10000 rpm. Arsenic concentrations in the supernatant were measured by ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) using a Jobin Ultima-C spectrometer.

Triplicate samples with surface coverages of 5%, 10% and 100% of the maximum adsorption capacity, referred to respectively ***Nmag***As5, ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100, were prepared. After the adsorption process the solid phase was rinsed, freeze-dried and analyzed with the techniques described further.

1.2.3 Powder X-ray Diffraction

X-ray diffraction (XRD) experiments were done on powder samples prepared on a "zero-background" silicon plate and analyzed using a PANalytical X'Pert PRO diffractometer with a Co Kα radiation (1.79Å) at 40 kV and 40 mA. The 2θ range was 15-120° with a step size of 0.05° with a RTMS (Real Time Multiple Strip) detector speed of 0.027°/min leading to a total counting time of 65h per spectrum. NaCl was used as internal standard to correct a potential shift in the peak positions. The crystalline structure and the structural evolution of ***Nmag*** during the adsorption processes was investigated using a Rietveld refinement (Roddick-Lanzilotta et al., 2002). This theoretical calculation was performed using the Fullprof software (Rodriguez-Carvajal, 2005).

1.2.4 X-ray absorption experiments

Arsenic K-edge (11.73 KeV) XAS experiments were performed at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, France) on the FAME beamline (BM-30b) with Si(220) monochromator crystals (Proux et al., 2005; Proux et al., 2006). By combining the high brilliance from the ESRF synchrotron source with a multi-channel fluorescence detector, we were able to obtain spectra with a very high signal/noise ratio even at low As concentration. Samples were pressed to thin pellets, which were cooled to a temperature close to that of liquid Helium (around 10K) during spectra acquisition. This procedure improves spectrum quality by minimizing radiation damages, decreasing thermal motions of atoms and keeping As in the same oxidation state during the experiment (Meitzner et al.,

2005). XAS spectra were scanned using a step-by-step mode from 100 below to 800 eV above the edge. Multiple scans (3-4) were collected for each sample. To ensure that the high photon flux of the monochromatic beam on FAME beamline did not induce changes in the redox state of As, prior XAS spectra were also acquired in the continuous "quick XAS" scanning mode (Proux et al., 2005; Proux et al., 2006). XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) and EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) were analyzed using standard procedure for data reduction with a set of software developed by Michalowicz (Ankudinov et al., 1998; Michalowicz, 1991; Michalowicz, 1997). EXAFS oscillations were theoretically re-calculated using amplitude and phase functions obtained with the FEFF8 code (Ankudinov et al., 1998; Michalowicz, 1991; Michalowicz, 1997). FEFF functions were validated for each scattering path by modeling the spectra of well-characterized crystalline model compounds (As_2O_3, $FeAsO_4.7H_2O$). FEFF8 was also used to estimate the contribution of multiple scattering paths on the EXAFS signal.

1.3 Results and discussion

1.3.1 Adsorption of As^{III} onto *Nmag*

The adsorption isotherm of As^{III} onto ***Nmag*** is shown in Figure 1 plotting the moles of arsenic per nm^2 versus arsenic equilibrium concentration. An experimental maximum is reached at C_{ads} = 13.4 ± 0.1 μmol/m^2 ~ 8 ± 0.5 As^{III}/nm^2 (Figure III.4). The measured adsorption capacity of ***Nmag*** for As^{III} is comparable to that reported in literature for magnetite with a size of 11 nm (Table III.1).

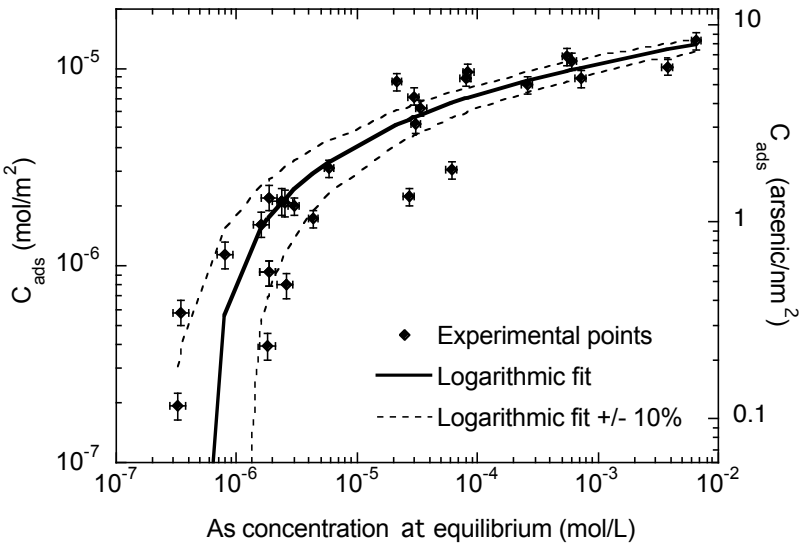


Figure III. 4 : adsorption isotherm of As^{III} onto ***Nmag***. C_{ads}: concentration of As adsorbed at the ***Nmag*** surface. Dark curve: logarithmic fit. pH = 7 ± 0.2, 0.01 M NaCl, [***Nmag***] = 30 mg/L, 22-25°C.

1.3.2 Arsenite adsorption sites as function of the surface coverage

The analysis of samples at low (***Nmag***As5 and ***Nmag***As10) and high (***Nmag***As100) surface coverage is crucial since i) at low surface coverage arsenite was hypothesized to adsorbed first on the more reactive sites and ii) at high surface coverage it becomes possible to assess the frequency of the various adsorption surface sites.

The consequences of the adsorption of As^{III} onto the ***Nmag*** structure were firstly studied by X-ray diffraction. The diffraction patterns of the ***Nmag***, ***Nmag***As5, ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100 are given on Figure III.5A. The main peaks are perfectly superimposed, indicating that structure and crystallinity of the ***Nmag*** are not affected by As adsorption. However the relative intensity of some peaks is modified after As adsorption. The most sensitive is the peak at 21.4° corresponding to the $\{111\}$ lattice plane (d-spacing = 4.815 Å) for which the normalized intensity decreases when the adsorbed As quantity increases (inset on Figure III.5A). The intensity of this peak is highly sensitive to the level of occupancy (σ_A) of the tetrahedral A site of maghemite as illustrated by theoretical calculations (Figure III.5B). The sensitivity of the $\{111\}$ peak to σ_A is related to the fact that the A-oxygen bonds are oriented in the $\{111\}$ direction. Brice-Profeta et al. (Brice-Profeta et al., 2005) have shown that σ_A decreases as the size of maghemite particles decreases (Figure III.3). They also prove the existence of a preferential iron octahedral layer at the ***Nmag*** surface, which consequently indicates a deficit of $[Fe_{Td}]$ in the A sites at the surface of very small nanoparticles (Figure III.3).

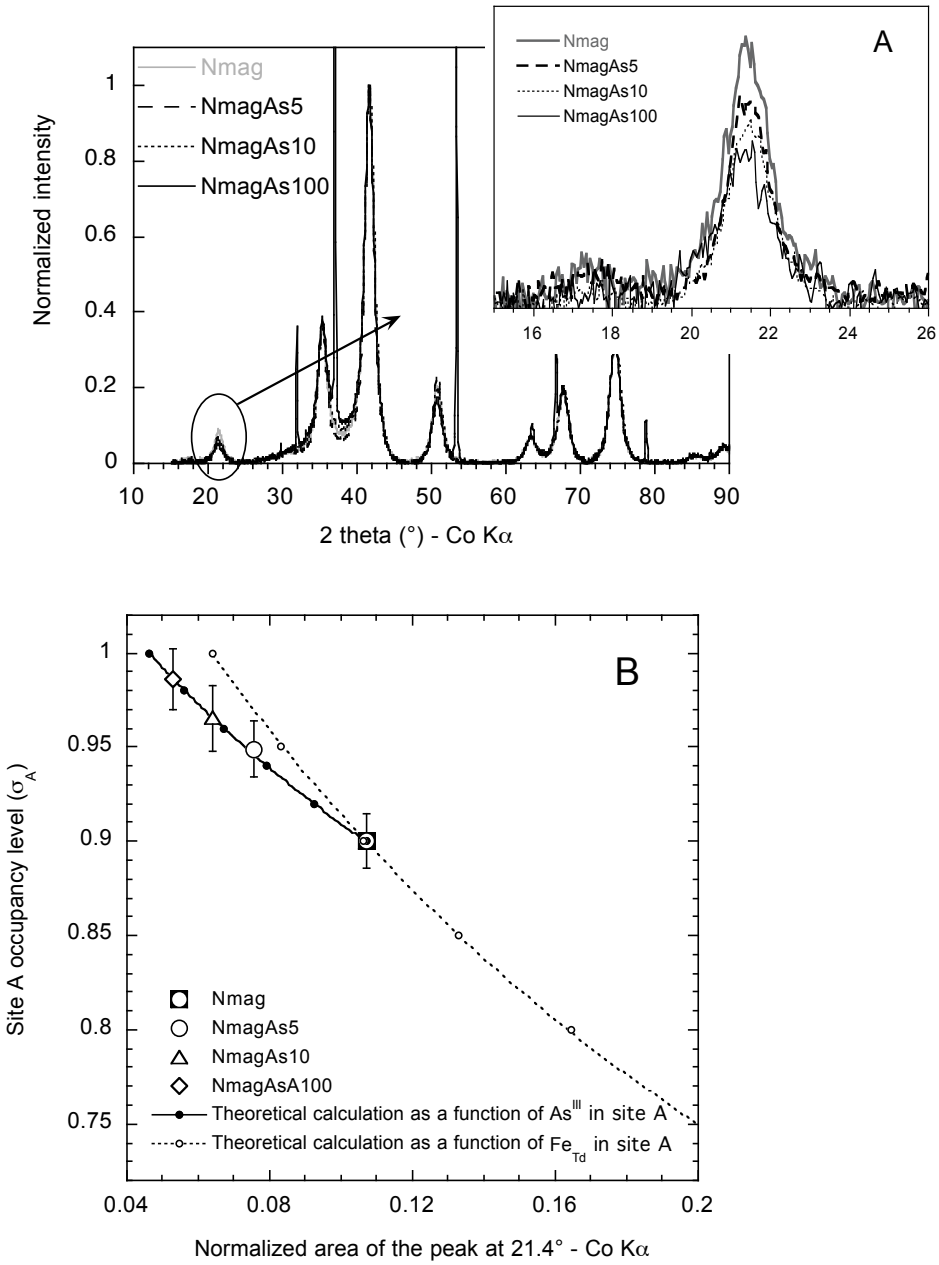


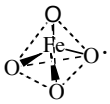
Figure III. 5 : (A) X-ray diffraction patterns of ***Nmag*** as a function of As surface coverage. (B) Theoretical evolution of XRD $\{111\}$ normalized peak area of standard maghemite as a function of the level of occupancy of the tetrahedral A site with $[Fe_{Td}]$ (dotted line) or As (solid line), compare with experimental values.

Based on these results, we performed a first theoretical calculation on the XRD patterns of a standard maghemite (Figure III.5B, dotted line). In this calculation, the intensity of the peak $\{111\}$ was plotted as a function of the level of occupancy of $[Fe_{Td}]$ atoms in the tetrahedral site. Hence, the σ_A for ***Nmag*** before arsenic adsorption was recalculated and we estimate that 90%±2 of the A sites are occupied in ***Nmag*** leaving approximately 10% of the sites A vacant. We assumed that these vacant tetrahedral sites are mainly located in the surface layer of ***Nmag*** as suggested by Brice-Profeta et al.

(Brice-Profeta et al., 2005). Consequently, by taking into account the volume (V=113 nm^3), the surface (S=113 nm^2) of ***Nmag***, the volume of the maghemite unit cell (a^3=0.581 nm^3) and the number of tetrahedral sites per unit cell (N=8), an estimate of 1.4 vacant A sites/nm^2 at the surface of ***Nmag*** is obtained using the following equation:

$$Surface\ vacant\ A\ sites\ per\ nm^2 = \frac{V \times N \times (1-\sigma_A)}{S \times a^3}$$

The decrease of the intensity of the $\{111\}$ peak observed with the increase of As^{III} surface coverage is attributed to the filling of the surface vacant A sites by As^{III}. As^{III} may be adsorbed in a maghemite lattice position due to the strong affinity to iron oxides, the equal charge to Fe^{III} and the fact that the O-O-O angles and O-O distances for the

molecule are isomorphic to the O-O-O faces of the Fe tetrahedron 

. To confirm this hypothesis, a second theoretical calculation was performed on the XRD pattern of a standard maghemite (Figure III.5B, continuous line). In this calculation, the intensity of the peak $\{111\}$ was plotted as a function of the level of occupancy of As atoms in the tetrahedral lattice position. Hence, the σ_A for ***Nmag***As5, ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100 were recalculated as a function of the filling of the 10% of vacant A sites of ***Nmag*** with arsenic. By doing so, the σ_A for ***Nmag***As5 and ***Nmag***As10 was estimated at 94.5% ± 1.5 and 96.5% ± 1.5 respectively. This suggests that 0.8 ± 0.25 A sites/nm^2 (for ***Nmag***As5) and 0.5 ± 0.25 A sites/nm^2 (for ***Nmag***As10) remain vacant. Since the maximum surface vacancy for A sites was estimated to be 1.4 per nm^2, we deduce that there are 0.6 ± 0.3 A sites/nm^2 for ***Nmag***As5 and 0.9 ± 0.3 A sites/nm^2 for ***Nmag***As10 occupied by As^{III}. Since for ***Nmag***As10 only 0.7 ± 0.07 As/nm^2 are adsorbed, the vacant A structural sites appear to have unique characteristics. Since As replaces $[Fe_{Td}]$ in the A site, this implies that As is bound to a high number of iron octahedra from the B sites; 5 at a theoretical maximum. EXAFS results discussed below confirm this hypothesis. For ***Nmag***As100, the σ_A was estimated at 99% ± 2 suggesting that all the A sites are occupied by arsenic. Since almost 8 As/nm^2 are adsorbed and the vacant structural A sites can only accommodate 1.4±0.3 As/nm^2, this implies that at least one other type of As surface site must exist.

X-ray absorption spectroscopy at the As K-edge (11.73 KeV) was used to characterize these adsorption surface sites at the atomic scale. EXAFS spectra allow for a precise determination of the local order around the central As absorbing atoms. Previous work using EXAFS spectroscopy has investigated the adsorption of As^{III} on iron (oxy)hydroxide larger than 20 nm. Evidence of three types of complexes has been obtained: binuclear bridging complex ($R_{AsIII\text{-}FeIII}$=3.30-3.38 Å), linear monodentate complex ($R_{AsIII\text{-}FeIII}$=3.57-3.60 Å) and edge-sharing complex ($R_{AsIII\text{-}FeIII}$=2.80-2.81 Å) (Manceau, 1995; Manning et al., 1998; Manning et al., 2002; Sherman and Randall, 2003; Thoral et

al., 2005; Waychunas et al., 1995; Waychunas et al., 1993; Zhang et al., 2005). XANES spectra were carefully analyzed to obtain information on the valence state of the arsenic.

In the "quick XAS" configuration, XANES acquisition was performed within 40s in order to follow a possible change in shape under the X-ray beam. These spectra revealed two absorption peaks centered on 11873 eV and 11875eV characteristic of the As^{III} and As^{V} valence states respectively (inset on Figure III.6A). For each spectrum, we used linear combination of XANES spectra of pure As^{III} and As^{V} samples to determine the $As^{III}/As^{(III+V)}$ ratio evolution with time (Figure III.6A). In the initial state, the ratio is close to 1 for both samples, ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100. With an increasing counting time under the X-ray beam, two different behaviors are observed: an arsenite oxidation appeared for ***Nmag***As10 with irradiation time (even at 10 K) while the ***Nmag***As100 remained stable over long scanning times. We estimate that 30% of As^{III} of ***Nmag***As10 was oxidized after 15 minutes under the beam. For ***Nmag***As100 only 7% of the adsorbed As^{III} was oxidized which is in agreement with the fraction of As^{III} oxidized for the ***Nmag***As10 sample. These differences in oxidation under X-ray beam reflect i) the strong reactivity of As for sites where oxidation takes place and ii) the presence of very different adsorption sites as already suggested by the adsorption and diffraction experiments.

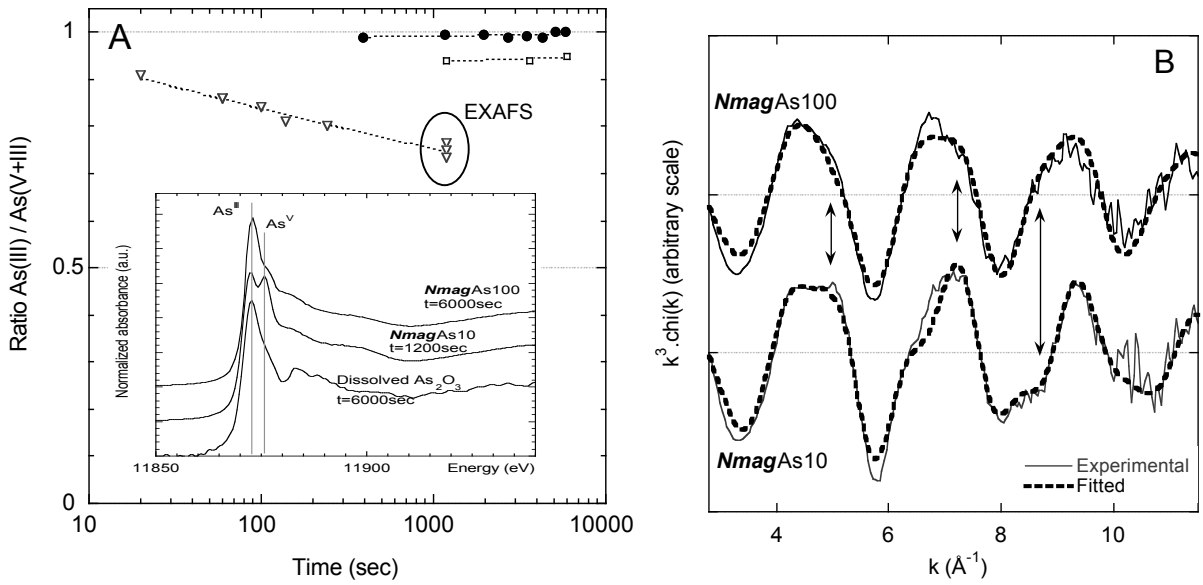


Figure III. 6 : (A) $As^{III}/As^{(III+V)}$ ratio in function of the exposition time under X-ray beam obtained by linear combination of XANES spectra of As_2O_3 and As_2O_5. Dotted lines: linear fitting, ● : dissolved As_2O_3, Δ:***Nmag***As10, □ : ***Nmag***As100. (B) EXAFS spectra (As K-edge) of ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100: experimental data (solid line) and simulation (dotted line).

Table III. 2 : structural parameters deduced from the EXAFS analysis at the As K-edge.

Sample	Atomic shell	N ± 20%	R (Å) ± 0.02Å	σ (Å) ± 0.01Å
***Nmag*As10**	As-O	3.6	1.72	0.071
	As-O-O^{MS}	5.0	3.08	0.100
	As--Fe*	3.1	3.41	0.108
***Nmag*As100**	As-O	3.2	1.76	0.061
	As--Fe*	1.7	3.33	0.102

MS: multiple scattering of the photoelectron

*: As--Fe shells correspond to Fe atoms present in the second coordination sphere of As.

EXAFS spectra also revealed differences between ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100 spectra with different features at 5.2, 7.4 and 8.7 Å^{-1} (Figure III.6B). The modeling of these EXAFS spectra allows to quantify these differences and to precise the local structures. The first coordination sphere corresponds to As-O bonds: its length increases from 1.72 to 1.77 ± 0.02 Å while the number of As-O contributions decreased from 3.4 to 3.1 ± 0.6 for ***Nmag***As10 and ***Nmag***As100 respectively (Table III.2). It is also necessary to include a multiple scattering contribution of As-O-O to satisfactorily reproduce the experimental spectra of ***Nmag***As10. The bond length values can be directly compared to the ones obtained for reference compounds: the As^{V}-O distances (1.60-1.73 Å range) are generally shorter than the As^{III}-O ones (1.77-1.80 Å range) (Farquhar et al., 2002). The EXAFS simulations then appear to confirm the XANES results *i.e.* the presence of As^{V} for the ***Nmag***As10 sample.

The second coordination sphere of As corresponds to an As--Fe contribution (Table III.2). At low adsorption quantities (***Nmag***As10), this contribution is characterized by 3.1 ± 0.6 iron atoms (N_{Fe}) at 3.40 ± 0.02 Å. The As--Fe distance is very close to the average As^{III}--Fe^{III} interatomic distance of 3.31-3.40 Å attributed to As^{III}-O-Fe linkages through double-corner-sharing in literature (Manceau, 1995; Manning et al., 1998; Sherman and Randall, 2003; Thoral et al., 2005; Waychunas et al., 1995; Waychunas et al., 1993). But the high iron coordination number N_{Fe} is not in agreement with a pure double-corner-sharing surface complex since N_{Fe} should be 2 in such a configuration. XRD results have previously highlighted that for this surface coverage, arsenic fills the A surface sites on the $\{111\}$ lattice plane. By examining the cation in this A site (Figure III.3), it appears that the cation is linked via 3 double corner linkages to 5 irons at maximum. Consequently, in such an adsorption site, arsenic can be linked with more that 2 iron atoms with an As--Fe distance characteristic of double corner linkage. The EXAFS results corroborate this hypothesis. Indeed, the obtained-contribution of 3.1 ± 0.6 Fe atoms at 3.40 ± 0.02 Å of arsenic could be in agreement with As adsorbed in the A vacant site to more than 2 iron atoms through double corner linkage.

At high surface coverage (***Nmag***As100) the number of Fe atoms obtained by EXAFS in the second coordination sphere of As decreases to 1.7 ± 0.3 and the As--Fe distance is 3.33 ± 0.02Å (Table III.2). This latter observation indicates that at high surface coverage arsenite adsorbed on a second site with lower Fe coordination number. This adsorption site will be discussed below.

In both cases (***Nmag***As10 and ***Nmag***As100), it is important to note that the σ values for the As^{III}--Fe linkages are elevated (between 0.102-0.108) (Table III.2). Using reference compounds (coprecipitated As^{V}/Fe) (Thoral et al., 2005) and surface χ^2 analysis, we have demonstrated that the N and σ values corresponding to the minimum χ^2 ± 10% are ranged between 3 to 3.8 and 0.100 to 0.120 respectively for ***Nmag***As10. Hence, the high σ values are physically significant and maybe due to structural disorder related to the very reactive surface. This indicates that the local atomic environment obtained for As at low (3.1 ± 0.6 Fe neighbors) and high surface coverage (1.7 ± 0.3 Fe neighbors) are not due to mathematic artifact.

1.3.3 Specificity of the As^{III} adsorption mechanisms on ultrafine nanomaghemite.

Structural information concerning the As surface layer has been obtained from EXAFS results (Figure III.6B, Table III.2). For ***Nmag***As100 and ***Nmag***As10, the As^{III}--Fe distances of 3.33-3.41 ± 0.02Å are in agreement with double-corner-linkage between As^{III} and $[Fe_{Oh}]$. But if we examine the $\{111\}$ surface, the possibility of double-corner-linkage at the ***Nmag*** surface only exists at the edge of the plane, suggesting a low number of possible sites. This statement is not in agreement with the high quantity of As at the plateau (~8 As/nm^2) indicating that the surface sites are different than those of the 'classical' adsorption sites on a larger iron oxide particles. Moreover, the high surface density of arsenite can not be attributed to a structural modification of the ***Nmag***, such as amorphization of the surface, the crystallinity of ***Nmag*** being constant as determined by XRD. It therefore seems that some specific As adsorption sites exists at the surface of ***Nmag*** based on the deficiency of $[Fe_{Td}]$ at the surface (Figure III.3). As previously mentioned, arsenite can be considered as isomorphic to $[Fe_{Td}]$ with a same charge and Pauli radius. Hence, As^{III} is physically able to occupy the free $[Fe_{Td}]$ lattice positions at the surface of ***Nmag*** (as demonstrated by XRD, Figure III.5). These free $[Fe_{Td}]$ lattice positions represent a high density of adsorption sites at the surface since the number of tetrahedral sites per nm^2, reaches 8, 5 and 6 for the $\{111\}$, $\{011\}$ and $\{100\}$ surface planes respectively (Figure III.7). This is in agreement with the high quantity of As at the plateau (~8 As/nm^2). Examination of the $\{111\}$ plane suggests that the As may be linked (i) 'in' the A vacant site (octahedral ring) surrounded by 5 $[Fe_{Oh}]$ sites at maximum through double corner sharing or (ii) 'on' a B trimer through single corner sharing, but linked to no more than 3 $[Fe_{Oh}]$ (Figure III.3). In both cases, the As^{III}--Fe interatomic distance are in the same range. But to go further, better determinations for the theoretical coordination number of iron around As (N_{Fe}) are needed as obtained by EXAFS. Indeed, there is still a discrepancy between the obtained value of 3.1 ± 0.6 for ***Nmag***As10 and 1.7 ± 0.3 for ***Nmag***As100 and the theoretical coordination of cations on the $\{111\}$ lattice plane : ~5 in the octahedral ring and ~3 on the B trimer.

To understand this discrepancy, we assume an equilibrium shape for the 6 nm ***Nmag*** crystals. Brice-Profeta et al. (2005) observed that crystallized ***Nmag*** (synthesized in exactly the same manner as our initial material), exhibited well-defined faceted edges but with no shape anisotropy (Brice-Profeta et al., 2005). To approximate the shape of the ***Nmag*** crystals we use a Kossel model (cubic theoretic crystal). By taking into account the second nearest neighbors interaction, and applying the Wulf theorem, the equilibrium shape of a 2 D crystal is calculated to be an octogon and a 26-face polyhedron for the 3D crystal (Figure III.7) (Mutaftschiev, 2001). Three different faces exist on the polyhedron corresponding to the three densest lattice planes $\{111\}$, $\{100\}$ and $\{110\}$ of a cubic structure.

To explain the N_{Fe} of 3.1 ± 0.6 obtained for ***Nmag***As10, we determine the coordination number of $[Fe_{Td}]$ localized 'in' the A vacant site (octahedral ring) for the three main planes. For $\{111\}$, $\{100\}$ and $\{110\}$ the coordination number is estimated at 5, 4.2 and 3.3 respectively (Figure III.7). If the three planes are equivalent, then the mean Fe coordination number will be 4.1. By considering that all faces of the polyhedra exhibit the same surface, we estimate the surface area of each face at 4.3 nm^2. Therefore due to the low extension of the plane and the size of the unit cell (0.837 nm) at least one third of the A sites of each plane will be at the edge with a coordination number estimated at 2 or 3. Then the mean total coordination number of $[Fe_{Td}]$ in the octahedral ring is certainly close to 3.5 ± 0.5. Although this coordination value is based on several simplifying assumptions, it reasonably explains the N_{Fe} value of 3.1 ± 0.6 around As obtained for the ***Nmag***As10. Therefore, we conclude that the adsorption of As^{III} for low adsorption quantities most likely occurs in the octahedral ring 'in' the A vacant site. As determined by XRD, this site adsorbed 0.9 As^{III}/nm^2. Moreover, the X-ray beam damage (Figure III.6A) illustrates the high reactivity of this surface site for which the electron transfer between arsenic and the octahedral ring seems to be facilitated (X-ray beam effects).

To explain the value obtained for N_{Fe} of 1.7 ± 0.3 for ***Nmag***As100, we calculate in the same manner the coordination number of $[Fe_{Td}]$ localized 'on' the B trimer for the $\{111\}$, $\{100\}$ and $\{110\}$ planes to be 2.5, 1.7 and 1.7 respectively (Figure III.8). By considering that the three planes are equivalent and that one third of the A site are at the edge of the face with a coordination number estimated at 1 or 2, we estimate the mean coordination number of $[Fe_{Td}]$ on the B trimer as to 1.8 ± 0.2. Further, by considering that As localized on the B trimer represents 7.1 of the 8 As^{III} adsorbed per nm^2 (the other 0.9 As^{III}/nm^2 being linked in the A vacant site) we obtain an estimate of 2 ± 0.2 for the mean total Fe coordination number around As on the saturated surface. This value, based on several simplifying assumption, explains reasonably the N_{Fe} value of 1.7 ± 0.3 around As obtained for the ***Nmag***As100.

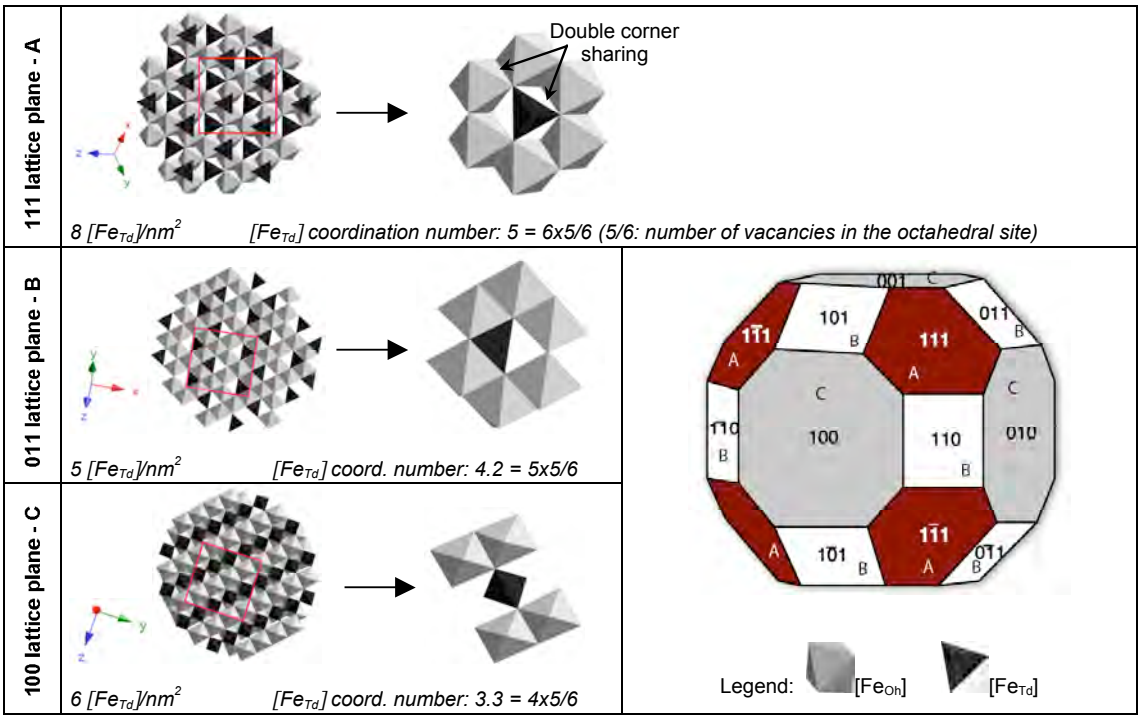


Figure III. 7 : assumed equilibrium energy shape of the particles (based on a Kossel model) and structure of the three main lattice planes at the surface of ***Nmag***. This figure gives an estimation of the coordination number of $[Fe_{Td}]$ in the octahedral ring. Red square: $1nm^2$

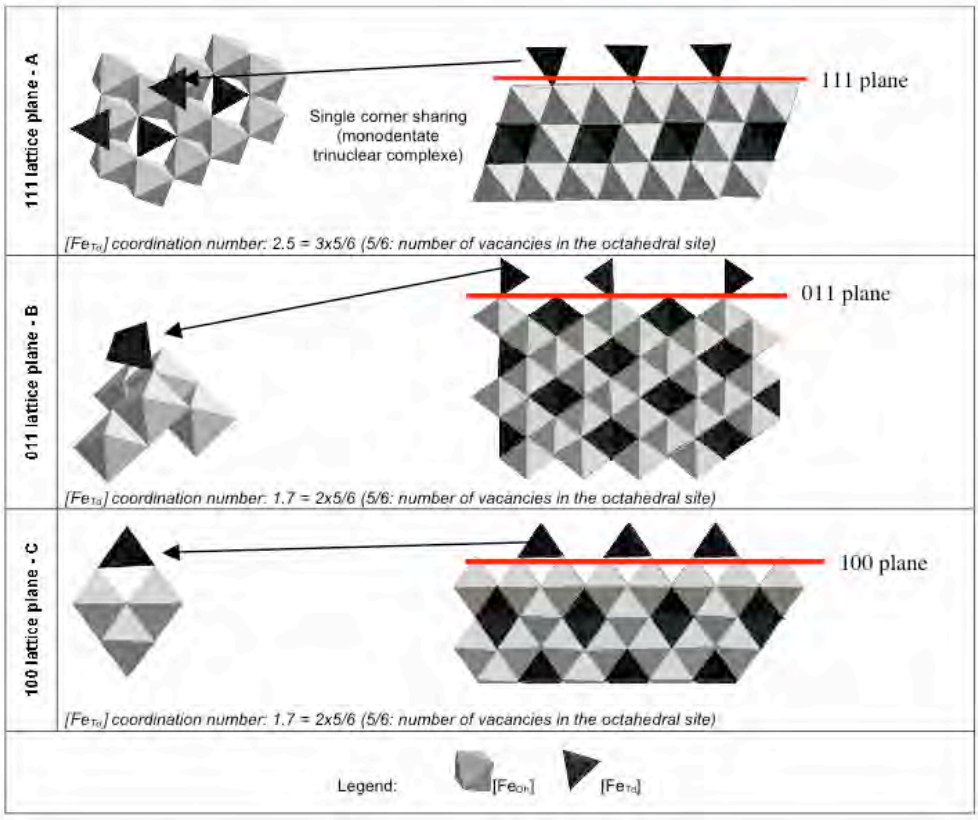


Figure III. 8 : structure of the three main lattice planes at the surface of ***Nmag***. This figure gives an estimation of the coordination number of $[Fe_{Td}]$ on the B trimer.

In summary, different mechanisms of As^{III} adsorption appear to dominate as a function of the surface coverage. Initially, 1.4 tetrahedral sites per nm^2 are vacant at the surface of ***Nmag*** (Figure III.9A). At low surface coverage, arsenic fills the more reactive surface sites in the octahedral ring (Figure III.9B). When all of these sites are filled, arsenite adsorbs on a $[Fe_{Oh}]$ trimer through monodentate trinulear complex in a lattice position (Figure III.9C).

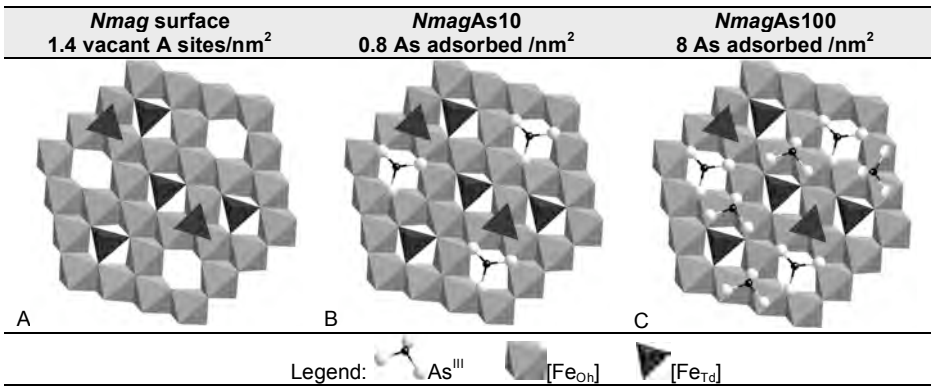


Figure III. 9 : scheme representing the adsorption mechanisms of As^{III} at the ***Nmag*** surface based on the structural information derived from the XRD and As K-edge XAS analyses.

Hence, we can explain the high As density (8 ± 0.5 As^{III}/nm^2) by considering As^{III} adsorbed in the $[Fe_{Td}]$ lattice position. But why for nanoparticles (< 20 nm) the As occupy the lattice position of $[Fe_{Td}]$ whereas for larger particles, As^{III} is classically adsorbed through double- or single-corner-sharing (Coker et al., 2006) ? It is worth noting that nanoparticles are thermodynamically instable compared with microscopic particles. Many phenomena may intervene in producing a decrease in the surface free energy, including changes in surface site coordination, displacement of atoms, change in bond length and angles and, aggregation or adsorption of chemical species (Banfield and Navrotsky, 2001). Adsorption of ions at the surface of particles decreases the energy (ΔG) of a system by $\Delta G = 3.V_m.\Delta\gamma/r$, where V_m is the molar volume, $\Delta\gamma$ is the difference of the interfacial energy before and after adsorption and r is the radius of the particles. Using the method presented by Jolivet et al. (2004) (Jolivet et al., 2004b) we estimate that as a consequence of the adsorption of one monolayer of arsenic at the surface of iron oxide particles of 6 nm, 20 nm and 300 nm, the $\Delta\gamma$ decreases by 0.2-0.3 J/m^2 (~ 3 kT), 0.002-0.003 J/m^2 and 0.0005 respectively. Comparing the different systems characterized by $r_{6nm}\langle r_{20nm}\langle r_{300nm}$ and $\Delta\gamma_{6nm}\rangle\rangle\rangle\Delta\gamma_{20nm}\rangle\Delta\gamma_{300nm}$ we observe that adsorption of a dense arsenite layer on nanoparticles of 6 nm decreases the energy of the system more than adsorption on larger particles of 20 or 300 nm ($\Delta G_{6nm}\rangle\rangle\rangle\Delta G_{20nm}\rangle\Delta G_{300nm}$). Whereas in macroscopic systems the adsorption is mainly governed by the chemical affinity and the electrostatic strength, for nanoparticles the decrease of free energy must be taken into account. This driving force is known to be preponderant in the case of crystal growth. In our study, the adsorption of As^{III} in the free $[Fe_{Td}]$ lattice position at

the ***Nmag*** surface can be compare to a crystal growth mechanism in which As^{III} mimics the $[Fe_{Td}]$ atoms. This may explain the high density of As adsorbed at the surface of ***Nmag***.

1.4 Conclusion

Two factors appear to contribute to an observed "nano-effect" of enhanced As^{III} adsorbtion by nano-iron oxides below 20 nm in diameter. First, there is a modification of the atomic structure of the particle surface as size decreases (Brice-Profeta et al., 2005). In the case of ***Nmag***, the size-dependant decrease of the occupancy of the tetrahedral site leaves vacant, highly reactive sites, which are available to adsorb arsenic. For larger particles, the ratio B/A at the surface seems to be closer to the theoretical value (Brice-Profeta et al., 2005) with fewer vacant A sites and therefore fewer accessible sites. Moreover the presence of $[Fe_{Td}]$ at the surface prevents the adsorption of arsenite through monodentate trinuclear complexes due to steric constraints. Only double or single-corner-sharing adsorbing complexes remain probable (Coker et al., 2006). The second factor relates to the thermodynamics of a decrease of the surface free energy. The high density of As adsorbed in the lattice position at the surface can be related to crystal growth.

❖ ❖ ❖

2. Bilan du chapitre III

Ce troisième chapitre a permis d'expliquer l'effet 'nano' à l'origine de la grande réactivité de surface des nano-oxydes de fer inférieurs à 20 nm avec leur environnement et notamment avec un polluant inorganique comme l'arsenic trivalent. Cette effet a deux origines principales :

❖ Une **modification structurale de la surface** des particules lorsque leur taille diminue (Brice-Profeta et al., 2005 ; Banfield et Navrotsky, 2003). Cela crée des sites d'adsorption « inhabituels » en position cristallographique. A la surface des nano-maghémites, il s'agit de sites de fer tétraédriques laissées vacants (ex : nouveau site d'adsorption en surface d'un cycle de 5 à 6 atomes de fer octaédriques).

❖ Une **diminution de l'énergie de surface** par adsorption d'ions sur ces sites réactifs. Dans le cas des nano-maghémites, la saturation de la surface par l'As^{III} diminue de 8 à 10% la pression de surface contre 2% pour des nanoparticules de 20 nm. Cela peut s'apparenter fortement à un mécanisme de croissance cristalline.

Cette forte capacité d'adsorption en surface des nano-oxydes de fer et leur réacivité de surface seront des facteurs importants à contrôler lorsque les nanoparticules se retrouveront dans l'environnement ou au contact d'organismes vivants. Il est possible que les réactions se produisant à l'interface nanoparticules/cellules soient intensifiées. Ceci sera discuté dans le chapitre suivant, qui a pour objectif d'étudier les réponses biologiques à l'évolution physico-chimique des nanoparticules manufacturées.

❖ ❖ ❖

3. Références bibliographiques

Al-Abadleh, H.A. and Grassian, V.H., 2003. Oxide surfaces as environmental interfaces. Surface Science Reports, 52(3-4): 63.

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): 7565-7576.

Arai, Y. and Sparks, D.L., 2001. ATR-FTIR Spectroscopic Investigation on Phosphate Adsorption Mechanisms at the Ferrihydrite-Water Interface. Journal of Colloid and Interface Science, 241(2): 317.

Banfield, J.F. and Navrotsky, A., 2003. Nanoparticles and the environment. Reviews in mineralogy and geochemistry. Geochimica et Cosmochimica Acta, 67, Washington DC, 1753 pp.

Bottero, J.Y., Rose, J. and Wiesner, M.R., 2006. Nanotechnologies: tools for sustainability in a new wave of water treatment processes. Integrated Environmental Assessment and Management, 2(4): 391-395.

Brayner, R. et al., 2006. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. Nano Lett., 6(4): 866-870.

Brice-Profeta, S. et al., 2005. Magnetic order in [gamma]-Fe2O3 nanoparticles: a XMCD study. J. Magn. Magn. Mater., 288: 354.

Casiot, C. et al., 2005. Sorption and redox processes controlling arsenic fate and transport in a stream impacted by acid mine drainage. Sci. Total Environ., 347(1-3): 122.

Coker, V.S. et al., 2006. XAS and XMCD Evidence for Species-Dependent Partitioning of Arsenic During Microbial Reduction of Ferrihydrite to Magnetite. Environ. Sci. Technol., 40: 7745-7750.

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

Deliyanni, E.A., Bakoyannakis, D.N., Zouboulis, A.I. and Matis, K.A., 2003. Sorption of As(V) ions by akaganeite-type nanocrystals. Chemosphere, 50(1): 155.

Farquhar, M.L., Charnock, J.M., Livens, F.R. and Vaughan, D.J., 2002. Mechanisms of Arsenic Uptake from Aqueous Solution by Interaction with Goethite, Lepidocrocite, Mackinawite, and Pyrite: An X-ray Absorption Spectroscopy Study. Environ. Sci. Technol., 36(8): 1757-1762.

Gimenez, J., Martinez, M., de Pablo, J., Rovira, M. and Duro, L., 2007. Arsenic sorption onto natural hematite, magnetite, and goethite. J. Hazard. Mater., 141(3): 575-580.

Goldberg, S. and Johnston, C.T., 2001. Mechanisms of Arsenic Adsorption on Amorphous Oxides Evaluated Using Macroscopic Measurements, Vibrational Spectroscopy, and Surface Complexation Modeling. J. Colloid Interf. Sci., 234(1): 204.

Jolivet, J.P., Chaneac, C. and Tronc, E., 2004. ron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. Chem. Commun.(5): 481-487.

Lenoble, V., Bouras, O., Deluchat, V., Serpaud, B. and Bollinger, J.-C., 2002. Arsenic Adsorption onto Pillared Clays and Iron Oxides. J. Colloid Interface Sci., 255(1): 52.

Manceau, A., 1995. The mechanism of anion adsorption on iron oxides: Evidence for the bonding of arsenate tetrahedra on free Fe(O, OH)6 edges. Geochim. Cosmochim. Acta, 59(17): 3647.

Manning, B.A., Fendorf, S.E. and Goldberg, S., 1998. Surface Structures and Stability of Arsenic(III) on Goethite: Spectroscopic Evidence for Inner-Sphere Complexes. Environ. Sci. Technol., 32(16): 2383.

Maynard, A.D. et al., 2006. Safe handling of nanotechnology. Nature, 444(16): 267-269.

Meitzner, G., Gardea-Torresdey, J., Parsons, J., Scott, S.L. and Deguns, E.W., 2005. The effect of cryogenic sample cooling on X-ray absorption spectra. Microch. J., 81(1): 61.

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.

Mutaftschiev, B., 2001. The atomistic nature of crystal growth, 43. Springer-Verlag, Berlin, 368 pp.

Myneni, S.C.B., Traina, S.J., Waychunas, G.A. and Logan, T.J., 1998. Vibrational spectroscopy of functional group chemistry and arsenate coordination in ettringite. Geochim. Cosmochim. Acta, 62(21-22): 3499.

Peak, D., Ford, R.G. and Sparks, D.L., 1999. An in Situ ATR-FTIR Investigation of Sulfate Bonding Mechanisms on Goethite. J. Colloid Interf. Sci., 218(1): 289.

Pena, M., Meng, X., Korfiatis, G.P. and Jing, C., 2006. Adsorption Mechanism of Arsenic on Nanocrystalline Titanium Dioxide. Environ. Sci. Technol., 40(4): 1257-1262.

Proux, O. et al., 2005. FAME: A New Beamline for X-Ray Absorption Investigations of Very-Diluted Systems of Environmental, Material and Biological Interests. Phys. Scr., T115: 970–973.

Proux, O. et al., 2006. Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. J. Synchrotron Radiat., 13: 59–68.

Randall, S.R., Sherman, D.M. and Vala Ragnarsdotti, K., 2000. Sorption of As(V) on green rust and lepidocrocite: surface complexes from EXAFS spectroscopy. Geochim. Cosmochim. Acta, 65: 1015-1023.

Roddick-Lanzilotta, A.J., McQuillan, A.J. and Craw, D., 2002. Infrared spectroscopic characterisation of arsenate (V) ion adsorption from mine waters, Macraes mine, New Zealand. Applied Geochemistry, 17(4): 445.

Sherman, D.M. and Randall, S.R., 2003. Surface complexation of arsenic(V) to iron(III) (hydr)oxides: structural mechanism from ab initio molecular geometries and EXAFS spectroscopy. Geochim. Cosmochim. Acta, 67(22): 4223.

Sigg, L., Behra, P. and Stumm, G.N., 2000. Chimie des milieux aquatiques, chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, 350-390 pp.

Tejedor-Tejedor, M.I. and Anderson, M.A., 1990. Protonation of phosphate on the surface of goethite as studied by CIR-FTIR and electrophoretic mobility. Langmuir, 6(3): 602.

Thoral, S. et al., 2005. XAS Study of Iron and Arsenic Speciation during Fe(II) Oxidation in the Presence of As(III). Environ. Sci. Technol., 39(24): 9478.

Tronc, E. et al., 2000. Surface-related properties of [gamma]-Fe2O3 nanoparticles. J. Magn. Magn. Mater., 221(1-2): 63-79.

Turro, N.J. et al., 2002. Spectroscopic Probe of the Surface of Iron Oxide Nanocrystals. Nano Lett., 2(4): 325-328.

Uheida, A., Salazar-Alvarez, G., Bjorkman, E., Yu, Z. and Muhammed, M., 2006. Fe3O4 and [gamma]-Fe2O3 nanoparticles for the adsorption of Co2+ from aqueous solution. Journal of Colloid and Interface Science, In Press, Corrected Proof.

VanGeen, A. et al., 2004. Testing Groundwater for Arsenic in Bangladesh before Installing a Well. Environ. Sci. Technol., 38(24): 6783-6789.

Voegelin, A. and Hug, S.J., 2003. Catalyzed Oxidation of Arsenic(III) by Hydrogen Peroxide on the Surface of Ferrihydrite: An in Situ ATR-FTIR Study. Environ. Sci. Technol., 37(5): 972-978.

Waychunas, G.A., Davis, J.A. and Fuller, C.C., 1995. Geometry of sorbed arsenate on ferrihydrite and crystalline FeOOH: Re-evaluation of EXAFS results and topological factors in predicting sorbate geometry, and evidence for monodentate complexes. Geochim. Cosmochim. Acta, 59(17): 3655.

Waychunas, G.A., Rea, B.A., Fuller, C.C. and Davis, J.A., 1993. Surface chemistry of ferrihydrite: Part 1. EXAFS studies of the geometry of coprecipitated and adsorbed arsenate. Geochim. Cosmochim. Acta, 57(10): 2251.

Wei-xian, Z., 2003. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. J. Nanopart. Res., V5(3): 323.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V. and Alvarez, P.J.J., 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. Environ. Sci. Technol., 40(14): 4337-4445.

Wilkie, J.A. and Hering, J.G., 1996. Adsorption of arsenic onto hydrous ferric oxide: effects of adsorbate/adsorbent ratios and co-occurring solutes. Colloids Surf., A, 107: 97.

Xia, T. et al., 2006. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett., 6(8): 1794-1807.

Yean, S. et al., 2005. Effect of magnetic particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenate. J. Matter. Res, 20: 3255-3264.

Zhang, Y., Yang, M., Dou, X.M., He, H. and Wang, D.S., 2005. Arsenate Adsorption on an Fe-Ce Bimetal Oxide Adsorbent: Role of Surface Properties. Environ. Sci. Technol., 39(18): 7246-7253.

CHAPITRE IV. 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-CeO_2 : 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- genotoxical 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-γFe_2O_3 126
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-CeO_2 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).

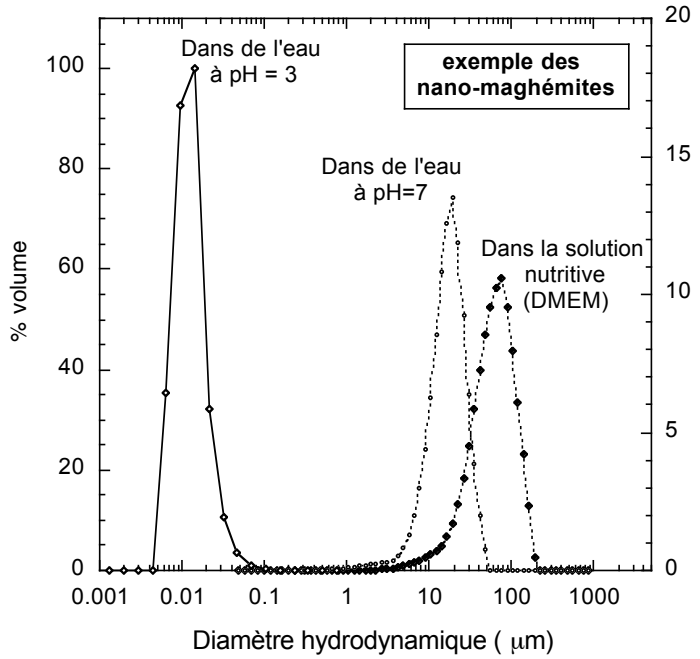


Figure IV. 1 : agrégation des nanoparticules d'oxydes métalliques dans le milieu de culture des cellules humaines (DMEM). Exemple des nano-maghémites.

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 ce de 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-CeO_2 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-CeO_2 et des nanoparticules à base de fer est donnée ci-aprés.

1.2 Synthèse bibliographique

1.2.1 Les nano-CeO_2 : 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-CeO_2 et leurs résultats se révèlent très contradictoires. La cytotoxicité de nano-CeO_2 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-CeO_2 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-CeO_2, 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-CeO_2 qui entraînent des transferts d'électrons et d'oxygènes importants. Ces cycles ont un intérêt dans les applications catalytiques utilisant des nano-CeO_2 car ils sont à l'origine de la capacité des nano-CeO_2 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-CeO_2 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-CeO_2 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 qu'elle 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
$MnFe_2O_4$		Injection intrapéritonéale chez des souris	Inflammations dans la cavité péritonéale.	*Lacava et al., 1999*
γFe_2O_3		Injection intraveineuse dans des souris	Inflammation des poumons qui disparaît avec le temps. (0.2 g/L)	*Pereira Garcia et al., 2005*
γFe_2O_3 (DMSA)		Cellules nerveuses	Diminution de la capacité de différenciation des cellules nerveuses en présence de nanoparticules enrobées de DMSA. (1 g/L)	*Pisanic II et al., 2007*
γFe_2O_3 (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)	*Wilhelm et al., 2002 ; 2003*
Fe_3O_4		Injection intraveineuse dans des souris	Effets génotoxiques observés aprés une semaine.	*Sadeghiani et al., 2004*
Fe_3O_4		Cellules du foie de souris	Pas de toxicité aux doses testées. (0.25 g/L)	*Hussain et al., 2005*
Fe_3O_4 (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)	*Zhang et al., 2002 ; 2005 ; Kamruzzaman et al., 2007)*
Fe_3O_4 (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)	*Berry et al., 2003 ; 2004a*
Fe_3O_4 (transferrine)		Fibroblastes dermiques humains	Pas d'internalisation des nanoparticules enrobées de transferrine. Augmentation de la prolifération cellulaire. (0.05 g/L)	*Berry et al., 2004b*
Oxyde de fer		Cellules humaines et fibroblastes de rongeurs	Diminution de la viabilité et du contenu en ADN. (7 mg/L)	*Brunner et al., 2006*
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 gL)	*Gupta et al., 2004 ; 2005*

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 (Fe^{II}/Fe^{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 (Fe^{II}/Fe^{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° ($Eh_{FeII/Fe°}$=-0.44 V) des nZVI et lors du relargage du Fe^{II} de la magnétite ($Eh_{FeIII/FeII}$=0.77 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-CeO_2 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-CeO_2. 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 CeO_2 Nanoparticles for Escherichia coli. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism.** 2006, Environmental Science and Technologie, 40(19): 6151-6156.

Brièvement, ces résultats ont montré la forte affinité des nano-CeO_2 pour la membrane d'*E.coli* (capacité maximale de rétention par les nano-CeO_2 : 13 mg nano-CeO_2/m^2 de surface bactérienne). Cette adsorption n'est pas sans conséquence car dès l'introduction de 0,003 g/L de nano-CeO_2, 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-CeO_2 ($Eh_{CeIV/CeIII}$=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-CeO_2 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 Méditerrannée, 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 reducion of O_2 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: γFe_2O_3 (Fe^{III}), Fe_3O_4 ($Fe^{II/III}$) and metallic iron (Fe°) nanoparticles. These nanoparticles are widely used and studied for a variety of applications ranging from the biomedical to the environmental fields. Fe° nanoparticles are used in soil and groundwater decontamination (Zhang, 2003) while the superparamagnetic and adsorbing properties of γFe_2O_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, γFe_2O_3 and Fe° 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 $[Fe^{3+}]/[Fe_{total}]$ of 0.66. Iron cations were distributed into the octahedral (Oh) and tetrahedral (Td) sites according to $[Fe^{3+}]_{Td}[Fe^{3+}Fe^{2+}]_{Oh}O_4$ (Jolivet et al., 2004). Maghemite (γFe_2O_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 $[Fe^{3+}]_{Td}[Fe_{5/3}{}^{3+}V_{1/3}]_{Oh}O_4$ (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 m^2/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 M $FeCl_3.6H_2O$ solution as described by Wang and Zhang (Wang and Zhang, 1997). Ferric ion was reduced and Fe° precipitated according to the following reaction: $Fe(H_2O)_6^{3+} + 3BH_4^- + 3H_2O \longrightarrow Fe^0 + 3B(OH)_3 + 10.5H_2$ (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 m^2/g (Joo et al., 2005) and an average primary particle size of 50nm.

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 Nanotrac® (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 bactotriptone, and 10 g/L of NaCl. Two antibiotics, kanamycine (50 µg/mL) and chloramphenycol (25 µg/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 ± 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 Kα radiation (1.79Å) at 40 kV and 40 mA. A counting time of 25s per 0.05° step was used for the 2θ 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 ±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±5 nm and 320±30 nm respectively. The suspension of ***Nmagnet*** is stable until pH 4.2 with slight aggregation occuring 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.

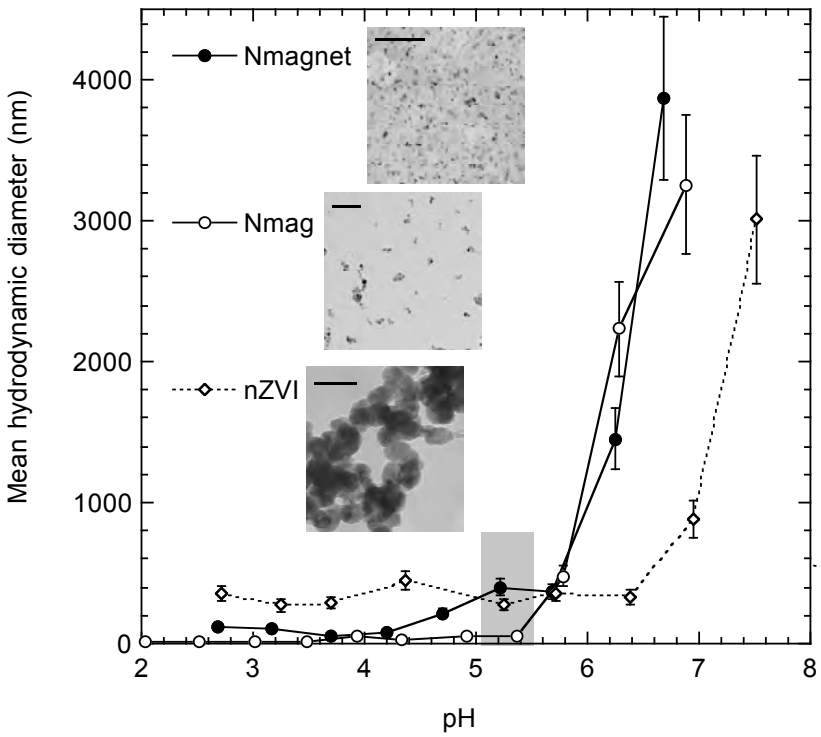


Figure IV. 1 : influence of the pH on the colloidal stability of ***Nmag***, ***Nmagnet*** and ***nZVI*** (0.01mol/L NaCl, 25°C). Inset pictures: transmission electron micrograph of ***Nmag***, ***Nmagnet*** and ***nZVI*** before contact with bacteria. Black dash: 90 nm.

The biological effects of well-dispersed iron-based NPs towards $E.coli_{WT}$ and $E.coli_{\mathrm{SodAB}}$ 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%±11% and 100%±20% of survival with respect to $E.coli_{WT}$ and $E.coli_{\mathrm{SodAB}}$ 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 $E.coli_{\mathrm{SodAB}}$ 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.

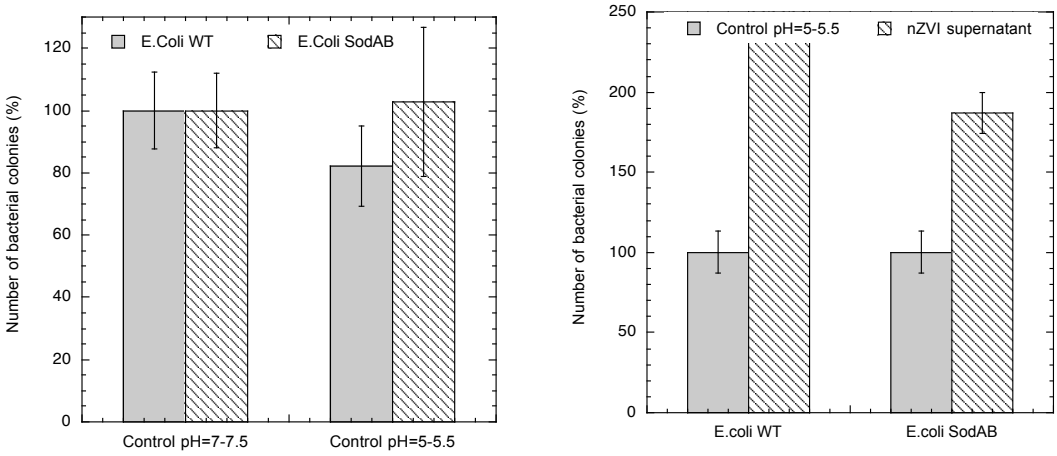


Figure IV. 2 number of colonies of $E.coli_{WT}$ and $E.coli_{\mathrm{SodAB}}$ formed as a function of the pH of the growth medium (left) and formed in the supernatant of ***nZVI*** suspension (right).

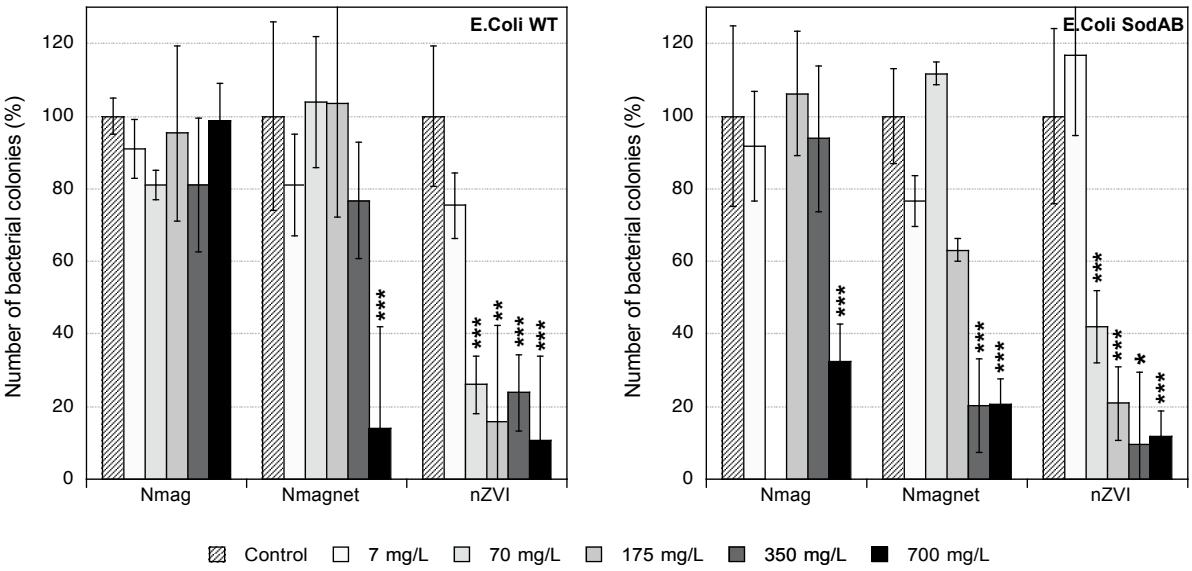


Figure IV. 3 : number of colonies of $E.coli_{WT}$ and the $E.coli_{\mathrm{SodAB}}$ formed on the agar plate as a function of the concentration of NPs (mg/L). Statistical significance: *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001.

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 × 0.5 μm) 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.

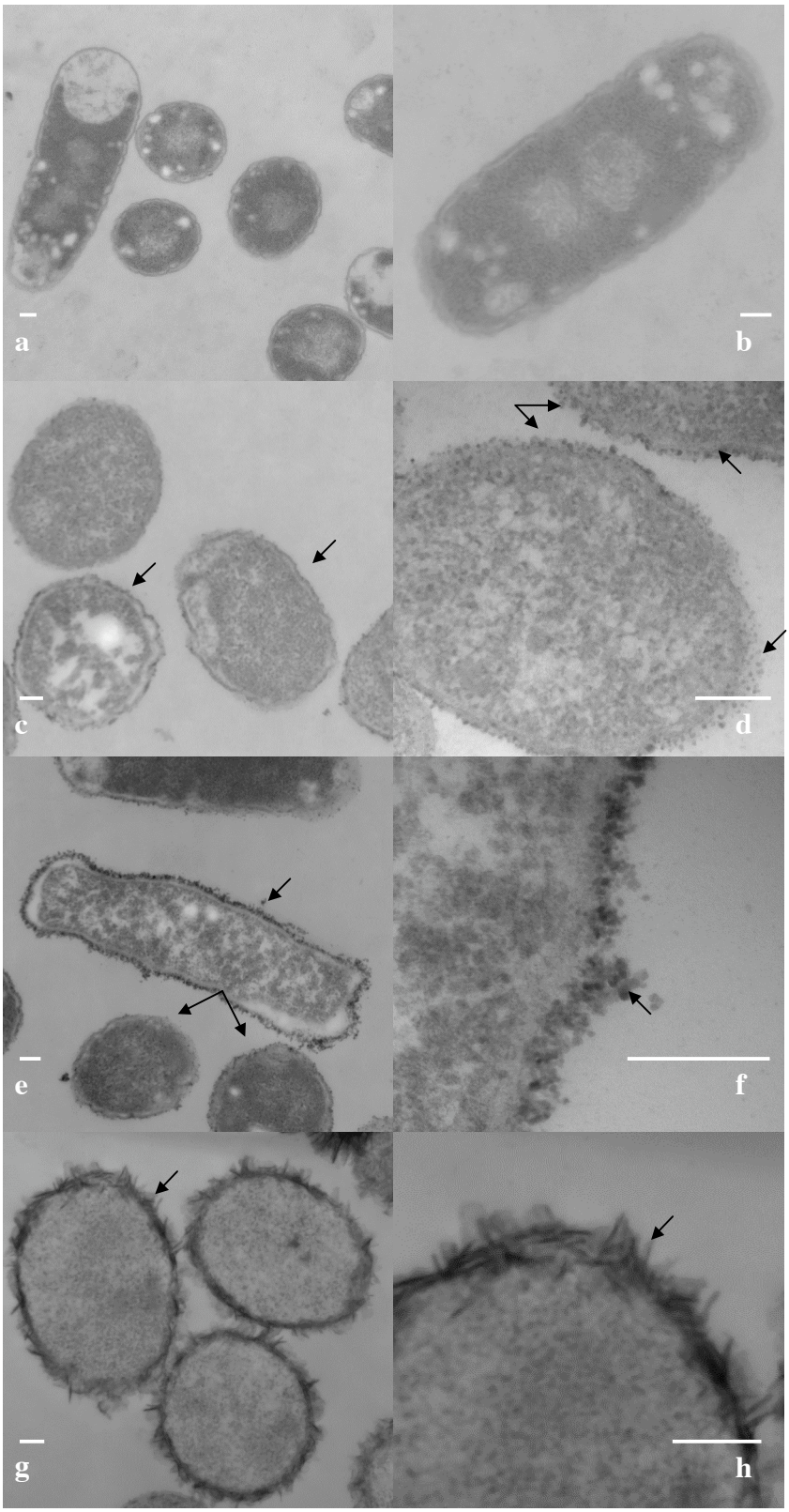


Figure IV. 4 : TEM pictures of *E.coli* ultrathin sections. (a,b) control bacteria incubated in water at pH 5 during 1h. *E.coli* observed after 1h of incubation with 100 mg/L of ***Nmag*** (c,d), ***Nmagnet*** (e,f) and ***nZVI*** (g,h). White dash: 100 nm

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 (γFe_2O_3) (Figure IV.6). Because the two spinel phases, Fe_3O_4 and γFe_2O_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 γFe_2O_3 can be discriminated. The differences between the XANES spectra of γFe_2O_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 γFeOOH/Fe_3O_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.

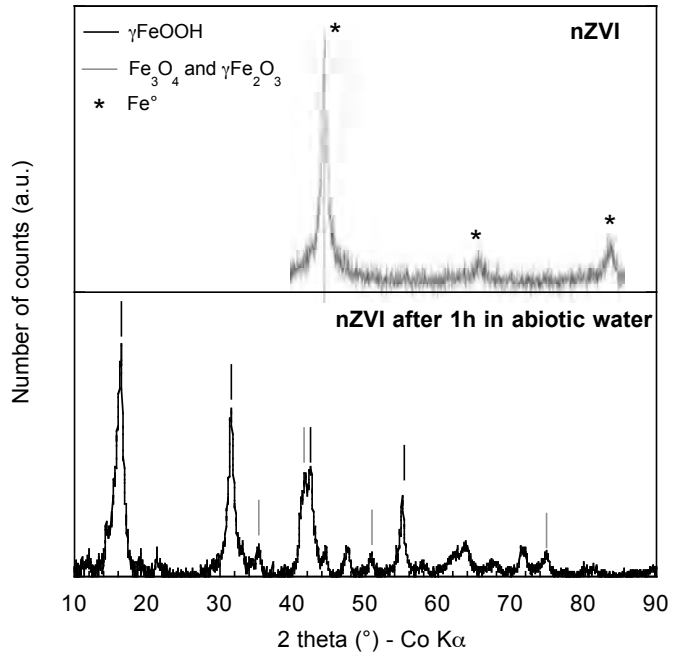


Figure IV. 5 : XRD patterns of ***nZVI*** before and after 1h of incubation in water at pH =5-5.5.

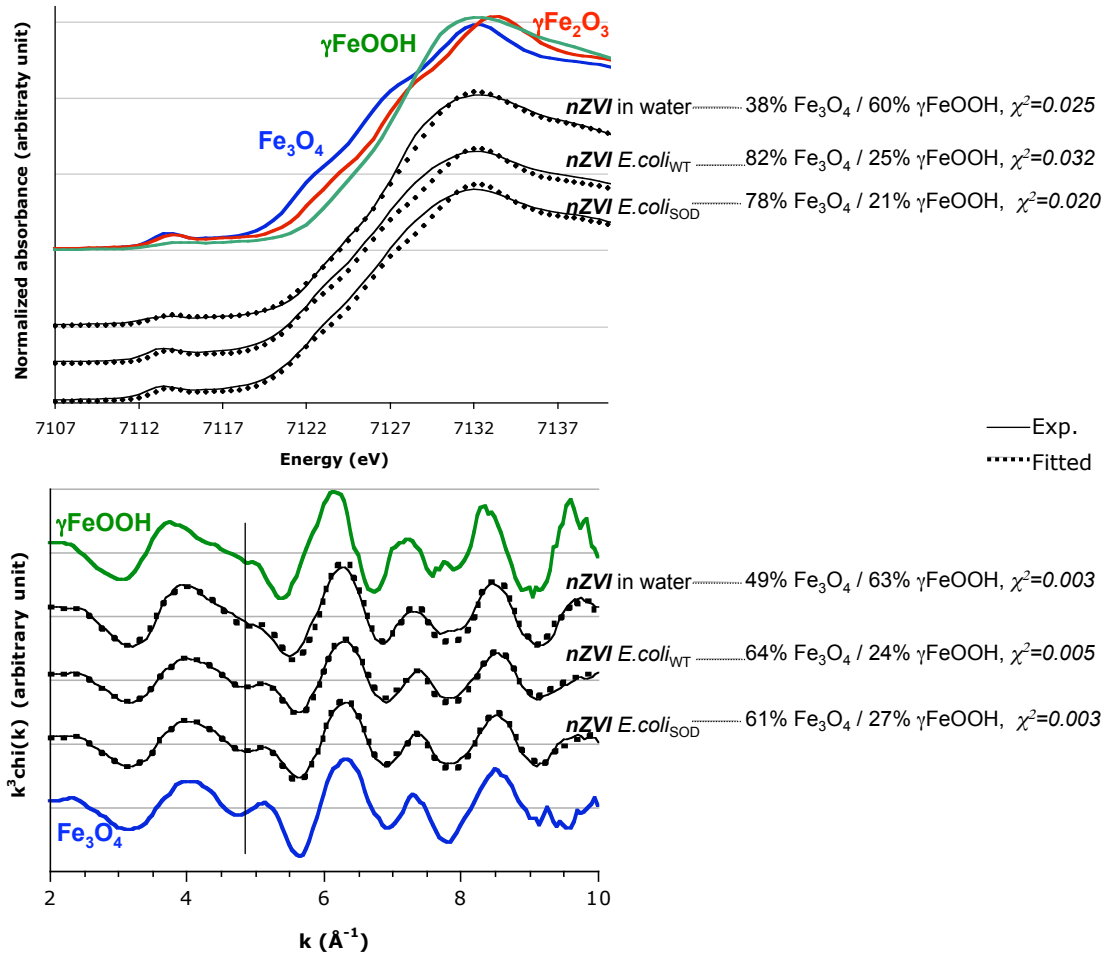


Figure IV. 6 : Fe K-edge XANES and EXAFS spectra of ***nZVI*** after 1h incubation in water and after contact with *E.coli* compared with data reference compounds. The dotted line is the best fit line to the sample. The results and the quality (χ^2) of the fits are given on the right of each spectrum.

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 $Å^{-1}$ (for ***nZVI*** in abiotic water) and the appearance of an oscillation at 5 $Å^{-1}$ (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.

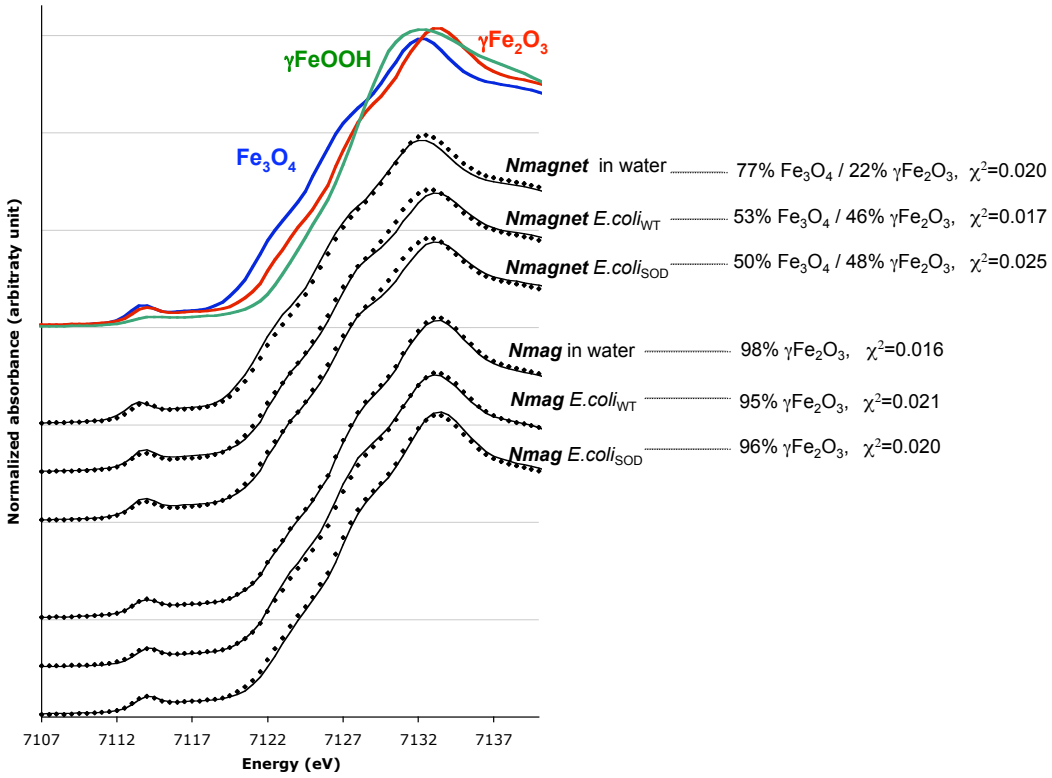


Figure IV. 7 : Fe K-edge XANES spectra of ***Nmagnet*** and ***Nmag*** after 1h incubation in water and after contact with *E.coli* compared with data reference compounds. The dotted line is the best fit line to the sample. The results and the quality (χ^2) of the fits are given on the right of each spectrum.

A similar approach was used to follow the evolution in structure of iron oxide nanoparticles during incubation with *E.coli* (Figure IV.8). In the case of ***Nmagnet***, XANES data also present differences before and after incubation with to strains of *E.coli*. To adequately fit the XANES spectra of ***Nmagnet*** after exposure to water for 1 h at pH 5, a contribution of 77% of Fe_3O_4 and 22% of γFe_2O_3 was necessary. When ***Nmagnet*** particles were placed in contact with $E.coli_{WT}$ and $E.coli_{SodAB}$, the ratio $Fe_3O_4/\gamma Fe_2O_3$ increased with a contribution of 50-53% of Fe_3O_4 and 46-48% of γFe_2O_3. In comparison, ***Nmag*** appeared highly stable after direct contact with *E.coli*. No contribution of mineral phase other than maghemite was necessary to reproduce the XANES experimental data and no structural modifications were observed (Figure IV.8).

1.4 Discussion

XAS results combined with XRD revealed that iron-based NPs react in differing ways on incubation with *E. coli*. The extent of structural modifications increase in the order ***Nmag***<***Nmagnet***<***nZVI***. The most stable NPs examined here are the ***Nmag*** (Fe^{III}). They are composed of fully oxidized crystals and consequently are highly stable under aerobic conditions even in the

presence of bacteria. In comparison, ***Nmagnet*** (Fe^{II}/Fe^{III}) are unstable against oxidation due to the high mobility of electrons within the structure and the diffusion of Fe^{II} from the solid into the solution, finally leading to a stable structure close to that of maghemite. Molecular modeling suggests that electron transfers are facilitated in magnetite by the large overlap of the Fe^{III}-Fe^{II} octahedral d-orbitals found in the edge-sharing environment (Williams and Scherer, 2004). The presence of *E. coli* enhances this structural transformation and, after 1 h, 50% of ***Nmagnet*** particles present are oxidized into maghemite compared to only 20% in water. Given that 30-40% of the iron atoms present are localized at the surface of the NPs, it is likely that the entire surface and sub-surface region of the ***Nmagnet*** is fully oxidized.

nZVI particles are the most sensitive to oxidation under both abiotic and biotic aerobic conditions. Lepidocrocite ($\gamma Fe^{III}OOH$) and magnetite ($Fe_3^{II/III}O_4$) are the end-products of this oxidation process. Similar corrosion products of ZVI powder have been noted in previous studies (Gu et al., 1999; Kanel et al., 2006; Kanel et al., 2005; Manning et al., 2002; Zhang and Huang, 2006). These oxy-hydroxides can only be obtained at room temperature through an intermediate oxidation of Fe° in a precursor phase named green rust ($Fe^{II}_4Fe^{III}_2(OH).12X, nH_2O$) (Cornell and Schwertmann, 1996; Cudennec and Lecerf, 2003; Jolivet et al., 2004; Morgan and Lahav, 2007; Refait et al., 2006). This hydroxide is formed via a dissolution and re-crystallization process. This reconstructive transformation can explain the change of morphology observed for the ***nZVI*** before (pseudo-spherical) and after (pseudo-lamellar) 1h-contact with *E. coli* (Figure IV.1 and IV.4). The oxidation of green rust leads to $\gamma FeOOH$ and Fe_3O_4 crystalline phases which are formed via two pathways (Cudennec and Lecerf, 2003; Jolivet et al., 2004; Morgan and Lahav, 2007). $\gamma FeOOH$ is obtained at neutral pH if the oxidation of Fe^{II} in the green rust is fast enough and the ratio O_2/Fe^{II} ratio is high. When this ratio decreases and the oxidation of Fe^{II} is slower, there is a pool of Fe^{II} and Fe^{III} which leads to the crystallization of Fe_3O_4. Moreover, we have shown that in the abiotic suspension, $\gamma FeOOH$ is the main product of ***nZVI*** oxidation whereas Fe_3O_4 predominates in the presence of bacteria. Two hypotheses can explain the change in the $Fe_3O_4/\gamma FeOOH$ ratio. Firstly, bacterial respiration may well consume a portion of the oxygen present thereby decreasing the O_2/Fe^{II} ratio favouring the crystallization of Fe_3O_4. Secondly, the range of pH for the $\gamma FeOOH$ crystallization is known to be very narrow (between 5 and 7) (Morgan and Lahav, 2007). It is possible that an increase of the pH occurs in presence of *E. coli* due to the close-contact between nanoparticles and the bacterial membrane (pH ~7) or to the initial corrosion process (Joo et al., 2005).

The extent of structural modifications observed for the nanoparticulate materials examined can be directly related to the increase of cytotoxicity observed with ***Nmag***<***Nmagnet***<***nZVI***. ***nZVI*** were entirely oxidized and exhibited the highest toxicity. However, although the ***Nmag*** are the more physico-chemically stable, they were toxic toward the double mutant completely devoid of superoxide dismutase indicating a generation of an oxidant stress. It is worth noting that iron oxidation and phase

transformation mechanisms of ***nZVI*** and ***Nmagnet*** involve ionic and/or electronic transfers at the NPs surface. Since the contact between NPs and the cell membrane is strong (Figure IV.4), such contact and chemical transformations can strongly disrupt the membrane integrity, disturb the electron and ionic transport chains between the intra- and extra-cellular media or induce an oxidative stress towards *E. coli* by generating reactive oxygen species (ROS). The hypothesis of an oxidative stress is directly supported by the greater sensitivity of the mutant strain of *E. coli (*deficient in superoxide dimustase, SOD) to the presence of iron-based NPs. SOD is the first line of defense against oxidative stress. In absence of SOD, the reaction between oxygen free radicals and biological structures are not inhibited (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999) with a resultant stronger cytotoxic effect. ROS can be directly generated during the corrosion of ***nZVI*** (eq.(4) and eq.(6)) via the Fenton reaction (Joo et al., 2005; Joo et al., 2004). Moreover, ***nZVI*** are able to catalyze this reaction via eq.(5) and the regeneration of Fe^{II}.

$$Fe^0 + O_2 + 2H^+ \longrightarrow Fe^{2+} + H_2O_2 \quad eq(4)$$

$$Fe^0 + H_2O_2 \xrightarrow{eq.(5)} Fe^{2+} + 2OH^- \quad eq(5)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \xrightarrow{eq.(6)} Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^- \quad eq(6) - Fenton\ reaction$$

ROS can also be generated on exposure of ***Nmagnet*** to oxic solutions as a result of oxidation of either structural Fe^{II} at the Fe_3O_4 surface or Fe^{II} released to solution (Schoonen et al., 2006).

In summary, we have shown that exposure to increasing concentrations of iron-based NPs containing either Fe^{II} or Fe° results in a dose-dependant decrease in survival of *E. coli*. The main source of toxicity is an oxidative stress induced by oxygenation of reduced Fe species (Fe^{II} and/or Fe°) either within the NP lattice or on release of Fe^{II} to solution. These results highlight the importance of further research into the mechanisms accounting for the generation of ROS and into factors influencing the extent of ROS production. Moreover, the strong toxicity observed with ***nZVI*** highlights the particular care that must be taken to fully understand potential ecotoxicological impacts of these materials given their increasing use in environmental and manufacturing applications. Indeed, these results lead to lot of questions concerning the toxicity of all the nanometric crystallites with a low oxidation degree and consequently a high reactivity at the contact with living organisms.

❖ ❖ ❖

B. EFFETS BIOLOGIQUES DES NANOPARTICULES MANUFACTUREES SUR DES CELLULES HUMAINES

Résumé étendu des articles

Cette partie est consacrée à l'étude de l'interaction entre des nanoparticules manufacturées et un modèle cellulaire humain. La démarche utilisée est la même que dans la partie précédente, c'est-à-dire le couplage de deux approches toxicologique et physico-chimique. En revanche, l'étude toxicologique est plus complète puisqu'elle associe une étude cytotoxique à une étude génotoxique. La génotoxicologie est une étape essentielle dans notre problématique car l'étude de l'altération du patrimoine génétique des cellules par les nanoparticules est nécessaire dans la détermination des risques cancérogènes pour l'Homme. D'autres part, les tests de génotoxicité sont plus sensibles à la présence d'agents toxiques que les tests de viabilité cellulaire. En effet, il est possible que l'ADN et les chromosomes des cellules soient altérés sans pour autant observer une mortalité cellulaire. Cela nous permettra d'étudier de manière plus fine les effets biologiques induits par les nanoparticules.

À ce jour, peu d'études se sont intéressées à la génotoxicologie des nanoparticules manufacturées (Freitas et al., 2002 ; Sadeghiani et al., 2004 ; Auffan et al., 2006). La génotoxicité peut se manifester soit indirectement par l'intermédiaire de lésions sur des macromolécules biologiques, soit directement par la production d'espèces radicalaires (ROS) qui induisent des lésions de l'ADN (Schoonen et al., 2006). Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, certaines nanoparticules d'oxydes métalliques ont la faculté d'engendrer un stress oxydatif important chez *E.coli* (cf. chapitre IV-A) mais également chez des cellules mamifères (Xia et al., 2006 ; Nel et al., 2006). Ainsi, le risque pour que le stress oxydatif généré par les nanoparticules manufacturées induise des altérations du patrimoine génétique chez cellules humaines est réel. L'objectif de cette partie a été d'établir les relations existant entre effets cyto- et génotoxiques potentiels des nanoparticules sur des fibroblastes dermiques humains et leurs propriétés de surface.

Notre attention s'est portée sur les nano-CeO_2 et les nano-maghémites car elles ont des comportements chimiques distincts en solution. Alors que les nano-CeO_2 sont chimiquement instables et caractérisées par des transferts d'électrons à leur surface liés au cycle redox $Ce^{IV} \longrightarrow Ce^{III} \longrightarrow Ce^{IV}$, les nano-maghémites sont chimiquement stables en solution ainsi qu'au contact direct des bactéries. De plus, les nano-CeO_2 sont fortement bactéricides (Thill et al., 2006) alors que les nano-maghémites ne sont pas toxiques vis-à-vis de *E.coli* dans nos conditions expérimentales. Afin de limiter au maximum, les contacts directs entre les composants biologiques et

la surface des nano-maghémites, leur surface a été passivée (Wilhelm et al., 2002) avec une molécule non toxique : le DMSA (cf. chapitre II-1.4) (Fauconnier et al., 1997 ; 1999). Nous noterons NmDMSA les nano-maghémites enrobées de DMSA. D'un point de vue expérimental, la principale différence avec la partie précédente réside dans le mode d'adressage des nanoparticules aux fibroblastes. Alors que les expériences avec *E.coli* sont effectuées dans l'eau, les études *in vitro* sur les cellules humaines sont faites dans une solution nutritive complexe (cf. chapitre II). Les cellules humaines étant plus sensibles que les bactéries à un changement de milieu, elles seraient trop rapidement déstabilisées, ce qui perturberait fortement les réponses cyto- et génotoxiques.

Nos travaux ont montré que dès leur injection dans la solution nutritive cellulaire, les nano-CeO_2 et les Nm DMSA s'agrègent. Cette agrégation est limitée (< 350 nm) pour les NmDMSA grâce à leur enrobage anionique contrairement au nano-CeO_2 dont la taille des agrégats peut atteindre 3 μm. Malgré leur déstabilisation, les nano-CeO_2 et les NmDMSA s'adsorbent sur la membrane externe des fibroblastes puis sont internalisées via des vésicules d'endocytose. Mais les réponses cyto- et génotoxiques des fibroblastes seront différentes dans les deux cas.

Pour les NmDMSA, aucune cytotoxicité ni génotoxicité n'est observée. La stabilité de l'enrobage au DMSA a été suivie par XAS au seuil K du fer. Nous avons montré que lors du contact avec les fibroblastes, le DMSA reste chimiquement adsorbé à la surface des nano-maghémites via des liaisons fortes Fe-S. Cet enrobage constitue une couche organique stable qui protége les cellules d'un contact direct avec la surface des nano-maghémites.

En revanche, de fortes perturbations du patrimoine génétique sont observées en présence de nano-CeO_2 pour des faibles concentrations. Des cassures simples brins de l'ADN (pour 6×10^{-2} g/L) et des mutations chromosomiques (pour 6×10^{-5} g/L) apparaissent très rapidement. Cette génotoxicité s'atténue lorsque le milieu cellulaire est dopé avec un anti-oxydant, la L-ergothionéine (Aruoma et al., 1999, Decome et al., 2005 ; Franzoni et al., 2006). Ainsi, nous avons pu relier la génotoxicité observée à un stress oxydatif induit par les nano-CeO_2. Les propriétés physico-chimiques de la surface des nano-CeO_2 ont été suivies par XAS au seuil L_3 du cérium. Nous avons montré que 25 à 30% du Ce^{IV} de la surface des nano-CeO_2 était réduite en Ce^{III} ($Eh_{CeIV/CeIII}$=1.47 V) dès leur incorporation dans le milieu cellulaire. Cette réduction du Ce^{IV} et les transferts d'électrons qui en découlent semblent être responsables du stress oxydatif et de la génotoxicité observée chez les fibroblastes dermiques humains.

De plus, dans le cas des nano-CeO_2, nous avons comparé les effets génotoxiques induits par des nanoparticules de 7 nm et de 300 nm. Pour une même masse de CeO_2, (effet lié à la surface spécifique), une génotoxicité deux fois plus importante est obtenue dans le cas des nano-CeO_2 par rapport aux particules de 300 nm. Ainsi, l'importante surface des nano-CeO_2 et donc le plus grand nombre d'atomes disponibles en surface pour subir des évolutions redox semble être un paramètre en faveur ou corréler à la toxicité des nanoparticules. En revanche, exprimées par unité de surface (effet

lié à la réactivité de surface) les réponses génotoxiques obtenues sont similaires pour les deux tailles de particules. Il n'y a donc pas d'effet lié à la réactivité potentielle des nanoparticules lors de l'interaction avec les modèles cellulaires.

Ces résultats ont fait l'objet de deux publications présentées ci-aprés. La première a été publiée dans *Environmental Science and Technology* en 2006 et traite de la relative inocuité des nano-maghémites enrobées de DMSA vis-à-vis des fibroblastes. La deuxième a été soumise à *Environmental Science and Technology* en 2007 et concerne les effets génotoxiques induits par les nano-CeO_2.

❖ ❖ ❖

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

Mélanie Auffan, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Laetitia Decome, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Jérôme Rose, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Thierry Orsière, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Michel De Méo, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Valérie Briois, synchrotron SOLEIL, Gyf sur Yvette, Paris, France
Corinne Chanéac, LCMC, CNRS-UPMC, Paris, France
Luca Olivi, synchrotron ELETTRA, Trieste, Italie
Jean-Louis Bergé-Lefranc, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Alain Botta, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Mark R. Wiesner, Duke University, Durham, Caroline du Nord, USA
Bottero Jean-Yves, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France

Abstract. Although the current production of oxide nanoparticles may be modest, the wide range of proposed applications and forecasted growth in production has raised questions about the potential impact of these nanoparticles on the environment and human health. Iron oxide nanoparticles have been proposed for an increasing number of biomedical applications although in vitro toxicity depending on the particles coating has been evidenced. The aim of this study was to examine the potential in vitro cyto- and genotoxicity on human dermal fibroblasts of DMSA-coated maghemite nanoparticles (NmDMSA) as a function of well-defined physico-chemical states. Well-stabilized NmDMSA produced weak cytotoxic and no genotoxic effects. This is attributed in part to the DMSA coating, which serves as a barrier for a direct contact between nano-oxide and fibroblasts, inhibiting a potential toxic effect.

1.1 Introduction

During the last decade, interest in nanotechnology and manufactured nanoparticles has grown and a wide range of applications for emerging nanomaterials has been proposed. In particular, the physical properties of engineered oxide nanomaterials are quite versatile and can be tailored to electronic, medical, environmental, and many other application areas. One element that environmental and medical applications have in common is that nanoparticles are often present in aqueous solutions where a large specific surface area and an elevated surface pressure favor adsorptive and cellular interactions with nanoparticles (Auffan et al., 2006; Banfield and Zhang, 2001; Zhang, 2003). Also, the relative stability of nanoparticles often varies as function of solution chemistry (Lecoanet et al., 2004). Numerous investigations have been carried out in the biomedical field using nanosized iron

oxides (for magnetic resonance imaging, cell biology, medical diagnostic and therapy) linked to their high mobility and specific reactivity with cells (Fahlvik and Klaveness, 1993; Gupta and Gupta, 2005b; Halbreich et al., 1998; Sahoo and Labhasetwar, 2003). Some studies revealed that iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4, γFe_2O_3, Fe_2O_3) could be internalized by cells and generate cell death (Berry et al., 2004; Berry et al., 2003; Berry et al., 2004; Brunner et al., 2006; Gupta and Gupta, 2005). However, the limited available informations on the iron oxide nanoparticle / living organisms interactions highlights the complexity of assessing their health and environmental impacts. For example, in function of the nature of their coating, Fe_3O_4 nanoparticles do not have the same behavior towards cell. They can be internalized in human fibroblasts or attached on the cell membrane and in both cases they could generate cell death or cell proliferation (Berry and Charles S, 2004; Berry et al., 2003; Berry et al., 2004; Gupta and Gupta, 2005a). Moreover, underivatized Fe_2O_3 nanoparticles induce a dramatic decrease in the metabolic activity and proliferation of human cells (MSTO-211H) (Brunner et al., 2006). The derivatization (or coating) of iron oxide nanoparticles seems of great importance regarding to the cell adhesion and the internalization efficiency as well as the cytotoxic effects (Brunner et al., 2006; Wilhelm et al., 2003). Moreover, with their low solubility, iron oxide nanoparticles are persistent in biological systems and could induce long term effect involving mutagenic influence on the organisms (Brunner et al., 2006).

Toxicological data are difficult to compare since the parameters controlled in each of these studies may differ and may not include those of interest in a toxicological or environmental context: mineralogical nature, purity of nanosized iron oxides and stability of the suspension in biological media. This last parameter is of great importance as one recent study concluded that the size and the aggregation state of oxide nanoparticles controlled their uptake by fibroblasts (Limbach et al., 2005). Among the derivatized iron oxide nanoparticles, meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) coated nano-maghemites (NmDMSA) are highly internalized in cells (Wilhelm et al., 2003) and offer a high potential in the biomedical (Fauconnier et al., 1997) and environmental (Hu et al., 2005) fields. The aim of the present study is to elucidate the potential in vitro cyto- and genotoxicity on human dermal fibroblasts of NmDMSA as a function of well-defined physico-chemical states and to follow the nanoparticle/cell interactions from the macroscopic to the atomic scale.

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Maghemite nanoparticles and the DMSA coating

Maghemite nanoparticles (nano-γFe_2O_3) were synthesized via aqueous co-precipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} to form magnetite, followed by an oxidation to maghemite under acidic conditions. Transmission electron microscopy and X-ray diffraction measurements have shown that these nanoparticles are roughly spherical with a mean coherent diameter of 6 nm (Jolivet et al., 2002). The specific surface area was evaluated to 172 m^2/g by adsorption of N_2 and analysis through BET method. After their synthesis, nano-γFe_2O_3 were surface-coated with DMSA ($C_4S_2O_4H_6$, Aldrich Chemicals). DMSA is an organic molecule composed by two carboxylate (pK_{COOH}=2.71; 3.43) and two thiolated functions (pK_{SH}=9.65) (Crisponi et al., 2002). Detailed elsewhere (Fauconnier et al., 1997), the coating procedure begins with an acidic solution containing a molar ratio of [DMSA] to [Fe]total of 9.2% ([nano-γFe_2O_3] = 2.1 g/L and [DMSA] = 0.45 g/L) that is alkalinized to pH 11 and then acidified to physiological pH. At the end of the coating procedure, DMSA is present as a sorbed layer at the nano-γFe_2O_3 surface yielding nanoparticles with a negative surface charge.

1.2.2 Normal human fibroblast culture and treatment

Normal human fibroblasts were isolated by the outgrowth method using infant foreskin obtained after circumcisions. Dermis was cut into small pieces of 0.5-1 mm^3 under sterile conditions. The small tissue pieces were seeded in culture dishes and incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-Glutamine, 1mM sodium pyruvate, 10μg/mL gentamicin. Fibroblasts were then cultured in complete DMEM without antibiotic at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere for 24h. Before the treatment stage, a stable colloidal suspension of NmDMSA was filter-sterilized using 0.2 μm membrane. Fibroblasts were then incubated with several concentrations of this suspension ([nano-γFe_2O_3]= 0 to 10^{-1} g/L) in complete culture medium at 37°C. For EXAFS experiments, 2.10^8 cells were incubated with 0.1 g/L of NmDMSA during 24h. The sample was freeze dried and the amount of maghemite was ≈1% by weight.

1.2.3 Nanoparticle size measurement

The particle size distribution of the NmDMSA was determined by photon correlations spectroscopy (PCS) using a SEM120 apparatus equipped with an Omnichrome ion laser (514 nm, 120mW). Samples were put in 10mm diameter cells and the system was maintained at 25°C. The photomultiplier was set to a scattering angle of 90° and the signal was transmitted to a RTG-Sematech autocorrelator. Particle size analysis was carried out using the RTG software package and the mean

mass hydrodynamic radius (<R>) was calculated from the average translational diffusion coefficient (<D>), assuming that the particle size is related to diffusivity through the Stokes–Einstein equation:

$$< D >= \frac{kT}{6\pi\eta < R >}$$

where k is the Boltzmann constant, T the absolute temperature and η is the viscosity of the fluid

1.2.4 Extended X-ray Absorption Fine Structure

X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) is a powerful tool for structural characterization of nanometer scaled materials as measurements have high selectivity between elements and are independent of the long-range order of the material. XAS spectra were recorded in transmission mode at beamline 11.1 at the ELETTRA synchrotron (Trieste, Italy). Spectra were acquired using a Si(111) monochromator from 100 eV below to 800 eV above the Fe K-edge (7.112 KeV). EXAFS spectra were obtain after performing standard procedures for pre-edge subtraction, normalization, polynomial removal and wave vector conversion using a series of programs developed by Michalowicz (Michalowicz, 1991; Michalowicz, 1997). EXAFS oscillations were theoretically recalculated using amplitude and phase functions obtained with the FEFF8 code (Ankudinov et al., 1998). FEFF functions for the Fe-O, Fe-Fe and Fe-S atomic pairs were tested by modeling the spectra of pure reference compounds ($Fe(OH)SO_4$, FeOOH, Fe_2O_3). For each atomic shell of the samples, the inter-atomic distance R, the coordination number N and the Debye-Waller factor σ were adjusted and the number of independent parameters ($N_{ind} = 2\Delta k\Delta R/\pi$) was never exceeded during modeling.

1.2.5 Toxicity assessment

Potential cytotoxic and genotoxic effects of NmDMSA were evaluated at concentrations ranged from 10^{-6} to 10^{-1} g/L with 4 replicates for each test.

Cytotoxicity assay (WST-1). WST-1 was performed to evaluate the effects of NmDMSA on normal human fibroblasts viability and to assess a decrease in the metabolically active cells (Kikkawa et al., 2005). The principle is based on cleavage of the tetrazolium salt WST-1 by mitochondrial dehydrogenases in viable cells to form a yellow formazan dye. A lower absorbance is therefore interpreted as a decrease in cell viability. After treatment with NmDMSA, a 30-min treatment with the tetrazolium salt WST-1 was performed and the absorbance was measured at 450 nm using a microtiter plate reader (Multiskan RC, Labsystems).

Genotoxicity test (comet assay). The comet assay (single cell gel electrophoresis) detects DNA single strand breaks, alkaline labile sites and excision repair processes in individual cells. It was performed under alkaline conditions according to a procedure describe in detail elsewhere (Singh et al., 1988) with slight modifications (Jean et al., 2000). The assay was carried out under yellow light to

prevent any additional damage induced by natural light. Following NmDMSA treatments, fibroblasts were resuspended in a solution of 0.5 % low melting point agarose (LMP) in PBS (phosphate buffer saline) at 37°C. The cell suspension was placed on microscope slides previously coated with two agarose layers. Solidified slides were immersed in a cold lysis solution during 90 min at 4°C. Slides were then placed in an electrophoresis tank and DNA was allowed to unwind in freshly prepared alkaline electrophoresis buffer (pH > 13) for 20 min at room temperature. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA. The slides were then neutralized and stained with ethidium bromide to visualize and analyze DNA damage, using a fluorescence microscope (250X). Image analysis was performed using the Fenestra Komet software (Kinetics Imaging 5.5, Liverpool, UK) on 100 randomly selected cells from duplicate slides. DNA damage was quantified by the increase of Olive Tail Moment (OTM). Non-linear regression analyses were performed with a χ^2-function model. The calculated degree of freedom (n) of the function, also named OTMχ^2, has been previously shown to be a quantitative parameter of the level of DNA damage in samples (De Méo et al., 1991).

1.2.6 Transmission Electron Microscopy analysis

After incubating with 0.1 g/L of NmDMSA fibroblasts were washed two times in PBS and then fixed with 4% of glutaraldehyde (in PBS) for 1h at 4°C. Cells are then dehydrated in successive alcohol baths and embedded in Araldite resin. Ultrathin sections of 50 nm were examined with a JEOL/JEM-1220 apparatus.

1.3 Results and Discussion

1.3.1 Interfacial properties and colloidal stability of nano-γFe_2O_3

A stable colloidal suspension is characterized by a high-energy repulsive barrier to prevent aggregation between particles (Stumm and Morgan, 1981; Waychunas, 2001). At physiological conditions (pH 7.4 and 0.2M NaCl), the untreated nano-γFe_2O_3 surface is electrically neutral. Under these conditions, aggregates easily formed and rapidly settled from suspension. To control the colloidal stability during the nano-γFe_2O_3/cell interactions, nanoparticles were coated with DMSA.

- **Conditions of dispersion of nano-γFe_2O_3**

Figure IV.9 shows the pH dependence of the mean hydrodynamic diameter (<2R>) of nano-γFe_2O_3 or aggregates of these particles during the coating process. For pH < 8.5, the DMSA surface coating did not produce sufficiently surface charge to prevent the aggregation of the 6 nm particles, and <2R> of the suspension was approximately 450 ± 20 nm. For pH > 8.5, DMSA generates enough

negative surface charges to enhance the stability of the suspension and the nano-γFe_2O_3 were well dispersed as small aggregates with a <2R> of 20 ± 1 nm. No reversibility and no aggregation were observed when the pH was decreased to values as low as 7.4.

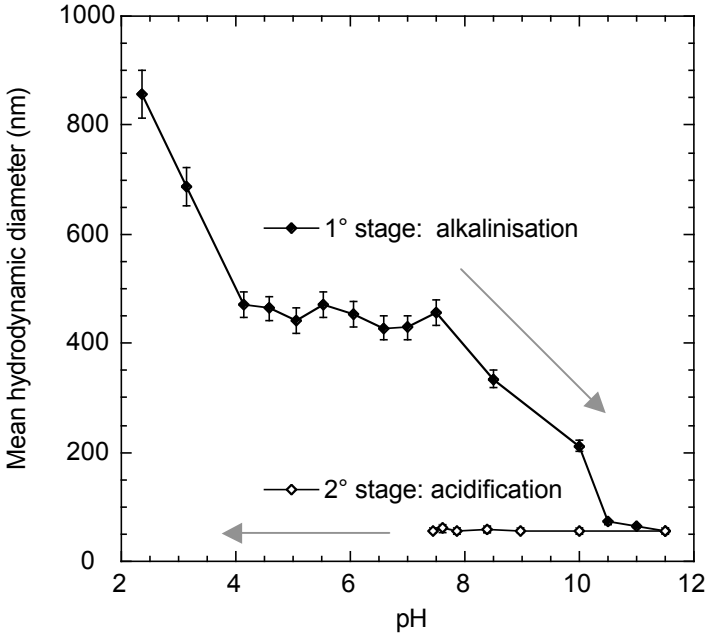


Figure IV. 1 : evolution of the mean hydrodynamic diameter of nano-γFe_2O_3 during the two-stage DMSA coating process. [nano-γFe_2O_3] = 20 mg/L.

- **Mechanisms of interaction between DMSA and nano-γFe_2O_3**

The mechanisms of interaction of DMSA with the nano-γFe_2O_3 condition the stability of the nanoparticles during their interactions with cells. The comparison between the EXAFS spectra of NmDMSA and uncoated nano-γFe_2O_3 reveals a higher amplitude of the oscillation centered at 11 $Å^{-1}$ in the case of the NmDMSA (Figure IV.10). Moreover, the Fourier transform of the EXAFS signal (Figure IV.10) shows an additional peak at approximately 2.2 Å in presence of DMSA. EXAFS signals were recalculated with the parameters shown in Table IV.2. In the case of uncoated nano-γFe_2O_3 the best fit was obtained using 3 atomic shells: 5±20% oxygen atoms at 1.96±0.02 Å in the first coordination sphere and respectively 3.9 and 8.5±20% iron atoms in the second one at 2.97 and 3.43±0.02 Å. In the literature, such inter-atomic distances are characteristic of the local atomic structure of iron atoms in maghemite (Shmakova et al., 1995). In the case of NmDMSA, the important result is the presence of sulfur atoms in the first coordination sphere of Fe. The calculations using 4 shells (including Fe-S bonds) leads to a better adjustment of the EXAFS curve in the high-k region and the residue (χ^2) is 22% off. Iron atoms are surrounded by 0.5±20% sulfur at 2.21±0.02 Å. Such inter-atomic distance exists in iron sulfur minerals: 2.24 Å for marcasite (Wyckoff, 1963), 2.26 Å for

chalcopyrite (Hall and Stewart, 1973), 2.15 Å for pyrite (Bayliss, 1977) and greigite (Skinner et al., 1964).

This result implies that 40±10% of Fe atoms are bound to S atoms at 2.21 Å. By taking into account the size and the crystal structure of the nano-γFe_2O_3, we estimate that 40% of the Fe atoms are in the surface layer. Therefore it appears that almost the surface Fe atoms are affected by the DMSA through chemical linkage. Thus, with the strong Fe-S bonds, the DMSA coating i) slightly disturb the structure of the surface of nano-γFe_2O_3 and ii) allows a good dispersion of the suspension through the $-COO^-$ functions.

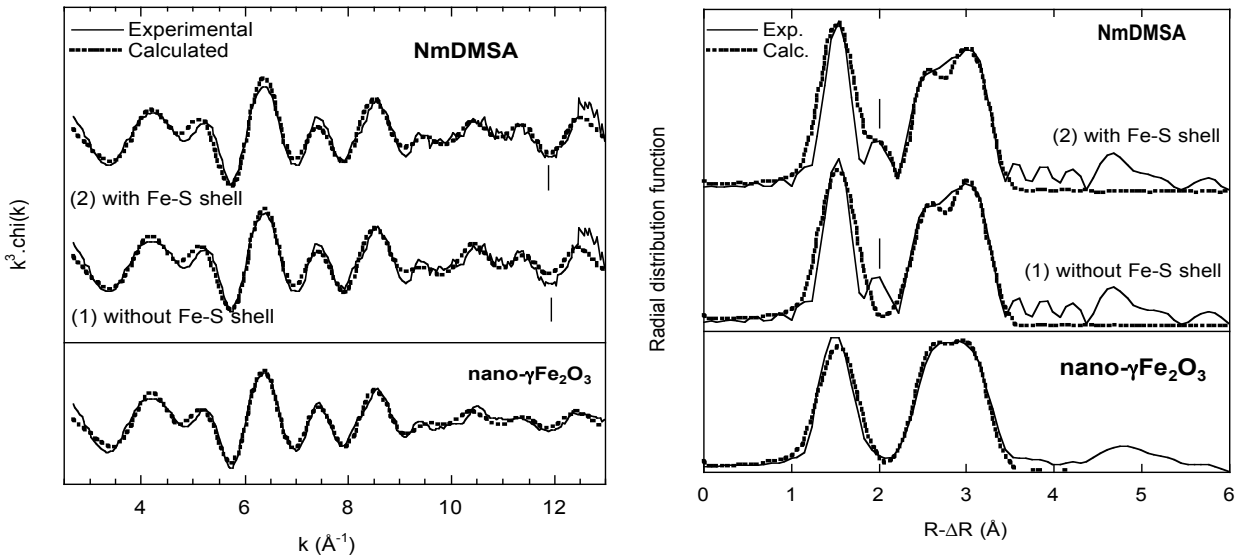


Figure IV. 2 : EXAFS Fe K-edge spectra and their corresponding Fourier transform for uncoated nano-γFe_2O_3 and NmDMSA calculated with and without Fe-S shell.

Table IV. 1 : structural parameters deduced from EXAFS analysis for NmDMSA and uncoated nano-γFe_2O_3.

Samples	Fit number	Atomic shells	N ± 20%	R (Å) ± 0.02Å	σ (Å)	Residue
nano-γFe_2O_3		Fe-O	5.0	1.96	0.107	980
		Fe--Fe_1*	3.9	2.97	0.101	
		Fe--Fe_2*	8.5	3.43	0.105	
DMSA-coated nano-γFe_2O_3	(1) Without Fe-S shell	Fe-O	4.8	1.95	0.094	8930
		Fe--Fe_1*	4.8	2.96	0.108	
		Fe--Fe_2*	7.3	3.44	0.095	
	(2) With Fe-S shell	Fe-O	4.9	1.95	0.090	6990
		Fe-S	**0.5**	**2.21**	**0.010**	
		Fe--Fe_1*	4.8	2.96	0.108	
		Fe--Fe_2*	7.3	3.44	0.094	

* The Fe--Fe_1 and Fe--Fe_2 shells correspond to iron present in the second coordination sphere at short and long distance respectively

1.3.2 Colloidal stability of NmDMSA in biological media

The limit of the colloidal stability of NmDMSA is shown in Figure IV.11. For concentrations lower than 10^{-3} g/L, no destabilization was observed within the abiotic DMEM medium over a period of 48h. However, for values greater than 10^{-3} g/L, aggregation readily occurred and the <2R> increase to 70 nm.

The NmDMSA exhibited a weak aggregation when mixed with the supernatant of a fibroblasts culture medium. This limited aggregation is attributed to destabilization of NmDMSA by molecules excreted by fibroblasts (e.g. collagens, proelastin, glycoproteins and proteoglycans) (Pieraggi et al., 1985; Smola et al., 1998). We speculate that excreted proteins may have interacted with $-COO^-$ groups of the adsorbed DMSA and decreased the repulsion between particles due to partial charge neutralization (Kim et al., 2005; Limbach et al., 2005).

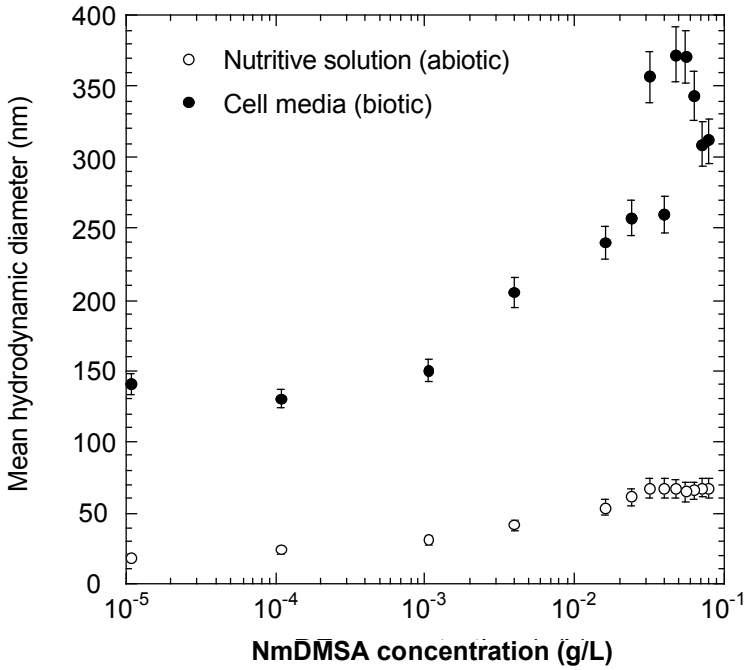


Figure IV. 3 : stability of the NmDMSA suspension in the abiotic supplemented DMEM (o) and a supernatant of a 24h cell culture (●). Contact time: 48 h.

1.3.3 Endocytosis of NmDMSA by fibroblasts

The TEM images show the internalization of NmDMSA within fibroblasts after 2h of incubation (Figure IV.12). NmDMSA are clearly visible and distinct from the cellular matrix due to their high electron density. In a first step, nanoparticles are adsorbed on the outside layer of the cell membrane in the form of nano-aggregates as predicted by the previous size measurements (Figure IV.11). This nanoparticle / cell membrane interaction is certainly governed by electrostatic interactions

as described previously (Wilhelm et al., 2002). Then, endocytosis vesicles containing nanoparticles are formed through the deformation of the membrane and dispersed throughout the cytoplasm (Figure IV.12 B,C). No evidence of aggregates in the cytoplasm or inside mitochondria or nucleus could be found from TEM images.

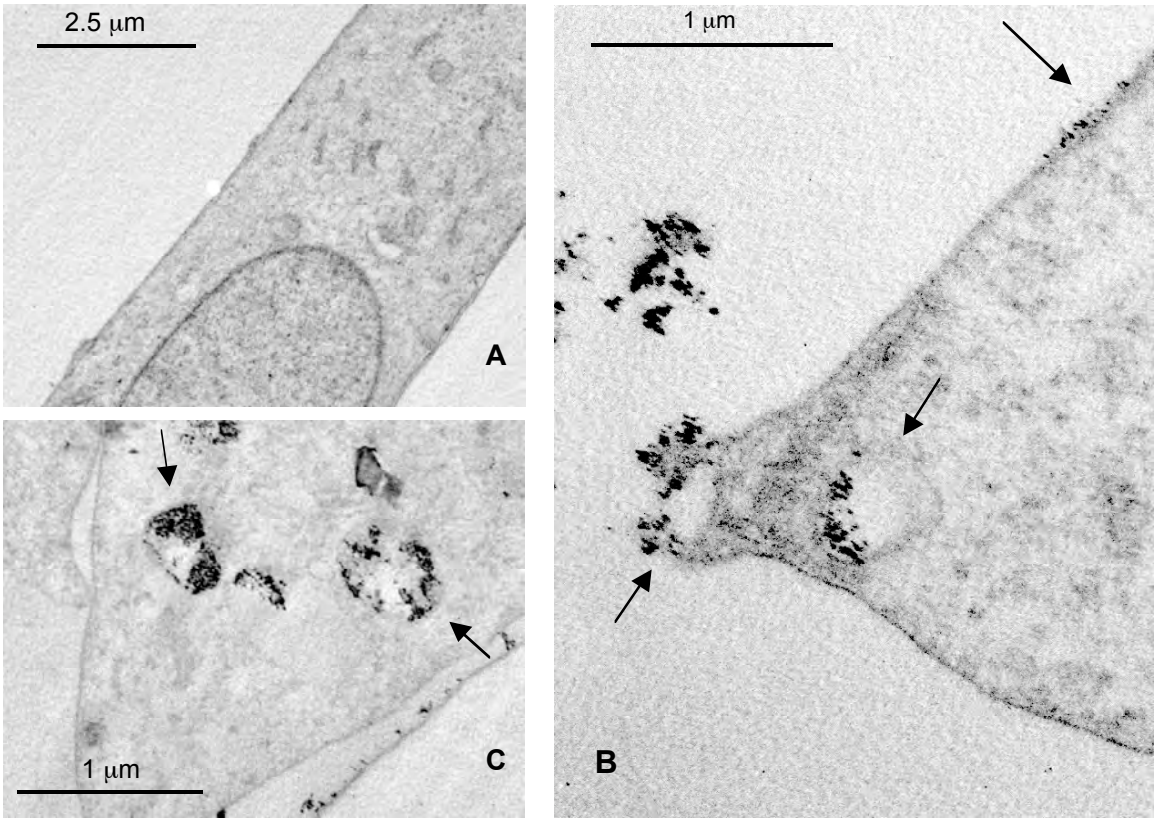


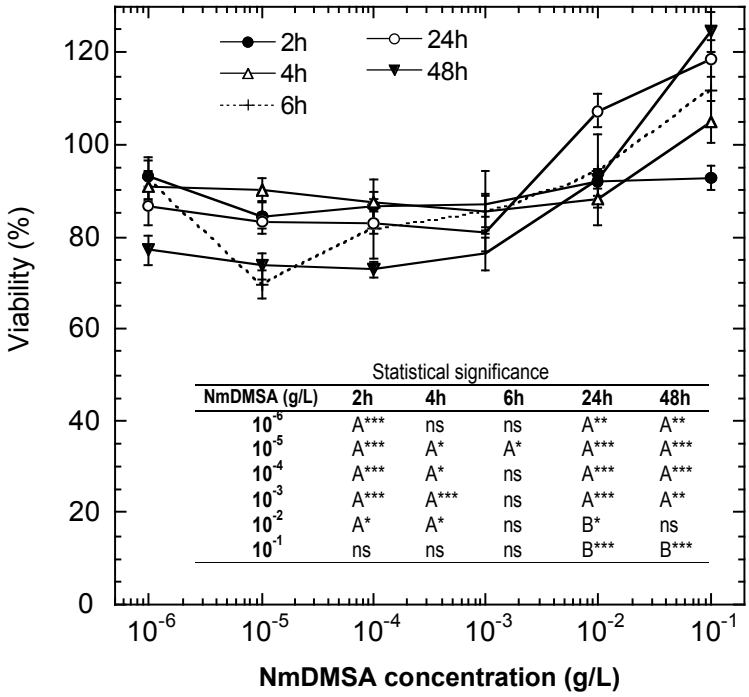
Figure IV. 4 : TEM pictures of human fibroblasts incubated with 0.1 g/L of NmDMSA during 2h (b) and 24h (c). (a) Control fibroblasts. Thin surface layer of NmDMSA and endocytosis vacuoles containing aggregates of different size are visible.

1.3.4 Cytotoxicity and genotoxicity of NmDMSA towards fibroblasts

The concentrations of NmDMSA used in the cyto- and genotoxicity tests are those tested for dispersion experiments as shown in Figure IV.11. The cell viability slightly but significantly decreases from 10^{-6} to 10^{-3} g/L following 2h, 24h- and 48h-exposure duration (Figure IV.13). This slight decrease in the metabolic mitochondrial activity (MMA) seems to be transient as the statistical significance was loss for 6h-exposure duration. It has been demonstrated that the internalization processes take place in the few minutes following adhesion (Wilhelm et al., 2003). One can hypothesis that once the nanoparticles are in the endocytosis vesicles, cell components are transiently protected from their moderate deleterious effect. Nevertheless, the presence of NmDMSA over 24h and 48h

induced also a decrease in MMA which may be linked to a higher proportion of cell that have divided once (Brunner et al., 2006).

Surprisingly, 10^{-1} g/L of NmDMSA leads to a moderate but statistically significant increase in the MMA following 24h and 48h exposure duration. This could be related to the aggregate size increasing (Figure IV.11) which suggests a lower contact of NmDMSA with cells (Limbach et al., 2005).



NmDMSA (g/L)	2h	4h	6h	24h	48h
10^{-6}	A***	ns	ns	A**	A**
10^{-5}	A***	A*	A*	A***	A***
10^{-4}	A***	A*	ns	A***	A***
10^{-3}	A***	A***	ns	A***	A**
10^{-2}	A*	A*	ns	B*	ns
10^{-1}	ns	ns	ns	B***	B***

Figure IV. 5 : fibroblasts viability over a 48h period determined by the WST-1 assay and statistical significance (t-test) of the assay. A : decreased mitochondrial activity ; B : increased mitochondrial activity. Statistical significance : ns : no significant ; * : P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** : P<0.001.

The genotoxicity tests using the comet assay represents DNA strand breaks following either direct damage induced by the tested compound or indirect effects linked to the DNA repair processes. MethylMethaneSulfonate (MMS), an alkylating agent used as positive control, yielded increases of the OTM and OTMχ^2 values (De Boeck et al., 2000). No significant increase of OTM values (Figure IV.14) could be detected at any tested dose although a tendency towards greater values could be noticed with increasing doses. No significant difference in the OTMχ^2 values was found between treated cells and the control whatever the concentration and the duration of the incubation time (Table IV.3). The OTMχ^2 values of the control were similar. Thus, NmDMSA did not appear to induce DNA single-strand breaks in human fibroblasts.

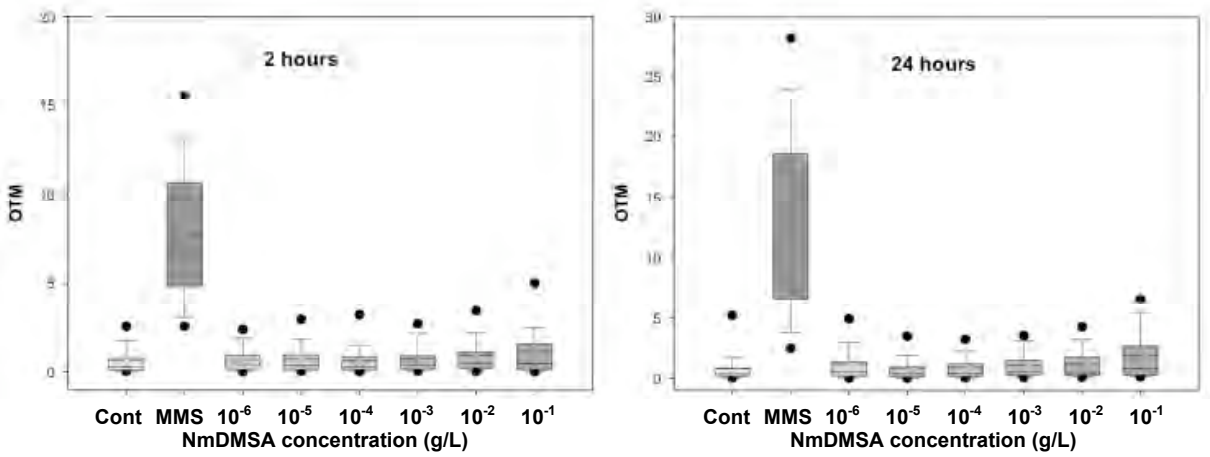


Figure IV. 6 : box-and-Whisker plots of OTM values for the comet assay experiments. The graphs display the 25th and 75th percentiles (lower and upper sides of boxes), the 5th and 95th percentiles (error bars), the lowest and highest OTM values (black circles), the median (black line), and the mean (dashed line).

Table IV. 2 : complete results of the genotoxicity of NmDMSA in normal human fibroblasts by the comet assay.

Substances	Concentrations	OTMχ^2 ± SD 2h	24h
Control		2.08 ± 0.04	2.10 ± 0.08
MMS	3.3 mg/L	13.95 ± 0.51 ***	11.77 ± 0.61 ***
DMSA coated Nano-γFe_2O_3	10^{-6} g/L	2.10 ± 0.05 (ns)	2.08 ± 0.02(ns)
	10^{-5}	2.11 ± 0.08 (ns)	2.05 ± 0.01 (ns)
	10^{-4}	2.11 ± 0.08 (ns)	2.11 ± 0.08 (ns)
	10^{-3}	2.12 ± 0.08 (ns)	2.12 ± 0.07 (ns)
	10^{-2}	2.11 ± 0.05 (ns)	2.10 ± 0.05 (ns)
	10^{-1}	2.12 ± 0.07 (ns)	2.12 ± 0.05 (ns)

MMS: MethylMethaneSulfonate
For all samples, the probability of the calculated OTMχ^2 was $P < 10^{-5}$
ns : non significant difference as compared to the control
***: statistically different from the control ($P < 0.001$)

1.3.5 Surface state of NmDMSA in contact with the fibroblasts

EXAFS spectra of NmDMSA before and after a 24h-contact with cells were compared. The results are similar (a peak at 2.2Å (Figure IV.15B) and the low $R_{3/2}$ residue (Figure IV.15A)) indicating that DMSA remain adsorbed at the nanoparticles surface through Fe-S bonds when contacting cells.

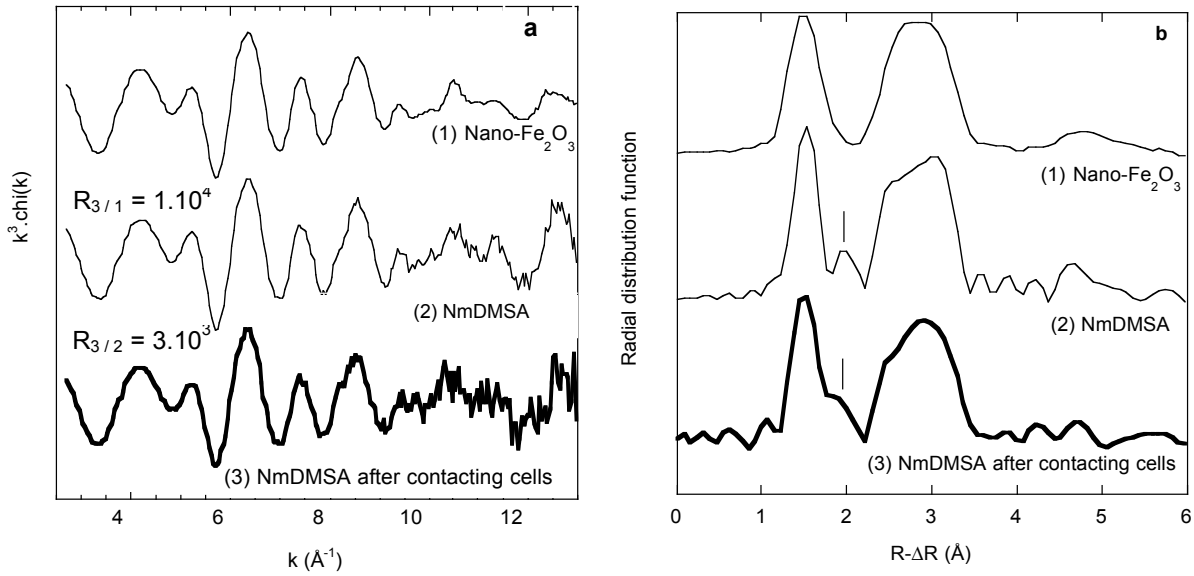


Figure IV. 7 : (a) raw EXAFS (Fe K-edge) and (b) their corresponding Fourier transform of NmDMSA before and after contacting fibroblasts. $R_{3/1}$ and $R_{3/2}$ corresponds to the difference between the spectra (3) and (1) and (3) and (2) respectively. Residue calculation formula: $R = \sum_i (y_i^a - y_i^b)^2 \big/ (y_i^a)^2$

In presence of very low concentrations of NmDMSA, the MMA is ≈20% off. Recent work shows similar decrease of viability after applying high uncoated and dextran coated nano-magnetite concentrations (0.05 g/L) (Berry et al., 2004). Recently, a pronounced cytotoxic effect on fast growing cells in presence of uncoated iron oxide nanoparticles at 3.75 mg/L has been shown (Brunner et al., 2006). At 0.1 g/L of NmDMSA one observed an increase in the MMA, which might be related to an enhanced cell proliferation. The lack of genotoxicity of NmDMSA (Figure IV.14, Table IV.3) could be associated with the lack of evidence of nanoparticles in the cytoplasm or inside mitochondria and nucleus (Figure IV.12). Nevertheless, we could point out that NmDMSA damage occur in very few cells at large NmDMSA concentration (Figure IV.14).

The chemical nature of the coating seems to imply different cell responses in term of cytotoxicity. The stability of the coating onto nano-oxide surface could play a preponderant role. The albumin and dextran coating can be displaced when the particles are on / in the cells (Berry et al., 2003; Berry et al., 2004), while in the case of NmDMSA the coating is never or weakly displaced (Figure IV.15) preventing a direct contact of cell constituents with the strong oxidizing nano-oxide surface. Although the absence of DNA break are not a proof of the absence of carcinogenic effect, complete DMSA coating should increase the biocompatibility of iron oxide nanoparticles. Experiments with partial surface coating of nano-maghemites should be led to confirm this protective effect.

❖ ❖ ❖

2. DNA damage generated by surface redox processes of nano-CeO_2 towards human cells

Mélanie Auffan, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Jérôme Rose, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Thierry Orsière, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Michel De Méo, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Antoine Thill, CEA Saclay, Gyf-sur-Yvette, France
Ophélie Zeyons, CEA Saclay, Gyf-sur-Yvette, France
Perrine Chaurand, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France
Olivier Proux, LGIT, CNRS-Université Joseph Fourier, St Martin d'Hères, France
Alain Botta, LBME, Faculté de médecine et pharmacie, Marseille, France
Mark R. Wiesner, Duke University, Durham, Caroline du Nord, USA
Bottero Jean-Yves, CEREGE, CNRS – Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, France

Abstract. We report here the DNA lesions and chromosome damage generated by nanosized CeO_2 water suspension towards human dermal fibroblasts. By combining a physico-chemical and a genotoxicological approach, we define the causal mechanisms linking the physico-chemical properties of nano-CeO_2 with their biological effects. Our results strongly suggested that oxydo-reduction processes occurring at the nanoparticles surface were directly related to the observed DNA lesions and chromosome damage.

2.1 Introduction

The enhanced physicochemical properties of manufactured nanoparticles make them highly attractive for a large range of applications and it is predicted that their global production will reach 500 000 tonnes/year in 2015 (afsset, 2006). Following this development a new discipline has emerged, the nanotoxicology (Donaldson et al., 2004; Oberdörster et al., 2005). Indeed, it is to be feared that manufactured nanoparticles, characterized by a large specific surface area (SSA) and a greater reactivity, can directly interact with living organisms leading to potential toxicological effects. Among all the nanoparticles used currently, CeO_2 nanoparticles (nano-CeO_2) represent a good candidate for nanotoxicological studies since they are widely used and studied in medicine, cosmetics, as automotive catalysis converters and also polishing materials (Hochino et al., 2001; Jung et al., 2004; Larachi et al., 2002; Tsunekawa and Fukuda, 1999). The successful applications of nano-CeO_2 are linked to their ability to absorb UV radiation, their antioxidant properties and the fast valence exchange between Ce^{4+} and Ce^{3+} ions associated to oxygen storage.

To date, the interactions between nano-CeO_2 and biological or environmental targets are paradoxical. Recently, nano-CeO_2 has been described as promising radio-, cardio- and neuroprotectant in biological systems by keeping cells from radiation-induced cell death and/or from oxidative-stress

induced cell death. Nano-CeO_2 have been shown to scavenge reactive oxygen species (ROS) and reduce oxidative stress as free radical scavenger (Das et al., 2007; Niu et al., 2007; Schubert et al., 2006; Tarnuzzer et al., 2005). These studies have proposed that nano-CeO_2 with a mixed valence $Ce^{4+/3+}$ acted as an antioxidant via an oxido-reduction cycle $Ce^{3+} \xrightarrow{(1)} Ce^{4+} \xrightarrow{(2)} Ce^{3+}$ occurring at their surfaces: (1) during the oxidation of Ce^{3+} they scavenge the ROS generated by irradiation for example and (2) an autoregenerative mechanism renews the oxidation state from Ce^{4+} to Ce^{3+}. Paradoxically, first toxicological studies revealed that nano-CeO_2 decreased the viability of some bacteria, human and rodent cells (Brunner et al., 2006; Lin et al., 2006; Thill et al., 2006). This cell death was supposed to be related to the ROS generation by nano-CeO_2 leading to an oxidative stress but without any direct evidence (Brunner et al., 2006; Lin et al., 2006). These observations were inconsistent with those previously reported concerning the protective antioxidant properties of nano-CeO_2. To go further in the comprehension of the biological impacts of nano-CeO_2 it is necessary to define the mechanisms linking the physicochemical properties of nano-CeO_2 with their biological effects. That should be one of the main concerns of nanotoxicological studies.

To date, the causal relationships between the surface properties of nanoparticles and the organisms are not well understood and key issues must be addressed: are the nano-CeO_2 a ROS scavenger or a source of ROS in biological medium? If they generate ROS, does this oxidative stress can induce DNA damage? What is the nature of the nano-CeO_2 / cell interactions? To answer these questions, it is necessary to connect cellular answers to the physicochemical behavior of CeO_2 particles. The aim of the present was to study the potential *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of nano-CeO_2 towards human dermal fibroblasts and the mechanisms occurring at the nanoparticles/cell interface. For this purpose, we combined toxicological and physicochemical approaches. Moreover, this study compares the potential genotoxic effects of nano-CeO_2 to one of larger particles (320nm diameter). This comparison allowed to study a size-dependent toxicity of CeO_2 particles in relation with the specific surface area (SSA) and the surface reactivity.

2.2 Experimental section

Nano-CeO_2 (Rhodia chemicals) were synthesized by aqueous precipitation of $Ce^{4+}(NO_3^-)_4$ salt at acidic pH (Chane-Ching, 1987). Nano-CeO_2 are ellipsoidal crystallites with a mean diameter of 7nm and a specific surface area (SSA) of 400 m^2/g (Nabavi et al., 1993; Spalla and Cabane, 1993). Powdered micro-CeO_2 with a mean diameter of 320nm and a SSA estimated from the mean size at ~40 m^2/g were obtained by calcinations and grindings.

Normal Human Fibroblasts were selected as biological target for this study. They were cultured at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate. Fibroblasts were incubated with several concentrations of the filter-sterilized (<0.2µm) suspension of nano-CeO_2

ranging from 6×10^{-6} to 1.2 g/L during several contact periods. The cell viability and potential DNA damages were evaluated with the WST-1 assay (measurement of cell viability based on the metabolic mitochondrial activity), the comet assay (detection of the DNA single-stand breaks) (De Méo et al., 1991; Jean et al., 2000; Singh et al., 1988) and the cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) assay (detection of chromosome breakage and loss) (Fenech, 2007; Iamarcovai et al., 2006). For each test, 4 replicates were performed. Statistical significant differences between exposed and unexposed samples were analyzed using (i) the student's t-test for the WST-1 assay, (ii) comparison of the mean OTMχ^2 for the comet assay and (iii) the contingency 2×2 χ^2 test for the CBMN. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the fibroblasts incubating with 0.6 g/L of nano-CeO_2 during 24h. The biological samples were embedded in resin and cut into ultra thin sections.

The physico-chemical properties of nano-CeO_2 were followed using two spectroscopic techniques. The colloidal stability of nano-CeO_2 in the culture medium was determined by dynamic light scattering using a Nanotrac®. The nano-CeO_2 surface properties were followed at the atomic scale by X-ray absorption spectroscopy (XAS) at the Ce L_3-edge (5.723 keV). Experiments were done at the Swiss Light Source (SLS, Switzerland) on the LUCIA beamline and at the European Synchrotron Radiation Facilities (ESRF, France) on the FAME beamline (BM30b) (Proux et al., 2005; Proux et al., 2006). XANES data were obtained after performing standard procedure for pre-edge substraction and normalization using a serie of programs developed by Michalowicz (Michalowicz, 1997). For XAS experiments, 5×10^7 cells were incubated with 0.6 g/L of nano-CeO_2 during 24h. The sample was freeze-dried and the amount of nano-CeO_2 was ≈1% by weight. A detailed description of the material and methods used in this study is given in annexe 4.

2.3 Aggregation of nano-CeO_2 in DMEM culture medium

The point of zero net charge (PZC) of nano-CeO_2 in water is known to be highly alkaline (pH 7.9 to 10.5) (De Faria and Trasatti, 1994; Nabavi et al., 1993; Sehgal et al., 2005; Spalla and Cabane, 1993). Hence at physiological pH (7.4) nano-CeO_2 should be dispersed. But a strong colloidal destabilization occurred within the DMEM culture medium that was related to their concentration in solution (Figure IV.16). For concentration in nano-CeO_2 lower than 4×10^{-2} g/L an aggregation occurred and exhibited a bimodal distribution. The larger aggregates reached a mean size of 1.2±0.1 μm but the major part of aggregates had a mean size of 110±10 nm. For concentration higher than 4×10^{-2} g/L this aggregation was increased. The distribution also showed two mean sizes, one at 3500±500 nm and the other at 300±10 nm. As previously demonstrated, once injected in DMEM the isoelectric point of nanoparticles is shifted to value close to zero (Limbach et al., 2005) and as a consequence aggregation occurred.

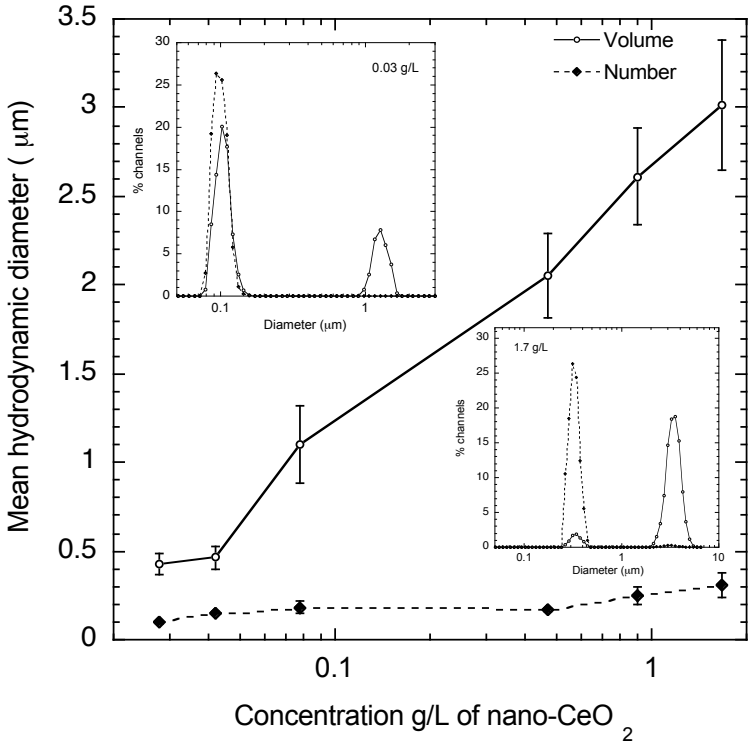


Figure IV. 8 : colloidal stability of nano-CeO_2 in the DMEM as a function of their concentration in solution. The aggregation diameter distribution in DMEM is given for two nano-CeO_2 concentrations.

2.4 Internalization of nano-CeO_2 within fibroblasts

The majority of nano-CeO_2 met the fibroblasts under the form of aggregates. TEM images showed that during the incubation with fibroblasts, these aggregates were adsorbed onto the extern membrane of cells (Figure IV.17). Nano-CeO_2 were clearly visible and distinct from the cellular matrix due to the high electron density of CeO_2. The nanoparticle/cell membrane interaction is certainly governed by electrostatic interaction as predicted previously (Limbach et al., 2005; Wilhelm et al., 2002). The adsorption onto the membrane is followed by the internalization of the aggregates via an endocytosis pathway (Figure IV.17) as noted by the presence of vesicles filled with nano-CeO_2 and dispersed throughout the cytoplasm. The internalization of nano-CeO_2 and nano-iron oxides inside fibroblasts has ever been observed in the literature (Limbach et al., 2005; Wilhelm et al., 2002). No evidence of nano-CeO_2 inside mitochondria or nucleus was found from the TEM images.

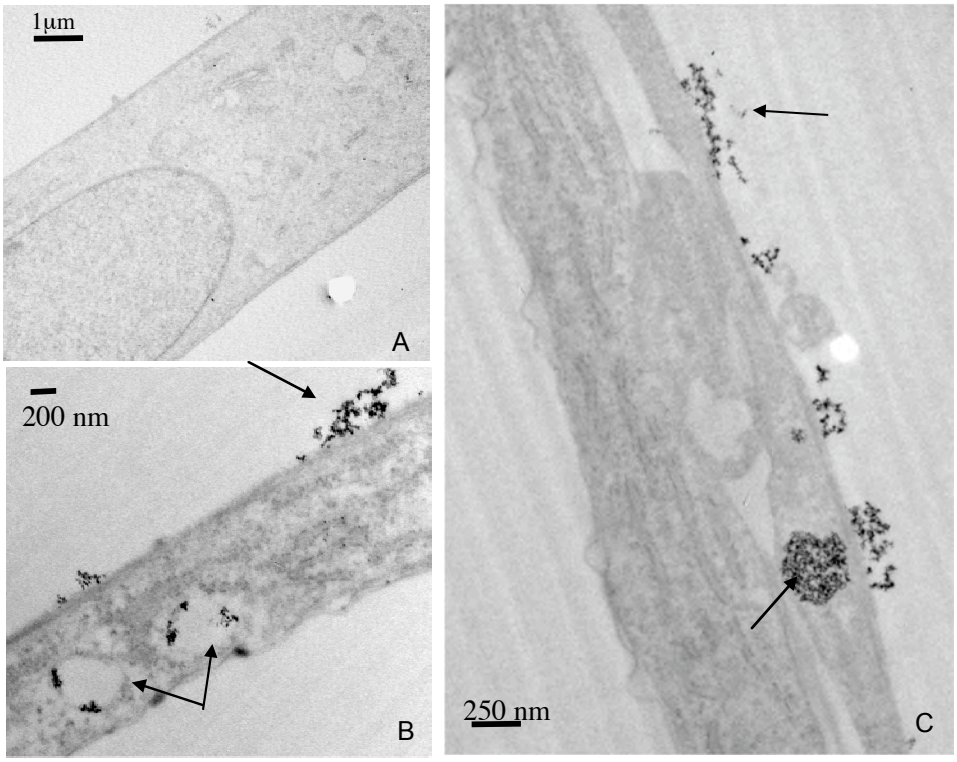


Figure IV. 9 : transmission electron microscopy imaging of (A) human fibroblasts and (B-C) human fibroblasts incubated with 0.6 g/L of nano-CeO_2 during 24h. Surface layer of nanoparticles and endocytosis vacuoles (arrows) are visible.

2.5 In vitro cyto- and genotoxicity of nano-CeO_2 towards fibroblasts

The potential hazardous effect of nano-CeO_2 on human fibroblasts was studied using several tests of cyto- and genotoxicity. As demonstrated by the WST-1 results, the endocytosis did not generate any modification of the metabolic mitochondrial activity (MMA) of fibroblasts from 6×10^{-6} to 6×10^{-2} g/L of nano-CeO_2 (Figure IV.18). No statistical significant modification of the cell viability occurred whatever the exposure duration. However, for concentrations higher than 0.6 g/L the MMA was significantly disturbed in our experimental conditions, particularly for short exposure duration (Figure IV.18). After 2h with 0.6 g/L the MMA was 43% off while after 4h, 6h, 24h and 48h, the respective MMA were 83%, 76%, 59% and 97%. Surprisingly, the cytotoxic effect observed with 0.6g/L nano-CeO_2 was transient. Indeed, the MMA was not modified following a 48h incubation period. Nevertheless, this concentration was so high that its occurrence following human exposure is clearly unlikely.

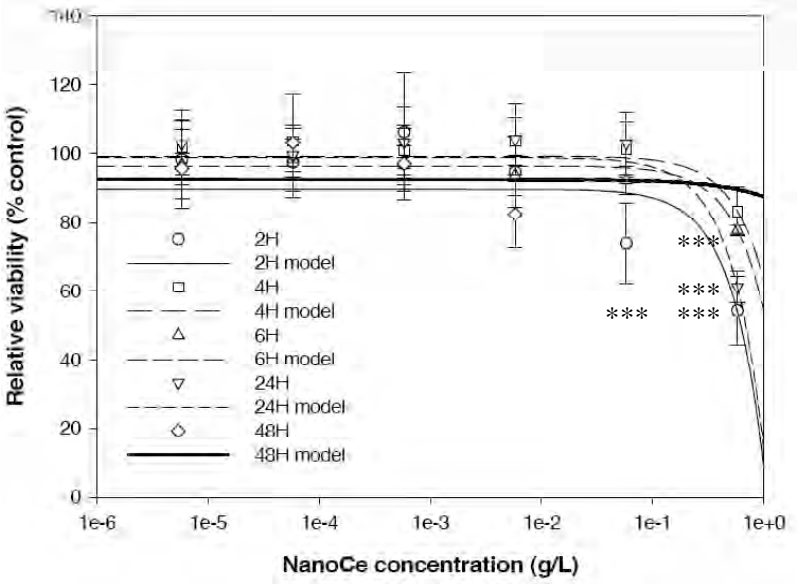


Figure IV. 10 : effect of the nano-CeO_2 treatment on the fibroblasts viability over a 48h period determined by the WST-1 assay. The statistical significance is determined by the Student's *t* test (***: $P<0.001$)

The genotoxic potentials of nano-CeO_2 were studied with the monitoring of DNA single-strand breaks (SSB) formation and micronuclei (MN) induction as sensitive markers. As assessed by the CBMN assay, there is a strong dose-dependence effect of nano-CeO_2 and the chromosome damage (Figure IV.19). Binucleated micronucleated fibroblast frequencies were significantly increased following 48h exposure duration from 6×10^{-5} to 6×10^{-2}g/L. Since micronucleus expression is dependent on cell division, cell proliferation has been assessed by the calculation of the Cytokinesis-blocked Proliferation Index (CBPI). No decrease in the CBPI was observed indicating that the incubation with nano-CeO_2 did not induce any decrease in the cell proliferation after 48h, which is in agreement with our cytotoxicity data. However, the binucleated micronucleated fibroblast frequencies were as high as those of Mitomycin C, a well-known DNA cross linker used as positive controls. These MN induced by nano-CeO_2 towards fibroblasts in our experimental conditions can originate from (i) chromosome breakages induced by direct double strand break or by misrepair of DNA lesions and/or (ii) chromosome losses due to impairment in the mitotic apparatus linked to oxidative stress.

As assessed by the comet assay, the measurements of DNA-SSB formation were performed for a short incubation period (2h) to reveal primary DNA lesions. As presented in Figure IV.20, a dose-response effect was clearly demonstrated by the comet assay between the OTMχ^2 values (that quantifies the levels of DNA lesions) and the increased concentration of nano-CeO_2. For less than 6×10^{-4} g/L of nano-CeO_2, no increase of the OTMχ^2 value could be detected. A slight but significant increase of the OTMχ^2 value appeared in presence of 6×10^{-3} to 6×10^{-2} g/L of nano-CeO_2. But for concentrations higher than or equal to 0.6 g/L a significant cell response occurred. In this case, the

OTMχ^2 values were as high as those of methylmethanesulfonate (MMS), a well-known alkylating agent used as a positive control. These results highlighted the ability of nano-CeO_2 to induce DNA SSB towards fibroblasts in our experimental conditions.

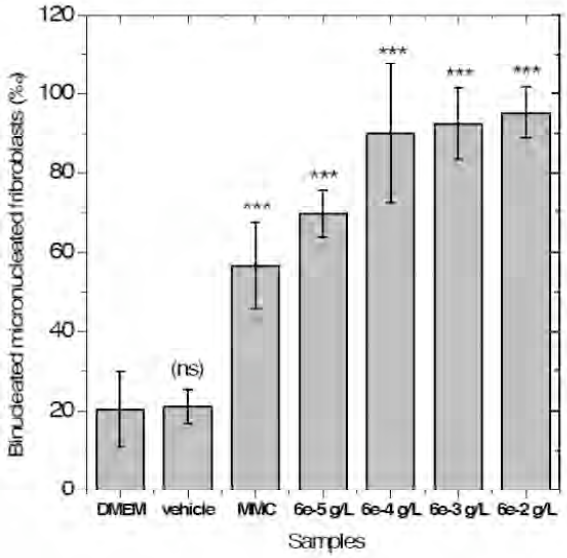


Figure IV. 11 : CBMN assay on human dermal fibroblasts exposed to nano-CeO_2 for 48h. Vehicle consisted in the addition of 0.5% milli-Q water. ***: P<0.001. ns : non-significant

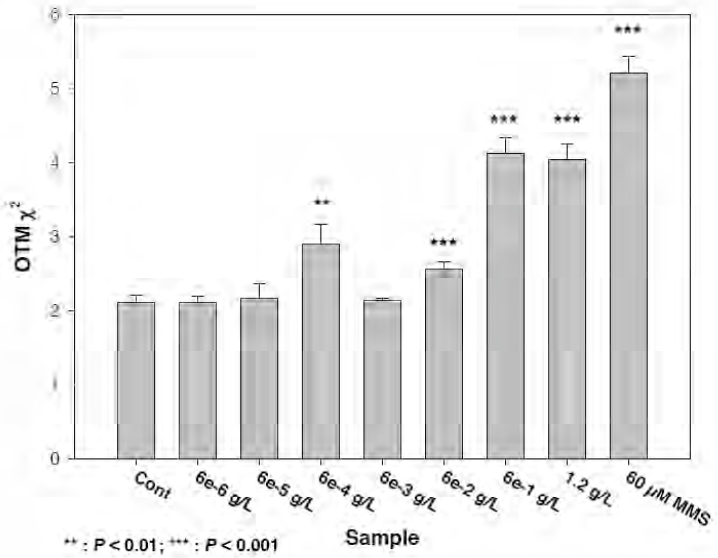


Figure IV. 12 : genotoxicity of nano-CeO_2 estimated via the comet assay. Fibroblasts were incubated with different concentrations of nano-CeO_2 for 2h at 37°C and SSB were immediately quantified after the contact period using alkaline comet assay.

2.6 Size-dependance of the toxicity of nano- versus microparticles

The size-dependence of the toxicity and genetic alterations previously observed was studied with the comet assay. Two properties differentiate nano- from micro-particles: (i) the large specific surface area (the SSA of 7nm-diameter nanoparticles is ~10 times larger than the SSA for 320nm-sized particles) and (ii) the greater surface reactivity (nanoparticles with a 10nm-diameter can adsorb per unit surface area ~3 times more ions than particles of 300nm) (Yean et al., 2005). This greater reactivity and large SSA mean that for one gram or one nm^2, the interaction between particles and their environment will be stronger in the case of nanoparticles. As demonstrated in Figure IV.21A, for a given mass, the OTM χ_2 values of the comet assay were larger for nano- than micro-CeO_2. For 0.6 and 1.2 g/L of CeO_2, the DNA SSB observed in presence of micro-CeO_2 were at least 2 times lower than for nano-CeO_2. At the reverse, the greater reactivity and the 'nano' effect previously observed in adsorption studies did not appear to induce a greater toxicity of nano-CeO_2. As shown in Figure IV.21B, when expressed by unit surface area the DNA alterations induced by nano- and micro-CeO_2 were similar.

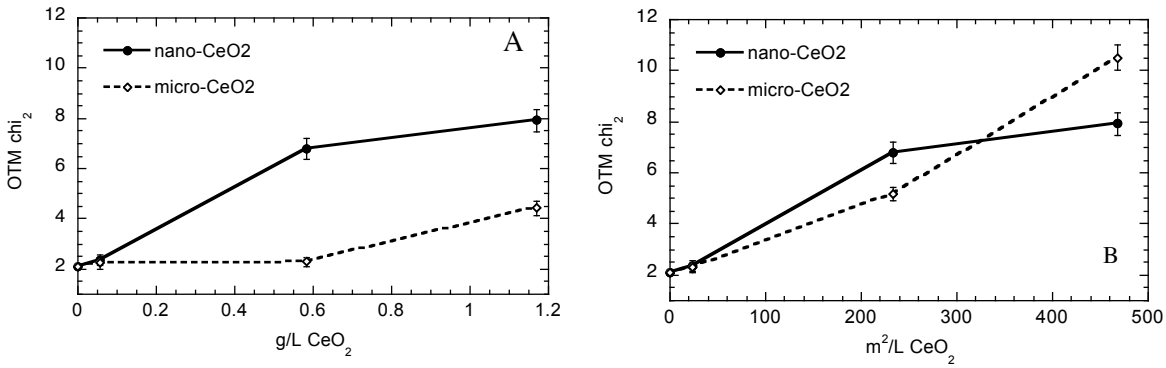


Figure IV. 13 : comparison of the genotoxicity induced by nano-CeO_2 and micro-CeO_2 estimated via the comet assays. The results are expressed per mass (A) and surface area units (B).

2.7 The oxidative stress induced by the surface of nano-CeO_2

Nano-CeO_2 have been shown to induce oxidative stress in human cells (Lin et al., 2006) and the authors suggested that this oxidative stress would induce DNA damage. To explore the role of oxidative species in the increase in DNA damage a pre-incubation of cells with an anti-oxidant, the L-ergothioneine (ERT) was done before performing the Comet assay. ERT can act as an efficient scavenger of ROS such as hydroxyl radicals, hypervalent ferryl complexes, halogenated oxidants peroxynitrite-derived nitrating species and also singlet oxygen (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999; Decome et al., 2005). As demonstrated in Figure IV.22, the pre-incubation with 4mM of ERT during 2h, significantly decreased the DNA SSB induced by the presence of nano-CeO_2. The ERT pre-incubation inhibited the appearance of SSB between 6×10^{-2} to 0.6 g/L of nano-CeO_2 and divided by

two the OTMχ^2 value for 1 g/L of nano-CeO_2. Since ERT is a scavenger of ROS, this result indicates that the DNA damages observed on fibroblasts in presence of nano-CeO_2 are related to an oxidative stress induced by ROS generation.

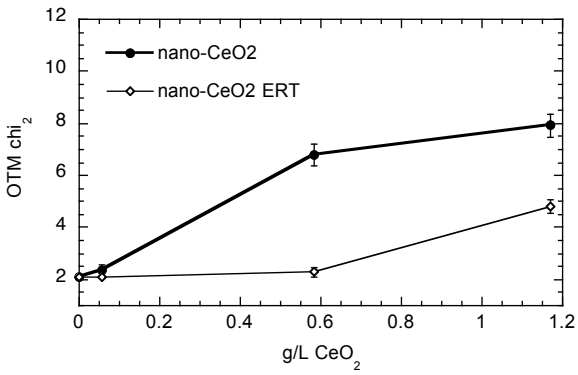


Figure IV. 14 : effect of pre-incubation of fibroblasts with L-ergothioneine (4mM at 37°C for 2h) prior to exposure to 0.06, 0.6 and 1 g/L of nano-CeO_2 for 2h (fine line) on the comet assay results. Thick line: incubation with nano-CeO_2 without pre-incubation with ERT.

The nano-CeO_2/cell interface reactions were studied by XANES at the Ce L_3-edge (Figure IV.23) to elucidate the origin of ROS. The shapes of XANES spectra (double white line for Ce^{4+} and single one for Ce^{3+}) and the position of the edge (5729eV for Ce^{3+} and 5733eV and 5741eV for Ce^{4+}) are strongly different between Ce^{3+} and Ce^{4+} references compounds. Consequently a slight change in the redox state of nano-$Ce^{4+}O_2$ during the interaction with cells can be easily quantified through linear combination of Ce^{3+} oxalate and nano-$Ce^{4+}O_2$. In this study, nano-CeO_2 were put in the abiotic complemented DMEM culture medium during 24h and the solid phase was analysis by XAS. After incubation in DMEM, a shoulder appeared on the XANES spectra of nano-CeO_2 at the energy of the Ce^{3+}. By linear combination, we estimated that a contribution of 8%±0.5 of Ce^{3+} was required to fit well the experimental data. Hence, 8%±0.5 of the Ce^{4+} of nano-CeO_2 was reduced in Ce^{3+} in the abiotic DMEM. When nano-CeO_2 are suspended in water, this reduction is not observed.

By taking into account the size of the particles (7nm) and the thickness of the surface layer (5Å), a total of 35-40% of the Ce atoms was at the surface of the nano-CeO_2. By supposing that the reduction of Ce observed in the DMEM culture medium only occured at the surface, 20-25% of Ce^{4+} of the surface was reduced to Ce^{3+}. After 24h of incubation with fibroblasts, there was no increase of the Ce^{3+}/Ce^{4+} ratio compared to the incubation in abiotic DMEM. That indicates that the 8% of reduction was mainly due to redox processes between nano-CeO_2 and organic molecules presents in nutritive medium. Such reaction could occurs due to the highly elevated standard potential of the chemical couple Ce^{4+}/Ce^{3+} (+1.72 eV) as compared to the standard potential of (in)organic molecules present in the DMEM. Therefore the surface of nano-CeO_2 is able to destabilize a large number of molecules.

Moreover, the surface chemistry of nano-CeO_2 can directly produce reactive species. Indeed, there are different processes by which minerals surface may promote the formation or transformation of ROS: dissolution of metal ions, oxydo-reduction, adsorption of ROS inducing-compounds and also the presence of surface defects. One of the main characteristic of cerium particles is the presence of highly reactive intrinsic defect (oxygen vacancies) on their surface (Fukui et al., 2002; Nolan et al., 2006). These vacancies give to nano-CeO_2 the ability to store and release oxygen through a dynamic oxido-reduction cycle $Ce^{4+} \longrightarrow Ce^{3+} \longrightarrow Ce^{4+}$. The reaction of vacancy formation can be writing as follows: $CeO_2 \longrightarrow CeO_{2-x} + \frac{1}{2}O_2$. During this reaction: (i) two electrons from the oxygen atoms are transferred to two Ce^{4+} ions neighboring the vacancies site which are reduced in Ce^{3+} and (ii) oxygen or hydroxyl groups are release by the surface. Indeed, while the Ce^{4+} cations occupied a f.c.c-type (face centered cubic) position in the unit cell surrounded with eight oxygen atoms in the bulk and/or OH groups at the surface , the Ce^{3+} is only surrounded by seven O atoms and/or OH . Consequently, the reduction of Ce^{4+} to Ce^{3+} at the surface of nano-CeO_2 release electron and oxygen or hydroxyl groups. An inverse reaction occurs when the Ce^{3+} is oxidized in Ce^{4+}. These electron and atomic transfers consecutive to the $Ce^{4+} \longrightarrow Ce^{3+} \longrightarrow Ce^{4+}$ cycle can be one possible mechanisms of the ROS generation by nano-CeO_2. We find that the reduction of the nano-CeO_2 only occurs in the cell culture medium. Hence, the cycle $Ce^{4+} \longrightarrow Ce^{3+} \longrightarrow Ce^{4+}$ seems to be amorced by the interaction with the organic molecules present in the DMEM which destabilize the surface of nano-CeO_2.

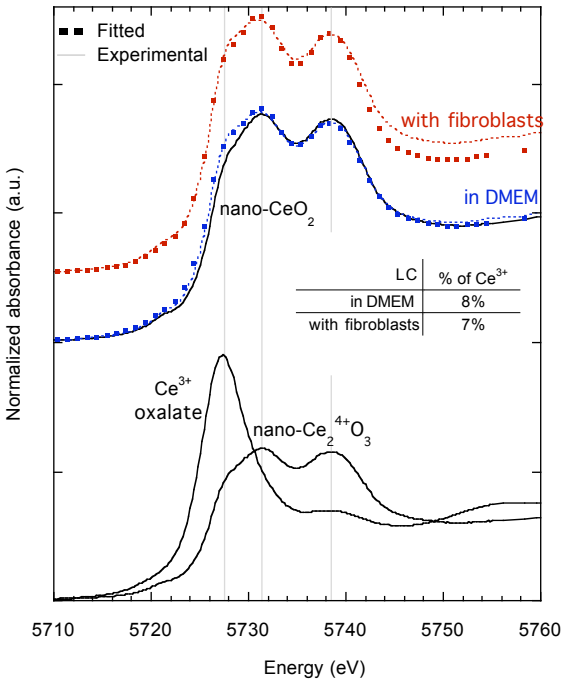


Figure IV. 15 : experimental XANES spectra at the Ce L_3-edge of pure nano-CeO_2, nano-CeO_2 incubating with an abiotic culture medium (DMEM) and with fibroblasts during 24h. [nano-CeO_2] = 0.6 g/L. LC: linear combination of XANES spectra of nano-CeO_2 (Ce^{4+}) and Ce^{3+} oxalate.

Hence, by combining physico-chemical and toxicological studies, we elucidated the relationships between the oxidative stress induced by nano-CeO_2 and the surface properties of nanoparticles. We found that the oxido-reduction cycle between Ce^{4+} and Ce^{3+} surface atoms combined with the release and storage of oxygen species were able to generated DNA damage. The decreasing effect of ERT on the DNA-SSB formation following a short incubation period (2h) reveals primary DNA lesions due to oxidative stress (Figure IV.22). As nano-CeO_2 were firstly absorbed onto the cytoplasmic membrane and then entrapped in endocytosis (Figure IV.17), the redox cycling process involved at the surface of the nano-CeO_2 would induce oxidative/nitrosative stress and lipid peroxidation (LPO), thereby generating excess reactive oxygen species (ROS), nitrogen reactive species (RNS), and DNA-reactive aldehydes (Bartsch and Nair, 2006; Choe et al., 2003; Wang et al., 1996). LPO caused by exposure to nano-size particles has been observed in other nanotoxicological studies (Gurr et al., 2005; Lin et al., 2006). Lin et al. (2006) have demonstrated that after 48h of exposure with concentrations in nano-CeO_2 upper than 23 mg/L the production of malondialdehyde, a LPO byproduct, increase (Bartsch and Nair, 2006). When the generation of these reactive species exceeds the cellular enzymatic detoxification and antioxidant capacity, damage to DNA and proteins occurs. Both DNA and proteins damage consecutive to ROS, RNS and LPO byproducts would be of concern in the increase in micronucleated fibroblasts frequencies scored following 48h exposure duration to nano-CeO_2 (Figure IV.19). First, these reactive species have been shown to damage DNA, inducing chromosome breakage during the replication of the DNA. Second, several key DNA repair enzyme are inhibited by NO-mediated nitrosylation of active site cysteine (O_6-alkyl DNA transferase, formamidopurimidine glycosylase, XPA protein, and DNA ligase with active lysine residues) (Bartsch and Nair, 2006), leading also in chromosome breakage during the replication of DNA. Finally, NO-mediated oxidization of tubulin cysteine and tubulin nitro-tyrosination are translational modifications known to induce microtubule dysfunctions (Eiserich et al., 1999; Landino et al., 2004). Microtubules, composed of tubulin and microtubule associated proteins, are key components of the mitotic apparatus and are requisite for chromosome disjunction and migration during mitosis. Thus, persistent oxidative/nitrosative stress and excess LPO generated by redox cycle at the nano-CeO_2 surface would induce chromosome breakage and loss, both of them generating MN. Discrimination between chromosome breakage and losses due to nano-CeO_2 using pancentromeric DNA probes warrants further investigation. The proposed cyto- and genotoxic mechanism of nano-CeO_2 towards human fibroblasts is summarized pictorially in Figure IV.24.

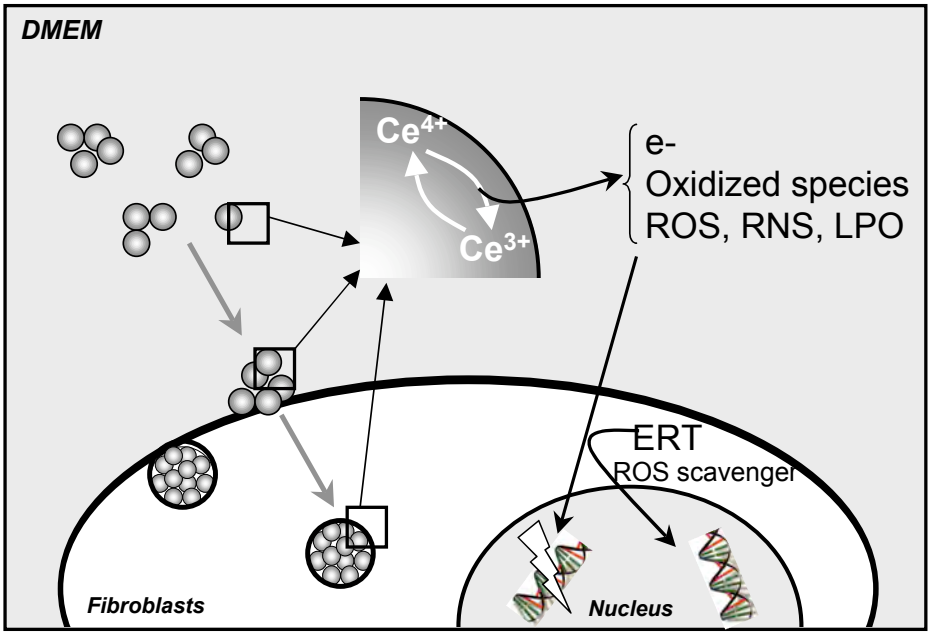


Figure IV. 16 : hypothesis for the genotoxic and cytotoxic mechanisms of nano-CeO_2 in human fibroblasts.

❖ ❖ ❖

C. Bilan du chapitre IV

Dans ce quatrième chapitre, nous avons (i) étudié les effets biologiques des nanoparticules d'oxydes métalliques sur des bactéries environnementales et des cellules humaines et (ii) tenté de les relier à une évolution de leurs propriétés physico-chimiques de surface.

❖ **Localisation des nanoparticules dans les structures cellulaires**. Nous avons montré la forte affinité des nano-oxydes métalliques pour la membrane externe d'*Escherichia coli* et des fibroblastes dermiques humains. Dans le cas des cellules humaines, malgré l'agrégation dans le milieu de culture, les nanoparticules adsorbées sur la membrane sont internalisées via des vésicules d'endocytose. Dans le cas des bactéries aucune internalisation n'a été mise en évidence.

❖ **Capacité des nano-oxydes métalliques à induire un stress oxydatif**. La nature chimique et surtout l'état redox des nanoparticules semble jouer un rôle capital dans leurs effets biologiques. Pour la première fois, les réponses cyto- et génotoxiques ont été reliées aux modifications physico-chimiques de la surface des nano-oxydes métalliques. Les nano-maghémites chimiquement stables au contact des bactéries et des fibroblastes ne montrent aucune toxicité. En revanche, une cytotoxicité significative est induite par les nano-magnétites et nZVI qui sont chimiquement et structuralement très instables (oxydation en maghémite, magnétite et lépidocrocite) en présence d'*E.coli*. De même, les nano-CeO_2 sont toxiques pour *E.coli* (cytotoxicité) et les fibroblastes (génotoxicité) suite à la réduction du Ce^{IV} en Ce^{III} de leur surface. Dans tous les cas, la toxicité observée est reliée à un stress oxydatif. Nous présumons que le facteur prépondérant de ce stress est la génération de ROS lors des réactions de réduction ou d'oxydation des atomes de surface. Mais d'autres facteurs comme l'oxydation des protéines ou l'interférence avec les chaînes de tranport d'électrons sont également à prendre en compte, au vue du pouvoir oxydant ou réducteur des nano-oxydes.

D'autres part, nous avons montré que ces effets seront d'autant plus marqué dans le cas de nanoparticules inférieures à 10 nm par rapport à des particules plus grosses (ex : 300 nm). Pour une même masse, le nombre d'atome en surface disponible pouvant s'oxyder ou se réduire sera 10 fois plus important.

❖ ❖ ❖

D. Références bibliographiques

Adams, L.K., Lyon, D.Y. and Alvarez, P.J.J., 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions. Water Research, 40(19): 3527.

Afsset, 2006. Les nanomateriaux. effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement.

Alberts, B. et al., 1983. Biologie moléculaire, La cellule, NewYork, 1146 pp.

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): 7565-7576.

Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E. and Mahmood, N., 1999. Protection Against Oxidative Damage and Cell Death by the Natural Antioxidant Ergothioneine. Food and Chemical Toxicology, 37(11): 1043.

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-Genotoxical Study. Environ. Sci. Technol., 40(14): 4367-4373.

Banfield, J.F. and Zhang, H., 2001. Nanoparticles in the Environment., 44, In Nanoparticles and the environment, Reviews in mineralogy and geochemistry by Banfield, J. F. and Navrosky, A.; Washington, DC, 349 pp.

Bartsch, H. and Nair, J., 2006. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. Lamgenbecks Arch. Surg., 391: 499-510.

Bayliss, P., 1977. Crystal structure refinement of a weakly anisotropic pyrite. Am. Mineral., 62: 1168-1172.

Bedrane, S., Descorme, C. and Duprez, D., 2002. Investigation of the oxygen storage process on ceria- and ceria-zirconia-supported catalysts. Catalysis Today, 75(1-4): 401.

Berry, C.C., Charles, S., Wells, S., Dalby, M.J. and Curtis, A.S.G., 2004a. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. International Journal of Pharmaceutics, 269(1): 211-225.

Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G. and Curtis, A.S.C., 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. Biomaterials, 24(25): 4551-4557.

Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G. and Curtis, A.S.C., 2004b. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. Biomaterials, 25(23): 5405-5413.

Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A. and Stark, W.J., 2006. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. Environ. Sci. Technol., 40(14): 4374-4381.

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.

Chane-Ching, J.Y., 1987. European Patent EP208580.

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

Choe, T., Lee, B., Park, I. and Hong, S., 2003. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 and -2 expression using nitric oxide synthase inhibitors in UV-irradiated human dermal fibroblasts. J. Cosmet. Sci., 54(3): 229-238.

Chunfu, Z., Jinquan, C., Duanzhi, Y., Yongxian, W., Yanlin, F. and Jiaju, T., 2004. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. Applied Radiation and Isotopes, 61(6): 1255.

Corrias, A., Ennas, G., Mountjoy, G. and Paschina, G., 2000. An X-ray absorption spectroscopy of the Fe K edge in nanosized maghemite and in Fe2O3-SiO2 nanocomposites. Phys. Chem. Chem. Phys., 2: 1045-1050.

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.

Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J.-F., Riedel, L.M., Seal, S. and Hickman, J.J., 2007. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. Biomaterials, 28(10): 1918.

De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Vande, P.A. and Kirsch-Volders, M., 2000. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. Mutation Research, 469: 181-197.

De Faria, L.A. and Trasatti, S., 1994. The Point of Zero Charge of CeO2. Journal of Colloid and Interface Science, 167(2): 352.

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

Decome, L., De Meo, M., Geffard, A., Doucet, O., Dumenil, G. and Botta, A., 2005. Evaluation of photolyase (Photosome(R)) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 79(2): 101.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W. and Born, P.J.A., 2004. Nanotoxicology. Occup. Environ. Med., 61: 727-728.

Eiserich, J.P., Estevez, A.G., Bamberg, T.V., Ye, Y.Z., Chumley, P.H., Beckman, J.S. and B.A., F., 1999. Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of α-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. Proc. Natl. Acad. Sci., 96: 6365–6370.

Fahlvik, A.K. and Klaveness, J., 1993. Iron oxides as MR Imaging contrast agents. J. magn. reson. imaging, 3(1): 187-194.

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.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant. Mécanismes biochimiques: 108-115.

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols, 2: 1084-1104.

Franzoni, F. et al., 2006. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. Biomedecine & Pharmacotherapy, 60(8): 453.

Freitas, M.L.L., Silva, L.P., Azevedo, R.B., Garcia, V.A.P., Lacava, L.M., Grisolia, C.K., Lucci, C.M., Morais, P.C., Da Silva, M.F., Buske, N., Curi, R. and Lacava, Z.G.M., 2002. A double-coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetic tests. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252: 396.

Fukui, K.-i., Namai, Y. and Iwasawa, Y., 2002. Imaging of surface oxygen atoms and their defect structures on CeO2(1 1 1) by noncontact atomic force microscopy. Applied Surface Science, 188(3-4): 252.

Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, D., 2003. Especes reactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? Mécanismes biochimiques: 91-96.

Goetze, T., Gansau, C., Buske, N., Roeder, M., Gornert, P. and Bahr, M., 2002. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252: 399.

Gu, B., Phelps, T.J., Liang, L., Dickey, M.J., Roh, Y., Kinsall, B.L., Palumbo, A.V. and Jacobs, G.K., 1999. Biogeochemical Dynamics in Zero-Valent Iron Columns: Implications for Permeable Reactive Barriers. Environ. Sci. Technol., 33(13): 2170-2177.

Gupta, A.K. and Curtis, A.S.G., 2004. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. Biomaterials, 25(15): 3029.

Gupta, A.K. and Gupta, M., 2005a. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. Biomaterials, 26(13): 1565.

Gupta, A.K. and Gupta, M., 2005b. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 26(18): 3995.

Gurr, J.-R., Wang, A.S.S., Chen, C.-H. and Jan, K.-Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology, 213(1-2): 66.

Halbreich, A., Roger, J., Pons, J.N., Gelwerth, D., DaSilva, M.F., Roudier, M. and Bacri, J.C., 1998. Biomedical applications of maghemite ferrofluid. Biochimie, 80: 379-390.

Hall, S.R. and Stewart, Y.M., 1973. The crystal structure refinement of chalcopyrite, CuFeS2. Acta Cryst., B29: 579-585.

Hochino, T., Kurata, Y., Terasaki, Y. and Susa, K., 2001. Mechanism of polishing of SiO2 films by CeO2 particles. Journal of non-crystalline solids, 283: 129-136.

Hoet, P., Bruske-Hohlfeld, I. and Salata, O., 2004. Nanoparticles - known and unknown health risks. Journal of Nanobiotechnology, 2(1): 12.

Hu, J., Chen, G. and Lo, I.M.C., 2005. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. Water Res., 39(18): 4528.

Huang, Y.H. and Zhang, T.C., 2005. Effects of dissolved and oxygen on formation of corrosion products and concomitant oxygen and nitrate reducion in zero-valent iron systems with or without aqueous Fe(II). Water. Res., 39(1751-1760).

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T. and Schlager, J.J., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro, 19(7): 975.

Iamarcovai, G., Orsière, T. and Botta, A., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. Toxicol Letters, 166: 1–10.

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., Chaneac, C. and Tronc, E., 2004. ron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. Chem. Commun.(5): 481-487.

Jolivet, J.-P., Tronc, E. and Chaneac, C., 2002. Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites. C. r. chim., 5(10): 659-664.

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.

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.

Jung, H., Kittelson, D. and Zachariah, M., 2004. The influence of a cerium additive on ultrafine diesel particle emissions and kinetics of oxidation. Combustion and flame.

Kamruzzaman Selim, K.M. et al., 2007. Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes. Biomaterials, 28(4): 710.

Kanel, S.R., Greneche, J.M. and Choi, H., 2006. Arsenic(V) Removal from Groundwater Using Nano Scale Zero-Valent Iron as a Colloidal Reactive Barrier Material. Environ. Sci. Technol., 40(6): 2045-2050.

Kanel, S.R., Manning, B., Charlet, L. and Choi, H., 2005. Removal of Arsenic(III) from Groundwater by Nanoscale Zero-Valent Iron. Environ. Sci. Technol., 39(5): 1291-1298.

Kaspar, J. and Fornasiero, P., 2003. Nanostructured materials for advanced automotive de-pollution catalysts. Journal of Solid State Chemistry, 171(1-2): 19.

Kikkawa, R., Yamamoto, T., Fukushima, T., Yamada, H. and Horii, I., 2005. Investigation of a hepatotoxicity screening in prilary cells cultures – What biomarkers would need to be addressed to estimate toxicity in conventional and new approaches? J. Toxicol. Sci., 30: 61-72.

Kim, D., El-Shall, H., Dennis, D. and Morey, T., 2005. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. Colloid. Surface. B, 40(2): 83.

Lacava, L.M., Lacava, Z.G.M., Azevedo, R.B., Chaves, S.B., Garcia, V.A.P., Silva, O., Pelegrini, F., Buske, N., Gansau, C., Da Silva, M.F. and Morais, P.C., 2002. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252: 367.

Lacava, Z.G.M., Azevedo, R.B., Martins, E.V., Lacava, L.M., Freitas, M.L.L., Garcia, V.A.P., Rebula, C.A., Lemos, A.P.C., Sousa, M.H., Tourinho, F.A., Da Silva, M.F. and Morais, P.C., 1999. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 201(1-3): 431.

Landino, L.M., Moynihan, K.L., Todd, J.V. and Kennett, K.L., 2004. Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. Biochem. Biophy. Res. Comm., 314: 555–560.

Lanone, S. and Boczkowski, J., 2006. Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms. Current Molecular Medicine, 6(6): 651-663.

Larachi, F., Pierre, J., Adnot, A. and A., B., 2002. Ce 3d XPS study of composite Ce(x)Mn(1-x)O(2-y) wet oxidation catalysts. Applied surface science, 195: 236-250.

Lecoanet, H., Bottero, J.Y. and Wiesner, M.R., 2004. Laboratory assessment of the mobility of several commercial nanomaterials in porous media. Environ. sci. technol., 38 (19): 5164-5169.

Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. and Stark, W.J., 2005. Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. Environ. Sci. Technol., 39(23): 9370.

Lin, W., Huang, Y.-w., Zhou, X.-D. and Ma, Y., 2006. Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Lung Cancer Cells. International Journal of Toxicology, 25(6): 451 - 457.

Long, T.C., Saleh, N., Tilton, R.D., Lowry, G.V. and Veronesi, B., 2006. Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. Environ. Sci. Technol., 40(14): 4346-4352.

Manceau, A. and Gates, W.P., 1997. Surface structural model for ferrihydrite. Clays Clay Miner., 45(3): 448-460.

Manning, B.A., Hunt, M.L., Amrhein, C. and Yarmoff, J.A., 2002. Arsenic(III) and Arsenic(V) Reactions with Zerovalent Iron Corrosion Products. Environ. Sci. Technol., 36(24): 5455-5461.

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.

Nabavi, M., Spalla, O. and Cabane, B., 1993. Surface chemistry of nanometric particles in aqueous dispersions. J. Colloid Interf. Sci., 160: 459-471.

Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N., 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. Science, 311(5761): 622-627.

Niu, J., Azfer, A., Rogers, L.M., Wang, X. and Kolattukudy, P.E., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. Cardiovascular Research, 73(3): 549.

Nolan, M., Fearon, J.E. and Watson, G.W., 2006. Oxygen vacancy formation and migration in ceria. Solid State Ionics, 177(35-36): 3069.

Oberdörster, E., 2004. Manufactured nanomaterials (fullerene, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. Environ. Health Perpect., 112: 1058-1062.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives, 113(7).

Pereira-Garcia, M., Miranda Parca, R., Braun Chaves, S., Paulino Silva, L., Djalma Santos, A., Guerrero Marques Lacava, Z., Cesar Morais, P. and Azevedo, R.B., 2005. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293(1): 277-282.

Pieraggi, M.T., Bouissou, H., Angelier, C., Uhart, D., Magnol, J.P. and Kokolo, J., 1985. The fibroblasts. Ann. Pathol., 5(2): 65-76.

Pisanic Ii, T.R., Blackwell, J.D., Shubayev, V.I., Finones, R.R. and Jin, S., 2007. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. Biomaterials, 28(16): 2572.

Proux, O., Biquard, X., Lahera, E., Menthonnex, J.-J., Prat, A., Ulrich, O., Soldo, Y., Evisson, P., Kapoujyan, G., Perroux, G., Taunier, P., Grand, D., Jeantet, P., Deleglise, M., Roux, J.-P. and J-L.Hazemann, 2005. FAME: A New Beamline for X-Ray Absorption Investigations of Very-Diluted Systems of Environmental, Material and Biological Interests. Phys. Scr., T115: 970–973.

Proux, O., Nassif, V., Prat, A., Ulrich, O., Lahera, E., Biquard, X., Menthonnex, J.-J. and Hazemann, J.-L., 2006. Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. J. Synchrotron Radiat., 13: 59–68.

Ravel, B. and Newville, M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. Journal of Synchrotron Radiation, 12: 537-541.

Robichaud, C.O., Tanzil, D., Weilenmann, U. and Wiesner, M.R., 2005. Relative Risk Analysis of Several Manufactured Nanomaterials: An Insurance Industry Context. Environ. Sci. Technol., 39(22): 8985-8994.

Sadeghiani, N., Barbosa, L.S., Silva, L.P., Azevedo, R.B., Morais, P.C. and Lacava, Z.G.M., 2005. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 289: 466.

Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discov. Today, 8(24): 1112.

Schoonen, M.A.A., Cohn, C.A., Roemer, E., Laffers, R., Simon, S.R. and O'Riordan, T., 2006. Mineral-induced formation of reactive oxygen species, 64, In Medical Mineralogy and Geochemistry, Reviews in mineralogy and geochemistry by Sahai N. and Schoonen M.A.A., 349 pp.

Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J. and Chan, S.-W., 2006. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. Biochemical and Biophysical Research Communications, 342(1): 86.

Sehgal, A., Lalatonne, Y., Berret, J.F. and Morvan, M., 2005. Precipitation-Redispersion of Cerium Oxide Nanoparticles with Poly(acrylic acid): Toward Stable Dispersions. Langmuir, 21(20): 9359-9364.

Shmakova, A.N., Kryukova, G.N., Tsybulya, S.V., Chuvilin, A.L. and Solovyeva, L.P., 1995. Vacancy Ordering In Gamma-Fe2O3 - Synchrotron X-Ray-Powder Diffraction And High-Resolution Electron-Microscopy. J. Appl. Crystallogr., 28: 141-145.

Shvedova, A., Castranova, V., Kisin, E., Schwegler-Berry, D., Murray, A., Gandelsman, V., Maynard, A. and Baron, P., 2003. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 66(20): 1909.

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.

Skinner, B.S., Erd, R.C. and Grimaldi, F.S., 1964. Griegite, the thiospinel of iron: a new mineral. Am. Mineral., 49: 543-555.

Smola, H., Hans-Jurgen, S., Thiekotter, G., Mirancea, N., Krieg, T. and Fusenig, N.E., 1998. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblasts interactions in organotypic skin culture. Exp. Cell. Res., 239: 399-410.

Spalla, O. and Cabane, B., 1993. Growth of colloidal aggregates through polymer bridging. Coll. Polym. Sci., 271: 357-371.

Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L. and Klabunde, K.J., 2002. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. Langmuir, 18(17): 6679-6686.

Stumm, W. and Morgan, J.J., 1981. Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. 2nd Ed.: 780.

Tarnuzzer, R.W., Colon, J., Patil, S. and Seal, S., 2005. Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage. Nano Lett., 5(12): 2573-2577.

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

Tsunekawa, S. and Fukuda, T., 1999. Blue shift in ultraviolet absorption spectra of monodisperse CeO(2-x) nanoparticles. Journal of applied physics, 87(3): 1318-1321.

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).

Wang, R., Ghahary, A., Shen, Y.J., Scott, P.G. and Tredget, E.E., 1996. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. J. Invest. Dermatol., 106(3): 419-427.

Waychunas, G., 2001. Structure, Aggregation and Characterization of Nanoparticles, 44, In Nanoparticles and the environment, Reviews in mineralogy and geochemistry by Banfield, J. F. and Navrosky, A.; Washington, DC, 349 pp.

Wehrli, B., Sulzberger, B. and Stumm, W., 1989. Redox processes catalyzed by hydrous oxide surfaces. Chem. geol., 78(3): 167-179.

Wiesner, M.R. and Bottero, J.Y., 2007. Environmental nanotechnology: Applications and impacts of nanomaterials. MacGraw Hill, New-York, 540 pp.

Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N. and Bacri, J.C., 2002. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analysis of membrane adsorption and subsequent internalization. Langmuir, 18: 8148.

Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C. and Gazeau, F., 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. Biomaterials, 24(6): 1001.

Williams, A.G.B. and Scherer, M.M., 2004. Spectroscopic Evidence for Fe(II)-Fe(III) Electron Transfer at the Iron Oxide-Water Interface. Environ. Sci. Technol., 38(18): 4782-4790.

Wyckoff, R.W.G., 1963. Crystal structure, 1, 355 pp.

Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R. and Nel, A.E., 2006. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett., 6(8): 1794-1807.

Xu, X.Q., Shen, H., Xu, J.R., Xu, J., Li, X.J. and Xiong, X.M., 2005. Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. Applied Surface Science, 252(2): 494.

Yean, S., Cong, L., Yavuz, C.T., Mayo, J.T., Yu, W.W., Kan, A.T., Colvin, V.L. and Tomson, M.B., 2005. Effect of magnetic particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenate. J. Matter. Res, 20: 3255-3264.

Zhang, T.C. and Huang, Y.H., 2006. Profiling iron corrosion coating on iron grains in a zerovalent iron system under the influence of dissolved oxygen. Water Res., 40: 2311-2320.

Zhang, W.X., 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. J. nanopart. res., 5: 323-323.

Zhang, Y. and Zhang, J., 2005. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. Journal of Colloid and Interface Science, 283(2): 352.

Zhang, Y., Kohler, N. and Zhang, M., 2002. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. Biomaterials, 23(7): 1553.

CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

SOMMAIRE

CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 159
1. Conclusion 159
1.1 Compréhension de la réactivité des nano-oxydes de fer et leur capacité de rétention de polluants inorganiques (exemple de l'arsenic) 159
1.2 Étude des effets biologiques des nanoparticules manufacturées sur des modèles cellulaires humains et environnementaux 160
2. Perspectives 163

CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion

Dans l'ensemble des pays industrialisés, l'engouement pour les nanosciences et les nanotechnologies ne cesse de croître et génère une course scientifique et commerciale assimilable à une nouvelle révolution technologique. Le domaine de l'environnement n'est d'ailleurs pas à l'écart. En effet, les nanotechnologies pourraient apporter des réponses intéressantes à des questions de pollution : nouveaux adsorbants, catalyseurs, membranes de filtration et capteurs. Néanmoins, de nombreuses questions se posent sur l'impact environnemental et toxicologique que pourrait engendrer cette nouvelle technologie. Ces craintes sont justifiées car à ce jour, nos connaissances sur la toxicité des nanoparticules manufacturées sont limitées (manque de recul et résultats contradictoires des premières études). C'est pourquoi il est indispensable que de manière parallèle au développement d'applications utilisant les nanotechnologies, des études concernent leurs effets biologiques néfastes potentiels. C'est dans cette optique que cette thèse a été menée. Deux axes de recherche ont été suivis : (i) l'étude de la réactivité de surface des nanoparticules d'oxydes à des fins d'utilisation dans le traitement des eaux polluées et (ii) l'étude des mécanismes de toxicité potentielle des nano-oxydes métalliques.

Quatre types de nanoparticules manufacturées ont été sélectionnées pour leur importance dans le développement actuel des nanotechnologies : des nano-oxydes de Fe_3O_4, γ-Fe_2O_3 et CeO_2 et de nanoparticules métalliques de fer. Ces nanoparticules ont des propriétés physiques (taille, cristallinité, forme) et chimiques (nature, état d'oxydation) connues et contrôlées.

1.1 Compréhension de la réactivité des nano-oxydes de fer et leur capacité de rétention de polluants inorganiques (exemple de l'arsenic)

Nos travaux ont pour objectif d'expliquer l'effet 'nano' à l'origine de la grande capacité d'adsorption de métaux/métalloïdes à la surface des nano-oxydes de fer de taille inférieure à 20 nm. L'exemple suivi pour cette étude est celui de l'adsorption de l'As^{III} sur des nano-maghémites de 6 nm. Ces dernières peuvent retenir en surface jusqu'à 8 atomes d'As^{III} par nm^2 ce qui est considérable et largement supérieur à des nanoparticules ayant des tailles pourtant très proches (2,5 fois plus que des particules de 20 nm de diamètre). Nous avons montré qu'il y avait deux raisons principales à cet effet 'nano'.

- Une **modification structurale de la surface** des particules lorsque leur taille diminue. Cela crée des sites d'adsorption « peu classiques » et très réactifs en position cristallographique. À la

surface des nano-maghémites il s'agit de sites de fer tétraédriques laissés vacants (ex : nouveau site d'adsorption en surface d'un cycle de 5 à 6 atomes de fer octaédriques).

- Une **diminution significative de l'énergie de surface** lors de l'adsorption en surface de nanoparticules. La saturation de la surface des particules avec une couche de polyèdres d'As^{III} engendre une augmentation du diamètre d'environ 0,5 nm. Pour des particules de 20 nm, cette augmentation reste faible proportionnellement à la taille (1 à 2%). En revanche pour des objets de 6 nm de diamètre cela représente une augmentation de l'ordre de 10%. Cette évolution de la taille diminuera seulement de 2% la pression en surface de particules de 20 nm contre 8-10% dans le cas des nano-maghémites de 6 nm. Ainsi, l'adsorption de 8 As^{III}/nm^2, c'est-à-dire une couche dense où les cations d'As^{III} se placent sur les sites tétraédriques vacants des nano-maghémites, augmente significativement la taille des particules. Ce mécanisme induit une meilleure stabilité thermodynamique des particules et s'apparente fortement à un mécanisme de croissance cristalline.

Cette forte capacité de rétention est un atout indéniable pour les applications environnementales (ex : traitement des eaux de surface et des effluents). De plus, un avantage important sera de pouvoir récupérer sous un champ magnétique les nano-oxydes de fer, de régénérer leur surface et ainsi de diminuer la quantité de déchets secondaires produits. D'autres couples nano-adsorbant/adsorbat demandent également à être étudiés à l'échelle atomique afin d'élucider les mécanismes d'adsorption. Il s'agit notamment, du couple ion cobalt/nano-oxydes de fer en raison de leur forte affinité : jusqu'à 34 Co/nm^2 peuvent être retenus en surface (Uheida et al., 2006). On peut aussi supposer que les nano-oxydes puissent être enrobés d'un composé organique afin de les rendre spécifiques à certains polluants.

1.2 Étude des effets biologiques des nanoparticules manufacturées sur des modèles cellulaires humains et environnementaux

Le caractère original de notre étude réside dans le couplage d'une approche **pluridisciplinaire** afin de caractériser au mieux la nature et les mécanismes d'interaction nanoparticules/cellules. De plus l'utilisation de la spectroscopie d'absorption des rayons X nous a permis d'étudier ces mécanismes à l'échelle atomique au sein même des cellules. Notre objectif était de suivre les **évolutions des propriétés physico-chimiques de surface** des nanoparticules dans les milieux cellulaires et biologiques et de les corréler aux **réponses cyto- et génotoxiques**.

Dans un premier temps, nous avons montré la forte affinité des nano-oxydes métalliques pour la membrane externe d'*Escherichia coli* et des fibroblastes dermiques humains. Dans le cas des cellules humaines, l'adsorption sur la membrane est suivie de l'internalisation des nanoparticules via des vésicules d'endocytose (invagination de la membrane cellulaire). En revanche aucune internalisation

dans *E.coli* n'est observée dans nos conditions expérimentales. La capacité des fibroblastes à internaliser les nanoparticules ne semble pas dépendre de la stabilité colloïdale dans le milieu extracellulaire. En effet, l'endocytose est observée dans le cas des NmDMSA (maintenues dispersées) et des nano-CeO_2 (fortement agrégées). De plus, aucun lien de cause à effet n'est observé entre l'internalisation/adsorption des nanoparticules et leurs effets biologiques.

En revanche nous avons pu montrer le rôle capital joué par la nature chimique et surtout l'état redox des nanoparticules dans leurs effets biologiques. Pour la première fois, les réponses cyto- et génotoxiques ont été reliées à une évolution physico-chimique des nano-oxydes métalliques. Des nanoparticules chimiquement stables au contact des bactéries et des fibroblastes (ex : nano-maghémite et nano-maghémite enrobée de DMSA) ne montrent aucune cyto- ni génotoxicité dans nos conditions expérimentales. En revanche, des nanoparticules chimiquement instables dans les milieux modèles cellulaires seront cytotoxiques pour *E.coli* et cyto- et génotoxiques pour les fibroblastes. Il s'agit des nano-CeO_2 (réduction de ~30% du Ce^{IV} de la surface en Ce^{III}, $E°_{Ce4+/Ce3+}$=1.47 V), des nano-magnétites (désorption du Fe^{II} de la surface) et des nZVI (oxydation de la quasi-totalité des nZVI en magnétite et lépidocrocite, $E°_{Fe2+/Fe°}$=-0.44 V, $E°_{Fe3+/Fe2+}$=0.77 V).

Dans le cas des nano-CeO_2, nous avons comparé les effets génotoxiques induits par des nanoparticules de 7 nm et de 300 nm. Pour une même masse de CeO_2, (effet lié à la surface spécifique), une génotoxicité deux fois plus importante est obtenue dans le cas des nano-CeO_2 par rapport aux particules de 300 nm. Ainsi, l'importante surface des nano-CeO_2, et donc le plus grand nombre d'atomes disponibles en surface pour subir des évolutions redox, semble être un paramètre en faveur ou corrélé à la toxicité des nanoparticules.

En revanche, exprimées par unité de surface (effet lié à la réactivité de surface) les réponses génotoxiques obtenues sont similaires pour les deux tailles de particules. Il n'y a donc pas d'effet spécifique lié à la réactivité potentielle des nanoparticules lors de l'interaction avec les modèles cellulaires. Ainsi, la forte capacité d'adsorption des nanoparticules inférieures à 20 nm ne semble pas induire d'effet biologique particulier. Ceci est certainement lié à l'encombrement et la charge des composés organiques du milieu de culture s'adsorbant sur les nano-CeO_2 qui font que l'affinité des molécules organiques pour les sites de surface est moins importante que dans le cas d'ions inorganique comme l'arsenic. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Zhang et al. (1999) qui montre l'absence de relation entre la taille de particules de TiO_2 et leur capacité de rétention par unité de surface de petites molécules organiques (entre 60 et 150 g/mol).

Dans ces trois cas**,** la toxicité observée est reliée à un **stress oxydatif**. Nous présumons que le facteur prépondérant de ce stress est la génération de ROS lors des réactions de réduction ou d'oxydation des atomes de surface. Il s'agit notamment des nanoparticules à base de Fe° dont

l'oxydation est connue pour générer du peroxyde d'hydrogène et du Fe^{II}, deux réactifs intervenant dans des réactions toxiques de Fenton qui produisent des radicaux hydroxyles. Mais d'autres facteurs comme l'oxydation des protéines ou l'interférence avec les chaînes de transport d'électrons dans les membranes sont également possibles compte tenu des potentiels standards des couples redox mis en jeu à la surface des nanoparticules et de ceux actifs dans les milieux biologiques (Figure V.1).

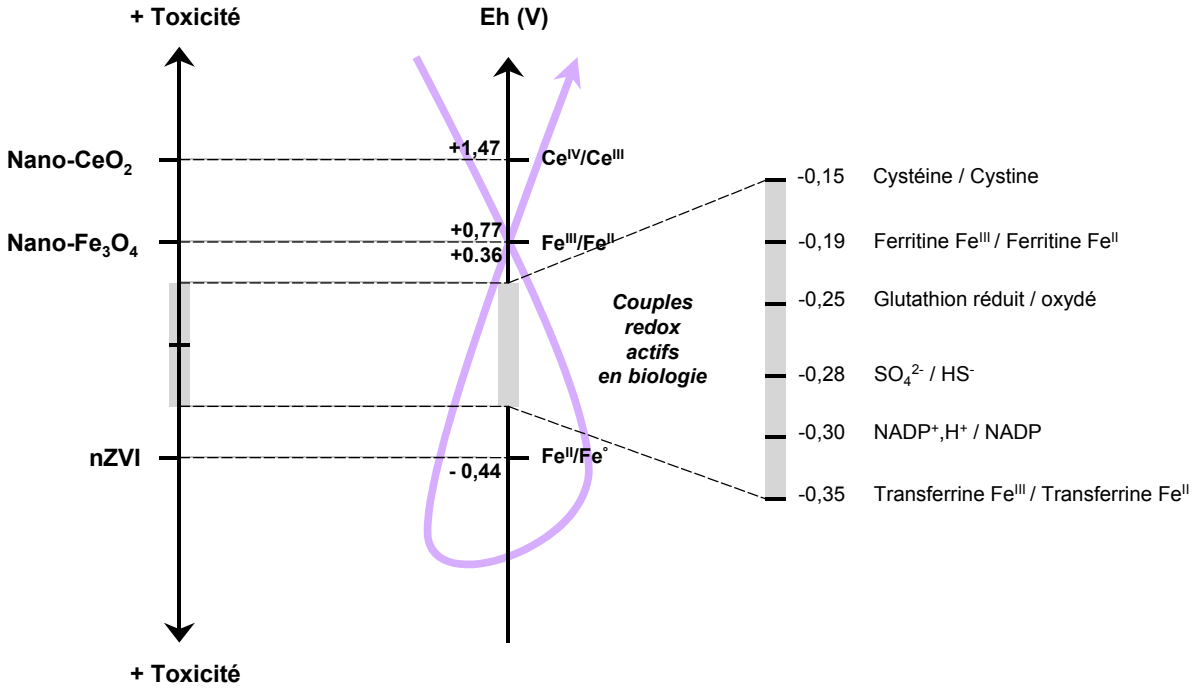


Figure V. 1 : échelle des potentiels standards des couples redox caractéristiques de l'évolution physico-chimique de la surface des nanoparticules versus ceux caractéristiques d'une activité biologique.

Ainsi les nanoparticules ayant un pouvoir oxydant ou réducteur sur les molécules actives dans le métabolisme cellulaire seront d'autant plus toxiques que la valeur absolue de leur E° sera éloignée des conditions redox standards d'un milieu biologique (~-0.35 à -0.15). Tel est le cas des nano-CeO_2 dont le E° est le plus haut et qui sont fortement cytotoxiques (*E.coli*) et génotoxiques (fibroblastes) à faible concentration. De même les nanoparticules comme les nZVI avec un E° très négatif, seront rapidement oxydées au contact des milieux biologiques et induiront une forte toxicité. Nous pensons que cette échelle de potentiels standards des couples redox caractéristiques de la chimie de surface des nanoparticules manufacturées peut être un moyen de classer les effets toxiques potentiels des nanoparticules manufacturées vis-à-vis des modèles biologiques.

2. Perspectives

Ce travail ouvre des perspectives de recherche dans les deux axes principaux que sont (i) la question sociétale et (éco)toxicologique des nanotechnologies et (ii) le lien entre l'évolution redox et la génération de ROS par les particules minérales en solution.

Le premier axe de recherche concerne les mécanismes physico-chimiques responsables de la toxicité des nanoparticules minérales. Les travaux que nous avons menés abordent le rôle des propriétés oxydantes ou réductrices de la surface des nanoparticules dans le stress oxydatif observé chez les cellules humaines et les bactéries. Cette étude demande à être élargie à d'autres types de nanoparticules. Nous pensons notamment aux nano-oxydes d'aluminium ($E°_{Al3+/Al}$ ~ -1,66) ou de magnésium ($E°_{Mg2+/Mg}$ ~ -2,50) qui seront très stables d'un point de vue redox ou aux nano-oxydes de manganèse dont le Eh élevé les rend instables en solution.

Nous avons montré que la génération de ROS par les nanoparticules pouvait être à l'origine du stress oxydatif observé. Pour une meilleure compréhension des phénomènes, il est important de quantifier cette production de ROS, déterminer les mécanismes pouvant se produire en surface des particules et identifier le type de ROS. Il existe de plus en plus de preuves que les minéraux naturels (quartz, amiante) ou synthétiques (TiO_2, CeO_2) génèrent des ROS en solution. Bien que certains de ces mécanismes soient identifiés, un grand nombre d'entre eux reste mal connus. Il est clair que les propriétés physico-chimiques de surface ont un rôle important dans la formation directe de ROS ou dans l'adsorption de molécules stimulant leur génération mais ces mécanismes restent à déterminer.

D'autres part, les informations obtenues dans cette étude sur l'évolution redox des nanoparticules sont des informations globales (moyennant toutes les nanoparticules qui interagissent avec la cellule quelles soient internalisées ou adsorbées sur la membrane). Il serait intéressant de suivre plus finement ce qui se passe à l'échelle de la cellule. *Est ce que des nanoparticules internalisées par endocytose dans les cellules humaines sont plus transformées que des particules adsorbées sur la membrane ? L'endocytose est-elle la seule voie d'entrée dans les cellules ? Existe-il un gradient de transformation redox, lorsque plusieurs couches de nanoparticules sont adsorbées sur la membrane des bactéries ?* Cela nécessite des techniques sensibles aux états redox avec une résolution spatiale fine. C'est le cas de la microscopie à balayage par transmission de rayons X (STXM). Malgré ses hautes performances, le STXM basé sur le rayonnement synchrotron, est encore peu utilisé dans le domaine des géosciences de l'environnement. Pourtant, avec une résolution spatiale de 15 à 30 nm, une sensibilité chimique importante, et la possibilité de mesurer les échantillons humides cette technique est trés adaptée à l'analyse des échantillons biologiques et des nanomatériaux.

Le deuxième axe de recherche concerne les effets (éco)toxicologiques des nanotechnologies dont un aspect clé est lié aux conditions réelles d'exposition des organismes vivants. Les études actuelles portent sur des nanoparticules pures synthétisées en laboratoire qui sont directement inoculées dans les milieux cellulaires *in vitro* ou chez des animaux. Mais la plupart des nanoparticules commercialisées sont sous forme de nanomatériaux *sensu stricto* c'est-à-dire des nanoparticules inclues dans une matrice (pneumatiques, peintures, verres autonettoyants, crèmes solaires...). Il est inévitable que l'utilisation de ces matériaux aboutira à une dégradation (usure mécanique, intempéries) et un déversement de leurs constituants dans l'environnement. Actuellement, aucune étude ne porte sur la dégradabilité et l'écotoxicité de ces nanomatériaux, qui sont pourtant plus pertinents à prendre en compte en termes de probabilité de rejet dans l'environnement et d'absorption par les organismes vivants. Ainsi une des perspectives de notre travail sera de déterminer l'évolution bio-physico-chimique des nanomatériaux *sensu stricto* déjà commercialisés. Il s'agira (i) d'étudier leur dégradation dans des conditions bio-physico-chimiques réalistes, (ii) de suivre le devenir des résidus d'altération et (iii) d'évaluer leur écotoxicité. Cette étude demandera également à être couplée avec des modèles de prédiction des risques (source + exposition + impact biologique).

Ces travaux ont déjà débuté en collaboration avec l'université de Duke (Caroline du Nord, USA). Les premiers objets qui ont retenu notre attention sont les crèmes solaires qui incorporent des nanoparticules de TiO_2 pour leur excellent pouvoir filtrant aux UV, enrobées d'additifs (hydroxydes d'aluminium et composés silico-organiques). Les problèmes que nous cherchons à résoudre concernent la stabilité bio-physico-chimique des couches enrobant et protégeant les nanoparticules de TiO_2. En effet, en cas d'altération de cette couche, le risque de production de ROS par l'activité photocatalytique du TiO_2 augmentera significativement.

❖ ❖ ❖

ANNEXES

ANNEXE 1

Chapter

10

Nanomaterials as Adsorbents

Mélanie Auffan *University of Aix-Marseille, Aix-en-Provence, France*
Heather J. Shipley *Rice University, Houston, Texas, USA*
Sujin Yean *Rice University, Houston, Texas, USA*
Amy T. Kan *Rice University, Houston, Texas, USA*
Mason Tomson *Rice University, Houston, Texas, USA*
Jerome Rose *CNRS-University of Aix-Marseille, Aix-en-Provence, France*
Jean-Yves Bottero *CNRS-University of Aix-Marseille, Aix-en-Provence, France*

Introduction

In recent years, drinking water regulations have continued to lower the maximum contaminant level (MCL) for pollutants. For instance, in 2002, the World Health Organization (WHO) decided to reduce the arsenic standard for drinking water from 50 μg/L to 10 μg/L. The stiffening of regulations generates strong demands to improve methods for removing pollutants from the water and controlling water-treatment residuals. Currently, a wide range of physico-chemical and biological methods are used and studied for the removal of organic and/or inorganic contaminants from polluted waters (Sheoran and Sheoran, 2006). Coagulation-flocculation, membrane processes, and adsorption are the most common methods of contaminant removal. The most efficient and low cost process for the removal of colloids and organics in water treatment is the use of inorganic salts as coagulation-flocculation agents such as Al_{13} (Bottero et al., 1980; Bottero et al., 1982) and Fe_{24} (Bottero et al., 1993; Bottero et al., 1994) polycation species. However, this approach has two disadvantages: a higher volume of sludge generated and difficulty in recovering the metals for reuse. For water treatment,

it is an advantage to use a decontamination process that does not generate residuals. This is the case of the Magnetically Assisted Chemical Separation (MACS) process (Ngomsik et al., 2005). MACS is a useful decontamination technique widely used for water and liquid waste treatment involving superparamagnetic particles (iron oxide microspheres of 0.1 to 25 μm of diameter). Superparamagnetism is very important for recovering and regenerating particles after adsorption of the pollutant. With MACS, no residuals are produced and the microparticles can be reused. However, even if micron-sized adsorbents have an internal porosity that increases their specific surface area (SSA), the diffusion limitation within the particles leads to a decrease in adsorption efficiency. An efficient system to remove containments from solution would consist of particles with large surface area, small diffusion resistance, superparamagnetic properties, and high reactivity and affinity for adsorbates.

Research has shown that nanoparticles represent a new generation of environmental remediation technologies that could provide cost-effective solutions to some of the most challenging environmental cleanup problems: pollution monitoring (Riu et al., 2006), groundwater (Liu et al., 2005b), and soil remediation (Zhang, 2003). For instance, metal iron nanoparticles are used in contaminated aquifers and soils for the transformation and decontamination of a wide variety of environmental pollutants, such as chlorinated organic solvents, pesticides, and metals or metalloids. The use of magnetic nanoparticles is also becoming promising for the adsorption of polluted ions during water and industrial liquid waste treatments. Indeed, magnetic nanoparticles exhibit properties (large surface area, small diffusion resistance, and superparamagnetic properties) that make them excellent candidates for containment removal from polluted water. This chapter presents results that demonstrate the effectiveness of using magnetic nanoparticles, as nano-adsorbents, for the removal of organic and inorganic ions during water-treatment processes. Also, this chapter gives insight into the nano-size effect on adsorption efficiency and experimental techniques used to investigate the magnetic nanoparticle/pollutant interactions.

Adsorption at the Oxide Nanoparticles/Solution Interface

As the dimensions of metal oxide particles decrease to the nanometer range, there are significant changes in optical and electronic properties due to both quantum and size effects. This is mainly due to the increasing role of the surface in controlling the overall energy of the particles. For instance, dissolution of nanoparticles is a fascinating issue. For 1 mm macrocrystalline quartz, dissolution kinetics would be about 34×10^6 years, while

nano-cube quartz with an edge of 10 nm should dissolve in 1.07 seconds under identical conditions; however this is not observed, in general (Bertone et al., 2003; Lasaga, 1998). The remarkable stability of nanoparticles in solution might be explained by the lack of defects on the surface, the strong surface passivation, or the altered surface composition due to adsorption of surfactants or oxidation, as seen with magnetite (Shipley et al., 2006). While many of the unusual physical properties of the nanocrystalline materials are now well known (Banfield and Navrotsky, 2003), the influence of size on adsorption, chemical reactivity, and on the nanoparticles/solution interface needs to be further understood.

Size effect on adsorption capacity

As a particle shrinks to the nanometer range, an increasing fraction of atoms are exposed to the surface, giving rise to excess energy. Consequently, nanoparticles are thermodynamically metastable compared to macrocrystalline materials. They tend to approach the minimum free energy state (equilibrium state) through several ways: phase transformation, crystal growth, surface structural changes, aggregation, and surface adsorption (Banfield and Navrotsky, 2003; Rusanov, 2005). Therefore, nanoparticles with a higher total energy should be more prone to adsorb molecules onto their surfaces in order to decrease the total free energy. Hence, adsorption should be favored on nanoparticles (Banfield and Navrotsky, 2003). This is the case for the adsorption of arsenic at the surface of iron oxide nanoparticles. For instance, magnetite with a diameter of 11 nm adsorbs 3 times more arsenic per nm^2 than does magnetite of 20 nm or 300 nm.

However, some experimental results have shown that the sorption capacity of inorganic nanoparticles is not always size-dependent for a given surface area. This is the case for the adsorption of organic acids (valeric, acetic, adipic, and oxalic acids) at the surface of titanium nanoparticles (Zhang et al., 1999). This study explicitly demonstrated that when corrected for surface area there is no size-dependence, while for a given mass of TiO_2 nanoparticles that are 6 nm in diameter are more prone to adsorb organic molecules than nanoparticles with 16 nm in diameter (Table 10.1).

In this case a greater interest of using nano-sized particles as adsorbents is their higher specific surface area (SSA). For instance, the SSA of an oxide nanoparticle of 10 nm in diameter is ≈100 times larger than the SSA of an oxide particle of 1 μm. It is well known that the surface hydroxyl groups are the chemically reactive entities at the surface of the solid in an aqueous environment. A higher SSA increases the number of available functional groups on the nanoparticle surface. Consequently, for a given mass, the maximum adsorption capacity of ions in solution is higher for nanoparticles than for micron-sized particles.

TABLE 10.1 Adsorption Capacity of Oxide Particles

Adsorbents mineral	Size (nm)	SSA* (m^2/g)	Adsorbates	Adsorption μmol/m^2	Capacity mmol/g	*Experimental conditions*	References
Fe_3O_4	300	3.7	As^{III}	5.62	0.021	*pH = 8.0*	
Fe_3O_4	20	60	As^{III}	6.48	0.388	*pH = 8.0*	
Fe_3O_4	11.72	98.8	As^{III}	15.49	1.532		
				18.22	1.800	*pH = 8.0*	
Fe_3O_4	300	3.7	As^{V}	3.89	0.014	*pH = 4.8*	(Yean et al., 2005)
				2.70	0.010	*pH = 6.1*	
Fe_3O_4	20	60	As^{V}	2.54	0.152	*pH = 4.8*	
				1.69	0.101	*pH = 6.1*	
				1.32	0.079	*pH = 8.0*	
Fe_3O_4	11.72	98.8	As^{V}	6.30	0.623		
				23.30	2.300	*pH = 8.0*	
Fe_3O_4	1000	1.73	Co^{II}	1.6	0.003	*pH = 7.0*	(Tamura et al., 1997)
						IS = 0.1 M	
Fe_3O_4	11.3	97.5	Co^{II}	58	5.655	*pH = 6.9*	(Uheida et al., 2006)
						IS = 0.01 M	
Fe_3O_4 + Chitosan	13.5	(86.43)	Co^{II}	–	0.467	*pH = 5.5*	(Chang et al., 2006)
Fe_3O_4 + Chitosan	13.5	(86.43)	Cu^{II}	–	0.374	*pH = 5.5*	(Chang and Chen, 2005)
α-Fe_2O_3	10000	15.9	Co^{II}	0.2	0.030	*pH = 6.5*	(Tamura et al., 1997)
						IS = 0.1 M	
γ- Fe_2O_3	10	(114.50)	Co^{II}	37	3.601	*pH = 6.9*	(Uheida et al., 2006)
						IS = 0.01 M	
γ- Fe_2O_3	6	174	$As^{III,V}$	10	1.810	*pH = 7.4*	(Auffan et al., 2007)
						IS = 0.2 M	
β-FeOOH	2.6	330	As^{V}	5.4	1.79	*pH = 7.5*	(Deliyanni et al., 2003)
						IS = 0.1 M	

HFO	–	600	As^V	2.2	1.34		
TiO_2	6	260	Valeric acid	1.23	0.319	*pH = 4.0 IS = 0.01 M*	(Wilkie and Hering, 1996)
TiO_2	16	80	Valeric acid	1.51	0.121	*pH = 3–4.5*	
TiO_2	6	260	Acetic acid	1.59	0.415	*pH = 3–4.5*	
TiO_2	16	80	Acetic acid	1.66	0.133	*pH = 3–4.5*	
TiO_2	6	260	Adipic acid	1.08	0.281	*pH = 2.5–4*	(Zhang et al., 1999)
TiO_2	16	80	Adipic acid	1.08	0.086	*pH = 2.5–4*	
TiO_2	6	260	Oxalic acid	2.13	0.553	*pH = 1–3*	
TiO_2	16	80	Oxalic acid	2.13	0.169	*pH = 1–3*	

* SSA in parentheses is the calculated SSA from the particle size.

Adsorption/desorption experiments

The maximum adsorption capacity of an adsorbent is usually evaluated using adsorption isotherms. The results of adsorption experiments can be presented as a curve showing the amount of adsorbate taken up per unit weight or area of the adsorbent (in g or mol of adsorbates per g or m^2 of adsorbent) versus the equilibrium concentration remaining in solution. The pH, temperature, ionic strength, and concentration of the solid phase are maintained constant during the experiment. Numerous analytical forms of the adsorption isotherms have been derived (e.g., Langmuir, Freundlich, Linear) that invoke differing underlying assumptions, such as the existence of multiple adsorption layers, uniformity of the adsorption bond, and interactions between adsorption sites, to name a few (Sawyer et al., 2003; Stumm and Morgan, 1996). In macroscopic systems, adsorption data can be fitted with these equations in order to deduce thermodynamic and energetic information. However, they cannot lead to a thorough description of the different mechanisms in the case of a heterogeneous and finite surface.

Many theories and models have been used to express desorption hysteresis of hydrophobic organic compounds. These models express sorption and desorption as different processes, such as the two-compartment desorption model. The basic concept of the model is that both sorption and desorption are biphasic, consisting of two compartments, each with unique equilibrium and kinetic characteristics. A model that accomplishes this is the following equation (Chen et al., 1999; Cheng et al., 2005; Kan et al., 1998):

$$q = K_d^{1st} C_w + \frac{K_d^{2nd} f q_{max}^{2nd} C_w}{f q_{max}^{2nd} + K_d^{2nd} C_w}$$

where K_d^{1st} and K_d^{2nd} are solid-water distribution coefficients for the first and second compartment; and q_{max}^{2nd}(μg/g) is the maximum sorption capacity for the second compartment. The factor f ($0 \leq f \leq 1$) denotes the fraction of the second compartment that is filled at the time of exposure. At higher aqueous concentrations, q is related to aqueous concentration by a linear isotherm, $K_d^{1st} C_w$, and at lower concentrations by a Langmuir-type isotherm that becomes linear, $K_d^{2nd} C_w$(Chen et al., 1999; Cheng et al., 2005; Kan et al., 1998).

Adsorption mechanisms at the atomic scale

A large body of work has been done on the adsorption mechanisms of ions onto metal oxide surfaces from solution (Al-Abadleh and Grassian, 2003; Arai et al., 2001; Cornell and Schwertmann, 1996; Manceau, 1995; Stipp et al., 2002; Waychunas et al., 1993; Waychunas et al., 1995). The

surface hydroxyl groups (≡MOH) are the functional groups of metal oxides. They have a double pair of electrons with a dissociable hydrogen atom that enables the metal oxide to react with ions in solution and to form surface complexes. The following are acid-base equilibria reactions of metal oxides in water (K_1 and K_2: equilibrium constants that represent the concentration of surface species [moles/kg] of metal oxide) (Cornell and Schwertmann, 1996; Sawyer et al., 2003).

$$\equiv MOH \rightarrow \equiv MO^- + H^+ \qquad \text{where } K_1 = [\equiv MO^-][H^+]/[\equiv MOH]$$

$$\equiv MOH + H^+ \rightarrow \equiv MOH_2^+ \qquad \text{where } K_2 = [\equiv MOH_2^+]/[\equiv MOH][H^+]$$

Surface sensitive techniques can be used to provide direct information about the mode of attachment of adsorbates to the surface of nanoparticles at the atomic scale. In general, electron-based spectroscopy, vibrational spectroscopy, and synchrotron-based X-ray techniques are among the common structural methods in use (see Chapter 4). Spectroscopic studies reveal that sorption on a crystalline surface may result from the molecular mechanisms shown in Figure 10.1.

It is difficult to precisely study sorption reactions without spectroscopic evidence. Spectroscopic data provide a better understanding of the adsorption mechanisms at the atomic scale and enable more meaningful interpretation of the adsorption isotherm experiments. In addition to the increasing importance and the remarkable improvement of the experimental surface methods, theoretical calculations are also becoming an indispensable tool in chemical research, particularly in the case of nano-systems. The computational and calorimetric techniques yield rich insight into the structure and the adsorption processes at the surface of the nanoparticles.

Nanomaterial-Based Adsorbents for Water and Wastewater Treatment

As an example of the use of nanomaterials as adsorbents in water treatment, we will consider the problem of arsenic removal from water. Arsenic in drinking water is a priority pollutant of considerable interest worldwide. In the Bangladesh crisis, approximately 30 to 36 million people are exposed to carcinogenic levels of arsenic (Bates et al., 1992; Hossain, 2006). Arsenic mobility in aqueous media and its removal by various water treatment technologies have been the subject of considerable study. Much of this work has addressed the adsorption of arsenic on iron-containing solids. The sorption of inorganic or organic contaminants at the surface of iron (hydr)oxide minerals may affect the mobility, reactivity, bioavailability, and toxicity of these particles in natural waters (Al-Abadleh and Grassian, 2003; Johnson and Hallberg, 2005; Stipp et al., 2002).

Outer-sphere complex: if the ion is attracted to the surface via long-range coulombic forces but retains its water of hydration.

Inner-sphere complex: if the ion loses some of its hydration water molecules and becomes chemically bound to the surface via short-range forces.

Surface precipitation: 3D species nucleate and grow on the surface.

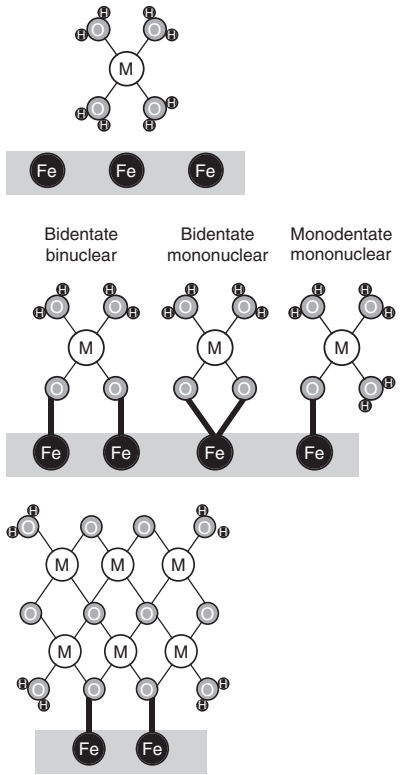


Figure 10.1 Modes of ligand coordination to the oxide surface.

Recently, several studies have focused on the removal of (in)organic contaminants from polluted water, using nano-sized iron oxide particles. Iron oxide magnetic nanoparticles have been chosen as promising adsorbents because: (1) they can be produced in large quantities using physicochemical methods, (2) it is expected that their adsorption capacity and affinity for pollutants is higher considering the larger surface area and possibly highly active surface sites, (3) the separation of metal-loaded magnetic nano-adsorbent from treated water can be achieved via an external magnetic field (Prodan et al., 1999), and (4) nanoparticles might be regenerated and reused (Ngomsik et al., 2005). Also, iron oxide nanoparticles can be surface-coated with organic compounds to increase their sorption efficiency and specificity for pollutants. In this case, it is

worth noting that the covalent attachment of molecules to the surface of nanoparticles and the stability of the coating are important. In the following sections, we consider the role and effectiveness of nano-sized magnetic particles, including maghemite (γ-Fe_2O_3, a Fe^{III} oxide) and magnetite (Fe_3O_4, a mixed Fe^{II} and Fe^{III} oxide) in the adsorption of inorganic and organic ions from aqueous solution, focusing on the interactions between these nanoparticles, arsenite (As^{III}) and arsenate (As^{V}).

Iron oxide nanoparticles for metals and metalloids removal

Numerous papers have shown that iron oxides have a high affinity for arsenite and arsenate (Dixit and Hering, 2003; Pierce and Moore, 1982; Raven et al., 1998). Direct evidence of inner sphere adsorption of arsenic to iron oxides has been provided by extended X-ray absorption fine structure and infrared spectroscopy (XAS, FTIR) spectroscopy. This adsorption is mainly controlled by the surface properties of the absorbate, the pH on the solution, and the oxidation state of arsenic.

Maghemite nanoparticles for arsenic removal. To study the efficiency of iron oxide nanoparticles to treat arsenic contaminated water, the adsorption mechanisms of arsenic ions onto maghemite nanoparticles (6 nm) (Jolivet et al., 2002) were quantitatively and qualitatively examined. The experimental data of a typical adsorption isotherm are presented in Figure 10.2. The maximum sorption capacity of arsenite was found to

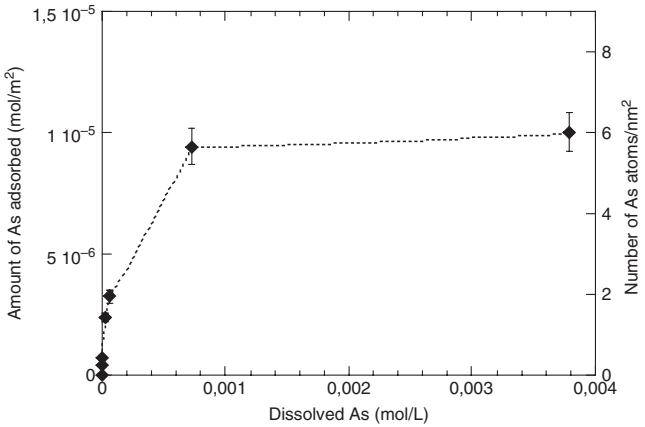


Figure 10.2 Experimental adsorption isotherm of As onto maghemite nanoparticles. IS = 0.2 M NaCl, pH = 7.4, adsorbent concentration is 27 mg·L^{-1}, contact time is 24 h at 298 K.

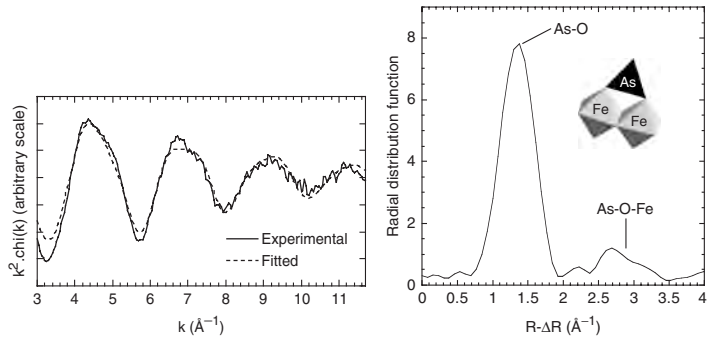


Figure 10.3 EXAFS As K-edge spectra (left) and its corresponding Fourier transform (right) of arsenic adsorbed onto maghemite nanoparticles. Experiments performed on the FAME beamline at the ESRF synchrotron (Grenoble, France).

be of the order of 1.0×10^{-5} mol·m^{-2} (or 1.8 mmol·g^{-1} of maghemite or ~6 As atoms/nm^2). This value can be compared (Table 10.4) with those obtained with β-FeOOH or HFO taking into account that the specific surface area of HFO is certainly lower than 600 m^2/g. The value of ~6 As atoms/nm^2 corresponds to a complete fulfillment of the surface of the maghemite nanoparticles.

EXAFS spectroscopy at the As K-edge (see Chapter 4, Rose et al.) was used to determine the local atomic environment of arsenic adsorbed on maghemite nanoparticles. The EXAFS oscillations, their corresponding Fourier transform (FT), and the parameters used to achieve the best theoretical fit are presented in Figure 10.3 and Table 10.2 and correspond to one monolayer of arsenic around maghemite nanoparticles. The dominant lower frequency on the EXAFS spectra and the first peak in the corresponding FT corresponds to oxygen atoms immediately

TABLE 10.2 Structural Parameters for As Contributions Obtained from Fitting EXAFS As K-edge Spectra of Arsenic Adsorbed onto Maghemite Nanoparticles

Samples	Atomic shells	N ± 20%	R(Å) ± 0.02 Å	σ (Å) ± 0.01 Å
As adsorbed onto	As-O	3.2	1.76	0.061
maghemite	As-O-O	7.1	3.02	0.013
nanoparticles	As-Fe*	1.7	3.33	0.102

N represents the number of backscatters at distance R; σ, the Debye-Waller term, is the disorder parameter for the absorber-backscatterer pair.
* Corresponds to iron atoms in the second coordination sphere of As.

surrounding the arsenic. In agreement with the literature and the study of reference compounds, the presence of 3.2 oxygen atoms at 1.67 Å, highlights that arsenic remains under the trivalent form during adsorption at the maghemite nanoparticles surface and XAS experiments. The second peak on the FT corresponds to the presence of iron atoms in the second coordination sphere of As. Previous EXAFS studies have described the adsorption of As^V and As^{III} onto iron oxide using multiple As-Fe shells: As-Fe = 3.55–3.60 Å for monodentate mononuclear complex, As-Fe = 3.25–3.40 Å for bidentate binuclear complex, and As-Fe = 2.8–2.9 Å for bidentate mononuclear complex (Arai et al., 2001; Ladeira et al., 2001; Manceau, 1995; Manning et al., 1998; Manning and Goldberg, 1996; Pierce and Moore, 1982; Sherman and Randall, 2003; Thoral et al., 2005; Waychunas et al., 1993; Waychunas et al., 1995). In the case of arsenate, the distance As-Fe at 2.8–2.9 Å is controversial and several authors suggest that it corresponds to multiple scattering of the photoelectron involving O-O pairs with the As^VO_4 tetrahedron (Arai et al., 2001; Manceau, 1995; Manning et al., 1998; Waychunas et al., 1995; Waychunas et al., 1993). In our particular case, a contribution of 1.7 iron atoms at 3.33 Å from As is necessary to satisfactorily reproduce the experimental spectra. This As-Fe distance is very close to the average As^{III}-Fe^{III} inter-atomic distances of 3.25–3.40 Å attributed to As^{III}-O-Fe linkages through double corner sharing.

Magnetite nanoparticles for arsenic removal. The effectiveness of using nanoscale magnetite to treat arsenic-contaminated drinking water was investigated. The adsorption and desorption behavior of arsenite and arsenate to magnetite nanoparticles brings some very interesting responses on the size effect on the surface properties. Three types of magnetite nanoparticles were studied: 300 nm (3.7 m^2/g) and 20 nm (60 m^2/g) commercially made nano-magnetites, and 11.72 nm (98.8 m^2/g) monodispersed magnetite synthesized in the laboratory.

The adsorption of As^{III} to 20 nm and 300 nm magnetite nanoparticles is dependent on pH and SSA (Table 10.1). The adsorption of As^V to 20 nm and 300 nm nanoscale magnetite decreases with increasing pH, because arsenate ionicity is pH dependent and the surface of the magnetite is positively charged at pH values below 6.8 (the point of zero charge for magnetite). The adsorption isotherm (Figure 10.4) of As^{III} and As^V onto 11.72 nm magnetite reveals dramatic changes (Al-Abadleh and Grassian, 2003; Axe and Trivedi, 2002; Dixit and Hering, 2003; Zhang et al., 1999). Compared with other literature results (Dixit and Hering, 2003; Morel and Hering, 1993), the maximum adsorption densities for 11.72 nm magnetite are very high (~18 and ~23 μmol/m^2 or ~10 and ~15 As atoms/nm^2).

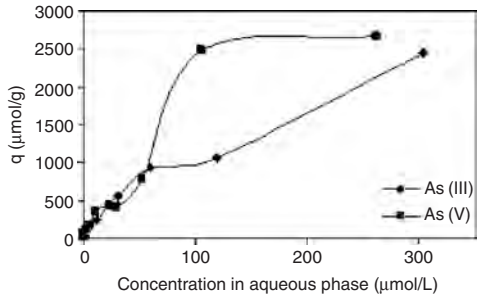


Figure 10.4 Plot of the adsorption of As^{III} and As^V to 11.72 nm magnetite at pH 8 (Yean et al., 2005).

Arsenite and arsenate adsorption experiments were also performed with 20 nm magnetite with Lake Houston water (pH 7.8) and 0.01 M $NaNO_3$ electrolyte solution (pH 8.0). The sorption of arsenite and arsenate to 20 nm magnetite was lower in the presence of Lake Houston water compared to the electrolyte-only solution. Literature has shown that arsenic sorption to mineral surfaces decreases in presence of competitive ions such as phosphate, sulfate, nitrate, natural organic matter (NOM), and molybdate (Appelo et al., 2002; Jackson and Miller, 2000; Manning and Goldberg, 1996; Munoz et al., 2002; Su and Puls, 2001; Swedlund and Webster, 1999; Violante and Pigna, 2002). Therefore, the decreased arsenite and arsenate adsorption to 20 nm magnetite was probably due to the NOM, since the other competing ion concentrations in Lake Houston water were negligible (Yean et al., 2005).

Desorption experiments were conducted on 20 nm and 300 nm nanoscale magnetite. Literature shows that desorption hysteresis occurs for many gas-solid and liquid-solid interactions (Ainsworth et al., 1994; Gao et al., 1993; Stumm and Morgan, 1996; Yin et al., 1997). Genc-Fuhrman et al. (2004) observed that arsenate desorption rate from activated neutralized red mud greatly increased when the pH increased (pH>9), but was irreversible at common environmental pH ranges. For 300 nm magnetite at pH 6.1, desorption of As^{III} and As^V appears to be hysteretic, only 20–25 percent of adsorbed As^{III} and As^V desorbs. From 20 nm magnetite, desorption of As^{III} and As^V was almost completely hysteretic, only 1 percent of the adsorbed As^{III} and As^V desorbs. Similar phenomena were seen at pH 4.8 and 8.0.

This study revealed that a critical size in the 12–20 nm range corresponds to a dramatic change of the surface structure. The very large adsorption density increase could be due to the formation of a porous surface lower than this critical size due to the large increase of the surface

stress. This hypothesis could explain the desorption hysteresis, which increases as the size decreases.

Iron oxide–doped TiO_2 nanoparticles for the degradation of organic pollutants

Recently, photocatalytic oxidation with TiO_2 nanoparticles (6–20 nm) has been investigated as a promising water-treatment process. When irradiated with UV light, TiO_2 nanoparticles can adsorb and degrade a wide variety of environmental organic pollutants (Bianco Prevot and Pramauro, 1999; Bianco Prevot et al., 1999a; Bianco Prevot et al., 1999b; Pramauro et al., 1998). For instance, the strong affinity between the surface of TiO_2 nanoparticles for arsenic organic species (monomethylarsonic [MMA] and dimethylarsinic [DMA] acids) were shown by EXAFS (Jing et al., 2005). Results show that both MMA and DMA are covalently bounded to the surface of nanoparticles through bidentate (As_{MMA}-Ti = 3.32 Å) and monodentate (As_{DMA}-Ti = 3.37 Å) inner sphere complexes, respectively.

In treating organic pollutants in water, there are some problems that arise from using TiO_2 nanoparticles. Two limiting factors are the low efficiency of the utilization of visible light and the recombination between the photogenerated electrons and holes, even if the kinetics of degradation of organic pollutants are increased in presence of TiO_2 nanoparticles. It has been reported that doping TiO_2 nanoparticles with ions (Zn^{2+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, K^{+}, Fe^{3+} . . .) at 0.1–0.5 percent may significantly increase the photocatalytic activity (Bessekhouad et al., 2004; Choi et al., 1994; Liu et al., 2005a). The doped ions act as charge separators of the photoinduced electron–hole pair and enhanced interfacial charge transfers. For instance, Liu et al., (2004) have studied the photocatalytic activity of TiO_2 nanoparticles doped with $ZnFe_2O_4$ (20 nm). The $ZnFe_2O_4$ doping strongly enhanced the photocatalytic activity of TiO_2 nanoparticles and improved the degradation of chlorinated pesticide (Liu et al., 2004).

The main problem is that the separation of the nano-photocatalyst from the polluted aqueous media is difficult and TiO_2 suspensions are not easily regenerated. To get around these difficulties, iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4, $CoFe_2O_3$, or $(Ba,S,Pb)Fe_{12}O_{19}$) have recently been coated with TiO_2 to synthesize magnetic photocatalytic nanoparticles (Fu et al., 2006). In such core-shell nano-structures (20–100 nm), the magnetic core is useful for the recovery of nano-photocatalyst from the treated water stream by applying an external magnetic field while a TiO_2 outer shell is used to destroy organic contaminants in wastewaters (Fu et al., 2006). The topic of photocatalytic degradation of organic contaminants is discussed in detail in Chapter 5.

Interaction of organic pollutants with carbon nanomaterials

Recently, interest has been focused on carbon nanomaterials, such as single wall nanotubes and fullerenes, because of their unique chemical, physical, and mechanical properties. Possible applications for these carbon nanomaterials are in energy, space, medicine, industry, and environmental applications, as well as concern about their environmental impact (Borm, 2002; Dagani, 2003). Fullerene (C_{60}) interactions with common environmental contaminants, such as naphthalene and 1,2-dichlorobenzene, have been studied on C_{60} large aggregates (20–50 μm), C_{60} small aggregates (1–3 μm), and nC_{60} (about 100 nm) (Figure 10.5). A linear isotherm ($K_d = 10^{2.39\pm0.02}C$), a Freundlich isotherm (q =

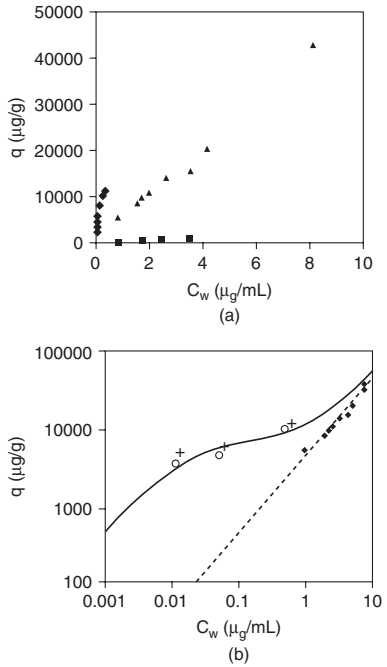


Figure 10.5 (a) Naphthalene adsorption to C_{60} large aggregates ■, C_{60} small aggregates ◆, nC_{60} ▲ (b) Adsorption and desorption of naphthalene with nC_{60} ◆; o and +, desorption of naphthalene from nC_{60}. Straight line, a linear isotherm in the form of q(μg/g) = 103.75 Cw (μg/mL); upper curve, model fitting curve assuming two-compartment desorption model. (Cheng et al., 2005).

TABLE 10.3 DED Model Parameters for Naphthalene and 1,2-Dichlorobenzene Adsorption and Desorption with nC_{60} (Cheng et al., 2005)

Sorbate	[a]Log K_d^{1st}			
Naphthalene	3.75±0.01	5.9±0.04	3.91±0.01	0.996
1,2-DCB	3.48±0.01	5.68±0.08	3.98±0.03	0.977

[a]adsorption data used to determine K_d^{1st} from first term in Eq. 6. Desorption data and K_d^{1st} determined from adsorption data used to find K_d^{2nd} and q_{max}^{2nd} by fitting the data to Eq. 6.

$10^{4.28\pm0.04}\ C_w^{0.45\pm0.05}$), and a linear isotherm ($K_d = 10^{3.7\pm0.01}C$) were used to fit the data of the C_{60} large aggregates, small aggregates, and the nC_{60} forms, respectively. The data suggest that adsorption of naphthalene to nC_{60} is similar to other forms of carbon. Desorption of the naphthalene from the nC_{60} was highly hysterertic. The K_d value for desorption increased by about two orders of magnitude higher than the corresponding adsorption value. These data were fitted with a two-compartment desorption model (Kan et al., 1998) (Figure 10.5 and Table 10.3). Adsorption and desorption experiments were also performed with 1,2-dichlorobenzene to nC_{60}. The adsorption and desorption data were fitted with a linear isotherm ($q = 10^{3.48\pm0.01}\ C_w$) and with the two-compartment desorption model, respectively (Table 10.2).

The experimental data show that 1,2-dichlorobenzene and naphthalene adsorption and desorption with nC_{60} are similar. The different sizes of the C_{60} aggregates affect the adsorption of naphthalene by orders of magnitude. The desorption of the environmental contaminants from nC_{60} exhibits hysteresis. Kinetic data also showed that desorption of naphthalene from C_{60} aggregates is composed of two compartments: a labile compartment, where naphthalene is probably adsorbed on the outside surface and can readily be desorbed, and a resistant desorption compartment, where naphthalene may be entrapped either in the C_{60} aggregates or in the surface crevices and desorption is hindered.

There is great potential for the use of inorganic nanoparticles, such as TiO_2, carbon or metallic nanoparticles (see Chapters 5 and 8), for the treatment of organic pollutants in water treatment and the environment. These nanoparticles have several advantages over the current microparticles used, such as high surface areas, higher affinity and surface reactivity, faster degradation rates, photocatalytic abilities, lower cost, and higher efficiency. With more fundamental research and development of technological applications, these inorganic nanoparticles have the ability to be used for environmental applications.

Inorganic nanoparticles with an organic shell

The combination of inorganic nanoparticles with an organic shell has attracted considerable attention because of the potential applications in many fields, such as separation processes, optoelectronics, catalysts and sensors, biotechnology, medical diagnostics, and therapy. Several nanosystems using iron oxide nanoparticles as the core and an organic layer on the surface have been studied to improve the water and liquid waste treatment. In such systems, the binding strength between the coating layer and the surface of nanoparticles and the affinity of the organic surface for specific pollutants play preponderant roles (Yamaura et al., 2002).

Organic-coated magnetite nanoparticles. Attention has been given to the functionalization of the surface of magnetite nanoparticles to develop new nano-adsorbents for the removal of ions from solution. For instance, Liao et al. (2003) coated magnetite nanoparticles (12 nm) with polyacrylic acid (PAA). The PAA coating was chosen for its strong affinity for cationic solutes with large molecular weights. The PAA coating layer attaches to the surface of magnetite nanoparticles through covalent linkage (Liao et al., 2003). This nano-adsorbent exhibits a high adsorption capacity and fast adsorption and desorption rates (Huang et al., in press, Liao et al., 2003; Liu et al., 1999). However, the PAA surface layer is not effective for the adsorption of metallic ions. Therefore, magnetite nanoparticles (13.5 nm) were surface-functionalized with chitosan (Chang et al., 2006; Chang and Chen, 2005). Chitosan is a natural polysaccharide with many useful characteristics, such as hydrophilicity, antibacterial properties, and affinity for heavy metal ions. Vibrational spectroscopic experiments have demonstrated the covalent attachment of the carboxymethyl chitosan at the surface of magnetite nanoparticles through the carboxylate functions. The resulting chitosan-coated nanoparticles were efficient for the fast removal of Co^{II} (0.47 mmol/g) and Cu^{II} ions (0.34 mmol/g) from aqueous solution (Chang et al., 2006; Chang and Chen, 2005). As for the PAA-coated nanoparticles, the kinetics of adsorption and desorption reactions were fast—one minute to reach equilibrium for Cu^{II} ions. The fast removal of ion from solution can be explained by the small internal diffusion within the structure of the nanoparticles. The chitosan coating may prevent a direct contact between the contaminants and the surface of the nanoparticle. Moreover, magnetic analysis indicates that once chitosan-coated, magnetite nanoparticles remain superparamagnetic, which could allow them to be separated from water under a magnetic field and reused.

DMSA-coated maghemite nanoparticles. To improve the efficiency of maghemite nanoparticles in the removal of arsenic from polluted waters, these nanoparticles were surface-coated with DMSA [meso-2,3-dimercaptosuccinic acid, $(SH)_2(CH)_2(COOH)_2$]. DMSA is an effective

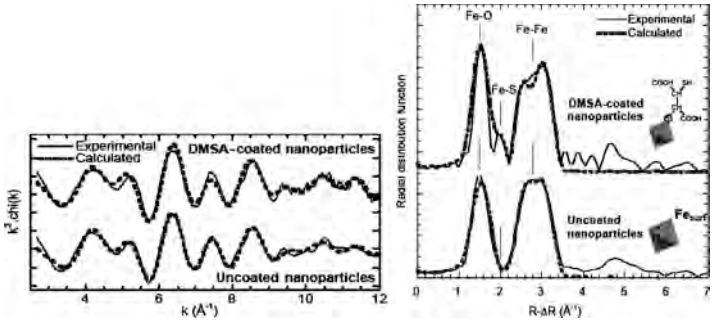


Figure 10.6 EXAFS Fe K-edge spectra (left) and its corresponding Fourier transform (right) of uncoated and DMSA-coated maghemite nanoparticles. Experiments performed on the beamlines 11.1 on the ELETTRA synchrotron (Trieste, Italy) (adapted from Auffan et al., 2006).

chelating agent, which has been used as a therapeutic antidote to heavy metal toxicity since the 1950s (Domingo, 1995). DMSA has been chosen as a coating agent for several reasons: (1) its lack of toxicity (Kramer et al., 2003); (2) its high efficiency to chelate heavy metals (Pb, Hg, Cd, As) (Domingo, 1995); and (3) because once DMSA is adsorbed on the surface of maghemite nanoparticles the colloidal suspension is stable over a broad range of pH values (3–11 pH) and ionic strengths (*IS* <0.35mol/L) (Fauconnier et al., 1997). The stability and the nature of the interactions between DMSA and the surface of the nanoparticles have been studied by EXAFS at the Fe K-edge (7.112 KeV) (Auffan et al., 2006). The EXAFS oscillations, their corresponding FT, and the parameters used to achieve the best theoretical fit are presented in Figure 10.6 and Table 10.4. The main difference between EXAFS results of the uncoated and DMSA-coated maghemite nanoparticles is the presence of 0.5 sulfur atoms in the first coordination sphere of iron (Fe-S = 2.21 ± 0.02 Å) after the coating. Such interatomic distance exists in iron sulfur minerals: 2.15 Å for pyrite (FeS_2)

TABLE 10.4 Structural Parameters for Fe Contributions Obtained from Fitting EXAFS Spectra of Uncoated and DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles (adapted from Auffan et al., 2006)

Samples	Atomic shells	N ±20%	R(Å) ±0.02Å	σ (Å) ±0.01 Å
Uncoated maghemite nanoparticles	Fe-O	5.0	1.96	0.107
	Fe- -Fe	3.9	2.97	0.101
	Fe- -Fe	8.5	3.43	0.105
DMSA-coated maghemite nanoparticles	Fe-O	4.9	1.95	0.090
	Fe-S	0.5	2.21	0.010
	Fe- -Fe	4.8	2.96	0.108
	Fe- -Fe	7.3	3.44	0.094

(Bayliss, 1977) and greigite (Fe_3S_4) (Skinner et al., 1964), 2.24 Å for marcasite (FeS_2) (Wyckoff, 1963), 2.26 Å for chalcopyrite ($CuFeS_2$) (Hall and Stewart, 1973). This result implies that 40% ±10% of Fe atoms are bound to S atoms at 2.21 Å. By taking into account the size and the crystal structure of the maghemite nanoparticles, we estimate that 40 percent of the Fe atoms are in the surface layer. Therefore, it appears that almost all of the surface Fe atoms are affected by the DMSA through inner sphere complexes (Auffan et al., 2006). The stability of the DMSA coating layer was investigated in a highly competitive medium rich in inorganic salt, sugar, and proteins (*IS* ≈ 0.2 M; pH = 7.4). Similar EXAFS experiments, as previously reported, have been performed at the Fe K-edge. They revealed the stability of the DMSA coating and its nondesorption from the surface of the maghemite nanoparticles even in a competitive solution. The efficiency of DMSA-coated maghemite nanoparticles to treat arsenic contaminated water was evaluated using a typical adsorption isotherm experiment. The maximum sorption capacity of arsenic was found to be of the order of 2.5 10^{-5} mol·m^{-2} (or 4.6 mmol·g^{-1} of maghemite or ~15 As atoms/nm^2). This value is comparatively higher than previously reported for maghemite nanoparticles alone without any coating.

All these results show that the functionalization of the surface of inorganic nanoparticles offer excellent opportunities for selective removal of a wide array of target compounds from polluted water. As illustrated, the combination of iron oxide nanoparticles with an organic compound surface provides advantages for water treatment processes that cannot be attained separately by the inorganic nanoparticles or organic compounds alone: pollutant specificity, fastest adsorption/desorption rates, and magnetic removal (Cumbal et al., 2003).

Concluding Remarks

In recent years, serious problems with water contamination have produced high demands to improve methods for contaminant treatment in water and liquid waste, along with controlling water-treatment residuals. This chapter has shown that oxide nanoparticles (<20 nm) have the potential to be an efficient system to remove contaminants from solution due to their high surface area, small diffusion resistance, high reactivity, and high affinity to adsorbates. This chapter also shows that a lot of opportunities can exist for a variety of hybrid organic/inorganic oxide nanomaterials in the field of water and liquid waste treatment. The hybrid nanomaterials can be created with specific coatings that are selective for contaminants, such as DMSA with its affinity for As, Cd, or Pb. The superparamagnetic properties of iron oxide nanoparticles might allow for the removal of nanoparticles from water or liquid waste using a magnetic field. Also, the well-defined crystalline structure makes it possible to regenerate the surface for reuse along with not creating residuals. These unique properties

of nanoparticles could be used to create a small water-treatment system that provides a low cost process and localized treatment. This could be useful in poor regions such as Bangladesh, Vietnam, and Latin America, which are exposed to high levels of arsenic in groundwater.

Acknowledgements

We acknowledge the French national "ACI-ECCOdyn" program supported by the CNRS. We also acknowledge the financial support from National Science Foundation through the Center for Biological and Environmental Nanotechnology [EEC-0118007], United States Environmental Protection Agency (US EPA) Office of Research and Development (ORD)/National Center for Environmental Research (NCER)/Science to Achieve Result (STAR) program, US EPA Hazardous Substance Research Center/South and Southwest Region.

References

Ainsworth, C.C., Pilou, J.L., Gassman, P.L., and Van der sluys, W.G., 1994. Cobalt, cadmium and lead sorption on hydrous iron oxide: Residence time effect. *Soil Sci. Soc. Am.,* 58:1615–1623.

Al-Abadleh, H.A., and Grassian, V.H., 2003. Oxide surfaces as environmental interfaces. *Surface Science Reports*, 52(3–4):63.

Appelo, C.A.J., Van der Weiden, M.J.J., Tournassat, C., and Charlet, L., 2002. Surface complexation of ferrous iron and carbonate on ferrihydrite and the mobilization of arsenic. *Environ. Sci. Technol.*, 36(14):3096–3103.

Arai, Y., Elzinga, E.J., and Sparks, D.L., 2001. X-ray absorption spectroscopic investigation of arsenite and arsenate adsorption at the aluminum oxide-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 235(1):80.

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.; Bottero, J.Y., In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxical study. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 4367–4373.

Axe, L., and Trivedi, P., 2002. Intraparticle surface diffusion of metal contaminants and their attenuation in microporous amorphous Al, Fe, and Mn oxides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 247(2):259.

Banfield, J.F., and Navrotsky, A., 2003. Nanoparticles and the environment. Reviews in mineralogy and geochemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, Washington DC, 1753 pp.

Bates, M.N., Smith, A.H., and Hopenhayn-Rich, C., 1992. Arsenic ingestion and internal cancers: A review. *Am. J. Epidemiol.*, 135(5):462–476.

Bayliss, P., 1977. Crystal structure refinement of a weakly anisotropic pyrite. *American Mineralogist*, 62:1168–1172.

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]-Fe_2O_3 vacancies ordering and lattice parameters. *Journal of Solid State Chemistry*, 163(2):459.

Bertone, J.F., Cizeron, J., Wahi, R.K., Bosworth, J.K., and Colvin, V.L., 2003. Hydrothermal synthesis of quartz nanocrystals. *Nano Letters*, 3:655–659.

Bessekhouad, Y., Robert, D., Weber, J.V., and Chaoui, N., 2004. Effect of alkaline-doped TiO_2 on photocatalytic efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 167(1):49.

Bianco Prevot, A., and Pramauro, E., 1999. Analytical monitoring of photocatalytic treatments. Degradation of 2,3,6-trichlorobenzoic acid in aqueous TiO_2 dispersions. *Talanta*, 48(4):847.

Bianco Prevot, A., Pramauro, E., and de la Guardian, M., 1999a. Photocatalytic degradation of carbaryl in aqueous TiO_2 suspensions containing surfactants. *Chemosphere*, 39(3):493.

Bianco Prevot, A., Vincenti, M., Bianciotto, A., and Pramauro, E., 1999b. Photocatalytic and photolytic transformation of chloramben in aqueous solutions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 22(2):149.

Borm, P.J.A., 2002. Particle toxicology: From coal mining to nanotechnology. *Inhalation Toxicol.*, 14:311–324.

Bottero, J.Y. et al., 1993. Surface and textural heterogeneity of fresh hydrous ferric oxides in water and in dry state. *Journal of Colloids and Interface Science*, 159:45–52.

Bottero, J.Y., Cases, J.M., Fiessinger, F., and Poirier, J.E., 1980. Studies of hydrolyzed aluminum chloride solutions. 1. Nature of aluminum species and composition of aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 84(22):2933–2937.

Bottero, J.Y., Manceau, A., Villieras, F., and Tchoubar, D., 1994. Structure and mechanisms of formation of FeOOH(Cl) polycations. Langmuir, 10(1):316–320.

Bottero, J.Y., Tchoubar, D., Cases, J.M., and Fiessinger, F., 1982. Investigation of the hydrolysis of aqueous solutions of aluminum chloride. 2. Nature and structure by small-angle x-ray scattering. *J. Phys. Chem.,* 86(18):3667–3673.

Chang, Y.-C., Chang, S.-W., and Chen, D.-H., 2006. Magnetic chitosan nanoparticles: Studies on chitosan binding and adsorption of Co(II) ions. *Reactive and Functional Polymers*, in press, corrected proof.

Chang, Y.-C., and Chen, D.-H., 2005. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2):446.

Chen, W., Kan, A.T., Fu, G., Vignona, L.C., and Tomson, M.B., 1999. Adsorption-desorption behaviors of hydrophobicorganic compounds in sediments of Lake Charles, Louisiana, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(8):1610–1616.

Cheng, X., Kan, A.T., and Tomson, M.B., 2005. Uptake and sequestration of naphthalen and 1,2-dichlorobenzene by C_{60}. *Journal of Nanoparticle Research.*, 7:555–567.

Choi, W.Y., Termin, A., and Hoffmann, M.R., 1994. The role of metal ion dopants in quantum-sized TiO_2: Correlation between photoreactivity and charge carrier recombination dynamics. *J. Phys. Chem.*, 98:13669–13679.

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

Cumbal, L., Greenleaf, J., Leun, D., and SenGupta, A.K., 2003. Polymer supported inorganic nanoparticles: Characterization and environmental applications. *Reactive and Functional Polymers*, 54(1–3):167.

Dagani, R., 2003. Nanomaterials: safe or unsafe? *Chem. Eng. News*, 81(30).

Deliyanni, E.A., Bakoyannakis, D.N., Zouboulis, A.I., and Matis, K.A., 2003. Sorption of As(V) ions by akaganeite-type nanocrystals. *Chemosphere*, 50(1):155.

Dixit, S., and Hering, J.G., 2003. Comparison of arsenic(V) and arsenic (III) sorption onto iron oxide minerals: Implications for arsenic mobility. *Environmental Science & Technology*, 37(18):4182–4189.

Domingo, J.L., 1995. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*, 9(2):105.

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.

Fu, W., Yang, H., Chang, L., Yu, Q., and Zou, G., 2006. Preparation and photocatalytic characteristics of core-shell structure $TiO_2/BaFe_{12}O_{19}$ nanoparticles. *Materials Letters*, in press, uncorrected proof.

Gao, Y., Kan, A.T., and Tomson, M.B., 1993. Critical evaluation of desorption phenomena of heavy metals from natural sediments. *Environmental Science & Technology*, 37(24):5566–5573.

Genc-Fuhrman, H., Tjell, J.C., and McConchie, D., 2004. Adsorption of arsenic from water using activated neutralized red mud. *Environmental Science & Technology*, 38(8):2428.

Hall, S.R., and Stewart, Y.M., 1973. The crystal structure refinement of chalcopyrite, $CuFeS_2$. *Acta Cryst.*, B29:579–585.

Hossain, M.F., 2006. Arsenic contamination in Bangladesh—An overview. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1–4):1.
Huang, S.-H., Liao, M.-H., and Chen, D.-H., Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. *Separation and Purification Technology*, in press, corrected proof.
Jackson, B.P., and Miller, W.P., 2000. Effectiveness of phosphate and hydroxide for desorption of arsenic and selenium species from iron oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64:1616–1622.
Jing, C., et al., 2005. Surface complexation of organic arsenic on nanocrystalline titanium oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 290(1):14.
Johnson, D.B., and Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: A review. *Science of the Total Environment*, 338(1–2):3.
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.
Kan, A.T., et al., 1998. Irreversible sorption of neutral hydrocarbons to sediments: Experimental observations and model predictions. *Environ. Sci. Technol.*, 32:892–902.
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.
Ladeira, A.C.Q., Ciminelli, V.S.T., Duarte, H.A., Alves, M.C.M., and Ramos, A.Y., 2001. Mechanism of anion retention from EXAFS and density functional calculations: Arsenic (V) adsorbed on gibbsite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(8):1211.
Lasaga, A.C., 1998. *Kinetic Theory and Applications in Earth Sciences*. Princeton Press, Princeton.
Liao, M.-H., Wu, K.-Y., and Chen, D.-H., 2003. Fast removal of basic dyes by a novel magnetic nano-adsorbent. *Chemistry Letters*, 32(6):488–489.
Liu, G., et al., 2004. Effect of $ZnFe_2O_4$ doping on the photocatalytic activity of TiO_2. *Chemosphere*, 55(9):1287.
Liu, G., et al., 2005a. The preparation of Zn^{2+}-doped TiO_2 nanoparticles by sol-gel and solid phase reaction methods respectively and their photocatalytic activities. *Chemosphere*, 59(9):1367.
Liu, T., et al., 1999. Bondlength alternation of nanoparticles Fe_2O_3 coated with organic surfactants probed by EXAFS. *Nanostructured Materials*, 11(8):1329.
Liu, Y., Choi, H., Dionysiou, D., and Lowry, G.V., 2005b. Trichloroethene hydrodechlorination in water by highly disordered monometallic nanoiron. *Chemistry of Materials*, 17(21):5315.
Manceau, A., 1995. The mechanism of anion adsorption on iron oxides: Evidence for the bonding of arsenate tetrahedra on free $Fe(O, OH)_6$ edges. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(17):3647.
Manning, B.A., Fendorf, S.E., and Goldberg, S., 1998. Surface structures and stability of arsenic(III) on goethite: Spectroscopic evidence for inner-sphere complexes. *Environmental Science & Technology*, 32(16):2383.
Manning, B.A., and Goldberg, S., 1996. Modeling arsenate competitive adsorption on kaolinite, montmorillonite and illite. *Clays Clay Miner.*, 44(5):609–623.
Morel, F.M., and Hering, J.G., 1993. Principles and applications of aquatic chemistry. *Journal of Hydrology*, 155, New York, 588 pp.
Munoz, J.A., Gonzalo, A., and Valiente, M., 2002. Arsenic adsorption by Fe(III)-loaded open-celled cellulose sponge. Thermodynamic and selectivity aspects. *Environ. Sci. Technol.*, 36(15):3405–3411.
Ngomsik, A.-F., Bee, A., Draye, M., Cote, G., and Cabuil, V., 2005. Magnetic nano- and microparticles for metal removal and environmental applications: A review. *Comptes Rendus Chimie*, 8(6–7):963.
Pierce, M.L., and Moore, C.B., 1982. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Research*, 16(7):1247.
Pramauro, E., Prevot, A.B., Vincenti, M., and Gamberini, R., 1998. Photocatalytic degradation of naphthalene in aqueous TiO_2 dispersions: Effect of nonionic surfactants. *Chemosphere*, 36(7):1523.
Prodan, D., et al., 1999. Adsorption phenomena and magnetic properties of [gamma]-Fe_2O_3 nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 203(1–3):63–65.

Raven, K.P., Jain, A., and Loeppert, R.H., 1998. Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: Kinetics, equilibrium, and adsorption envelopes. *Environmental Science & Technology*, 32(3):344.
Riu, J., Maroto, A., and Rius, F.X., 2006. Nanosensors in environmental analysis. *Talanta*, 69(2):288.
Rusanov, A.I., 2005. Surface thermodynamics revisited. *Surface Science Reports*, 58(5–8):111.
Sawyer, C.N., McCarty, P.L., and Parkin, G.B., 2003. *Chemistry for Environmental Engineering and Science*., 5th ed.
Sheoran, A.S., and Sheoran, V., 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Minerals Engineering*, 19(2):105.
Sherman, D.M., and Randall, S.R., 2003. Surface complexation of arsenic(V) to iron(III) (hydr)oxides: Structural mechanism from ab initio molecular geometries and EXAFS spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(22):4223.
Shipley, H.J., Yean, S., Kan, A.T., and Tomson, M.B., 2006. Rice University.
Skinner, B.S., Erd, R.C., and Grimaldi, F.S., 1964. Griegite, the thiospinel of iron: A new mineral. *American Mineralogist*, 49:543–555.
Stipp, S.L.S., et al., 2002. Behaviour of Fe-oxides relevant to contaminant uptake in the environment. *Chemical Geology*, 190(1–4):321.
Stumm, W., and Morgan, J.J., 1996. Aquatic chemistry: 3rd ed. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, 1200 pp.
Su, C.M., and Puls, R.W., 2001. Arsenate and arsenite removal by zerovalent iron: Effects of phosphate, silicate, carbonate, borate, sulfate, chromate, molybdate, and nitrate relative to chloride. *Environ. Sci. Technol.*, 35 (22):4562–4568.
Swedlund, P.J., and Webster, J.G., 1999. Adsorption and polymerisation of silicic acid on ferrihydrite, and its effect on arsenic adsorption. *Water Res.*, 33(16):3413–3422.
Tamura, H., Katayama, N., and Furuichi, R., 1997. The Co_{2+} adsorption properties of Al_2O_3, Fe_2O_3, Fe_3O_4, TiO_2, and MnO_2 evaluated by modeling with the Frumkin isotherm. *Journal of Colloid and Interface Science*, 195(1):192.
Thoral, S., et al., 2005. XAS study of iron and arsenic speciation during Fe(II) oxidation in the presence of As(III). *Environmental Science & Technology*, 39(24):9478.
Uheida, A., Salazar-Alvarez, G., Bjorkman, E., Yu, Z., and Muhammed, M., 2006. Fe_3O_4 and [gamma]-Fe_2O_3 nanoparticles for the adsorption of Co_{2+} from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, in press, corrected proof.
Violante, A., and Pigna, M., 2002. Competitive sorption of arsenate and phosphate on different clay minerals and soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 66:1788–1796.
Waychunas, G.A., Davis, J.A., and Fuller, C.C., 1995. Geometry of sorbed arsenate on ferrihydrite and crystalline FeOOH: Re-evaluation of EXAFS results and topological factors in predicting sorbate geometry, and evidence for monodentate complexes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(17):3655.
Waychunas, G.A., Rea, B.A., Fuller, C.C., and Davis, J.A., 1993. Surface chemistry of ferrihydrite: Part 1. EXAFS studies of the geometry of coprecipitated and adsorbed arsenate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(10):2251.
Wilkie, J.A., and Hering, J.G., 1996. Adsorption of arsenic onto hydrous ferric oxide: Effects of adsorbate/adsorbent ratios and co-occurring solutes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 107:97.
Wyckoff, R.W.G., 1963. Crystal structure. 1:355.
Yamaura, M., Camilo, R.L., and Felinto, M.C.F.C., 2002. Synthesis and performance of organic-coated magnetite particles. *Journal of Alloys and Compounds*, 344(1–2):152.
Yean, S., et al., 2005. Effect of magnetic particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenate. *J. Matter. Res*, 20:3255–3264.
Yin, Y., Allen, H.E., Huang, C.P., and Sanders, P.F., 1997. Adsorption/desorption isotherms of Hg(II) by soil. *Soil Sci.*, 162:35–45.
Zhang, H., Penn, R.L., Hamers, R.J., and Banfield, J.F., 1999. Enhanced Adsorption of Molecules on Surfaces of Nanocrystalline Particles. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(22):4656.
Zhang, W.X., 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research*, 5:323–323.

ANNEXE 2

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DES FIBROBLASTES

Sels inorganiques	mmol/L
CaCl2	2,12E+00
Ca	3,40E-01
Cl	1,45E+01
Fe(NO3)3	3,67E-04
KCl	4,78E+00
K	1,44E+00
MgSO4	1,48E+00
Na	2,98E+01
NaCl	9,74E+01
NaHCO3	3,92E+01
NaH2PO4	1,05E+00
P	3,16E-01
Se	3,29E-05
Autres composants	**mmol/L**
D-Glucose	2,29E+01
Rouge de phénol	3,77E-02
Creatine	2,36E-02
Bilirubin	6,84E-04
Uric acid	1,73E-02
Cholesterol	8,02E-02
Acides aminés	**mmol/L**
Alanine	3,17E+00
L-Arginine . HCl	1,34E+00
Asparagine	3,51E-03
Aspartic acid	3,27E+00
L-Cystine	1,78E-01
Cysteine	8,67E-01
Glutamic acid	4,46E+00
L-Glutamine	3,53E+00
Glycine	2,29E+00
L-Histidine . HCl	7,84E-01
L-Isoleucine	2,73E+00
L-Leucine	3,75E+00
L-Lysine . HCl	2,94E+00
L-Méthionine	9,77E-01
L-Phénylalanine	1,43E+00
Proline	2,04E+00
L-Sérine	3,13E+00
L-Thréonine	2,84E+00
L-Tryptophane	4,38E-01
L-Tyrosine	9,85E-01
L-Valine	3,22E+00
Vitamines	**mmol/L**
Pantothénate Ca	7,47E-03
Chlorure de Choline	2,55E-02
Acide Folique	8,07E-03
i-Inositol	3,56E-02
Nicotinamide	2,91E-02
Pyridoxine HCl	1,73E-02
Riboflavine	9,46E-04
Thiamine HCl	1,18E-02
Pyruvate de Na	1,00E+00

ANNEXE 3

Environ. Sci. Technol. **2006**, *40,* 6151−6156

Cytotoxicity of CeO_2 Nanoparticles for *Escherichia coli.* Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism

ANTOINE THILL,*,† OPHÉLIE ZEYONS,† OLIVIER SPALLA,† FRANCK CHAUVAT,‡ JERÔME ROSE,§ MÉLANIE AUFFAN,§ AND ANNE MARIE FLANK‖

CEA Saclay, Direction des Sciences de la Matiere, Departement de Recherche sur l'Etat Condense les Atomes et les Molecules, Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanometrique et Supramoleculaire, 91191 Gif-sur-Yvette, France, CEA Saclay, Direction des Sciences du Vivant, Service de Biologie Moleculaire Systemique, 91191 Gif-sur-Yvette, France, CEREGE UMR 6635 CNRS-Universite Paul Cezanne Aix-Marseille 3, IFR Pole Mediterraneen des Sciences de l'Environnement, 112, Europole de l'arbois, 13545 Aix-En-Provence, France, and Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, 5232 Villigen PSI, Switzerland

The production of nanoparticles (NPs) is increasing rapidly for applications in electronics, chemistry, and biology. This interest is due to the very small size of NPs which provides them with many interesting properties such as rapid diffusion, high specific surface areas, reactivity in liquid or gas phase, and a size close to biomacromolecules. In turn, these extreme abilities might be a problem when considering a potentially uncontrolled exposure to the environment. For instance, nanoparticles might be highly mobile and rapidly transported in the environment or inside the body through a water or air pathway. Accordingly, the very fast development of these new synthetic nanomaterials raises questions about their impact on the environment and human health. We have studied the impact of a model water dispersion of nanoparticles (7 nm CeO_2 oxide) on a Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). The nanoparticles are positively charged at neutral pH and thus display a strong electrostatic attraction toward bacterial outer membranes. The counting of colony forming units (CFU) after direct contact with CeO_2 NPs allows for the defining of the conditions for which the contact is lethal to *Escherichia coli.* Furthermore, a set of experiments including sorption isotherms, TEM microscopy, and X-ray absorption spectroscopy (XAS) at cerium L_3 edge is linked to propose a scenario for the observed toxic contact.

1. Introduction

Nanotechnologies are developing rapidly in numerous industries and in particular those related to the following: computer sciences and information technologies; material sciences with optical, magnetic, or mechanical applications; medical sciences—diagnostics tools (*1*) and drug delivery (*2*); and environmental applications—clean energy (fuel cells), membranes, and catalysts. Indeed, the particular physical and chemical properties of nanoobjects (rapid diffusion, high specific surface areas, important reactivity in liquid or gas phase, size close to biomacromolecules such as DNA and other biological molecules) contribute to the positive expectations associated with their use. However, with these particular and promising properties, interrogations about their potential toxicity and environmental impact emerge (*3*−*6*). Indeed, it is suspected that their small size can bring new and unforeseen toxicity, and some aspects of recent history (e.g., asbestos fibers) just feed the mistrust of those materials. This suspicion of a direct toxicity is emphasized when considering the furtivity of fully dispersed nanoobjects. Past errors, and the application of a "principle of precaution" in many countries, underline the crucial need for intensive research on the risks associated with the increasing production of nanomaterials. Several papers related to this subject have been published very recently (*7*−*10*).

The present work is dedicated to the impact of nanoparticles (thereafter called NPs) through a water path and describes the interaction between a water dispersion of nanoparticles and a model bacteria. We have selected cerium oxide as the model nanoparticles for our studies, and, on the other hand, *E. coli* was chosen as a widely used model organism. Our two main reasons for choosing these nanoparticles were as follows: they are relevant to the global initial question since cerium oxide is indeed used in its nanometric form as an exhaust gas catalyst, and, when they are diluted, they form a dispersion of individual NPs. Cerium toxicity has been previously studied in its Ce^{III} form (*11*), and, more recently, a mechanism of ceria uptake by fibroblasts was proposed (*12*, *13*). Moreover, not only the "negative" but also the "positive" effects of ceria NPs are now studied; indeed two recent studies showed that ceria NPs stabilized with polymers also display interesting neuro- and radiation protective properties on cells (*14*, *15*).

2. Materials and Methods

2.1. CeO_2 Nanoparticles and Bacterial Growth. *Escherichia coli* wild strain RR1 was used as a test organism. The bacteria culture was prepared at 37 °C overnight using LB (Luria Bertani) nutrient broth (*16*). Therefore, the bacteria are accompanied by a large amount of salt, organic molecules, and yeast extract. These raw cultures will be named "unwashed cultures" in the following. Taking into account that the NPs surfaces are known to adsorb very easily small organic materials (*12*, *17*), their presence in the "unwashed cultures" can corrupt the interaction between bacteria and NPs. Thus, the culture was centrifuged at 5000 rpm for 3 min and resuspended in a water solution of KNO_3, previously sterilized at 120 °C 1 bar for 20 min. This treatment was repeated three times. Three types of bacteria suspensions were prepared depending on the concentration of the KNO_3 washing solutions A (10^{-3} M), B (10^{-2} M), and C (10^{-1} M). Then, depending on the experiment, the number of bacteria was adjusted either to 0.5×10^9 or 1.66×10^9 bacteria·mL^{-1} as determined by CFU counting on LB Petri dishes. The final pH of the KNO_3 cell suspension was around 6.

CeO_2 NPs were a gift from the chemical company Rhodia. They are obtained as a powder through precipitation of $Ce^{4+}(NO_3^-)_4$ salt at very low pH (*19*). When water is added to this powder, a stable solution forms spontaneously. This

* Corresponding author e-mail: antoine.thill@cea.fr.
† Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanometrique et Supramoleculaire.
‡ Service de Biologie Moleculaire Systemique.
§ Universite Paul Cezanne Aix.
‖ Paul Scherrer Institut.

10.1021/es060999b CCC: $33.50 © 2006 American Chemical Society Published on Web 08/31/2006

solution contains perfectly dispersed ceria NPs, which are ellipsoidal monocrystallites with an average size of 7 nm (see Supporting Information) and a specific surface of 400 $m^2 \cdot g^{-1}$ (*18*). The point of zero charge (PZC) of the NPs has been measured at a pH of 10.5, and the presence in acidic conditions of adsorbed nitrates helps their stabilization (*18*). These NPs can be easily dispersed in acidic medium (pH<5) at high concentrations (up to 2×10^5 $mg \cdot L^{-1}$ of CeO_2). In the pH range 5−6 of the following studies, their surface bears positive charges.

2.2. Construction of the Isotherm of Adsorption. CeO_2 NPs stock solutions in MilliQ water were prepared with the concentration increasing from 0.12 to 12 $g \cdot L^{-1}$. The pH decreased accordingly from 6 to 2.5. Small volumes of these stock solutions were added to 2 mL of just freshly washed *E. coli* suspensions at a concentration of 0.5×10^9 $bacteria \cdot mL^{-1}$. The final concentration of CeO_2 was varied between 0 and 730 $mg \cdot L^{-1}$. Since the added amount was very small, it did not change the pH of the "washed" culture significantly. The samples were stirred just after mixing and then incubated until used for measurements. After 3 h of exposure time, the adsorption isotherm was measured. Separation of the bacteria from the solutions was achieved by centrifuging the sample tubes for 5 min at 5000 rpm. A few milliliters of the upper part of the supernatant was carefully sampled and stored at −4 °C until analysis. Measurements were performed by ICP-MS (Fisons Plasma-quad PQ2+). These measurements allow for construction of the isotherm of adsorption by plotting the amount of adsorbed CeO_2 per bacteria versus the nonadsorbed amount. The isotherms were constructed for A-, B-, and C-type washed cultures.

2.3. Electron Microscopy. For several points along the adsorption isotherm, thin sections of samples embedded in a resin were prepared for TEM measurements. One milliliter of the sample was fixed in a blood collecting tube with 1 mL of 2% osmium tetraoxide in a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h. Excess osmium tetraoxide was removed with phosphate buffer. The samples were then dehydrated in successive acetone baths (5 min at 10, 20, 40, and 60%, 15 min at 80%, 2 h 15 min at 95%, and 3 h 20 min at 100% acetone) and embedded in an epoxy resin (Kit Embed 812, Euromedex) in three stages. First, one-third of the acetone was replaced by the same volume of resin; then, two-thirds of the resulting mixed liquor was replaced by resin. The sample was placed under vacuum for 4 h after each step. Finally, all the supernatant was replaced by the resin. The sample remained in pure resin for 12 h under atmospheric pressure. Polymerization was carried out for 12 h at 60 °C. An ultramicrotome (Reichert OM U2) was used to slice the resin-fixed bacteria into very thin sections (0.2 μm thick). The sections were deposited on a TEM grid for observation.

2.4. X-ray Absorption Near Edge Structure: XANES. The XANES measurements were done on the LUCIA beamline (Swiss Light Source, Villigen, Switzerland). The spectra were scanned at room temperature under vacuum in the fluorescence mode for the diluted samples using a total-electron-yield detector for the references. The total electron yield mode measures the current of the electrons produced when the material is excited. A Si111 monochromator was used. The XANES spectra were scanned at a step increment of 0.3 eV in the 5.5−6.1 keV energy range which covers the L_3 edge.

The XANES spectra were normalized by fitting the photoelectric background above the absorption edge with a second-order polynomial function using a series of programs developed by A. Michalowicz (*20*).

2.5. Cytotoxicity Assays. The cytotoxicity was assessed by counting colony forming units (CFU) on LB Petri dishes prepared with Difco LB Agar, Miller (Luria−Bertani), composed of 10 $g \cdot L^{-1}$ of tryptone, 5 $g \cdot L^{-1}$ of yeast extract, 10 $g \cdot L^{-1}$ of NaCl, and 15 $g \cdot L^{-1}$ of Agar. Each set of the experiment was repeated three times for reproducibility. The reference sample was the unmodified LB culture. A potential cytotoxicity of KNO_3 was first checked. After three washing stages in KNO_3 (10^{-1} M) the survival tests yield 80% of survival with respect to the LB culture. Then a KNO_3 (10^{-1} M) washed and resuspended *E. coli* suspension at 1.66×10^9 $bacteria \cdot mL^{-1}$ was divided into aliquots of 2 mL. In each vial, 100 μL of a solution with different concentrations of cerium nanoparticles was added. The final concentration was ranging from 0.46 to 500 $mg \cdot L^{-1}$ of CeO_2, which corresponds to solutions of 2.7×10^{-3} $mmol \cdot L^{-1}$ to 2.9 $mmol \cdot L^{-1}$ of CeO_2. The cultures were then incubated at 37 °C for 3 h. The percentages of survival were calculated from the number of CFU for each concentration reported to the number of CFU counted for the samples incubated without nanoparticles in KNO_3 10^{-1} M for 3 h. In order to check the possible influence of time, cytotoxicity tests were also performed after 1 and 5 h of contact with two given concentrations of CeO_2, i.e., 4 $mg \cdot L^{-1}$ and 15 $mg \cdot L^{-1}$. The pH of the tested solutions decreased with ceria content from 6.5 (0 $mg \cdot L^{-1}$ of CeO_2) to 5 (500 $mg \cdot L^{-1}$ of CeO_2). Such a pH decrease induced by itself only a slight decrease of *E. coli* survival (*21*).

In parallel, experiments were designed to check whether the NPs are able to alter cell growth. Therefore, *E. coli* cells were grown in the presence of an increasing amount of NPs in the nutrient broth. The added amounts correspond to the ones used for the cytotoxicity test. The concentration of *E. coli* during the growth of the colony with and without NPs was followed by measuring the light transmission at 580 nm.

3. Results

3.1. Physicochemical Interaction and Cytotoxicity. The washed bacteria cultures form stable suspensions which strongly scatter the light, hence resulting in a milky aspect. Immediately after the last washing of the bacteria cultures, an increasing amount of CeO_2 NPs was added to these suspensions. The addition of CeO_2 ranged from 0 to 730 $mg \cdot L^{-1}$. The solutions were mixed and then left under rest. After 1 h of contact time, the cerium oxide concentrations between 1.2 and 37 $mg \cdot L^{-1}$ induce an aggregation and sedimentation of the bacteria. On the contrary, the suspensions kept their milky aspect for a smaller or larger addition of NPs. This influence of the NPs addition on the stability of the bacteria culture is the signature of a strong interaction between these two objects. This can be further quantified by constructing the isotherm of adsorption which is reported in Figure 1 and shows the concentration of adsorbed CeO_2 versus the free CeO_2 concentration after centrifugation.

The amount of adsorbed NPs is usually quantified using $mg \cdot m^{-2}$ (*22*), corresponding here to milligrams of CeO_2 per m^2 of bacteria surface. Scanning electron microscopy has shown that the bacteria have a tubular shape with a small diameter of about 0.5 μm and a length of about 3.4 μm. Furthermore, small angle light scattering measurements performed on the bacteria washed suspensions confirm that this shape is a valid statistical description of the bacteria suspension. The surface of a unique bacteria is thus estimated to 5.8 μm^2. Taking a number density corresponding to 0.5×10^9 $bacteria \cdot mL^{-1}$, the specific surface of the solution is therefore 3 m^2/L .

Figure 1 shows that there was no measurable free ceria up to concentrations of about 30 $mg \cdot L^{-1}$. Expressed in classical units, this number is 10 $mg \cdot m^{-2}$ of adsorbed CeO_2. Above this concentration, an increasing amount of free ceria is found in the supernatant, and a maximum of the adsorbed NPs concentration is reached at 48 $mg \cdot L^{-1}$ (corresponding to 16 $mg \cdot m^{-2}$ in classical units). After this point, every extra added NP is found in the supernatant. Similar isotherms of NPs adsorption were observed irrespectively of the KNO_3

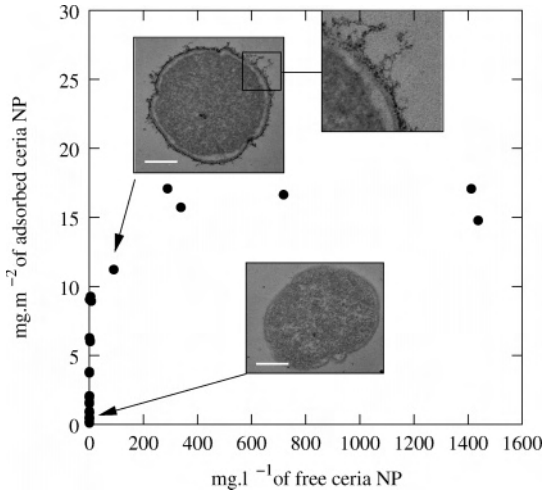


FIGURE 1. Isotherm of adsorption of CeO_2 NPs on *E. coli* bacteria. Insets show TEM observations of *E. coli* ultramicrotomic thin sections before and after contact with 12 mg·m^{-2} of adsorbed ceria. The scale bar is 0.1 μm. A zoom shows the multilayer of NPs at the cell outer membrane.

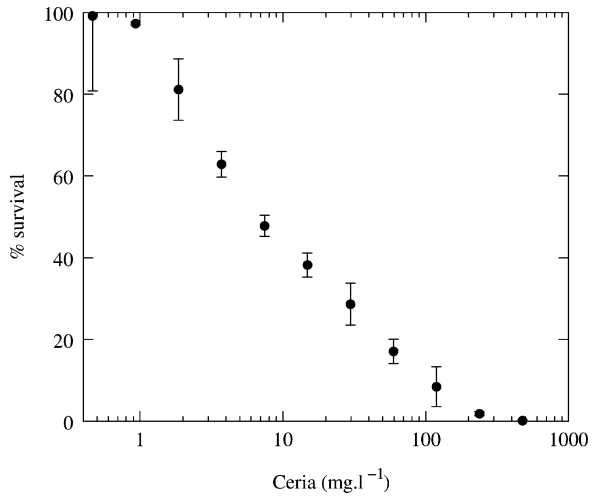


FIGURE 2. Influence of the NPs treatment on cell survival to CeO_2. Black points are for the survival of cells (counted as the ratio of CFU corresponding to NP-treated versus untreated cells) exposed to CeO_2 for 3 h in 10^{-1} M KNO_3 buffer.

solution (10^{-3}, 10^{-2}, and 10^{-3} M) used for washing and resuspension of the cells.

In addition, the insets in Figure 1 show transmission electronic microscopy (TEM) observations of thin sections of the bacteria before contact with the NPs and after contact with a ratio of 12 mg·m^{-2}. The shape of the whole bacteria and the contrast of the cytoplasm is not obviously modified by the NPs. On the contrary, the external part of the bacteria clearly displays an outer shell of high electronic density corresponding to a layer of NPs adsorbed at the outer membrane of the cells.

Following the protocol described in the cytotoxicity assays section, the ability of the bacteria to divide and further form a colony after a contact with the NPs has been measured. Figure 2 shows the percentage of colony forming units (CFU) after 3 h of contact with CeO_2 NPs. The test was repeated three times. We observed that the percentage of CFU is strongly affected when the concentration of NPs increases. Indeed, the survival rate is still above 90% below 0.9 ppm of CeO_2 addition. The rate decreases down to 50% for a CeO_2 addition of 5 ppm. There is no survival CFU above a CeO_2 addition of 230 ppm. For the two concentrations of CeO_2 (4 mg·L^{-1} and 15 mg·L^{-1}) tested at 1, 3, and 5 h of contact, no difference in the toxicity could be noticed.

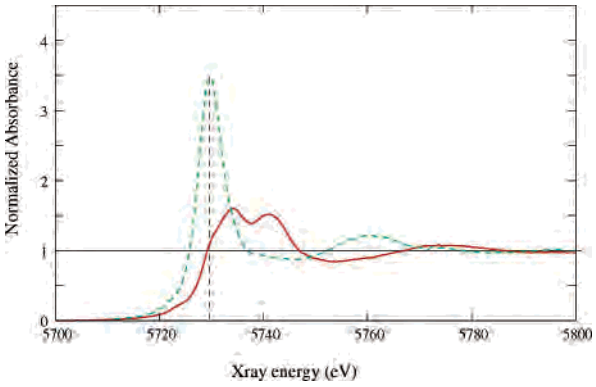


FIGURE 3. XANES spectra at cerium L_3 edge of chemically pure micrometric CeO_2 powder (line) and $CeCl_3$ in water (dotted line).

On the contrary, the presence of NPs in the LB growth medium did not influence the growth of the cells. After an overnight growth, the cells density reached the same value irrespective of the presence or absence of NPs in the cultures. This result is in a strong contrast with what is obtained on a washed culture.

3.2. Chemical Modifications of the Nanoparticles. The XANES spectra for the two reference states of Ce are shown in Figure 3. The references were $CeCl_3$ solution and a chemically pure micrometric CeO_2 powder. The differences between a Ce^{III} state and a Ce^{IV} state of oxidation are very strong, and therefore a slight change can be easily quantified. Indeed, for Ce^{III} atoms, a strong low-energy peak at about 5729 eV is dominating. For Ce^{IV} the major band exhibited a double white line characteristic of the mixture of the two cerium ground-state electronic configurations, $4f^{0}$and $4f^{1}$ (*23*). The ratio of these two peaks is noted hereafter IA/IB. The quantification of the cerium oxidation state can be performed using a linear component (LC) fitting or a peak fitting method (*24*, *25*) (see Supporting Information). The peak fitting method enables the determination of the exact transition energy and an estimation of the Ce^{III} fraction, whereas the LC fitting method only leads to an estimation of the Ce^{III} fraction within the samples. Differences in the results come from the component at 5729 eV used to fit the Ce^{IV} references spectra. Indeed, a controversy still exists about its physical origin. It can either come from Ce^{III} impurities (*24*, *25*) and/or crystal field splitting (*26*, *27*). The fact that two effects can lead to the presence of the 5729 eV peak, leads to uncertainty in the determination of the Ce^{III} fraction by the method of peak fitting. On the other hand, the LC fitting method overcomes such difficulty. Nevertheless, the LC fitting method requires the choice of the Ce^{IV} and Ce^{III} standards. In our case, we have selected the spectrum of CeO_2 nanoparticles in solution as the Ce^{IV} standard and the spectrum of $CeCl_3$ in contact with *E. coli* during 2 h as the Ce^{III} standard. Indeed the XANES of the $CeCl_3$ in contact with *E. coli* during 2 h indicated that the cerium remained under the Ce^{III} form.

Figure 4 presents typical examples of fits to the XANES spectra of the NPs in solution. Applied to the references, the fitting method yields a ($Ce^{III}/Ce^{III} + Ce^{IV}$) ratio of 1 for the Ce^{III} salt, 0.16 for the CeO_2 initial NPs, and 0.12 for the CeO_2 micrometric grains. The LC method yields to the ($Ce^{III}/Ce^{III}+Ce^{IV}$) ratio of 1 for the Ce^{III} salt and 0 for the CeO_2 initial NPs.

The XANES spectra of the NPs (filled circles in Figure 4) after 1 h of contact with the washed bacteria culture, at a concentration of 11 mg/m^2, is drastically different from the one of the NPs in solution. The major difference is a very

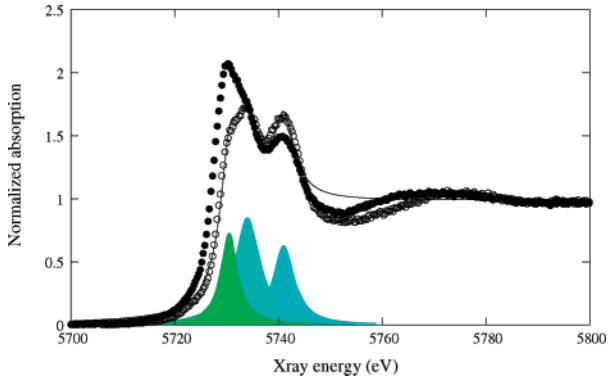


FIGURE 4. Open circles correspond to the XANES spectra of the NPs in water at cerium L_3 edge; the line is the fit for this spectra. The three peaks used for fitting the XANES spectra of the CeO_2 NPs in water are also displayed. The filled circles correspond to the spectra of washed *E. coli* suspension covered with 11 mg/m^2 of adsorbed CeO_2.

strong increase of a contribution at 5729 eV which is the signature of the Ce^{III}. Indeed, even if the fitting of the NPs in solution has shown that a 5729 eV peak is present, its amplitude was very far from the present one. This demonstrates a measurable reduction of the Ce^{IV} NPs by the bacteria. The peak fitting and LC methods lead to 44% and 29%, respectively, of reduced cerium. Moreover, the ratio (Ce^{III}/Ce^{III}+Ce^{IV}) is about 0.5 whatever the addition of CeO_2. This is linked to the fact that all the tested samples are before the plateau of the isotherm. Thus, all the NPs are adsorbed on the bacteria surface and are therefore submitted to the same rate of reduction.

On the other hand and in contrast with the washed culture case, when the NPs are put in an unwashed bacteria culture, the reduction of the NPs is still measurable but not constant with the amount of added NPs (Figure 5). It gets smaller as the added concentration of NPs is increased. This may indicate that the biotic supporting media is charged with species able to reduce the NPs. These species being removed from the washed culture, the reduction is thus performed by the bacteria alone through oxidation of their wall membrane (*28*).

Finally, the influence of the LB growth medium on the oxidation of cerium is limited. The measured XANES spectra (not shown) were the same as for the NPs in water. This indicates that the oxidation state of the nanoparticles and the symmetry of the cerium atoms are not modified by the abiotic environment (4% of Ce^{III}). The peak fitting method lead to 20%, whereas the LC fitting method indicated that 4% of cerium has been reduced to Ce^{III}. The last case corresponds to the contact between NPs and a bacteria equilibrated LB growth medium. The medium is the supernatant obtained after the centrifugation of an LB grown colony and thus contains all the biological small molecules in equilibrium with the bacteria. The reduction of NPs is again very limited in this medium.

Figure 5 shows the evolution of the value of (Ce^{III}/Ce^{III}+Ce^{IV}) as a function of the cerium concentration in the sample for both washed bacteria cultures and unwashed bacteria culture.

Finally, the reduction did not lead to modifications of the intensity ratio between the two peaks of the double white line of Ce^{IV} (IB/IA, Table 1). This ratio is representative of the ionicity of the Ce−O linkage in CeO_2 (*24*). The biological effects did not modify the Ce−O bonding of the Ce^{IV} atoms.

4. Discussion

Our main results are as follows: (i) a large amount of CeO_2 NPs can be adsorbed on the *E. coli* outer membrane; (ii) the speciation of the NPs is significantly modified after adsorption; (iii) the adsorption of the NPs and their reduction are associated with a significant bacterial cytotoxicity; and (iv) the toxicity of the NPs is prevented when they are put into contact with the bacteria in the presence of the growth medium. These results involve three types of interactions between the NPs and the bacteria: adsorption, oxidoreduction, and toxicity. The conditions for which these interactions

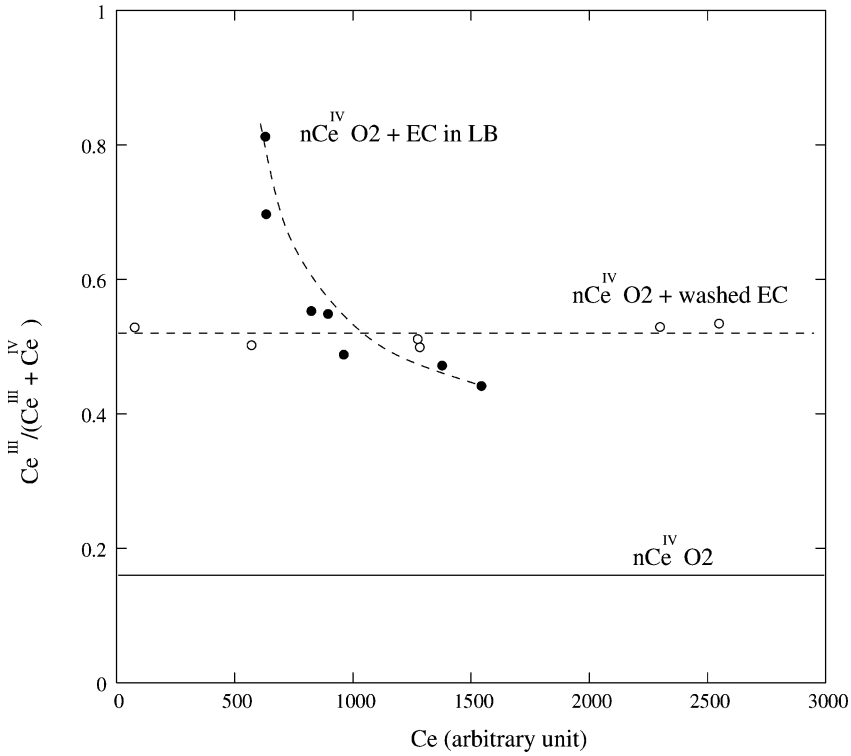


FIGURE 5. Ce^{III}/(Ce^{III}+Ce^{IV}) obtained with the peak fitting method as a function of the Ce concentration from EDX in an arbitrary unit.

TABLE 1: Ce^{III} Percentage Estimated from XANES

	$[Ce^{III}]$(%) estimated with the LC method	$[Ce^{III}]$(%) estimated with the peak fitting method	IB/IA[a]
CeO_2(macro)		12	1.47
NPs in solution	0	16	1.45
NPs in the LB growth medium	4	20	1.47
$nCe^{IV}O_2$ + washed EC samples	29± 4	44 ± 3	1.44 ± 0.03

[a] Peak intensity ratio between the two peaks forming the double Ce^{IV} white line.

are active and related constitute the object of the discussion. The first interaction is the adsorption. It is clear that the large adsorption of the NPs on washed bacteria is driven from distance by the electrostatic attraction between the two objects. Nevertheless, the level of adsorption at saturation is very high since it corresponds to 6.4 m^2 of NPs surface for 1 m^2 of outer bacteria surface. Considering that the projection of a sphere surface on its surface of adsorption yields a surface ratio of 4 ($4\pi r^2/\pi r^2$), one can conclude that a multilayer of NPs is adsorbed onto the membrane. The saturation is furthermore linked to a charge reversal of the initial surface. In the present case, one main difference with a solid interface is the extended structure of the outer membrane of *E. coli.* Indeed, it is made of lipopolysaccharide molecules which bear six negative charges dispatched in a layer of up to 40 nm thick (*31*, *32*). Thus, the large thickness of the outer membrane certainly plays a crucial role in the very high level of adsorption which is observed as already suspected by others (*29*). A comprehensive model of the adsorption can only be done by numerical simulations which is beyond the scope of this paper. Another key for this high adsorption rate may be an absorption of the NPs inside the cell. At the present time, the TEM images cannot decide whether NPs have penetrated inside the cell, and more refined experiments are called for. The strong electrostatic interaction between the NPs and the membrane may block them at the surface for very long time.

The second interaction is the reduction of the NPs. It always appears when the bacteria are present, either in a washed or unwashed culture. Indeed, no reduction is observed in the absence of bacteria (pure LB alone or cell free residual LB that has supported cell growth). For a washed culture, it is clear from the isotherm of adsorption and from the TEM images that the NPs are mainly located on the surface of the bacteria. The rate of reduction is the same for every amount of adsorbed particles and roughly corresponds to the ratio of surface atoms in the NPs. This means that the reduction is located at or close to the surface of the bacteria and may only concern the cerium atoms at the surface of the NPs. Furthermore, the reduction is linked to the occurrence of a strong cytotoxicity. The simultaneous apparition of the reduction and cytotoxicity reveals that the adsorption onto the surface is linked to an *oxidative stress* for the bacteria. In addition, the fact that the toxicity is the same after 1 and 5 h supports a rapid biological mechanism after the membrane adsorption of the NPs. For an unwashed culture, the reduction rate decreases as the concentration of NPs increases. This means that the reduction does not occur following the same process. In this case, no effect on the bacteria survival is observed.

On the other hand, in the unwashed case, the absence of cytotoxicity accompanying the reduction of the NPs supports the conclusion that the NPs reduction is occurring far from the bacteria. Nevertheless, it has to be promoted by the bacteria since the broth alone is not reducing the NPs. One scenario is that the bacteria are developing a defense against the *oxidative stress* of the NPs by releasing in solution molecules able to reduce NPs at a distance from the bacteria. When the supernatant of a culture is washed by a mineral salty solution, these species are eliminated, and the NPs can enter in direct *oxidative stress* contact. It may be that the *oxidative stress* provokes the loss of survival ability, but other mechanisms can also be involved (*30*). Indeed, when NPs are adsorbed directly onto the outer cell membranes, it may modify the viscosity of the membrane, corrupt the specific ionic pumps, and therefore strongly modify the transport exchanges of the cell with the solution, which interferes with the growth. Specifically designed biological tests and genomic transcription analysis have to be performed to examine in more details the biological consequences of the NPs adsorption.

Nevertheless, a main conclusion can already be drawn from these studies. We have found that a direct spatial contact has to be made in order to provoke a cytoxicity of CeO_2 NPs on *E. coli.* It is most interesting that the *E. coli* bacteria are more sensitive than human fibroblast (*12*, *13*). More generally, studies dealing with the toxicity of NPs for the environment and human health have to be designed with very special care in order to have a defined contact between the NPs and the biological objects. In particular, the use of NPs with poorly characterized state of dispersions and almost unknown supporting supernatant compositions cannot lead to any understandable results on cytotoxicity. The following first two steps depending on chemistry and physical-chemistry have to be done before any tedious and costly biological tests: assessing the state of dispersion of the NPs and controlling the physicochemical conditions involved during the contact between the two objects.

Acknowledgments

The project has been funded by the French National Program-ACI ECCO. We thank Barbara Gouget for her help in the ICPMS analysis of the cerium and Jean-Marc Verbavatz for the TEM experiments. The XAS work was performed at the Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland. We are grateful to the machine and beamline groups whose outstanding efforts have made these experiments possible. We also thank M. Wiesner for stimulating discussions and collaborations in the framework of the I-CENTR.

Supporting Information Available

Small angle X-ray scattering of CeO_2 NPs and peak fitting method details. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

Literature Cited

(1) Zhang, Y.; Kohler, N.; Zhang, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553−1561.

(2) Verrecchia, T.; Spenlehauer, G.; Bazile, D. V.; Murry-Brelier, A.; Archimbaud, Y.; Veillard, M. Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *J. Controlled Release* **1995**, *36*, 49−61.

(3) Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, *311*, 622−627.

(4) Barnard, A. S. Nanohazards: Knowledge is our first defence. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 245−248.

(5) *Nanoscience and nanotechnology: opportunities and uncertainties*; The Royal Society: London, 2004. http://www.nanotec.org.uk (accessed April 2006).

(6) Characterizing the potential risks posed by engineered nanoparticles UK government research report. http://www.defra.gov.uk (accessed April 2006).

(7) Derfus, A. M.; Warren, C. W. C.; Bhatia, S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11−18.
(8) Kirchner, C.; Liedl, T.; Kudera, S.; Pellegrino, T.; Javier, A. M.; Gaub, H.E.; Stolzle, S.; Fertig, N.; Parak, W. J. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331−338.
(9) Auffan, M.; Decome, L.; Rose, J.; Orsiere, T.; De Meo, M.; Briois, V.; Chanéac, C.; Olivi, L.; Berge-Lefranc, J. L.; Botta, A.; Wiesner, M. R.; Bottero, J. Y. Interactions between maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physico-chemical and toxicological study. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 4367−4373.
(10) Guzman, K. A. D.; Taylor, M. R.; Banfield, J. F. Environmental risks of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 1401−1407.
(11) Sobek, J. M.; Talburt, D. E. Effects of the rare earth Cerium on Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **1968**, *1*, 47−51.
(12) Limbach, L. K.; Li, Y. C.; Grass, R. N.; Brunner, T. J.; Hintermann, M. A.; Muller, M.; Gunther, D.; Stark, W. J. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9370−9376.
(13) Brunner, T. J.; Wick, P.; Manser, P.; Spohn, P.; Grass, R. N.; Limbach, L. K.; Bruinink, A.; Stark, W. J. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to Asbestos, Silica and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, Web release Mar 11, 2006.
(14) Schubert, D.; Dargusch, R.; Raitano, J.; Chan, S. W. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 86−91.
(15) Tarnuzzer, R. W.; Colon, J.; Patil, S.; Seal, S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from dadiation-induced cellular damage. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 12 2573−2577.
(16) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989; Vol. 3, p A2.2.
(17) Rezwan, K.; Meier, L. P.; Rezwan, M.; Voros, J.; Textor, M.; Gauckler, L. J. Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al2O3 particles: A new model based on zeta potential and UV vis measurements. *Langmuir* **2004**, *20*, 10055−10061.
(18) Nabavi, M.; Spalla, O.; Cabane, B. Surface chemistry of nanometric particles in aqueous dispersions *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *160*, 459−471.
(19) Chane-Ching, J. Y. European Patent EP208580 1987.
(20) Michalowicz, A. In *Logiciels pour la Chimie*; Societe Française de Chimie: Paris, 1991; p 102.
(21) O'May, G. A.; Reynolds, N.; Macfarlane, G. T. Effect of pH on an In Vitro Model of Gastric Microbiota in Enteral Nutrition Patients. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4777−4738.
(22) Lyklema J. *Fundamentals of interface and colloidal science*; Academic Press: 1995; Vol. 2.
(23) Bianconi, A.; Marcelli, A.; Dexpert, H.; Karnatak, R.; Kotani, A.; Jo, T.; Petiau, J. Specific intermediate-valence state of insulationg 4*f* compounds detected by L_3 x-ray absorption. *J. Phys. Rev. B* **1987**, *35*, 806−812.
(24) Nachimuthu, P.; Shih, W.-C.; Liu, R.-S.; Jang, L.-Y.; Chen, J.-M. The study of nanocrystalline cerium oxide by X-Ray absorption spectroscopy. *J. Solid State Chem.* **2000**, *149*, 408−413.
(25) Zhang, F.; Wang, P.; Koberstein, J.; Khalid, S.; Chan, S.-W. Cerium oxidation state in ceria nanoparticles studied with X-ray photoelectron spectroscopy and absorption near edge spectroscopy. *Surf. Sci.* **2004**, *563* 74−82.
(26) Soldatov, A. V.; Ivanchenko, T. S.; Della Longa, S.; Kotani, A.; Iwamoto, Y.; Bianconi, A. Crystal-structure effects in the Ce L_3-edge x-ray absorption spectrum of CeO_2: Multiple-scattering resonances and many-body final states. *Phys. Rev. B* **1994**, *50*, 5074−5080.
(27) Shahin, A. M.; Grandjean, F.; Long, G. J.; Schuman, T. P. Cerium L_3-edge XAS investigation of the structure of crystalline and amorphous cerium oxides. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 315−321.
(28) Kiwi, J.; Nadtochenko, V. Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO2 interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir* **2005**, *21*, 4631−4641.
(29) Chatellier, X.; Bottero, J. Y.; Le Petit, J. Adsorption of a cationic polyelectrolyte on *Escherichia coli* bacteria: 1. adsorption of the polymer. *Langmuir* **2001**, *17*, 2782−2790.
(30) Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 897−900.
(31) Amro, N. A.; Kotra, L. P.; Wadu-Mesthrige, K.; Bulychev, A.; Mobashery, S.; Liu G. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir* **2000**, *16*, 2789−2796.
(32) Snyder, S.; Kim, D.; McIntosh, T. J. Lipopolysaccharide bilayer structure: effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10758−10767.

Received for review April 26, 2006. Revised manuscript received July 6, 2006. Accepted July 21, 2006.

ES060999B

ANNEXE 4

Informations supplémentaires pour l'article :
DNA damage generated by surface redox processes occuring at the surface of CeO_2 nanoparticles

Material and methods

Normal human fibroblast culture.

Normal human fibroblasts were isolated by the outgrowth method using infant foreskin obtained after circumcisions. Dermis was cut into small pieces of 0.5-1 mm^3 under sterile conditions. The small tissue pieces were seeded in culture dishes and incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-Glutamine, 1mM sodium pyruvate, 10 μg/mL gentamicin. Fibroblasts were then cultured in complete DMEM without antibiotic at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere.

Transmission Electron Microscopy analysis.

After incubating with 0.6 g/L of nano-CeO_2, fibroblasts were washed two times in PBS and then fixed with 4% of glutaraldehyde (in PBS) for 1h at 4°C. Cells are then dehydrated in successive alcohol baths and embedded in Araldite resin. Ultrathin sections of 50 nm were examined with a JEOL/JEM-1220 apparatus.

Toxicity assessment.

◦ *Cytotoxicity*. WST-1 was performed to evaluate the effects of nano-CeO_2 on normal human fibroblasts viability and to assess a decrease in the metabolically active cells (Kikkawa *et al*. 2005). The principle is based on cleavage of the tetrazolium salt WST-1 by mitochondrial dehydrogenases in viable cells to form a yellow formazan dye. A lower absorbance is therefore interpreted as a decrease in cell viability. After incubation with nano-CeO_2 concentration ranging from 6×10^{-6} to 1 g/L during 2-, 4-, 6-, 24- and 48h, a 30-min treatment with the tetrazolium salt WST-1 was performed and the absorbance was measured at 450 nm using a microtiter plate reader (Multiskan RC, Labsystems).

◦ *Genotoxicity test*.

The comet assay (single cell gel electrophoresis) detects DNA single strand breaks, alkaline labile sites and excision repair processes in individual cells. It was performed under alkaline conditions according to a procedure describe in detail elsewhere (Singh *et al*. 1988) with slight modifications (Jean *et al*. **2000**). The assay was carried out under yellow light to prevent any additional damage induced by natural light. Following nano-CeO_2 treatments with concentration ranging from 6×10^{-6} to 1 g/L during 2h, fibroblasts were resuspended in a solution of 0.5 % low melting point agarose (LMP) in PBS (phosphate buffer saline) at 37°C. The cell suspension was placed on microscope slides previously coated with two agarose layers. Solidified slides were immersed in a cold lysis solution during 90 min at 4°C. Slides were then placed in an electrophoresis tank and DNA was allowed to unwind in freshly prepared alkaline electrophoresis buffer (pH > 13) for 20 min at room temperature. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA. The slides were then neutralized and stained with ethidium bromide to visualize and analyze DNA damage, using a fluorescence microscope (250X). Image analysis was performed using the Fenestra Komet software (Kinetics Imaging 5.5, Liverpool, UK) on 100 randomly selected cells from duplicate slides. DNA damage was quantified by the increase of Olive Tail Moment (OTM). Non-linear regression analyses were performed with a χ^2-function model. The calculated degree of freedom (n) of the function, also named OTMχ^2, has been previously shown to be a quantitative parameter of the level of DNA damage in samples (De Méo *et al*. **1991**).

The cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) assay was applied to evaluate chromosome damage. The CBMN assay can be considered as a multi-endpoint test for genotoxic responses to clastogens/aneugens. Indeed, micronuclei (MN) contain either acentric chromosomal fragments, or lagged chromosomes that have failed to segregate into a daughter macronucleus during mitosis. Fibroblasts were seeded in four-well chamber slides™ (Lab-Tek®, Nalge Nunc International, Rochester, NY) at 10^4 cells/well and cultured for 24 h prior to nano-CeO_2 treatment. Two wells per treatment were used as recommended (Kirsch-Volders *et al*. 2003). The cells were then treated for 48 hours with 4 different concentration of nano-CeO_2 ranging from 6×10^{-6} to 6×10^{-2} g/L and with the positive clastogens mytomicine C (10μg/l). At 48h of culture, Cytochalasin-B (2μg/ml; Sigma) was added in each well to block the cytokinesis. Indeed, MN are ideally scored in binucleated cells, that is cells that have completed nuclear division (Albertini *et al*. 2000; Kirsch-Volders *et al*. 2006). At the end of the treatment, the nano-CeO_2 were removed, the cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and the cultures were allowed to recover for 4 h in fresh growth medium containing 10% FCS and Cytochalasin-B and then, for 2 additional hours in the same medium without cytochalasin-B. For DAPI/phalloidin staining, cells were rinsed twice with PBS, and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. The cells were rinsed twice with PBS and the cells were permeabilized with 0.5% triton X-100 for 5 min. Once more, cells were rinsed twice with PBS. The staining of cells with phalloidin-TRITC (60 μg/l; Sigma) for 30 min and with DAPI (0.5 mg/l; ICN, Orsay, France) for 10 min was followed by two washes with PBS. The slides were then mounted with antifade Hardset (Vestashield) and the slides were examined with an Olympus BX-60 epifluorescence microscope. For each well, 1000 cells were evaluated (2 wells per treatment and 3 independent experiments). The different types of cells were identified, that is, mononucleated, mitotic, multinucleated, and apoptotic cells. Micronuclei were identified in binucleated cells according to the criteria described by Fenech (2007) (Fenech 2007). Statistical differences between controls and treated samples were performed by the contingency 2x2 chi-square test. P values < 0.05 indicated that differences were significant.

References

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.

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

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* **2**, 1084-1104.

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.

Kikkawa, R., Yamamoto, T., Fukushima, T., Yamada, H., and Horii, I. (2005). Investigation of a hepatotoxicity screening in prilary cells cultures – What biomarkers would need to be addressed to estimate toxicity in conventional and new approaches? *J. Toxicol. Sci.* **30**, 61-72.

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.

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.