



HAL
open science

Ecoconception de nouveaux agents biocides à base de nanoparticules d'argent à enrobage bio-inspiré

Marianne Marchioni

► **To cite this version:**

Marianne Marchioni. Ecoconception de nouveaux agents biocides à base de nanoparticules d'argent à enrobage bio-inspiré. Ecotoxicologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV046 . tel-02065300

HAL Id: tel-02065300

<https://theses.hal.science/tel-02065300v1>

Submitted on 12 Mar 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Chimie - Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Marianne MARCHIONI

Thèse dirigée par **Isabelle MICHAUD-SORET, DR, CNRS**, et
co-encadrée par **Aurélien DENIAUD, MCU, Université Grenoble-
Alpes**

Préparée au sein du **Laboratoire de chimie et biologie des
métaux**

Dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant 218**

Ecoconception de nouveaux agents biocides à base de nanoparticules d'argent à enrobages bio-inspirés

Thèse soutenue publiquement le **15 octobre 2018**,
devant le jury composé de :

Dr Florence GAZEAU

DR CNRS, Paris, Rapporteur

Dr Lydie PLOUX

CR CNRS, Mulhouse, Rapporteur

Dr Clément LEVARD

CR CNRS, Aix-en-Provence, Membre

Pr Franz BRUCKERT

PU UGA, Grenoble, Président

Dr Isabelle MICHAUD-SORET

DR CNRS, Grenoble, Directeur

Dr Aurélien DENIAUD

MCU UGA, Grenoble, Encadrant, Invité



« *...Si c'était si facile, tout le monde le ferait...* »

Aurélien Cotentin, Artiste contemporain

« I never lose. I either win or learn. »

Nelson Mandela, 1^{er} président de l’Afrique du Sud

ou dit plus trivialement :

“The greatest teacher, Failure is.”

Master Yoda, Maître Jedi

Résumé

Le recul sur les nano-objets et en particulier leur innocuité n'est toujours pas suffisant et les études sur leur transformation et leur impact in vivo sont sujet à d'intenses recherches. En effet, le devenir dans l'organisme des macro et micro matériaux étudiés classiquement n'est pas le même que celles des nanomatériaux. C'est pourquoi le développement de produits implantatoires qui se retrouvent donc en contact direct avec l'organisme, et qui contiennent des nanoparticules d'argent, utilisées pour leur activité biocide, doit prendre en compte les risques associés, ce qui peut se faire par une approche Safer-by-design.

Une des composantes principales du développement Safer-by-design est la fonctionnalisation des nano-objets. L'affinité des thiolates pour l'ion Ag^+ est très forte, cependant, il est connu que les molécules thiolées conduisent à différents comportements allant de la dissolution de la nanoparticule d'argent en ions Ag(I) à la simple passivation de la surface de la nanoparticule ce qui peut entraîner la perte de son activité biocide. Ainsi, ce projet avait pour objectif principal de poser les bases conceptuelles d'un agent biocide safer-by-design constitué de nanoparticules d'argent et de molécules thiolées en se positionnant à l'interface de plusieurs disciplines.

Pour ce faire, ce manuscrit de thèse s'articulera de la sorte : les 5 premiers chapitres présente l'état de l'art concernant les nanoparticules d'argent, leur activité biocide, leur toxicité et leurs transformation ainsi qu'une ouverture aux concepts développés par l'approche Safer-by-design. Une étude sur la réactivité de diverse molécules biologiques ou bio-inspirés thiolées avec les nanoparticules d'argent est présentée dans le chapitre 6. Nous y placerons les bases d'une réflexion sur la dissolution des nanoparticules d'argent par des biomolécules. Cette études ayant été menées à terme et publiée dans le temps impartie à mes travaux de doctorat, les résultats sont présentés sous la forme de la publication *Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by biorelevant molecules*, publié dans le journal *Environmental Science : Nano*. Le projet principal de ce doctorat, le développement de la preuve de concept d'un nouvel agent biocide composé de nanoparticules d'argent pontées entres elles par un ligand thiolé est développé dans le chapitre 7. Dans le dernier chapitre, un criblage sur des polyéthylènes glycols possédant deux à huit thiols et des longueurs de polymères variables a été mené. Ainsi nous avons voulu rationaliser les différences de comportement des nanoparticules d'argent en présence des molécules thiolées.

Remerciement

Mes remerciement s'adressent en premier lieu aux membres du jury, Dr Florence Gazeau, au Dr Lydie Ploux, au Dr Franz Bruckert et au Dr Clément Levard d'avoir accepté d'évaluer mon travail, et d'apporter leurs contributions à son achèvement.

Mes remerciements vont ensuite au Dr Isabelle Michaud-Soret, Directeur de ces travaux de doctorat, pour m'avoir fait confiance il y a trois ans et de m'avoir confié ces travaux aux cours desquels j'ai pu apprendre beaucoup, tant scientifiquement que sur moi-même.

J'aimerais ensuite remercier le Dr Aurélien Deniaud pour son encadrement et son aide qui ont été au delà de l'aspect scientifique ainsi que pour le temps conséquent qu'il m'a accordé. Nos discussions m'ont beaucoup appris, d'autant plus que nos points de vu, lorsqu'il ne s'agit pas des sciences, sont quasi systématiquement divergeant. Pour ta patience, merci.

A Grenoble, l'école doctorale met en place ce que l'on appelle des comités de suivi de thèse. Certains chercheur, Dr Pascale Delangle, Dr Geraldine Saret, Dr Laurence Motte et Dr Christophe Merlin y ont participés, et pour cela également je les remercies.

Il m'apparaît enfin comme une évidence de remercier les personne avec qui j'ai été amenée à travailler.

Au Dr Pascale Delangle qui nous a procuré les ligands utilisés dans mes différents travaux, merci pour ta présence et l'apport d'une vision de chimiste dans ce projet se situant à l'interface des disciplines mais menés par des biologistes. Au Dr Isabelle Worms, présente dans l'équipe à mon arrivée, tes explications ont été précieuses et j'ai gardé en tête à la suite de ton départ un grand nombre de tes remarques et conseils. Au Dr Mireille Chevalet, merci pour ta contribution à mes travaux sur le versant de l'imagerie et la gentillesse dont tu as fait preuve à mon égard lorsque nous partagions le même bureau. Au Dr Pierre-Henri Jouneau, collaborateur de l'autre côté du centre de recherche, merci pour les images de microscopie et pour les discussions montagne. Au Dr Jerome Laisney, dont le post-doctorat a été pour moi comme une bouée de sauvetage dans ce labo rempli de biologiste. Pour finir au Dr Giulia Veronesi. Ton investissement dans mes travaux n'a eu d'égale que le plaisir que j'ai eu à travailler avec toi, d'autant plus qu'au départ, je n'y comprenais vraiment rien.

La poursuite du doctorat représente un travail qui s'inscrit sur trois ans, non négligeables à l'échelle de mes 28 ans (10 % de ma vie totale, 15 % de mes souvenirs)

et constitue de par l'investissement et l'abnégation que cela demande, le fil d'Ariane d'une tranche de vie de son auteur. Cela prend place au crépuscule de la douce innocence étudiante et s'éteint à l'aube des obligations qu'impose la maturité. De nombreuses personnes se retrouvent ainsi sans l'avoir voulu ni s'en rendre compte, entre l'impétrant et son labeur. Ce sont quelques de ces personnes que j'aimerais mettre en avant à présent.

Ma famille en premier, mes parents, pour le courage que cela a demandé d'assumer un rejeton de mon acabit. Mon frère, absent aujourd'hui mais les 5932 kilomètres qui nous séparent ne peuvent pas se parcourir en un simple claquement de doigt. Ma sœur, bonne chance avec Grenoble, une simple étape vers un objectif plus grand.

Aux personnes que j'ai rencontré dans cette ville, malgré le désamour que nous sommes portés elle et moi, j'y ai fait des rencontres. Au labo, Amel, Xavier, Johanna, Serge, Jerome et Micheline et tous les jeunes du bâtiment K' avec qui j'ai eu moins l'occasion d'échanger, ce sont les interactions humaines qui rendent le travail agréable et amusant. Et en cela je peux dire que ça a été amusant! Nathan tu n'es pas là, alors je ne dirais rien. Aux un tout petit peu moins jeunes, Peggy et Carole, je ne donnerais pas votre petit surnom aujourd'hui, mais vous avez su rester jeune, Mohammed, merci pour la piscine, Patrice la force tranquille, Giulia, pour tout, Mathieu pour nos interactions surprenantes et Vincent dont je garde en tête certains de tes conseils conseil.

La vie d'un doctorant existe à l'extérieur de son laboratoire bien que le temps qu'on y passe pousse à une certaine fusion de nos vies professionnelles et personnelles. J'ai cependant rencontré Thomas que nous ajouterons à la liste de mes amis alopéciques, Gibert et Mélodie, dont mes interactions avec eux auront d'avantage été faite de discussions passionnantes ou fatigantes, probablement pour les autres, au choix.

Enfin, aux non Français, aux Alsaciens, Florian Loïc et Lucile, dans l'ordre alphabétique, chacun à votre délicate et subtile manière vous m'avez fait comprendre que la vie est faite de choix. Vous avez été présents au cours de tout ceux que j'ai fait dans ma vie de, disons, femme. J'ai cherché dans le dictionnaire une définition qui vous caractériserait et je n'en ai pas trouvé d'assez exacte donc je dois innover, ça tombe bien c'est mon boulot, je dirais donc que vous êtes ma bande de glups.

Pour finir, comme la vie est faite de choix, voilà le meilleur que j'ai pu faire. A travers les âges, des ménestrels et des paroliers bien plus doués et sensibles que moi ont illustré de par leurs mots choisis et réfléchis, ce que j'éprouve à ton égard. De fait, je ne m'essayerais pas à cet exercice mais je vais emprunter aux plus grands avant de conclure. Qu'on le donne à d'autre le paradis, je n'en voudrais pas, car nous n'avons

rien de ces magnifiques qui se répandent en sanglot, ce que l'on fait c'est que l'on insiste, car on sait que ça existe.

Table des Matières

Résumé	vii
Remerciement	ix
Table des Matières	xvi
Liste des Figures	xxii
Liste des Tableaux	xxiii
Liste des Abréviations	xxv
1 Nanomatériaux	1
1.1 Définitions	2
1.1.1 Nanoparticules	3
1.1.2 Nanotechnologie et Nanomatériaux	4
1.2 Part de marché	5
2 Les nanoparticules d'argent	7
2.1 Usage de l'argent et des nanoparticules d'argent	8
2.1.1 L'élément Argent	8
2.1.2 L'argent : utilisation	8
2.1.3 Utilisation des nanoparticules d'argent dans les produits de consommation courante	10
2.1.4 Utilisation des nanoparticules d'argent : produits pharmaceu- tiques	13
2.1.5 Future / Perspectives d'avenir	15
2.1.6 Architecture	17
2.1.7 Complémentarité des méthodes de caractérisation	19
2.1.8 Synthèse et production	20
2.1.9 Top-down	23
3 Action biocide de l'argent	25
3.1 Action sur la membrane bactérienne	26
3.2 Action sur les protéines	28
3.3 Action sur l'ADN	29
3.4 Formation de ROS	29

3.5	Mise en place de mécanismes de résistance à l'argent et aux nanoparticules d'argent	30
4	Transformations des nanoparticules d'argent	33
4.1	Transformations selon l'environnement	34
4.1.1	Dissolution oxydative	34
4.1.2	Réactivité avec les molécules thiolées	35
4.1.3	Réactivité avec les chlorures	35
4.2	Toxicité humaine et animale	36
4.2.1	Assimilation et transformation par l'organisme	36
4.2.2	Administration par voie orale	36
4.2.3	Clairance	39
4.2.4	Formation de la corona protéique dans les fluides biologiques	40
4.3	Mécanisme de toxicité	41
4.3.1	Généralités sur la toxicologie des nanoparticules d'argent chez les mammifères	41
4.3.2	Homéostasie des métaux chez les eucaryotes	41
4.3.3	Impact de l'argent sur l'homéostasie des métaux	45
4.3.4	Entrée des nanoparticules d'argent dans la cellule	46
4.3.5	Dissolution endosomale	47
4.3.6	La spéciation de l'argent intracellulaire	48
5	Safer-by-design et objectif des travaux	51
5.1	Maîtrise du risque	52
5.2	Nanomatériaux Safer-by-design : définition	53
5.3	Les leviers d'action dits « Safer-by-design »	53
5.3.1	Limites des principes « Safer-by-design » appliqués aux nanoparticules	54
5.4	Objectif de ces travaux de thèse	55
6	Etude de la dissolution des nanoparticules d'argent par des biomolécules thiolées	59
6.1	Introduction aux travaux de dissolution	60
6.1.1	Présentation des ligands linéaires	61
6.1.2	Présentation des molécules pré-organisées	62
6.1.3	Méthodologie	63
	<i>Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by biorelevant molecules</i>	64
7	Preuve de concept : les assemblages de nanoparticules d'argent	75
7.1	Observations préliminaires et sérendipité	76
7.1.1	Description principale	76
7.1.2	Cinétique de réaction	81
7.1.3	Stabilisation des édifices	87

7.1.4	Comparaison avec un phénomène connu	88
7.1.5	Conclusion	91
7.2	Production des échantillons	92
7.2.1	Réaction d'assemblage & purification	92
7.2.2	Caractérisation des assemblages de nanoparticules d'argent de 40, 60 et 200 nm	92
7.3	Description architecturale : physico-chimie des assemblages	101
7.3.1	Potentiel zêta	101
7.3.2	Caractérisation des liaisons stabilisant l'assemblage par XPS	102
7.3.3	Analyse des assemblages par XANES au seuil du soufre	109
7.3.4	Analyse de l'extrême surface par ToF-SIMS	112
7.3.5	Quantification du soufre engagé dans les assemblages de nano- particules d'argent	114
7.4	Activité biologique	118
7.4.1	Caractérisation et stabilité dans les milieux biologiques	118
7.4.2	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différents nano-objets	125
7.4.3	Origine de la différence d'activité bactéricide entre les nano- particules d'argent et les assemblages	126
7.4.4	Toxicité sur cellules eucaryotes	126
7.4.5	Origine de la différence de toxicité entre les nanoparticules d'argent et les assemblages de nanoparticules	128
7.4.6	Conclusion sur la toxicité eucaryote des assemblages des nano- particules	139
7.5	Nanoparticules d'argent isolées enrobées de L1	140
7.6	Déclinaison autour du même squelette organique	143
7.7	Conclusion	146
8	Des PEG-polythiols pour des assemblages plus versatiles	147
8.1	Déclinaison du projet	148
8.1.1	L'utilisation des Poly Ethylène Glycol (PEGs) dans l'industrie	148
8.2	PEGs utilisés pour l'étude	149
8.2.1	Les ligands qui entraînent une dissolution simple des nano- particules d'argent	150
8.2.2	Les ligands qui forment un enrobage autour des nanoparti- cules d'argent	152
8.2.3	Les ligands qui forment des assemblages entre les nanoparticules	153
8.2.4	Les ligands qui entraînent la formation d'assemblages et une dissolution	159
8.3	Conclusion	162
9	Conclusion	163

10 Matériels et méthodes	167
10.1 Production des nanoparticules d'argent et des assemblages de nanoparticules d'argent	168
10.1.1 Production des nanoparticules d'argent	168
10.1.2 Production des assemblages de nanoparticules d'argent	168
10.2 Production de protéine	170
10.2.1 Production de la protéine ATX1	170
10.3 Analyse de la taille, forme et homogénéité	171
10.3.1 Diffusion dynamique de la lumière : DLS	171
10.3.2 Nanoparticles Tracking Analysis : NTA	174
10.3.3 Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF4)	175
10.3.4 Microscopie électronique	177
10.4 Analyse élémentaire	178
10.4.1 Spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X : EDX	178
10.4.2 Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP)	179
10.5 Analyse de la surface	182
10.5.1 XPS	182
10.5.2 ToF-SIMS	182
10.5.3 Potentiel zêta	183
10.6 Analyse Mixte	184
10.6.1 Signal SPR	184
10.7 Approches synchrotron	185
10.7.1 X-ray Absorption Near Edge Structure	185
10.7.2 L'imagerie de fluorescence des rayons X (XRF)	186
10.8 Analyse de la toxicité des nanoparticules d'argent et assemblages de nanoparticules d'argent	187
10.8.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice de croissance (CMI)	187
10.8.2 Mesure de la viabilité cellulaire	187
10.8.3 Mesure de l'entrée d'argent dans les cellules HepG2	188
10.8.4 Préparation des échantillons pour les analyses XRF	188
10.8.5 Analyse de la corona protéique	188
10.8.6 Stabilité des assemblages de nanoparticules d'argent dans différents milieux	189
A Revue publiée au cours de la thèse : Silver nanoparticle fate in mammals : Bridging <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies	191

Listes des figures

1.1	Nanoparticules d'or de différentes formes.	4
1.2	Evolution du nombre de produits contenant des nanomatériaux répertoriés au niveau mondial entre 2005 et 2014	5
1.3	Application et production des nanoparticules d'argent. (A) : Distribution des classes de produits contenant des nanoparticules d'argent (Lem et al., 2012). (B) : Production de produits contenant des nanoparticules d'argent à travers le monde (enquête menée par le <i>Woodrow Wilson Institute</i>	6
2.1	Maille élémentaire de l'argent.	18
2.2	Représentation des différentes facettes des nanoparticules d'argent et de l'empilement des atomes d'argent dans celles-ci.	18
2.3	Molécule d'acide citrique.	19
2.4	Bloc élémentaire de polyvinyle pyrrolidone.	19
2.5	Différents types d'enrobage de nanoparticules d'argent	19
2.6	Illustration du concept des méthodes Bottom-up et Top down.	20
2.7	Mécanisme de la synthèse de nanoparticules d'argent par réduction des sels d'argent stabilisés par des ions citrate	21
2.8	Déprotonation d'un polyphénol dans un processus de production d'Ag(0). 22	
2.9	Production par photolyse de nanoparticules d'argent de différentes formes en fonction de la longueur d'onde utilisée.	23
3.1	Différences dans la composition et la structure des membranes et de la paroi des bactéries	27
3.2	<i>S.typhimurium</i> exposé à des nanoparticules d'argent	28
3.3	Représentation de la structure de différents acides aminés liant l'Ag(I) par leur chaîne latérale	29
3.4	Réaction de dismutation de l'oxygène par les enzymes SOD et catalase. 29	
3.5	Protéines responsables de la résistance bactérienne à l'argent	31
4.1	Résumé des transformations que subissent les nanoparticules d'argent dans l'environnement	36
4.2	Représentation schématique des transformations des nanoparticules d'argent lors de leur passage à travers le tractus digestif	37
4.3	Suivi de la concentration en argent dans le sang par ICP-MS au cours du temps en fonction de la voie d'administration	39

4.4	Homéostasie du cuivre dans une cellule eucaryote	44
4.5	Homéostasie du zinc dans une cellule eucaryote	44
4.6	Représentation schématique de l'internalisation par une cellule eucaryote et de la dissolution endosomale des nanoparticules d'argent par acidification	48
5.1	Diagramme des risques	52
5.2	Exemple de fonctionnalisation de la surface d'une nanoparticule d'argent par des molécules thiolés	54
6.1	Structure du glutathion	61
6.2	Représentation de la structure des phytochelatines, où n varie de 2 à 11 répétitions	62
6.3	Structure de la protéine ATX1. En violet : Ag(I)	62
6.4	Représentation schématique du mime chimique de ATX1 : P ²	63
7.1	Formule chimique du ligand L1	76
7.2	Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1, 1 : 1 (S : Ag)	77
7.3	Suivi par DLS de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 1 : 1 (S : Ag)	77
7.4	Modification de la couleur de la suspension de nanoparticules d'argent au cours du temps après ajout du ligand L1.	78
7.5	Quantification par ICP-AES de l'argent dissous et de l'argent sous forme nanoparticulaire au cours d'une incubation avec L1 1 : 1 (S : Ag)	78
7.6	Suivi du signal de l'argent par ICP-MS après fractionnement par AF4 d'un échantillon de nanoparticules en présence de L1 au cours du temps	79
7.7	Suivi par cryomicroscopie électronique à transmission de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1, 1 : 1 (S : Ag)	80
7.8	Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,25 : 1 (S : Ag)	83
7.9	Suivi par DLS de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,25 : 1 (S : Ag)	84
7.10	Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,05 : 1 (S : Ag)	85
7.11	Suivi par DLS de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,05 : 1 (S : Ag)	86
7.12	Photographie d'un échantillon	87
7.13	Réaction de neutralisation des thiols libres par l'iodoacétamide	87
7.14	Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,25 : 1 (S : Ag) au cours du temps en présence ou en absence d'iodoacétamide ajouté après 1 heure d'incubation	88

7.15	Formule chimique du glutathion oxydé	89
7.16	Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le glutathion oxydé	89
7.17	Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le glutathion oxydé	90
7.18	Analyse par spectroscopie UV-Visible d'un échantillon de nanoparticules d'argent incubé avec du glutathion oxydé avant et après l'ajout de NaOH	90
7.19	Résumé du suivi de la réaction d'assemblage des nanoparticules d'argent avec L1	91
7.20	Distribution de taille en intensité mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent	93
7.21	Signal SPR des assemblages de nanoparticules d'argent	94
7.22	Image de MET des assemblages	95
7.23	Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 40 nm déterminée par NTA	96
7.24	Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 40 nm déterminée par MET.	97
7.25	Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 60 nm déterminée par NTA	97
7.26	Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 60 nm déterminée par MET.	98
7.27	Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 200 nm déterminée par NTA	99
7.28	Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 200 nm déterminée par MET.	100
7.29	Superposition des distributions de taille obtenues par NTA des populations présentes dans les assemblages	100
7.30	Mesure du potentiel zêta	101
7.31	Spectre de l'assemblage de 80 nm : modélisation expérimentale et courbe gaussienne spécifique des différentes fonctions	103
7.32	Formule de l'acide tannique et ses 60 carbones aromatiques	103
7.33	Déconvolution en courbes gaussiennes des signaux XPS suite à l'excitation d'un électron de coeur S2p	104
7.34	Modélisation de la liaison entre un thiol (S-CH ₃) et une facette (111) d'argent	105
7.35	Représentation schématique de la liaison entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1.	106
7.36	Représentation schématique de la liaison entre le ligand L1 et l'iodoacétamide.	107
7.37	Représentation schématique de la liaison entre deux ligands L1.	107
7.38	Déconvolution en courbes gaussiennes du signal XPS Ag3d	108

7.39	Comparaison de spectres XANES (au seuil K du soufre) d'un échantillon de glutathion réduit selon la préparation de l'échantillon	110
7.40	Traitement des signaux du XANES au seuil du soufre	111
7.41	Cartographie élémentaire de l'argent sur des nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate déposées sur un wafer de silicium.	112
7.42	Analyse par ToF-SIMS pour des m/z entre 100 et 200 en mode positif	113
7.43	Analyse par ToF-SIMS pour des m/z entre 300 et 500 en mode positif	113
7.44	Analyse par ToF-SIMS en mode négatif	114
7.45	comparaison entre l'intensité du signal avant et après la réaction du DTNB avec L1	115
7.46	Evolution de la taille mesurée par DLS de nanoparticules d'argent enrobées de citrate au cours du temps dans différents milieux	119
7.47	Propriétés optiques des nanoparticules d'argent de 20 nm de diamètre dans différents milieux	119
7.48	Evolution de la taille mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent de 40 nm au cours du temps dans différents milieux	120
7.49	Propriétés optiques des assemblages de 40 nm de diamètre dans différents milieux	121
7.50	Evolution de la taille mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent de 60 nm au cours du temps dans différents milieux	122
7.51	Propriétés optiques des assemblages de 60 nm de diamètre dans différents milieux	122
7.52	Evolution de la taille mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm au cours du temps dans différent milieu	123
7.53	Propriétés optiques des assemblages de 200 nm de diamètre dans différents milieux	124
7.54	Cytotoxicité nanoparticules d'argent et des assemblages sur des cellules HepG2.	127
7.55	Comparaison de la cytotoxicité sur cellules HepG2, des nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate et des assemblages	128
7.56	Quantification de l'argent absorbé par les cellules suite à une exposition aux nanoparticules d'argent ou aux assemblages de nanoparticules d'argent.	129
7.57	Observation par XRF du devenir des nanoparticules d'argent dans les cellules HepG2	130
7.58	Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm dans les cellules HepG2	131
7.59	Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm dans les cellules HepG2	131
7.60	Observation par XRF du devenir des nanoparticules d'argent dans les cellules HepG2 à haute résolution	132

7.61	Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm dans les cellules HepG2 à haute résolution.	133
7.62	Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm dans les cellules HepG2 à haute résolution.	134
7.63	Quantification de la réponse du test BCA à une concentration croissante d'AgNO ₃ : détermination de la limite des faux positifs.	135
7.64	Analyse qualitative des protéines de la corona des nanoparticules d'argent	136
7.65	Suspension de (A) : nanoparticules d'argent enrobées de PVP et (B) : des assemblages de 60 nm après lavage dans le tampon Hepes-citrate .	137
7.66	Analyse par Gel SDS-PAGE des protéines de la corona des nanoparticules d'argent enrobées de PVP et des assemblages de nanoparticules d'argent	137
7.67	Evolution de la quantité de protéines dans la corona des nanoparticules d'argent enrobées de citrate en fonction de la quantité d'argent. .	138
7.68	Comparaison de la quantité de protéines engagées dans la formation de la corona protéique des différents nano-objets pour une quantité de 5 µg d'argent.	139
7.69	Caractérisation des nanoparticules d'argent enrobées de L1	140
7.70	Evolution de la taille mesurée par DLS des nanoparticules d'argent enrobées de L1 au cours du temps dans différent milieux	141
7.71	Signal SPR des assemblages de nanoparticules d'argent enrobées de L1	142
7.72	Re-suspension des nanoparticules enrobées de L1 dans le tampon Hepes-citrate après incubation dans le milieu MEM + 10 % SVF	142
7.73	Formule du ligand L2	143
7.74	Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L2 à un rapport 0,25 : 1 (S : Ag) par spectroscopie UV-Visible	144
7.75	Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L2 à un rapport 0,1 : 1 (S : Ag) par spectroscopie UV-Visible	144
7.76	Suivi du signal SPR d'un échantillon d'assemblage de nanoparticules d'argent pontées par L2 après une semaine de stockage	145
8.1	Structure d'un polymère PEG contenant deux thiols.	149
8.2	Structure d'un polymère PEG contenant quatre thiols.	149
8.3	Structure d'un polymère PEG contenant huit thiols.	150
8.4	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S2K au cours du temps	151
8.5	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S2K et de l'iodoacétamide	152
8.6	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S2K au cours du temps	153

8.7	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S300 au cours du temps	154
8.8	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S300 à un ratio 0,1 : 1 (S : Ag) au cours du temps	155
8.9	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S10K au cours du temps	156
8.10	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 8S10K au cours du temps	157
8.11	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 8S10K et de l'iodoacétamide	158
8.12	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S10K au cours du temps	160
8.13	Image de MET des nanoparticules d'argent après 1 heure d'incubation avec le ligand 4S10K	161
8.14	Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S10K	161
10.1	Image de MET de nanoparticules d'argent enrobées de citrate de 20 nm de diamètre synthétisées au laboratoire	168
10.2	Photo de la séparation des assemblages de nanoparticule d'argent après centrifugation	169
10.3	Représentation schématique des différents rayons d'une particule où R_{Vol} représente le rayon de l'objet, R_h représente le rayon hydrodynamique de l'objet et de son enrobage et R_{Rot} représente le rayon giratoire	172
10.4	Distribution de taille obtenue en DLS obtenue par mesure DLS	172
10.5	Représentation graphique de résultats obtenus par DLS	173
10.6	Représentation graphique de population multimodale	174
10.7	Schéma du processus de séparation par AF ₄	176
10.8	Représentation schématique d'un canal d'AF ₄	176
10.9	Schéma représentant la colonne d'un microscope électronique à transmission (MET) et d'un microscope électronique à balayage (MEB) . . .	178
10.10	Mesures répétées d'un échantillon contenant 20 μ g de soufre sous forme de GSH avec des ajouts dosés de soufre élémentaire.	181
10.11	Mesures répétées d'un échantillon contenant 40 μ g de soufre sous forme de GSH avec des ajouts dosés de soufre élémentaire	181

Listes des tableaux

1.1	Définition des nanoparticules et nanomatériaux selon les différents organismes officiels, nationaux et internationaux (Van Teunenbroek et al., 2017).	2
2.1	Répartition de la part de consommation de l'argent dans l'industrie mondiale en 2014.	9
2.2	Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits alimentaires de consommation courante ou en contact avec ceux-ci.	11
2.3	Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits d'hygiène quotidienne.	11
2.4	Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits électroniques quotidiens.	12
2.5	Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits électroménagers quotidiens.	12
2.6	Dispositifs médicaux actuellement sur le marché contenant des nanoparticules d'argent (Europe).	14
2.7	Possibles futures applications des nanoparticules d'argent dans le domaine chirurgical.	16
2.8	Futures possibles applications des nanoparticules d'argent dans le domaine médical.	17
7.1	Analyse semi-quantitative et attribution des atomes de soufre dans les échantillons d'assemblages de 40 et 80 nm	104
7.2	Analyse semi-quantitative et attribution des atomes d'argent dans les échantillons d'assemblages de 40 et 80 nm	109
7.3	Quantification du soufre et de l'argent dans les échantillons de nanoparticules enrobées de L1, d'assemblages de 40 nm, 60 nm et 200 nm	116
7.4	CMI des nanoparticules d'argent de différentes tailles et des assemblages de nanoparticules d'argent de différentes tailles sur <i>E.coli</i> .	125
8.1		162

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF4	Asymmetrical flow field-flow fractionation
Ag	Argent
AgCl	Chlorure d'argent
ARN	Acide Ribo Nucléique
ASTM	American Society of Testing and Material
ATP	Adénosine TriPhosphate
BauA	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
BE	Energie de liaison (Binding energy)
BSI	British Standards Institution
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Cu	Cuivre
Cys	Cystéine
DLS	Dynamic Light Scattering
<i>E. Coli</i>	Escherichia Coli
EDX	
cfc	Face cubique centrée
Fe	Fer
FWHM	Largeur à mi-hauteur du pic
G-	Gram negatif
G+	Gram positif
GSH	Glutathion
ICP-AES	Spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IgG	Immunoglobuline G
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
ISO	International Organization for Standardization
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MT	métallothionéines
MTF-1	Metal Transcription Factor 1
NIOSH	National Institute of Occupational Safety and Health
nm	Nanomètre
NP	Nanoparticules
NP-Ag	Nanoparticule d'argent
NM	Nanomatériaux
NTA	NanoTracking Analysis
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC	Phytochélatine
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SCCP	Scientific Committee on Consumer Product
SOD	Super Oxyde Dismutase
TiO ₂	Dioxyde de Titane
Tof-SIMS	L'analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de
UK	Royaume-Uni
USA	Etat-Unis d'Amérique
XAS	Spectroscopie des rayons X
XPS	Spectroscopie photoélectronique par rayon X
Zn	Zinc
2S300	Voir paragraphe 8.2 2s2k
Voir paragraphe 8.2 2s10k	Voir paragraphe 8.2 4s2k
Voir paragraphe 8.2 4s10k	Voir paragraphe 8.2 8s10k
Voir paragraphe 8.2	

Introduction

Chapitre 1

Nanomatériaux

1.1 Définitions

Le préfixe *nano* vient du mot grec nanos *νανος*, qui signifie « très petit ».

Une nanoparticule (NP) est un objet dont les trois dimensions ont une taille comprise entre 1 et 100 nm (Lem et al., 2012). Elle se trouve à l'interface des objets macroscopiques répondant aux lois de Newton et des atomes et molécules qui sont soumis aux lois quantiques. A titre d'échelle comparative, le diamètre moyen d'un cheveu humain est de 80 000 nm. Les nanotechnologies sont cependant encore en développement et les réglementations nationales et internationales n'ont pas encore statué sur des définitions standardisées. Chaque organisme national possède donc ses propres réglementations et définitions (**Tableau 1.1**). Ainsi, les nanoparticules sont parfois confondues dans les textes légaux avec les nanomatériaux (NM; dont une seule des dimensions est inférieure ou égale à 100 nm) ou même échappent à certaines contraintes réglementaires (*Rapport INERIS : Argent et nano-argent 2015*).

Tableau 1.1 – Définition des nanoparticules et nanomatériaux selon les différents organismes officiels, nationaux et internationaux (Van Teunenbroek et al., 2017).

Organisme	Nanoparticules	Nanomatériaux
ISO	Diamètre compris entre 1 et 100 nm	-
.....
ASTM	2 à 3 dimensions comprises entre 1 et 100 nm	-
.....
NIOSH	Diamètre compris entre 1 et 100 nm et/ou fibre avec dimensions comprises entre 1 et 100 nm	-
.....
SCCP	Au moins une dimension à l'échelle nanométrique	Au moins une dimension interne ou externe à l'échelle nanométrique
.....
BSI	Toutes les dimensions sont à l'échelle nanométrique	Au moins une dimension interne ou externe à l'échelle nanométrique
.....
BauA	Toutes les dimensions sont à l'échelle nanométrique	Constitué de nanoparticules ou de substance nanométrique

1.1.1 Nanoparticules

L'OCDE (L'Union Européenne, 2001) définit ces nanoparticules comme « *natural, randomly created or manufactured materials containing particles in a free state or an aggregate, wherein at least 50 % of the particles has one or more dimensions in the range 1-100 nm* » ce qui signifie qu'elles sont définies comme étant des matériaux naturels, fabriqués ou produits aléatoirement et contenant des particules dans un état libre ou agrégé, et dont au moins 50 % des particules possèdent au moins une dimension entre 1 et 100 nm. Ces nanoparticules peuvent donc être trouvées à l'état naturel, produites par l'environnement (dans la fumée des volcans ou les poussières du désert) ou anthropogénique (due à l'activité humaine, comme la pollution aux particules ultra-fines induites par le trafic routier ou la fumée des cigarettes).

Les nanoparticules peuvent être d'un large éventail de composition, aussi bien métallique qu'organique, ce qui permet de faire varier leurs propriétés en fonction de leurs utilisations. On retrouve ainsi d'une part des nanoparticules dites « solides » comprenant des nanoparticules composées d'éléments carbonés (nanotubes de carbone ou fullerènes), des nanoparticules d'oxydes de métaux comme le dioxyde de titane (TiO_2), utilisées dans les peintures, les cosmétiques ou bien qui sont trouvées dans l'industrie agroalimentaire comme colorant blanc (E171) (Weir et al., 2012), des nanoparticules métalliques (nanoparticules d'argent utilisées comme biocide) ou des quantum dots (de cadmium ou d'indium par exemple utilisés dans les écrans). Ces nanoparticules sont en général recouvertes d'un enrobage organique ou minéral. Il existe d'autre part des nanoparticules dites « molles » comme les liposomes ou les nano-vésicules, utilisées, par exemple, comme des vecteurs dans l'industrie pharmaceutique ou comme excipients dans l'industrie cosmétique (Berube et al., 2011).

Les nanoparticules ont différentes formes et tailles (**Figure 1.1**), ce qui permet une large modulation de leurs propriétés physico-chimiques : optique, électroconductrice, etc. Les nanoparticules métalliques présentent ainsi des propriétés bien différentes de celles de l'élément qui les constitue à l'état natif (propriétés optiques spécifiques, propriétés mécaniques, magnétisation ou température de fusion différente), ce qui justifie l'emploi de plus en plus fréquent de ces composés manufacturés dans la recherche et l'industrie.

Cette importante modularité est due à trois caractéristiques communes et liées : ce sont des objets (i) très mobiles (parfaitement illustré par leurs coefficients de diffusion) (Cai et al., 2011), (ii) possédant une surface spécifique très importante et (iii) présentant un effet quantique qui entraîne des effets de conduction et optique multiples et variables. La fraction d'atomes disponibles à la surface des nanoparticules capables d'interagir avec l'environnement extérieur est bien plus importante que dans les objets microscopiques ou macroscopiques. Pour exemple, dans une nanoparticule sphérique, le ratio entre le nombre d'atomes de surface et le nombre

d'atomes total est régie par l'équation suivante, où d est le diamètre de la nanoparticule, décrite dans le **paragraphe 7.1.2**.

$$\frac{\text{Atome de surface}}{\text{Atome total}} = 112,3.d^{\frac{2}{3}} \quad (1.1)$$

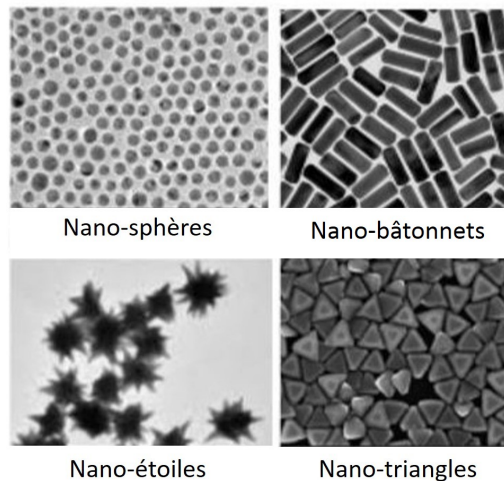


FIGURE 1.1 – Nanoparticules d'or de différentes formes.

1.1.2 Nanotechnologie et Nanomatériaux

Le terme nanotechnologie, décrit le développement, la production et la manipulation d'objet à l'échelle nanométrique, il s'agit donc d'un mot-valise comprenant aussi bien la science que l'applicabilité de l'objet. Ces nanomatériaux peuvent correspondre à des matériaux incorporant en leur sein des nanoparticules, présentant une surface interne très importante, ou bien d'un objet dont une dimension n'est pas nanométrique, comme les nano-fils d'argent, mesurant jusqu'à quelque dizaines de microns de long, mais dont le diamètre est à l'échelle nanométrique. Nous trouvons notamment de plus en plus de nanomatériaux dans des batteries afin d'augmenter la surface de stockage des électrons, dans des céramiques afin de les rendre plus solides et légères, ou bien dans les matériaux dits « intelligents », connectés ou auto-réparant. La **figure 1.2** montre bien que de plus en plus de nanomatériaux sont présents sur le marché, avec plus de 1 600 produits ajoutés en 9 ans.

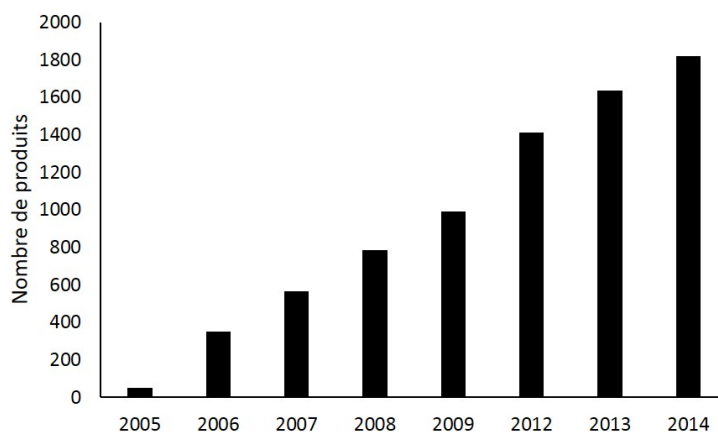


FIGURE 1.2 – Evolution du nombre de produits contenant des nanomatériaux répertoriés au niveau mondial entre 2005 et 2014 (Source : Woodrow Wilson Institute).

1.2 Part de marché

La production mondiale de nanomatériaux a été estimée en 2016 autour de 11,5 millions de tonnes par an par la commission européenne (Cantuarias-villessuzanne et al., 2016), partagée équitablement entre l'Asie (34 %), l'Amérique du nord (31 %) et l'Europe (30 %) (Pulit-Prociak et al., 2016).

Parmi les objets contenant des nanoparticules, ceux présentant des nanoparticules d'argent sont les plus nombreux sur le marché : en 2015 ils représentaient 25 à 30 % du marché des objets nanofonctionnalisés (Vance et al., 2015 ; *R-Nano.fr*). Il ne s'agit cependant pas d'une part importante dans la production mondiale de nanoparticules (uniquement 500 tonnes/an) (Mueller et al., 2008), surtout si nous la comparons à la production annuelle de nanoparticules de dioxyde de titane qui est de 10 000 tonnes/an (Piccinno et al., 2012). La distribution des classes de produits contenant des nanoparticules d'argent sur la **figure 1.3** souligne que les produits à usage médicaux et les cosmétiques représentent à eux seuls presque 80 % des produits sur le marché, et que les Etats-Unis sont les plus importants producteurs.

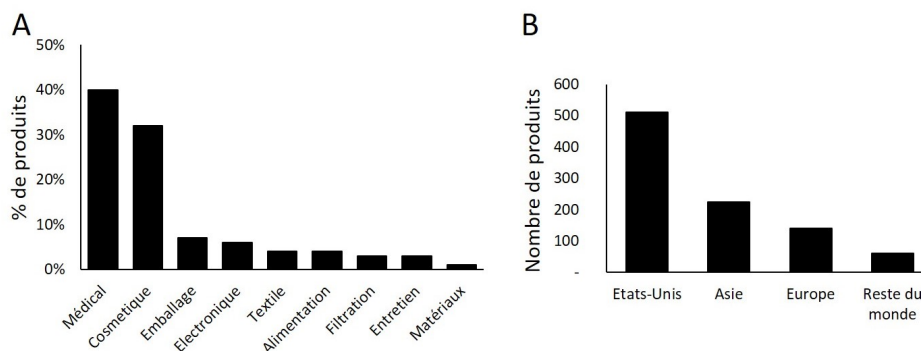


FIGURE 1.3 – Application et production des nanoparticules d’argent. (A) : Distribution des classes de produits contenant des nanoparticules d’argent (Lem et al., 2012). (B) : Production de produits contenant des nanoparticules d’argent à travers le monde (enquête menée par le *Woodrow Wilson Institute*).

Il faut cependant replacer ces chiffres en perspective car les réglementations concernant les nanoparticules sont en évolution. Les données concernant leur utilisation varient ainsi avec cette évolution. Pour exemple, il n’est à l’heure actuelle pas obligatoire de signaler la présence de nanoparticules d’argent dans des produits de la vie courante. Par conséquent, les pays dans lesquels les nanotechnologies ont bonne presse mettent leur emploi en avant, tandis que l’utilisation des nanoparticules est souvent sous-déclarée par les industriels dans les nations plus réticentes à l’utilisation des nanotechnologies (i.e. la plupart des pays européens). Cela explique la diminution relativement importante de la progression des produits contenant des nanoparticules d’argent sur le marché européen depuis quelques années. A l’opposé, dans le milieu médical, les réglementations sont très strictes et les industries pharmaceutiques sont dans l’obligation de déclarer les nanoparticules dans leurs produits (**Figure 1.3**). Ainsi la part de marché spécifique aux matériaux médicaux est très importante et est accentuée par cette différence de réglementation.

Chapitre 2

Les nanoparticules d'argent

2.1 Usage de l'argent et des nanoparticules d'argent

2.1.1 L'élément Argent

L'argent est un métal brillant, ductile et malléable, trouvé à l'état natif sous forme de pépite. Du latin *Argentum*, qui a donné les initiales de son symbole chimique Ag et du grec ancien *αργος* (*argos*), qui signifie : blanc, ou brillant, il a donné son nom durant l'antiquité à la cité *Argentoratum*, l'actuelle ville de Strasbourg.

Il s'agit d'un métal de transition, l'élément chimique 47, de valence $[\text{Kr}] 5s^1 4d^{10}$, légèrement plus dur que l'or. Il est le métal possédant la résistance la plus faible et proposant donc une excellente conductivité thermique.

L'atome d'argent métallique, dans son état d'oxydation neutre $\text{Ag}(0)$, est inerte chimiquement et biologiquement inactif. Au contraire, l'argent ionique au degré d'oxydation (I) (nitrate d'argent, chlorure d'argent, ...) est très réactif une fois en solution. Cette réactivité est à la base de l'action antibactérienne de l'argent. Il présente deux autres états d'oxydation : $\text{Ag}(\text{II})$ et $\text{Ag}(\text{III})$, qui sont instables en solution aqueuse et de ce fait bien moins répandus. On retrouve l'argent présent soit sous forme d'ion monovalent avec des sulfures, sulfates, soit sous forme de complexes avec des carbonates ou des chlorures. L'argent métallique est insoluble, mais les sels d'argent comme le nitrate d'argent (solubilité : $2\,340\text{ g.L}^{-1}$) sont solubles dans l'eau, alors que les chlorures d'argent, eux, sont insolubles dans l'eau ($K_{\text{sp}} : 1,77 \cdot 10^{-10}\text{ mol.L}^{-1}$).

2.1.2 L'argent : utilisation

Utilisation

Chaque année, 33 000 tonnes d'argent sont utilisées dans le monde (*The Silver Institute*).

L'argent a été vastement utilisé depuis des siècles, pour des applications aussi éclectiques que la bijouterie (7 700 tonnes/an), la confection d'ustensiles et plus récemment, le développement de la photographie ou de certains explosifs. L'argent, avec le cuivre et l'or, est l'un des métaux utilisés pour frapper la monnaie, ce qui est intrinsèquement lié à sa valeur marchande.

A l'heure actuelle, l'argent est toujours utilisé en grande quantité dans l'industrie moderne malgré la décroissance nette de sa consommation occasionnée par la transition numérique en photographie. Le secteur industriel de la photographie argentique représentait en 1996 26 % de la consommation totale d'argent. Le **tableau 2.1** décrit la répartition en 2014 de la part de consommation de l'argent, dont la majorité

est allouée à la frappe de la monnaie et la production de lingot, à hauteur de 22,7 % et à l'industrie électronique à hauteur de 21,6 %. La consommation moyenne d'argent a doublé entre 1960 et nos jours, mue par l'évolution du secteur industriel de l'électronique (composés d'argent utilisés pour optimiser la conduction) ainsi que par le développement des nouvelles applications de l'argent dans les domaines du textile et de la médecine comme agent biocide.

Tableau 2.1 – Répartition de la part de consommation de l'argent dans l'industrie mondiale en 2014.

Secteur d'activité	Part de la consommation
Monnaie et lingot	22,7 %
Électronique	21,6 %
Industrie	22,2 %
Bijouterie	18,4 %
Alliage	5,8 %
Photographie et radiologie	4,7 %
Alliage Argenterie	4,6 %

Utilisation biocide

On retrouve dès - 3500 en Egypte, des traces écrites de l'utilisation de l'argent pour ses vertus antiseptiques. Des témoignages datant de - 355 ont été retrouvés, décrivant l'utilisation durant les campagnes militaires d'Alexandre le Grand de contenants en argent pour stocker l'eau et la faire bouillir avant de la consommer afin de la rendre potable (Russel et al., 1994). Hippocrate, le père de la médecine moderne, décrivait la poudre d'argent comme un remède et le prescrivait pour le soin des ulcères. L'argent est toujours utilisé aujourd'hui sous forme de stylo au nitrate d'argent pour le soin des ulcères cutanées surinfectés (Chen et al., 2008a). Au XVIII^{ème} siècle, le nitrate d'argent, aussi connu sous le nom de *lapis infernalis*, était utilisé pour le traitement des blessures dont la cicatrisation était ralentie ou inexistante mais également pour traiter des maladies dites mentales ainsi que pour traiter l'addiction à la nicotine ou encore la syphilis. Dès le début du XIX^{ème} siècle, l'argent sous cette forme nitratée a été très utilisé pour le soin des brûlures fraîches, selon différentes formulations (Argent solide, poudre, pinceau ou solution aqueuse de 0,2 à 2 %). L'essor de la bactériologie à la fin du XIX^{ème} siècle a permis la mise en évidence et la compréhension des propriétés antibactériennes de l'argent dont l'utilisation dans le domaine de la lutte antimicrobienne s'est rapidement développée. On retient comme exemple le traitement et la prévention des infections oculaires par le gonocoque (*Neisseria gonorrhoeae*) chez le nouveau-né par des collyres à l'argent (n'est actuellement plus utilisé) et l'utilisation de pansements imprégnés d'argent

sur les plaies et blessures (Klasen, 2000).

L'avènement des antibiotiques durant la deuxième guerre mondiale avec en particulier la découverte en 1942 de la pénicilline par Flemming, rapidement produite à l'échelle industrielle par Eli Lilly, et de l'auroéomycine par Duggar, fit nettement rétrograder la place de l'argent dans l'arsenal antimicrobien. Si bien qu'elle ne garde plus de nos jours qu'un rôle très parcellaire limité à son utilisation comme antiseptique local (sous forme de crème (Colargol®), de collyre (nitrate d'argent Faure 1 %®) ou de poudre) ou comme revêtement antibactérien sur des dispositifs médicaux (canules d'intubation endo-trachéal afin de diminuer les pneumonies acquises sous ventilation artificielle, cathéters centraux ou prothèses qui sont à haut risque de colonisation bactérienne).

2.1.3 Utilisation des nanoparticules d'argent dans les produits de consommation courante

On retrouve des nanoparticules d'argent dans de nombreux produits du quotidien, avec lesquels nous sommes directement en contact. Les tableaux présentés dans ce chapitre sont issus d'une analyse et d'une classification des données collectées par l'institution *The Silver Institute*.

Il est intéressant de noter que les pays utilisant des nanoparticules d'argent dans les produits en contact direct avec l'organisme comme les produits alimentaires (**Tableau 2.2**) ou d'hygiène corporelle (**Tableau 2.3**) sont principalement des pays du continent asiatique et les USA. Les pays incorporant des nanoparticules d'argent dans les produits électroniques sont les pays leaders dans le marché de la téléphonie et de l'informatique (**Tableau 2.4 et 2.5**).

Tableau 2.2 – Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits alimentaires de consommation courante ou en contact avec ceux-ci.

Utilisation	Fabriquant	Pays
Complément	Conseal International,	USA
	Natural-Immunigenics Corps, NaturalCare, RBC life Sciences	
.....
Contenant	BabyDream, Aekyung	Corée du Sud
.....
Emballage	BlueMoonGoods, Sharper Image	USA
	JR nanotec	UK
	Quan Zhou Hu Zheng Nanotechnology	Chine
	Songsing Nano Technologie	Taiwan

Tableau 2.3 – Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits d'hygiène quotidienne.

Utilisation	Fabriquant	Pays
Odontologie	Digimax Innovative Products	Taiwan
	Nano Plasma Center Co, Nanogist Co	Corée du Sud
.....
Pommade	DHC USA INC, Utopia Silver Supplements	USA
	Skybright Natural Health	Nouvelle zélande
	Quan Zhou Hu zheng Nano Technology Co	Chine
	Songsing Nano Technologie Co	Taiwan
	Nano Plasma Center Co., Nanogist Co	Corée du Sud
.....
Cosmétique	Plank	USA
	Skybright Natural Health	Nouvelle zélande
	Nano Care Teechnology Ltd	Chine
	Natural Korea CoNanogist Co	Corée du Sud

Tableau 2.4 – Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits électroniques quotidiens.

Utilisation	Fabriquant	Pays
Informatique	IOGEAR, Nano care technology Ltd	Chine
	Samsung	Corée du Sud
.....
Téléphonie	Nano care technology Ltd	Chine
	Samsung, LG Electronics	Corée du Sud

Tableau 2.5 – Utilisation et production des nanoparticules d'argent dans les produits électroménagers quotidiens.

Utilisation	Fabriquant	Pays
Aspirateurs	Daewoo Electronics	Allemagne
	LG Electronic	Corée du sud
.....
Réfrigérateurs	Daewoo Electronics	Allemagne
	LG Electronic, Samsung corporation	Corée du sud
.....
Machine à laver	Daewoo Electronics	Allemagne
	LG Electronic	Corée du sud
.....
Fer à friser	Andys cimpany, Farouk Systems, ionFX, Metropolis Technology, Spectrum Brands	USA
	S E International	Corée du sud
.....
Filtre désodorisant	Helen of troy, Hyundai	USA
	Quan Zhou Hu zheng Nano Technology	Chine
	Songsing Nano Technology	Taiwan
.....
Intérieur	Conseal International, E47	USA
	Lion Corporation	Japon
	Nano care technology	Chine
	Skybright Natural Health	Nouvelle Zélande
	Songsing Nano Technology	Taiwan
.....
Piscine	MAHA Corp, Nanogist Co	Corée du Sud

.....
Piscine	Conseal International	USA

2.1.4 Utilisation des nanoparticules d'argent : produits pharmaceutiques

Dans le milieu médical (Chaloupka et al., 2010), les nanoparticules d'argent offrent une bonne alternative dans la lutte contre le développement bactérien. Dans le milieu hospitalier, les patients et le personnel soignant sont soumis à une forte concentration de germes pathogènes variés développant par de multiples biais des résistances aux anti-bactériens classiques (Mijnendonckx et al., 2013), nécessitent donc une alternative.

Infektions nosocomiales

Les infections nosocomiales sont une source importante de décès dont la survenue pourrait être limitée par une asepsie adéquate de l'environnement immédiat, tant intérieur qu'extérieur au patient. Depuis 2006, à peu près un patient sur 20 contracte une infection nosocomiale, ce qui représente 750 000 patients chaque année, et cause la mort de 4 000 patients en France (Source : INSERM).

L'incidence des infections nosocomiales varie selon plusieurs paramètres que sont : le type d'établissement (les centres de cancérologie sont très touchés), le type de séjour (23,2 % en réanimation, du fait de la fréquence des gestes invasifs), la durée des séjours (multiplié par 15 pour une durée d'hospitalisation supérieure à 1 mois), ainsi que le profil du patient (patients hospitalisés en gériatrie ou en néo-natalité, immunodéficients, soumis à une opération) ou à la mise en place d'un dispositif médical invasif. Les infections sur sondes urinaires sont les plus courantes (30 %), puis les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (16,7 %) suivies des infections sur site opératoire (13,5 %). En quatrième position se trouvent les bactériémies favorisées par l'introduction d'un cathéter intra-vasculaire.

Trois bactéries sont principalement responsables de ces infections : *Escherichia coli* (*E. coli*) (majoritairement au niveau urinaire), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sur les sites opératoires et les cathéters et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Dispositifs médicaux

En France, les dispositifs médicaux sont soumis à la régulation de l'Agence Nationale de Sécurité du médicament. Selon l'article 2 du Règlement 2017/745 (Directive, 2017) du parlement européen et du conseil du 5 avril 2017 un dispositif médical est défini comme « tout instrument, appareil, équipement, logiciel, implant, réactif, matière ou autres articles, destiné par le fabricant à être utilisé, seul ou en association, chez l'homme pour une ou plusieurs des fins médicales précises suivantes :

- Diagnostic, prévention, contrôle, prédiction, pronostic, traitement ou atténuation d'une maladie ;

- Diagnostic, contrôle, traitement, atténuation d'une blessure ou d'un handicap ou compensation de ceux-ci;
- Investigation, remplacement ou modification d'une structure ou fonction anatomique ou d'un processus ou état physiologique ou pathologique;
- Communication d'information au moyen d'un examen *in vitro* d'échantillons provenant du corps humain, y compris les dons d'organes, de sang et de tissus;

Et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens.

Les produits ci-après sont également réputés pour être des dispositifs médicaux :

- Les dispositifs destinés à la maîtrise de la conception ou à l'assistance à celle-ci;
- Les produits spécifiquement destinés au nettoyage, à la désinfection ou à la stérilisation des dispositifs visés. »

Ces dispositifs médicaux sont classés en fonction de la durée de contact avec le patient, du caractère invasif ou non et de l'association avec des produits considérés comme actifs. On retrouve ainsi quatre catégories :

- Catégorie I : risque faible;
- Catégorie IIa : risque moyen;
- Catégorie IIb : risque potentiellement élevé;
- Catégorie III : risque élevé.

En ce qui concerne les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, le nouveau règlement 2017/745 du parlement européen (Directive, 2017) introduit une nouvelle réglementation ciblée sous la règle 19 : « Tous les dispositifs qui incorporent un nanomatériau ou qui en sont constitués relèvent :

- De la classe III s'ils présentent un potentiel d'exposition interne moyen ou élevé;
- De la classe IIb s'ils présentent un faible potentiel d'exposition interne;
- De la classe IIa s'ils présentent un potentiel d'exposition interne négligeable.

Actuellement on retrouve déjà sur le marché un certain nombre de dispositifs médicaux invasifs ou non, contenant des nanoparticules d'argent (**Tableau 2.6**) :

Tableau 2.6 – Dispositifs médicaux actuellement sur le marché contenant des nanoparticules d'argent (Europe).

Domaine médical	Produit
Anesthésie	Cathéter d'administration locale
Cardiologie	Batterie implantable
Néphrologie	Cathéter de dialyse
Urologie	Batterie implantable, Cathéter urinaire
Plaie	Compresse, Gel, Adhésif, Pansement pour brûlure, Vêtement pour patient brûlé

Les pansements de traitement des brûlures sont les dispositifs médicaux contenant des nanoparticules d'argent les plus représentés sur le marché. Ils sont produits par Argentum medical, Johnson and Johnson (gamme Actisorb®), Smith & Nephew inc (gamme Acticoat®) et Beiersdorf AG (Gamme Hansaplast® et Elastoplast®). Les cathéters sont produits par Nano Care Technology Lts, Spiedelberg et I-Flow Corp. On trouve également sur le marché des produits dits «de bien être » contenant des nanoparticules d'argent, comme les préservatifs Nanometer Silver Foam condom produits par Blue cross Bio-medical Co, des sprays de décontamination nasal et des inserts orthopédiques.

2.1.5 Future / Perspectives d'avenir

L'utilisation des nanoparticules dans le milieu médical est en expansion. Les applications antibactériennes des nanoparticules d'argent intéressent de multiples spécialités et l'on trouve actuellement des brevets ou des études en cours dans le but de développer cette technologie à bien plus grande échelle (**Tableau 2.7 et 2.8**).

Tableau 2.7 – Possibles futures applications des nanoparticules d'argent dans le domaine chirurgical.

Domaine médical	Application	Références
Cardiologie	Revêtement de valves cardiaques	Andara et al., 2006
	Revêtement de cathéters centraux	Ghanbari et al., 2009
	Paladini et al., 2013
Neurologie	Revêtement de cathéters de drainage	Bayston et al., 2007
Orthopédie	Ciment osseux	Alt et al., 2004
	Revêtement de vis	Alt et al., 2006
	Revêtement de joint articulaire	Besinis et al., 2017
Odontologie	Revêtement de résine	Chen2006
	Adhésif	García-Contreras et al., 2011
	Traitement de la parodontite	Prabha et al., 2016
	Enrobage des bagues dentaires	Akhavan et al., 2013
Chirurgie	Revêtement du matériel chirurgical	Craciunescu et al., 2018
	Treillis tissulaire chirurgicale	Metin-Gürsoy et al., 2017
Urologie	Prothèse biologique	Zhang et al., 2016
	Traitement de la dermatite	Cohen et al., 2007
		Bhol et al., 2005

Tableau 2.8 – Futures possibles applications des nanoparticules d'argent dans le domaine médical.

Domaine médical	Application	Références
Anesthésie	Revêtement sur tubes endotrachéaux	
.....
Virologie	Inhibition du VIH-1	Elechiguerra et al., 2005
.....
Diabétologie	Traitement des ulcères du pied	Rahaman et al., 2017
.....
Néphrologie	Dialyse	Schäfer et al., 2017
.....
Imagerie	Imagerie moléculaire	Tai et al., 2007
.....
Ophthalmologie	Revêtement sur des lentilles	Weisbarth et al., 2007

2.1.6 Architecture

Ces nanoparticules d'argent incorporées dans les produits de consommation se présentent sous diverses formes mais peuvent être décrites ensemble comme suit. Les nanoparticules d'argent se présentent sous forme sphérique, cubique ou triangulaire, et se retrouvent incorporées dans un nombre croissant d'objets de consommation du quotidien ou de produits utilisés à des fins médicales.

Coeur

La maille élémentaire d'une nanoparticule d'argent est la maille Cubique Face Centrée (cfc), dont la compacité est de 0,74 (**Figure 2.1**) et est composée d'argent métallique de degré d'oxydation 0. A la surface de la nanoparticule, on trouve une couche d'atomes d'argent oxydés, Ag(I). L'empilement des atomes d'argent dans les nanoparticules diffère selon la forme des nano-objets, présentant donc trois types de facettes : {100}, {111} et {110} qui possèdent chacune une réactivité propre. En effet, l'empilement des atomes dans les différentes facettes est différent (**Figure 2.2**). Afin d'empêcher leur agrégation, les nanoparticules d'argent sont recouvertes de molécules dites d'« enrobage ». Ces molécules peuvent être des ligands anioniques ou cationiques extrêmement variés, allant de petites molécules déplaçables jusqu'à un revêtement polymérique ou bien des revêtements inorganiques comme de la silice ou de l'oxyde de titane. Dans le cas d'un revêtement solide, nous préférons l'utilisation du terme de « coquille » plutôt que d'enrobage.

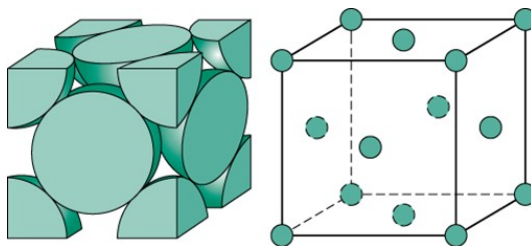


FIGURE 2.1 – Maille élémentaire de l'argent.

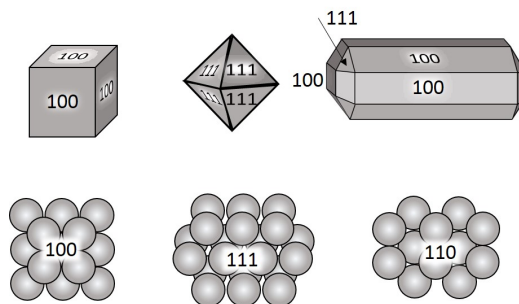


FIGURE 2.2 – Représentation des différentes facettes des nanoparticules d'argent et de l'empilement des atomes d'argent dans celles-ci.

Coquille

Les coquilles sont ajoutées aux nanoparticules d'argent afin de modifier leurs propriétés conductrice, électronique (coquille de nickel), catalytique (coquille de platine (Wojtysiak et al., 2014) ou coquille de titane (Angkaew et al., 2012)) et optique (coquille d'or (Lu et al., 2013; Pustovalov et al., 2013), coquille de silice (Han et al., 2011)) ainsi que biocide (coquille de cuivre (Hamidi-Asl et al., 2016)). Il est à noter que, contrairement à l'enrobage, une nanoparticule et sa coquille ne sont finalement qu'une superposition de couches concentriques d'éléments différents formant un seul objet final. Cette coquille ne faisant qu'un avec la nanoparticule, elle n'est donc pas déplaçable comme un enrobage.

Enrobage

Dans les productions de nanoparticules d'argent à grande échelle, les enrobages les plus fréquemment employés sont des enrobages compatibles avec des solvants aqueux, comme le citrate ou la polyvinyle pyrrolidone (PVP) (Sharma et al., 2014).

Le citrate (**Figure 2.3**) s'associe faiblement à la surface des nanoparticules par des interactions faibles et est donc facilement déplaçable par des molécules de plus haute affinité pour Ag(I) telle que les molécules portant des fonctions thiol ou imidazole.

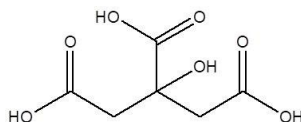


FIGURE 2.3 – Molécule d'acide citrique.

Le PVP (**Figure 2.4**), est un polymère qui se lie à la surface des nanoparticules d'argent par de multiples liaisons faibles résultant en un phénomène d'avidité et donc à une forte interaction entre le polymère et la nanoparticule. Le polymère recouvre ainsi toute la surface de la nanoparticule d'argent et entraîne donc une plus grande stabilité des nanoparticules enrobées de PVP que celle enrobées par le citrate. Le PVP est cependant très difficilement déplaçable. De plus, il interagit plus fortement avec les atomes situés sur les facettes {100} que sur les facettes {111}, ce qui permet de moduler la forme des nanoparticules et de, par exemple, produire des nanofils d'argent.

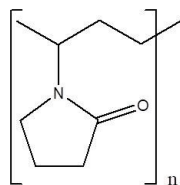


FIGURE 2.4 – Bloc élémentaire de polyvinyle pyrrolidone.

D'autres enrobages polymériques peuvent également servir d'agent stabilisant et protecteur pour les nanoparticules d'argent, tels que les poly (vinyl alcool) (Pencheva et al., 2012) (**Figure 2.5 A**), poly (éthylène glycol) (Shkilnyy et al., 2009) (**Figure 2.5 B**), poly (methacrylique acide) (Kaczmarek et al., 2016) (**Figure 2.5 C**) ou les poly (methylmethacrylate) (**Figure 2.5 D**).

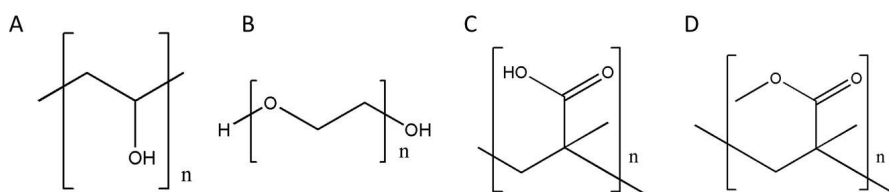


FIGURE 2.5 – Différents types d'enrobage de nanoparticules d'argent. (A) : polyvinyl alcool, (B) : polyéthylène glycol, (C) : acide polyméthacrylique et (D) : polyméthylméthacrylate.

2.1.7 Complémentarité des méthodes de caractérisation

La caractérisation d'un nano-objet nécessite donc l'utilisation d'un large panel d'outils analytiques, complémentaires les uns des autres, dont un certain nombre est décrit en détail dans le **chapitre 10** consultable pour obtenir d'avantage d'information sur les principes et les limites de ces méthodes. Cependant, la nature physique

complexe des nano-objets est à prendre en compte avant l'utilisation de chaque technique afin de limiter les biais dans l'interprétation des données. Ce n'est qu'en couplant plusieurs analyses qu'il est possible d'interpréter correctement les résultats.

2.1.8 Synthèse et production

De manière générale, les méthodes utilisées pour la préparation de nanoparticules métalliques peuvent être classées selon deux groupes : les méthodes Top-down ou les méthodes Bottom-up. Elles peuvent être représentées par l'obtention d'une brique comme illustré sur la **figure 2.6**. La méthode Top-down consiste en la réduction d'une masse d'un matériau donné pour obtenir des nanoparticules de ce matériau par un biais physique, chimique ou mécanique, alors que la méthode Bottom-up consiste à faire réagir les matériaux nécessaires sous leur forme moléculaire ou atomique les plus simples.

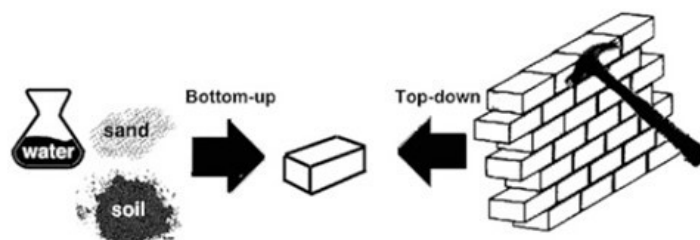


FIGURE 2.6 – Illustration du concept des méthodes Bottom-up et Top down.

La production par la méthode Bottom-up est divisée en plusieurs sous-catégories : en phase gazeuse, liquide, solide ou par méthode biologique. La bibliographie est très riche en ce qui concerne la production de nanoparticules d'argent. Nous ne décrivons dans cette partie que des méthodes de production en phase liquide, principalement Bottom-up car ce sont celles que nous avons utilisées pour produire des nanoparticules d'argent dans le cadre de ce travail et que l'on trouve le plus dans la littérature.

Voie de production dite « Bottom-up »

Réduction chimique

La réduction d'un sel d'argent (AgNO_3 par exemple) en nanoparticule représente la voie principale de production des nanoparticules d'argent. Cette réduction est communément appelée « Co-précipitation » car la réaction combine des phénomènes de réduction, de nucléation, de croissance et/ou d'agglomération (Cushing

et al., 2004).

Cette réaction est dépendante, comme toutes les réactions d'oxydo-réduction, des valeurs des potentiels d'oxydo-réduction standards des éléments engagés. Pour une réaction réussie, il est nécessaire que l'enthalpie libre de la réaction ΔG^0 soit négative ou que la différence des potentiels standards de réduction ΔE^0 soit positive. Ainsi, le choix des réducteurs engagés dans la production de nanoparticules d'argent par réduction chimique est important. Le potentiel de réduction du cation Ag(I) en Ag^0 est relativement élevé ($E^\circ = + 0,799 \text{ V}$) ce qui permet donc l'utilisation d'un grand nombre de réducteurs, comme le citrate de sodium ($E^\circ = - 0,180 \text{ V}$), le borohydrure de sodium ($E^\circ = - 0,230 \text{ V}$), l'hydroquinolone (Pérez et al., 2008) ($E^\circ = - 0,699 \text{ V}$), ou d'autres agents réducteurs comme des polyols ou des polyphénols.

Le procédé général est la formation d'un noyau d'argent nanoparticulaire fortement complexé à l'agent stabilisant (principalement des anions citrate). La taille de ce noyau augmente au fur et à mesure, par un phénomène d'agréga-tions succes-sives de ces noyaux d'argent nanoparticulaire. Une fois la taille optimale atteinte, la surface oxydée des nanoparticules d'argent permettra la fixation d'ion Ag^+ présents dans le milieu réactionnel. La réduction de l'argent à la surface des nanoparti-cules d'argent par complexation avec l'ion citrate est facilitée par la diminution du potentiel réducteur du métal sous forme nanoparticulaire comme représenté sur la **figure 2.7**.

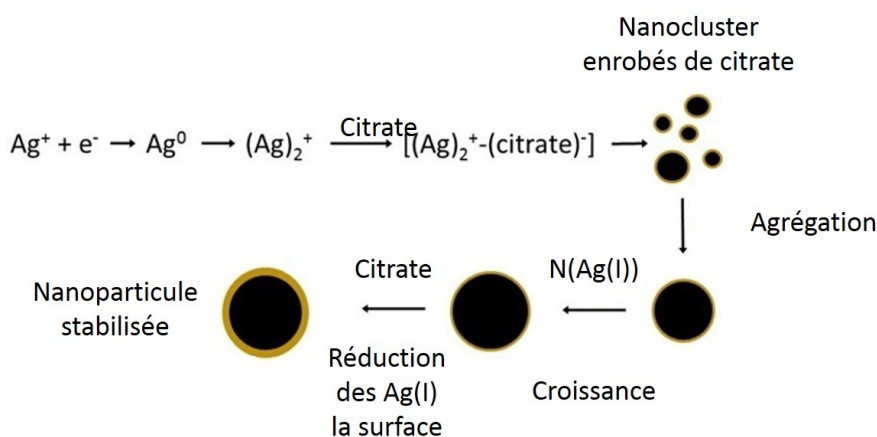
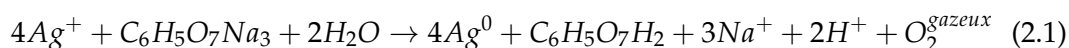


FIGURE 2.7 – Mécanisme de la synthèse de nanoparticules d'argent par réduction des sels d'argent stabilisés par des ions citrate

Le cas d'une réduction par le citrate de sodium présente la particularité d'utiliser ce sel comme agent réducteur et stabilisant. Cependant, le potentiel de réduction du citrate de sodium étant peu élevé, la réaction de réduction de l'ion Ag^+ est relativement lente. En effet, en quantité équimolaire ($[\text{Ag}^+] = [\text{citrate de sodium}]$) seule une faible partie d'ion Ag^+ est réduite et le maximum de la réaction est obtenu en

50 minutes à 100°C (Pillai et al., 2004). Le temps de réaction et son rendement sont influencés par le rapport de concentration entre le citrate et l'argent. Ainsi, la formation de nanoparticules d'argent par la procédure de réduction au citrate de sodium entraîne la formation de quelques noyaux d'argent nanoparticulaire de taille relativement élevée, qui s'agrègeront davantage que les noyaux d'argent nanoparticulaire de petite taille, jusqu'à ce que les nanoparticules obtenues aient un enrobage de citrate suffisant pour empêcher leur agrégation. La réduction par le citrate de sodium entraîne donc la formation de nanoparticules d'argent de grande taille (50 - 100 nm) et de diamètres hétérogènes, selon la réaction suivante :



Pour pallier à cela, les polyphénols peuvent être utilisés pour leur fort pouvoir réducteur dû à l'oxydation des phénols en ortho et en para (**Figure 2.8**). D'autres réducteurs peuvent également être utilisés comme le borohydrure de sodium, qui mène également à la formation de nanoparticules selon l'équation suivante :

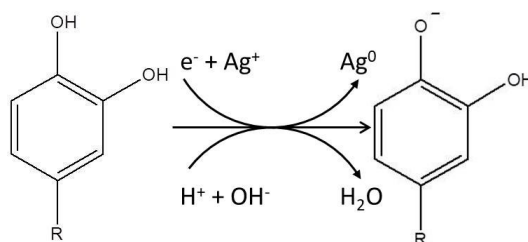
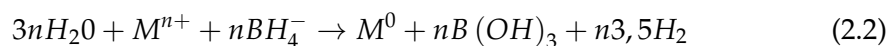


FIGURE 2.8 – Déprotonation d'un polyphénol dans un processus de production d'Ag(0).

Réduction en solvant organique

La réduction en milieu organique permet un meilleur rendement et un meilleur contrôle de la distribution de la taille des nanoparticules. Cela est dû au fait que le solvant est lui-même le réducteur permettant la nucléation de l'argent. Dans l'exemple des polyols, principalement le polyéthylène glycol (Wiley et al., 2005), le pouvoir réducteur du solvant est directement corrélé à la température. Ainsi, la vitesse de nucléation dont dépend la taille et la forme des nanoparticules d'argent est facilement contrôlable par celle-ci.

Irradiation lumineuse

Deux cents ans après la première description de l'action de la lumière sur l'élément argent par le scientifique allemand Johann Schulze, la réduction de l'argent

cationique Ag^+ par photolyse directe ou indirecte a permis la production de nanoparticules d'argent (Huang et al., 1996). La photo-réduction d' $Ag(I)$ en $Ag(0)$ par l'excitation directe d'un sel d'argent est basée sur le transfert d'électrons entre une molécule de solvant et l'argent cationique électroniquement excité. La réactivité et le rendement de la production de nanoparticules d'argent sont fortement augmentés en présence de solvants alcooliques, du fait de l'hydrogène α labile qui forme aisément un radical qui pourra réduire l' $Ag(I)$ ce qui accélère la production de nanoparticules d'argent (Hada et al., 1976). Cette production est décrite par l'équation suivante :

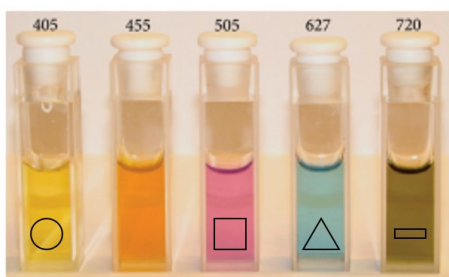
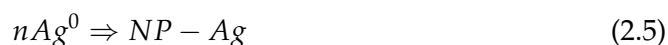
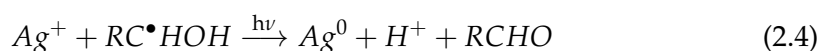
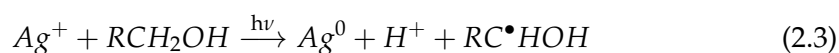


FIGURE 2.9 – Production par photolyse de nanoparticules d'argent de différentes formes en fonction de la longueur d'onde utilisée.

La réduction par le solvant radicalaire est très forte et les ions Ag^+ sont réduits rapidement et efficacement durant la photo-réduction. Ainsi, les noyaux d'argent de petite taille sont produits en continu. Ce citrate également présent dans le solvant joue le rôle de stabilisant et permet d'arrêter la croissance des nanoparticules d'argent (Pillai et al., 2004) permettant la production de nanoparticules d'argent de petite taille (5 - 20 nm) avec une faible dispersion des diamètres. La très faible variation dans les longueurs d'onde utilisées par les

lasers, lampes ou LEDs durant la nucléation permet de faire varier la morphologie des nanoparticules produites. Ainsi, une source lumineuse de 405 nm entraînera la formation de nano-sphères, alors qu'une source lumineuse de 627 nm entraînera la formation de nano-triangles et une source lumineuse de 720 nm des nano-bâtonnets (Stamplecoskie et al., 2010), produisant ainsi des solutions de couleurs différentes comme présenté sur la **figure 2.9**.

2.1.9 Top-down

Les méthodes d'obtention de nanoparticules d'argent par une fabrication dite Top-down nécessitent un apport en énergie important. Il s'agit de méthodes thermiques ou lithographiques, ou des ablations par laser de haute énergie. Ces méthodes sont moins répandues et bien plus coûteuses que les approches Bottom-up. Pour des raisons de simplicité et de coût, dans le cadre de mes travaux de doctorat, les nanoparticules d'argent ont été produites par une réduction chimique de sels

d'argents et stabilisées par des anions citrate.

Chapitre 3

Action biocide de l'argent

L'argent et les nanoparticules d'argent sont utilisés pour leur action biocide et donc bactéricide à large spectre, sur les bactéries à Gram positif et négatif (Rai et al., 2009; Jung et al., 2008; Kim et al., 2007; Reidy et al., 2013), ainsi que sur les champignons (Galván Márquez et al., 2018) et les virus (Elechiguerra et al., 2005; Lara et al., 2011). En effet, un agent biocide agira et détruira toutes les formes de vie, alors qu'un agent bactéricide est utilisé pour éliminer uniquement les bactéries. Leurs modes d'actions sont non ciblés ce qui permet d'obtenir un large spectre d'activité biocide, en particulier contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG).

L'action bactéricide de l'Ag(I) est déjà bien connue (Jung et al., 2008) et l'intérêt porté à la forme nanoparticulaire de l'argent sous sa forme Ag(0) pose un certain nombre de questions : l'action bactéricide observée en présence de nanoparticules est-elle uniquement liée à la libération d'Ag(I) ? Est-elle adjointe d'un effet *nano* spécifique ?

Plusieurs études ont investigué le sujet. Lok et al. (Lok et al., 2007) ainsi que Xiu et al. (Xiu et al., 2012) ont souligné l'importance de l'oxydation de surface des nanoparticules d'argent pour leur action bactéricide, en montrant que les nanoparticules d'argent non oxydées (ne présentant que des Ag(0) à leur surface) n'ont pas d'action biocide. Beer et al. (Beer et al., 2012) ont mis en évidence que c'est l'Ag(I) en solution dans les suspensions de nanoparticules qui est responsable de l'action bactéricide. De plus, l'entrée de nanoparticules d'argent dans les bactéries intactes n'a, à notre connaissance, jamais été observée. Morones et al. (Morones et al., 2005) ont décrit l'entrée de nanoparticules dans des bactéries, cependant la membrane de ces bactéries était détruite, ce qui explique que les nanoparticules aient pu entrer dans la cellule. L'ensemble des données de ces études suggèrent une synergie des différents mécanismes, où l'oxydation favorise le relargage d'Ag(I). Il est donc intéressant de définir les modes d'action de l'argent et des nanoparticules d'argent sur les microorganismes.

3.1 Action sur la membrane bactérienne

Les bactéries se présentent en deux catégories distinctes, différenciées l'une de l'autre par la nature de leur paroi. Les bactéries dites à Gram-positif (G+) (du fait de la rétention intracytoplasmique de la coloration de Gram lors de l'observation microscopique) ont une paroi bactérienne d'une épaisseur de 15 à 80 nm formée par des peptidoglycanes, un polymère constitué d'une partie glucidique et d'une partie peptidique. Les bactéries dites à Gram-négatif (G-) quant à elles possèdent une paroi bactérienne bien plus fine (2 nm) mais ont une membrane supplémentaire autour du peptidoglycane composée de phospholipides et de lipopolysaccharides (**Figure 3.1**).

L'interaction avec la paroi bactérienne est primordiale pour la compréhension de l'action bactéricide des nanoparticules d'argent. En effet, c'est en traversant la paroi bactérienne et la membrane plasmique que les Ag(I) pourront interférer avec les biomolécules comme l'ADN, les protéines et les petites molécules comme le glutathion (GSH) puis générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le cytoplasme. D'autre part, l'accumulation des espèces de l'Ag(I) sous forme ionique au niveau de la membrane bactérienne entraîne une perméabilisation de celle-ci (Marambio-Jones et al., 2010).

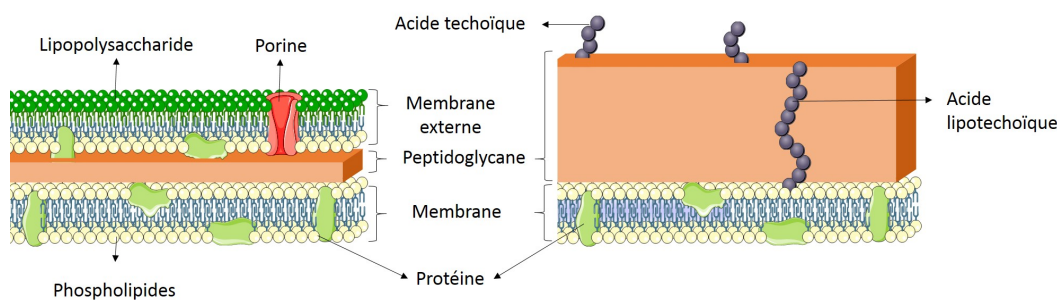


FIGURE 3.1 – Différences dans la composition et la structure des membranes et de la paroi des bactéries. G+ (à droite) et G- (à gauche).

Il a été montré par microscopie électronique à transmission (MET) que les Ag(I) causaient une modification de la morphologie des bactéries G+ et G- allant du détachement de la paroi bactérienne de la membrane plasmique jusqu'à sa rupture (observée sur *Staphylococcus aureus* après un traitement de deux heures par des ions argent) (Jung et al., 2008).

Dans le cas de l'exposition aux nanoparticules d'argent, leur fixation à la paroi d'*E. coli*, de *Salmonella typhimurium* (Figure 3.2) et *P. aeruginosa* a été observée par HAADF STEM (High Angle Annular Dark Field Scanning Transmission Electron Microscopy) et décrite (Morones et al., 2005) comme provoquant une modification de la perméabilité de la membrane et un déséquilibre dans le pool d'ATP, entraînant ainsi la mort de la bactérie. Cette perméabilisation est médiée par la fixation forte des Ag(I) aux protéines de surface de la bactérie probablement par l'intermédiaire de leurs groupements thiols. Cette fixation peut cependant être limitée par la charge de surface de la nanoparticule d'argent : une répulsion électrostatique peut s'opérer entre la nanoparticule et la bactérie. Une nanoparticule d'argent chargée négativement sera repoussée par une bactérie présentant des lipopolysaccharides chargés négativement (exemple : les *Bacillus* (-37mV)) ce qui ne sera pas le cas d'une nanoparticule chargée positivement (Badawy et al., 2011).

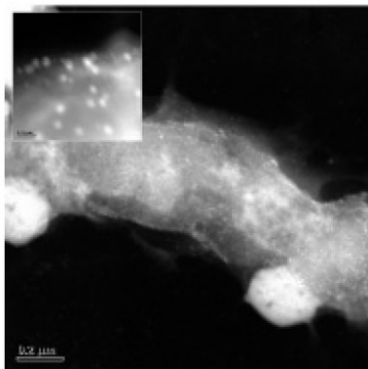


FIGURE 3.2 – *S.typhimurium* exposé à des nanoparticules d'argent.
Les points blancs sur l'image sont des nanoparticules d'argent collées à la paroi de la bactérie.

La deuxième action des nanoparticules d'argent sur la paroi bactérienne est la destruction des liaisons glycosidiques β -1-4 entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmurannique. Cela a été démontrée sur les bactéries G+ (Mirzajani et al., 2011) par chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse par spectrométrie de masse des résidus de la membrane des bactéries avant et après traitement par des nanoparticules. Cette approche a permis de mettre en évidence que la présence de nanoparticules d'argent entraîne le relargage de portions glucidiques de la membrane. Cette action a également été démontrée sur des G- (Li et al., 2010) décrite par la formation de trous, appelés « pits » (Kim et al., 2007) par lesquels s'écoulait le milieu extracellulaire (Sondi et al., 2004).

3.2 Action sur les protéines

Il a été montré que les Ag(I) peuvent se lier à différentes biomolécules et se substituent notamment aux ions métalliques physiologiques. Les protéines liant le cuivre ou le zinc contiennent des motifs riches en histidine, cystéine et méthionine qui sont également de bons ligands des Ag(I), ce qui explique ces substitutions. La situation la plus majoritairement décrite est celle dans laquelle l'ion Ag(I) forme un complexe avec les groupements thiols pour lesquels elle a une affinité picomolaire ou supérieure selon le type de coordination (Veronesi et al., 2015 ; Adams et al., 1999). Dans les protéines ou peptides, on trouve ce type de fonction sur la chaîne latérale de la cystéine. L'interaction de l'argent avec le résidu cystéine est la plus largement décrite mais cet ion possède également une bonne affinité pour d'autres acides aminés tels que la Met (groupement thioether) et l'histidine (groupement imidazole, **Figure 3.3**). La liaison des Ag(I) dans les protéines peut avoir différents impacts. Dans le cas particulier de l'interaction dans le site actif d'une enzyme à la place d'un ion cuivre, cette substitution entraîne l'inactivation de l'enzyme, comme dans le cas de la Super Oxyde Dismutase (SOD) (Chen et al., 2008b). En effet, le cuivre a un rôle redox dans les enzymes et oscille entre les états Cu(I) et Cu(II) que ce l'Ag(I) ne peut pas réaliser.

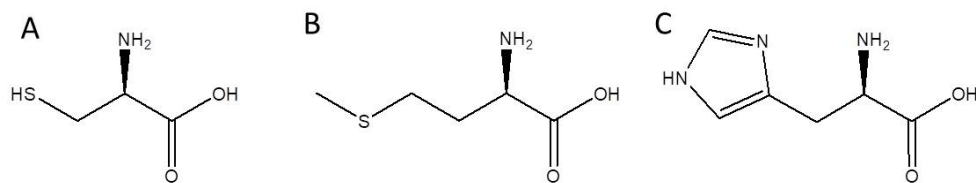


FIGURE 3.3 – Représentation de la structure de différents acides aminés liant l'Ag(I) par leur chaîne latérale. (A) : Cystéine; (B) : Méthionine; (C) : Histidine.

3.3 Action sur l'ADN

L'interaction entre les Ag(I) et l'ADN a été mise en évidence dans des bactéries G⁺ et G⁻ par (MET). Il a été décrit, au centre des bactéries, une région déplétée en électron mais riche en matériel organique et entourée de granules riches en électron très denses contenant une forte quantité d'argent et de sulfure. Cette zone est appelée « ADN condensé » (Li et al., 2011 ; Feng et al., 2000). Cet ADN a perdu sa capacité à se répliquer car seul l'ADN sous une forme dite « relaxée » peut se répliquer. Il a été observé par spectroscopie d'infrarouge par transformée de fourier (FTIR) que l'argent pouvait se fixer sur le N7 de la guanine et le N7 de l'adénine (Arakawa et al., 2001) ou bien se lier aux phosphates (Morones et al., 2005).

3.4 Formation de ROS

Les ROS sont générées à l'intérieur comme à l'extérieur de la bactérie, de manière continue et naturelle, étant à la fois cause et conséquence de l'endommagement de la membrane bactérienne. Ces ROS dérivent de réductions monoélectroniques successives du dioxygène O₂, pour former l'anion superoxyde O₂^{•-} puis le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le radical hydroxyle HO[•]. La SOD et la catalase sont des enzymes qui permettent la transformation de ces espèces réactives en espèces moins toxiques par des réactions de dismutation (**Figure 3.4**), c'est à dire la transformation d'une espèce chimique en deux espèces : l'une oxydée et l'autre réduite. L'espèce chimique de départ joue donc à la fois le rôle de réducteur et d'oxydant (Imlay, 2015).

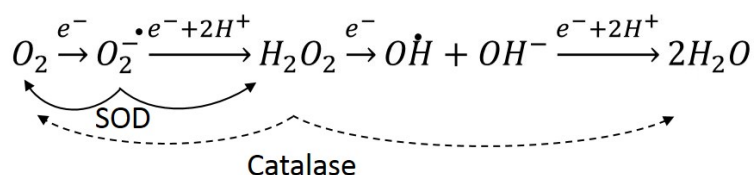


FIGURE 3.4 – Réaction de dismutation de l'oxygène par les enzymes SOD et catalase.

Les ROS ciblent l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides, causant des dommages irréversibles. Les ROS sont continuellement produites à partir de l'oxygène moléculaire comme un sous-produit au cours du métabolisme des cellules aérobies. Des mécanismes de protection ont donc été développés par ces organismes. De plus, à l'intérieur de la bactérie, la destruction de cluster fer/soufre par l'Ag(I) bloque la réaction enzymatique de la respiration et entraîne la production importante de radicaux hydroxyles (Gordon et al., 2010). Les nanoparticules d'argent entraînent davantage de formation de ROS que les ions argent, ce qui est dû au mécanisme de dissolution des nanoparticules produisant des espèces réactives intermédiaires, à l'extérieur de la bactérie, tels que H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ (Liu et al., 2010a)



Cela met en évidence que l'action bactéricide des nanoparticules d'argent n'est pas uniquement due à la libération des ions Ag(I) mais peut également être due aux réaction redox impliquant l'étape d'oxydation de l'Ag(0) en Ag(I), et du stress oxydant associé.

3.5 Mise en place de mecanismes de résistance à l'argent et aux nanoparticules d'argent

Il a été démontré que certaines souches bactériennes peuvent croître dans un environnement riche en argent dont la concentration est de l'ordre du millimolaire, comme les mines d'argent (Klaus et al., 1999), ou les services hospitaliers spécialisés dans les patients brûlés (Mchugh et al., 1975).

La résistance bactérienne aux métaux toxiques est en général médiée par des plasmides contenant des gènes codant des protéines permettant cette résistance. Dans le cas de l'Ag deux cas de figures ont été observés. Le premier consiste en l'expression de protéines permettant l'accumulation et le stockage d'Ag(0) par la bactérie, sous forme de dépôt d'argent (Klaus et al., 1999) dans le periplasme, comme cela a été décrit pour des bactéries telles que *Pseudomonas stutzeri* se développant sur le sol des mines d'argent (Haefeli et al., 1984). Le second est un mécanisme d'efflux d'argent, ou l'argent serait éliminé sous sa forme ionique ce qui a été observé sur des souches bactériennes dans des hôpitaux pour grands brûlés (Chopra, 2007).

La résistance à l'argent via un phénomène d'efflux a été décrite par Simon Silver en 1999 (Gupta et al., 1999) suite à l'identification d'une souche de Salmonelle : *Salmonella Typhimurium*. Ses travaux ont permis de mettre en évidence une famille de protéines, les protéines Sil responsables de la résistance à l'argent et à d'autres métaux (**Figure 3.5**). Les protéines SilE et SilF fixent les ions métalliques et le reste de la machinerie protéique est constituée de deux pompes à efflux : SilP ainsi que le

complexe échangeur de cation/proton SilABC. Les protéines SilE et SilF, malgré un rôle très similaire, ne fixent pas les métaux de la même façon : SilE est une protéine structurée en hélices alpha qui lie l'argent par des résidus histidine et méthionine alors que SilF est sous forme de plusieurs feuillets Beta qui fixent Ag(I) par des résidus méthionine uniquement (Silver et al., 2006).

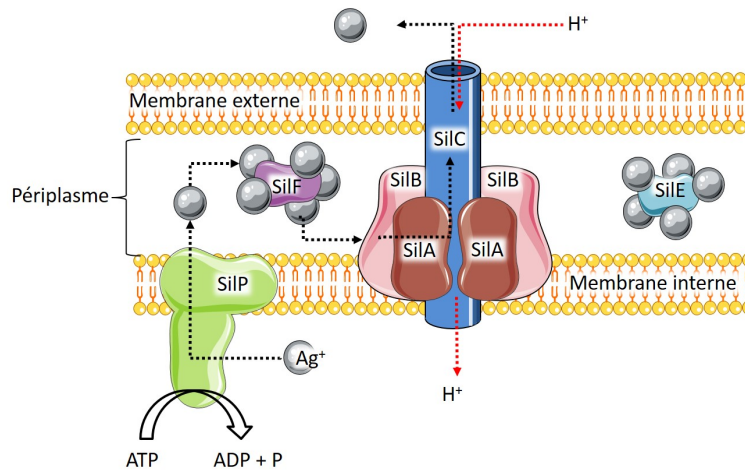


FIGURE 3.5 – Protéines responsables de la résistance bactérienne à l'argent. (Gupta et al., 1999).

Bien que les deux systèmes de résistance permettent la désintoxication de la cellule des Ag(I), les mécanismes en jeu sont complètement opposés, le premier étant basé sur une bio-accumulation et bio-transformation de l'argent dans la cellule sous une forme non toxique alors que le second permet une élimination progressive de l'élément. Ces résistances sont observées dans des milieux riches en Ag(I) et sont basés sur la présence d'un plasmide, ce qui permet le transfert de la résistance entre les bactéries. Cependant un troisième mécanisme de résistance spécifique aux nanoparticules d'argent a été décrit chez *E. Coli* et *P. aeruginosa*. Dans ce cas, après une exposition des bactéries aux nanoparticules d'argent en concentration sub-toxiques, la concentration minimale inhibitrice (CMI) des nanoparticules d'argent augmente progressivement, de pair avec l'observation d'une aggrégation des nanoparticules. Cette aggrégation est due à la sécrétion d'une protéine adhésive, la flagélline, qui va entraîner l'aggrégation des nanoparticules d'argent (Panáček et al., 2018) et de ce fait limiter l'action bactéricide des nanoparticules d'argent. La description de ce mécanisme propose une piste de réflexion sur la résistance des micro-organismes face à un traitement antimicrobien aux nanoparticules d'argent.

Ces multiples modes de résistance qui se développent montrent bien l'importance de l'utilisation raisonnée des biocides à base d'argent, afin d'éviter leur propagation et dissémination dans l'environnement et d'entraîner des résistances massives de ce type.

Chapitre 4

Transformations des nanoparticules d'argent

L'argent est un élément rare dans l'environnement naturel mais son utilisation anthropogénique a radicalement modifié l'écologie en créant des concentrations locales en argent très élevées du fait de son utilisation dans diverses industries générant d'importantes pollutions (*WHO 2002 : silver and Silver compounds*). Vingt-cinq pourcents de la production totale d'argent est dispersée dans les écosystèmes terrestres (deux tiers) et aquatiques (un tiers). La toxicité aigüe de l'argent est dépendante de sa forme chimique et de sa biodisponibilité (Ag(I)) or seule une fraction de l'argent trouvé dans l'environnement est biodisponible, la forme la plus abondante de l'argent dans l'environnement aquatique étant AgCl_2^- (Bryan et al., 1992). Dans ce manuscrit nous allons nous concentrer uniquement sur la toxicologie animale et tout particulièrement humaine. Pour plus d'information sur la transformation des nanoparticules d'argent en dehors de la toxicologie animale et humaine, une revue, *Silver nanoparticle fate in mammals : Bridging in vitro and in vivo studies*, rédigée pendant le temps de ce doctorat, a été publiée dans le journal *Coordination Chemistry Reviews*.

4.1 Transformations selon l'environnement

La principale problématique concernant la toxicité et l'écotoxicité des nanoparticules d'argent est leur fonction de réservoir en ions Ag(I) biodisponibles et toxiques, qui peuvent être libérés progressivement. Cette capacité est cependant régulée par de nombreux paramètres tels que l'état d'agrégation des nanoparticules, leurs tailles, leurs enrobages, etc.

4.1.1 Dissolution oxydative

En milieu aqueux, trois espèces d'argent co-existent i) Ag(0) dans la nanoparticule, ii) Ag(I) lié à la surface de la nanoparticule et iii) Ag(I) en solution.

Dans l'environnement et dans les organismes, les nanoparticules d'argent sont en solution aqueuse et en contact avec différents ions et molécules. Dans ce type de milieu et dans des conditions aérobies, il a été montré que les nanoparticules d'argent sont soumises à un processus de dissolution oxydative conduisant à la libération d'espèces Ag(I) (**Figure 4.1 A**). Ce processus décrit par Liu (Liu et al., 2010b) a montré la nécessité de la présence d'oxygène et de protons pour permettre la dissolution.

Cependant, la dissolution totale des nanoparticules en conditions aqueuses à pH physiologique n'est pas observée. Cela a été expliqué par un modèle théorique du mécanisme de dissolution (Molleman et al., 2017). Celui-ci montre que la dissolution oxydative des nanoparticules d'argent passe par l'intermédiaire de la formation de groupements hydroxyles : « OH », à la surface des nanoparticules liés aux atomes d'Ag(I) de surface. Cette couche stable d'Ag₃OH comprend les deux premières couches atomique d'Ag des nanoparticules et empêche la pénétration des

radicaux oxygénés dans la particule. Ce mécanisme explique la stabilisation des nanoparticules d'argent suite à la libération d'ions argent à pH neutre sans ajout d'oxydant.

4.1.2 Réactivité avec les molécules thiolées

De nombreuses études ont été menées afin de décrire l'impact de molécules présentes dans l'environnement sur les nanoparticules et deux comportements opposés ont été dégagés : celui des oxydants et celui des espèces thiolées. Tandis que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Sigg et al., 2015) ou l'ozone (O_3) (Liu et al., 2010a) induisent la dissolution des nanoparticules d'argent en Ag(I), les molécules thiolées (Battocchio et al., 2012) et le sulfure peuvent conduire soit à la sulfuration de surface de la particule (Levard et al., 2013), (**Figure 4.1 B**) soit à une dissolution lente (Gondikas et al., 2012) (**Figure 4.1 C**). Le premier phénomène, la sulfuration, est presque irréversible puisque la constante de solubilité (K_{sp}) du sulfure d'argent, Ag_2S , est de $6.10^{-51} \text{ mol.L}^{-1}$ (Levard et al., 2012). Ce processus a été décrit comme la principale transformation se produisant sur les nanoparticules d'argent dans les sols et l'environnement (Real et al., 2016) et n'a été décrit que dans certains processus spécifiques chez les mammifères, dans le cas, par exemple de la sulfuration, de nanoparticules présentes dans des implants osseux (Geng et al., 2017).

En ce qui concerne les molécules contenant des thiols, celles-ci se lient avec une forte affinité pour les Ag(I) à la surface des nanoparticules. Cette liaison avec les molécules thiolées va former un nouvel enrobage stabilisant les nanoparticules d'argent et leur offrant une meilleure dispersion en suspension. Selon les molécules et leur capacité chélatante, cela peut également mener à une dissolution de la nanoparticule en arrachant les atomes d'argent à la surface des nanoparticules (Sigg et al., 2015).

4.1.3 Réactivité avec les chlorures

Les chlorures tendent à protéger les nanoparticules d'argent en induisant leur précipitation (**Figure 4.1 D**) (Sigg et al., 2015; Loza et al., 2014). La solubilité de l'Ag(I) est très faible en présence de chlorure ($K_{sp} = 1,77.10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$) (Levard et al., 2012) et il se forme ainsi un précipité d'AgCl à la surface des nanoparticules d'argent par complexation avec les ions Ag(I) de surface. Ce précipité va protéger la nanoparticule d'argent de la dissolution oxydative mais va entraîner une précipitation des nanoparticules entre elles médiée par des forces de Van der Waals (Axson et al., 2015; Pfeiffer et al., 2014) puis renforcée par une interpénétration des édifices.

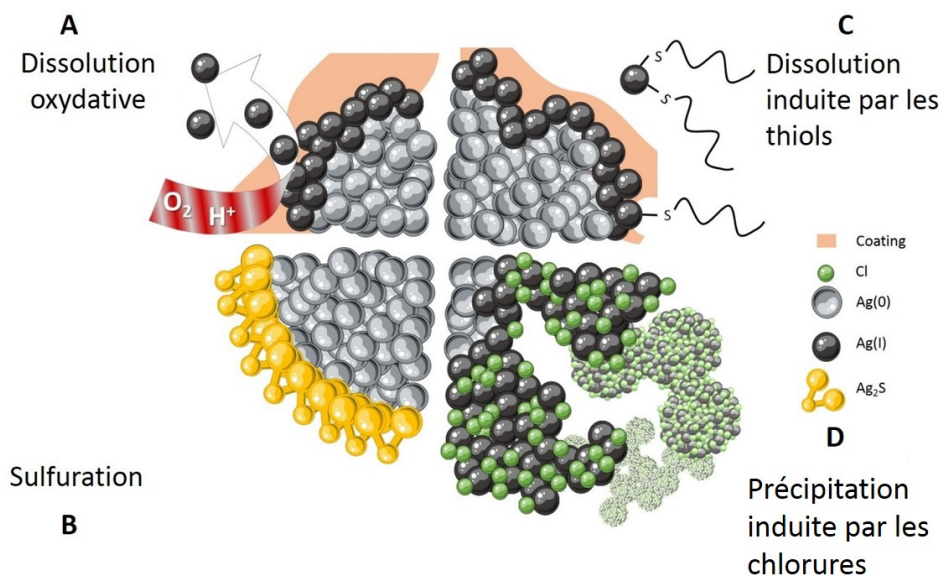


FIGURE 4.1 – Résumé des transformations que subissent les nanoparticules d'argent dans l'environnement. (A) : dissolution oxydative qui entraîne la libération d'Ag(I) dans le milieu extérieur, **(B) :** sulfuration qui forme une couche d' Ag_2S à la surface de la nanoparticule et empêche la libération d'Ag(I), **(C) :** dissolution induite par les thiols qui arrache les Ag(I) de la surface des nanoparticules par la liaison Ag - S et **(D) :** précipitation induite par les chlorures qui entraîne la précipitation des nanoparticules d'argent et la formation d'édifices de plus grandes tailles (Marchioni et al., 2018b).

4.2 Toxicité humaine et animale

4.2.1 Assimilation et transformation par l'organisme

Avant de s'intéresser davantage aux risques que représentent les nanoparticules d'argent pour l'Homme, il est nécessaire de se pencher au préalable sur les modes d'exposition. On retrouve trois catégories principales de produits contenant des nanoparticules d'argent : les produits alimentaires, les biens de consommation et les dispositifs médicaux (Bouwmeester et al., 2007). L'utilisation des nanoparticules d'argent dans les cosmétiques et autres produits de la vie quotidienne entraîne une exposition orale par ingestion, dermique par contact direct via les textiles, pulmonaire par inhalation et parentérale via les dispositifs médicaux. L'absorption des nanoparticules d'argent ou de l'argent par l'organisme sain dans le cas d'une exposition dermique ou pulmonaire est cependant difficile à prédire.

4.2.2 Administration par voie orale

Le risque d'exposition majoritaire pour l'Homme est la voie orale et ce par contamination de l'eau et de la nourriture. On retrouve en effet des nanoparticules d'argent à toutes les étapes de la production agro-alimentaire. Leur but est de réduire le risque d'exposition du consommateur à un aliment sujet à une contamination

bactérienne (Wijnhoven et al., 2009). Il est cependant nécessaire de garder à l'esprit que, dans la majorité des cas, les nanoparticules d'argent sont utilisées comme revêtement sur les emballages alimentaires et sont ainsi fixées à un matériel et donc a priori inertes. La seule exposition de l'Homme à l'argent est ainsi médiée par le relargage des nanoparticules d'argent des plastiques ou le relargage d'ions argent par les nanoparticules, relargage que l'on sait être minime vers les aliments. Une autre voie d'exposition directe par ingestion concerne l'argent colloïdal contenu dans des compléments alimentaires vendus pour leurs vertus purifiantes ou dans des sprays de désinfectants alimentaires à appliquer directement sur les aliments (**Paragraphe 2.1.3**). Des études ont été menées sur les populations de différents pays : en Italie, Clemente et al. ont déterminé une ingestion inférieure à $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$ (Clemente et al., 1977), alors qu'au Canada Gibson et al. ont trouvé une quantité de $7 \mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$ sur un groupe de femmes (Gibson et al., 1984). A la même époque, une autre équipe en Angleterre a mesuré une valeur moyenne de $27 \mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$ (Hamilton et al., 1973). Ces valeurs diffèrent donc entre elles de deux ordres de grandeurs.

Néanmoins, après une exposition orale aux nanoparticules d'argent, seulement 1 à 10 % de l'argent est absorbé au niveau intestinal (Park et al., 2010; Demin et al., 2015). A la suite d'une administration orale d'argent (sous forme nanoparticulaire ou ionique), celui-ci est retrouvé dans différents organes (rein, rate, foie, poumon) sous forme de nanoparticules (quantifié par Single Particle-ICP-MS) (Loeschner et al., 2011) composées dans ce cas d'argent, de soufre et de césium (déterminé par Microscopie électronique couplée à la spectroscopie à dispersion d'énergie : MET-EDX).

Afin de comprendre comment des nanoparticules d'argent incluant du soufre se retrouvent dans les organes, des expériences *in vitro* mimant les différentes étapes de la digestion ont été menées sur des nanoparticules d'argent. Il a ainsi été mis en évidence que le transit à travers un milieu gastrique simulé entraîne une dissolution massive des nanoparticules d'argent (95 % de dissolution) (Bove et al., 2017). Puis, le passage à travers un milieu intestinal simulé entraîne la formation de gros agrégats contenant de l'argent et du soufre (**Figure 4.2**).

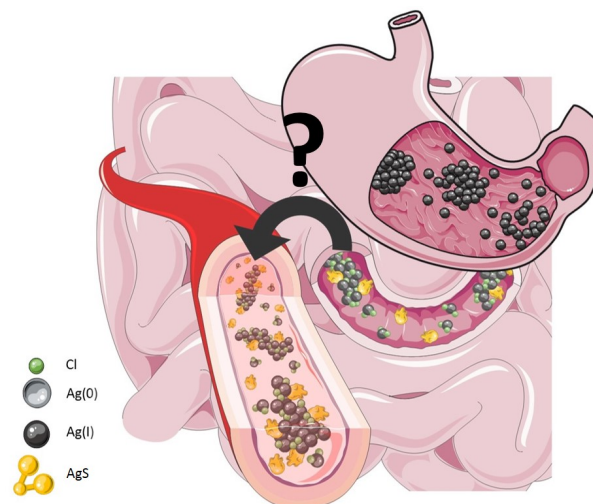


FIGURE 4.2 – Représentation schématique des transformations des nanoparticules d'argent lors de leur passage à travers le tractus digestif et passage éventuel dans le sang, suite à une dissolution au niveau de l'estomac suivi de la formation d'agrégat d'AgS au niveau intestinal (Marchioni et al., 2018b).

L'ensemble de ces études suggère que des nanoparticules d'argent secondaires contenant de l'argent, du chlore et du soufre sont formées à la suite de la transformation des nanoparticules d'argent dans le tractus gastro-intestinal. Il n'est cependant pas encore déterminé si les précipités qui se sont formés dans l'intestin transloquent ensuite dans la circulation sanguine pour être distribués dans les organes ou si des espèces d'Ag(I) solubles présentes dans l'intestin passent à travers la barrière intestinale et servent de substrats à la formation de nanoparticules secondaires dans les différents organes.

Lorsque l'absorption de l'argent nanoparticulaire est comparée à l'absorption de l'argent ionique administré par voie orale, on constate que la distribution des espèces d'argent à travers l'organisme se fait de la même manière alors que la quantité d'argent absorbée est inférieure lorsque l'argent est administré sous forme nanoparticulaire (2 à 3 fois inférieur). Cette information est à corrélérer avec une forte élimination de l'argent dans les fèces (Loeschner et al., 2011 ; Zande et al., 2012). Cependant ces deux équipes présentent des résultats contradictoires. Van der Zande administre des nanoparticules d'argent de 15 nm de diamètre enrobée de PVP à une concentration dix fois plus élevée (90 mg.kg^{-1}) que l'argent ionique administré (9 mg.kg^{-1}). Il propose l'hypothèse que l'unique espèce d'argent absorbable par l'organisme dans le cadre d'une ingestion de nanoparticules soit l'Ag(I) car ses résultats semblent être cohérentes avec cette hypothèse. Dans les travaux de Loeschner qui administre une quantité équivalente d'argent ionique et de nanoparticules d'argent de 14 nm de diamètre enrobée de PVP, l'absorption de l'argent nanoparticulaire est de 33 %, alors qu'en se basant sur l'hypothèse de Van der Zande, les nanoparticules d'argent utilisées pour ces expériences contiennent seulement 13 % d'Ag(I) en solution, qui devrait être assimilé. Il est envisageable que dans les expériences de Van der Zande, la barrière intestinale soit saturée du fait de la forte concentration d'argent administrée. Ainsi ce type d'étude apporte davantage de questions que de réponses car elles ne permettent pas d'expliquer cette différence d'assimilation.

Administration par voies parentérales

Les dispositifs médicaux contenant ou recouverts de nanoparticules d'argent conduisent à une exposition directe dans les fluides biologiques. Cela a d'ailleurs été mis en évidence sur une cohorte de 30 patients brûlés et soignés avec des pansements Acticoat contenant des nanoparticules d'argent, chez qui de l'argent a été retrouvé dans les urines (Vlachou et al., 2007 ; Trop et al., 2006).

4.2.3 Clairance

Quel que soit le mode d'administration des nanoparticules, les différentes espèces d'argent arrivant dans le sang se retrouvent en contact avec une grande variété de protéines, de ligands thiolés et d'ions chlorures. Les protéines et peptides (comme l'albumine ou le glutathion) vont se lier à l'argent soluble dans le sang ainsi qu'aux nanoparticules circulantes (**Paragraphe 4.2.4**). Une multitude d'espèces d'argent vont donc coexister dans le sang et ce particulièrement après administration orale du fait des nombreuses transformations déjà subies par les nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal. L'accumulation de l'argent dans l'organisme va de ce fait largement varier en fonction du mode d'administration. Pour exemple, l'administration par voie intraveineuse d'une dose d'argent nanoparticulaire (Park et al., 2010) entraîne une concentration d'argent totale dans le sang dix fois supérieure à celle obtenue avec cette même dose administrée par voie orale (**Figure 4.3**).

L'argent est également rapidement excrété après une administration orale de nanoparticules, tandis que la concentration d'argent dans le sang reste relativement constante pendant 5 jours après l'injection des nanoparticules d'argent avant de diminuer graduellement au fil du temps. Le mode d'administration a un réel impact sur la quantité d'argent accumulé dans les organes (Park et al., 2011). La quantité d'argent mesurée dans les différents organes testés reste également constante pendant au moins un mois lors d'une administration intraveineuse de nanoparticules d'argent de 8 nm de diamètre enrobée de citrate. De plus, des nanoparticules d'argent ont été mises en évidence dans le poumon, la rate, le foie, le rein et le cerveau dans des sections de tissus observés par MET (Park et al., 2011 ; Dziendzikowska et al., 2012).

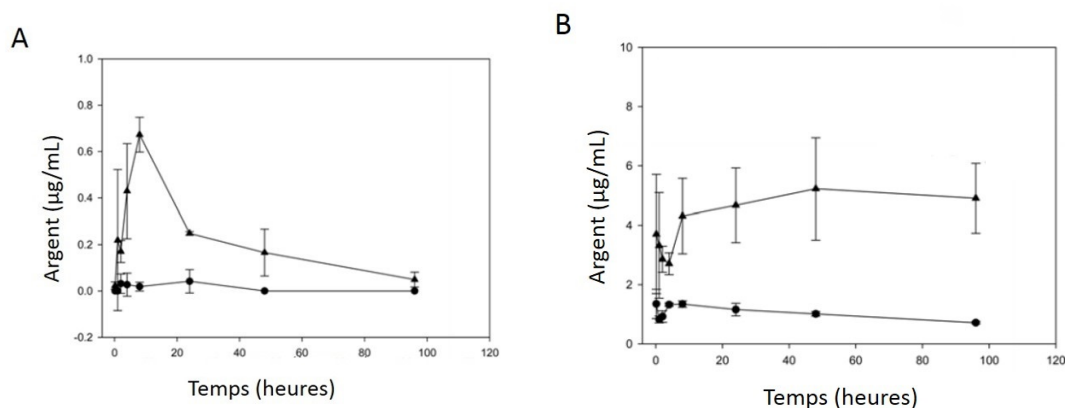


FIGURE 4.3 – Suivi de la concentration en argent dans le sang par ICP-MS au cours du temps en fonction de la voie d'administration : (A) orale et (B) intraveineuse. La dose administrée est représentée par des triangles : 10mg/kg et par des disques (1mg/kg) (Park et al., 2011).

Cependant, aucune analyse élémentaire plus poussée (EDX) n'a été effectuée, ce qui serait nécessaire (i) pour prouver que ces dépôts sont des nanoparticules d'argent et pas simplement des dépôts d'osmium (Os) et (ii) identifier si ce sont des nanoparticules d'argent dites « pristine » ou s'il pourrait s'agir d'agrégats d'argent et de soufre, comme il en a été observé dans les organes après une administration orale de nanoparticules d'argent (Loeschner et al., 2011). Ces différences dans l'excrétion de l'argent par l'organisme sont probablement dues aux faits des transformations subies par l'argent. En effet, les nanoparticules d'argent ingérées sont transformées et arrivent dans le sang dans un état oxydé Ag(I) sous forme d'espèces mixtes Ag - S - R, AgCl ou sous forme liées à des protéines solubles voire sous forme d'agrégats. Les espèces solubles sont facilement excrétées hors du corps ainsi que les précipités composés d'Ag(I). Au contraire, les nanoparticules formées d'Ag(0) (et donc non ou peu transformées) ont un temps de persistance dans le corps beaucoup plus long car les cellules doivent d'abord les transformer en espèces Ag(I) pour pouvoir mobiliser l'argent et l'excréter. De fait, la spéciation de l'argent n'influe donc pas uniquement sur le devenir cellulaire mais également sur la biodistribution et la clairance des espèces.

L'élimination de l'argent se fait essentiellement par voie rénale. Cependant, l'accumulation de l'argent dans le foie souligne le fait que l'élimination biliaire de l'argent via les fèces est également à prendre en compte. Les études actuelles se concentrent essentiellement sur les fluides biologiques (urine, salive, sang).

4.2.4 Formation de la corona protéique dans les fluides biologiques

Une fois en contact avec les fluides biologiques, les nanoparticules d'argent sont en contact avec un mélange complexe de protéines, de peptides et d'acides aminés présents dans les milieux intra et extra cellulaire. Il a été démontré que les protéines présentes dans le plasma comme l'albumine, les IgG ou le fibrinogène (Deng et al., 2009) enrobent les nanoparticules pour former une couronne de protéines, appelée corona protéique (Durán et al., 2015). Dans le cas de nanoparticules d'argent enrobées par des molécules organiques faiblement liées comme du citrate, les protéines prennent sa place à la surface des nanoparticules (Podila et al., 2012). Cependant, dans le cas de polymères tels que le PVP, des divergences existent dans la littérature entre la description de protéines se liant à l'enrobage (Podila et al., 2012), ou le déplaçant pour se fixer sur la nanoparticule (Miclăuş et al., 2014). En outre, le dichroïsme circulaire a révélé que les protéines présentent dans la corona protéique ont tendance à se déplier lors de la liaison à la nanoparticule (Shannahan et al., 2015).

Les données concernant l'influence de la corona protéique sur l'entrée dans les cellules et la toxicité sont plutôt convergentes. La corona protéique a tendance à limiter l'entrée dans les cellules des nanoparticules d'argent chez les mammifères

mais cela ne diminue que dans une faible mesure la cytotoxicité. Cette corona protéique est également rapidement libérée après l'entrée cellulaire des nanoparticules et influence l'activation cellulaire et la toxicité par des mécanismes encore inconnus (Shannahan et al., 2015).

4.3 Mécanisme de toxicité

La problématique des nanoparticules d'argent dans les produits alimentaires ayant déjà été discuté dans le **paragraphe 4.2.2**, nous nous concentrerons donc sur l'exposition dite parentérale. En ce qui concerne les dispositifs médicaux, les avancées scientifiques et techniques ont permis la mise sur le marché de nombreux produits. L'enrobage des dispositifs médicaux est effectué par un simple dépôt par vaporisation ou imprégnation, les nanoparticules ne sont pour ainsi dire pas « fixées » à la surface de l'objet. Ainsi, les dispositifs médicaux implantatoires entraînent une exposition systémique et donc une accumulation élevée d'argent, contrairement à des produits de consommation courante où les nanoparticules sont piégées dans des matériaux de plus grande taille.

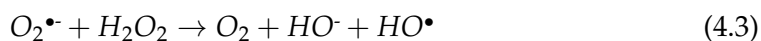
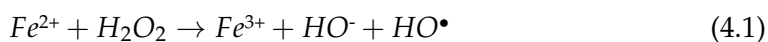
4.3.1 Généralités sur la toxicologie des nanoparticules d'argent chez les mammifères

Peu d'études rétrospectives existent concernant l'utilisation de dispositifs médicaux contenant des nanoparticules d'argent chez l'Homme. Les seules qui ont été publiées concernent l'utilisation des pansements pour grands brûlés Acticoat® (Vlachou et al., 2007; Trop et al., 2006). Dans ce contexte, il a été mis en évidence sur un patient de 17 ans brûlé sur 30 % de la surface corporelle, qu'à la suite d'un traitement de ses brûlures par les pansements Acticoat® le patient a présenté un développement d'argyrie. La mesure de l'activité des enzymes hépatiques aspartate amino transférase (ASAT), alanine amino transférase (ALAT) et gamma-galactosyl transférase (gamma-GT) était plus élevée au cours de l'exposition à ces pansements (Trop et al., 2006). Dans une autre étude sur une cohorte de patients plus importante, la mesure de la concentration de l'argent dans le sang suite aux soins d'une brûlure par les pansements Acticoat® a souligné le fait qu'une quantité significative d'argent a été mesurée dans le sang dès le premier jour d'utilisation des pansements et que celle-ci retourne à la normale au bout de 3 mois après la fin du traitement (Vlachou et al., 2007).

4.3.2 Homéostasie des métaux chez les eucaryotes

A l'intérieur de la cellule, les métaux et le potentiel rédox intracellulaire ont une relation intriquée et complexe qui peut aboutir à l'activation de voies spécifiques de

signalisation cellulaire. Un stress oxydatif peut notamment être induit par la présence de certains métaux sous forme libre dans la cellule comme le cuivre ou le fer. Ces deux métaux peuvent réaliser des réactions de type Fenton décrite par l'équation 4.1, Haber-Weiss décrite par l'équation 4.2 et résultant en l'équation 4.3 :



Les radicaux OH^\bullet ainsi formés entraînent des dommages importants pour un large panel de biomolécules comme les amino-acides ou les acides nucléiques, et peuvent ainsi induire des mutations dans le genome. Le comportement rédox des ions métalliques dépend intrinsèquement de leur état d'oxydation et de coordination et de leur accessibilité à l'intérieur du complexe métallique. Ainsi les ions fer et cuivre liés aux protéines et aux enzymes ne sont plus disponibles pour produire des réactions dites « dangereuses », comme le sont les ions Fe(II) et Cu(I) avec le peroxyde d'hydrogène qui sont particulièrement réactifs et mutagènes.

Dans la plupart des cas, le maintien de l'homéostasie des ions métalliques intracellulaires dépend de transporteurs, de chélateurs (incluant des métallochaperonnes et des protéines de stockage) et de régulateurs. Les métallothionéines (MT) peuvent lier une large variété d'ions métalliques et sont donc capables de séquestrer les métaux toxiques en les échangeant avec le zinc naturellement lié à leur site de liaison (ce qui permet donc un échange rapide). Les MT ont un rôle clef dans la régulation cellulaire de l'homéostasie des métaux. L'augmentation de la concentration en ions métalliques intracellulaires entraîne la surexpression des gènes codant pour les MT *via* le facteur de transcription MTF-1 (metal responsive element-binding transcription factor-1), qui, une fois lié à des ions Zn(II), va transloquer au noyau et induire l'expression entre autres des MT. Celles-ci vont donc séquestrer les métaux en excès dans la cellule avec des affinités dans l'ordre suivant : $Zn^{2+} < Cd^{2+} < Cu^+ < Ag^+$ (Ba et al., 2009). L'activation de MTF-1 intervient lorsque les niveaux de zinc labile intracellulaire s'élèvent au-dessus d'une concentration critique.

Dans la plupart des cas, le maintien de l'homéostasie des ions métalliques intracellulaires est combiné avec un transport contrôlé de ces ions au niveau intracellulaire par des métallo-chaperonnes spécifiques. L'homéostasie à l'échelle de l'organisme de plusieurs ions métalliques (cuivre, zinc, fer, manganèse), peut être décrite en plusieurs étapes clés : i) l'import, ii) la distribution et/ou stockage, iii) la régulation et iv) l'élimination.

L'homéostasie du cuivre dans l'organisme est assurée par l'absorption intestinale et l'excrétion biliaire de cet élément. L'entrée du cuivre est effectuée par les cellules polarisées de l'intestin par lesquelles 40 % du cuivre alimentaire est absorbé. Le cuivre traverse la paroi apicale par le transporteur membranaire CTR1 qui assure le transport du cuivre à haute affinité grâce à des résidus méthionines et histidines situés à l'extrémité extra-cellulaire (Lutsenko, 2010). Dans le cytoplasme (**Figure 4.4**), les ions Cu(I) sont d'abord pris en charge par le glutathion (concentration intracellulaire 1 - 10 mmol.L⁻¹, Hong et al., 2006) puis les ions Cu(I) transitent vers des sites d'affinité de plus en plus hautes, avec dans un premier temps les métallochaperones spécifiques telles que ATOX ou CCS, qui délivrent le cuivre à leurs protéines cibles, respectivement ATP7 et SOD1. En outre, il convient de spécifier qu'il existe différents systèmes de soutien comme le GSH (Ba et al., 2009) en tant que "substitut" pour certaines chaperones et / ou métallo-enzymes du cuivre. La métallo-chaperonne ATOX transfère le cuivre à des ATPase de type P (nommée ATP7 sur la **Figure 4.4**) transportant le cuivre, parmi lesquelles les protéines de la maladie de Wilson (ATP7B) (présentes dans les hépatocytes) et de Menkes (ATP7A) (Lutsenko, 2016) (présentes dans les autres types cellulaires). Ces ATPases permettent le passage du cuivre (en tant que Cu(I)) dans la lumière de l'appareil de Golgi. Une fois à l'intérieur de l'appareil de Golgi, le cuivre est libéré et peut se lier à ses protéines cibles dont la ceruloplasmine qui fait partie de la voie de sécrétion. En cas d'excès de cuivre, les MT sont surexprimées et l'ATP7 (Menkes ou Wilson) migre à la membrane plasmique et permet i) dans le cas d'une cellule quelconque, l'expulsion du cuivre dans la circulation sanguine où il est principalement lié à l'albumine ou la ceruloplasmine, puis le cuivre est capté par les cellules hépatiques, ii) dans le cas d'une cellule hépatique, le cuivre est libéré dans les canalicules biliaires pour en éliminer l'excès. Le foie constitue donc l'organe central de l'homéostasie du cuivre. Le trafic intracellulaire du cuivre est très complexe et implique de nombreux sites de liaison utilisant des thiolates ce qui permet de réguler le trafic du cuivre de manière couplée au statut rédox de la cellule.

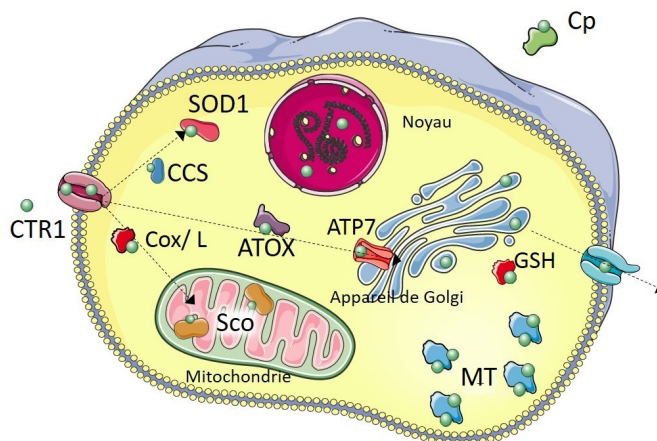


FIGURE 4.4 – Homéostasie du cuivre dans une cellule eucaryote. Entrée du cuivre par CTR1 et transfert par des chaperone aux protéines ciblées : ATP7, SOD1, cytochrome c oxydase. Le cuivre apporté par ATOX entre dans l'appareil de golgi par le transporteur ATP7 et est ensuite incorporé à la ceruloplasmine (Cp) dont il est le cofacteur. Dans le cytoplasme le cuivre en excès est séquestré par les MT.

Bien que le Zn(II) ne puisse pas participer directement à des événements rédox, 3 à 10 % des protéines codées dans le génome des mammifères lient du zinc qui est essentielle à leur activité, ce qui entraîne un risque non négligeable pour l'activité cellulaire dans le cas d'une modification de la concentration intracellulaire de zinc (Sekler et al., 2007). Il a été montré que l'augmentation de la forme libre Zn^{2+} dans la cellule neuronale était un facteur de risque d'épisode ischémique (Frazzini et al., 2006). Ensemble, les protéines ZnT et MT sont capables de réduire efficacement la concentration intracellulaire de Zn(II) labile (Figure 4.5). La protéine ZnT1 permet d'excréter le zinc intracellulaire en excès et les MT séquestrent efficacement les ions Zn(II) libres. L'élimination est facilitée par les échangeurs Na(I) / Zn(II).

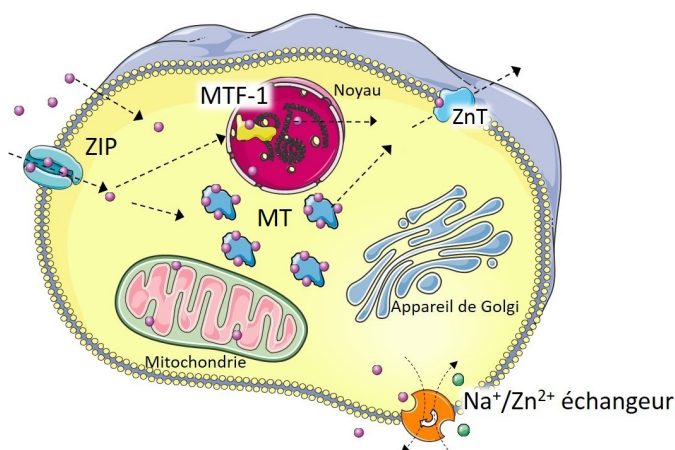


FIGURE 4.5 – Homéostasie du zinc dans une cellule eucaryote. Le zinc entre dans la cellule par la protéine ZIP et est séquestré dans le cytoplasme par les MT. Le zinc est éliminé par le transporteur ZnT ou un échangeur sodium/zinc.

Comme mentionné à la section ci-dessus, les ions cuivre et fer libres sont associés à des phénomènes de stress oxydatif, en particulier avec la production de radicaux hydroxyles *via* la réaction de Fenton. Il est donc surprenant que le niveau de fer libre à l'intérieur de la cellule soit considérablement plus élevé que celui du cuivre et du zinc. L'homéostasie du fer a été étudiée largement au cours des dernières décennies. En résumé, dans le plasma, le fer présent sous forme de Fe(II) se lie à la protéine de transport transferrine lors de son oxydation en Fe(III), un processus assisté par la protéine plasmatique à cuivre, la céruloplasmine. La transferrine est ensuite importée dans la plupart des cellules humaines par endocytose après fixation à un récepteur spécifique qui garantit que le fer ne soit pas libéré lors du transport membranaire. La transferrine contient environ 99 % du fer plasmatique, et les cellules expriment des récepteurs à la transferrine au niveau de leurs membranes plasmiques pour contrôler son import. Le fer à l'intérieur de la cellule est ensuite libéré après acidification des vésicules puis il est soit stocké dans la ferritine sous forme de Fe(III) soit lié au site métallique de metalloenzymes. Il est important de noter qu'il existe également des exemples de chaperonnes du fer similaires aux chaperonnes du cuivre, comme la frataxine qui intervient dans l'insertion du Fe(II) dans les clusters fer / soufre ; les Ferrochelatase permettant l'insertion du fer dans l'hème au niveau des mitochondries.

4.3.3 Impact de l'argent sur l'homéostasie des métaux

L'argent n'est pas un élément physiologique et la structure électronique de l'Ag(I) est très similaire de celle du Cu(I) : [Kr] 5s¹ 4d¹⁰ pour l'argent et [Ar] 4s¹ 3d¹⁰ pour le cuivre.

Le cuivre joue un rôle fondamental de cofacteur de certaines enzymes, catalysant des réactions d'oxydo-réduction, notamment anti-oxydantes comme dans la superoxyde dismutase cuivre-zinc (SOD1). Il possède également une place importante dans le métabolisme du glucose et du fer et entre en jeu dans les réactions auto-immunes.

Cu(I) et Ag(I) sont considérés comme des acides mous se liant préférentiellement à des ligands mous tels que les thiols ou les thioéthers. Les équilibres thermodynamiques vont ainsi conduire les ions Ag(I) vers des sites de liaison impliquant des thiols qui ont une très haute affinité pour ces cations métalliques (pmol.L⁻¹). Les ions Ag(I) pourraient donc suivre des voies de trafic similaires aux ions Cu(I) et donc être pris en charge par des protéines chaperonnes du cuivre telles qu'ATOX et finir dans les sites de liaison de cupro-enzymes telles que la SOD1 (Ciriolo et al., 1994). De ce fait, si l'argent prend la place du cuivre les enzymes ne pourront pas réaliser les réactions rédox nécessaires à leur activité. Ce mécanisme devient un problème pour la cellule dès que les thiols intracellulaires (GSH, MT, ...) sont complexés car ils sont impliqués dans le maintien rédox de la cellule et la défense contre le stress oxydant. Aussi longtemps que des thiols réduits libres sont présents, aucun ion Ag(I)

libre ne sera présent dans la cellule et il en va de même pour le cuivre (Chen et al., 2008a). La liaison des ions Ag(I) aux thiols réduits libres va ensuite entraîner une augmentation de la concentration intracellulaire de ROS, ce qui génèrera des dommages cellulaires. C'est l'une des principales causes communément proposées de la cytotoxicité des nanoparticules d'argent.

Ag(I) peut également remplacer Zn(II) lié aux thiols et donc perturber l'homéostasie du zinc qui est essentielle pour de nombreuses fonctions cellulaires. Le Zn [Ar] $4s^2 3d^{10}$ est le métal le plus abondant dans la cellule, sous forme de Zn(II) et permet la structuration de domaines protéiques, et donc la fonctionnalisation d'un enchaînement d'acides aminés afin d'en obtenir une activité précise (Pearson, 1963). C'est notamment le cas pour les doigts de zinc qui sont des sites à zinc tétracoordinés sous formes d'une hélice α et de deux feuillets β . Ils sont notamment nécessaires pour la reconnaissance de séquences d'ADN très spécifiques par des facteurs de transcription contenant des motifs à doigts de zinc. Les protéines à doigt de zinc représentent dans leur ensemble 3 % du génome humain. Le remplacement du zinc dans ces domaines lors de l'exposition aux nanoparticules d'argent a été proposé au cours d'une étude de l'équipe, travail qui est en cours de soumission. Dans un dernier temps, il a été mis en évidence que l'argent déplaçait l'équilibre des centres fer-soufre engagés dans de nombreuses réactions enzymatiques, bloquant l'activité enzymatique de ces dernières, et augmentant ainsi le pool de métaux libres dans le cytoplasme, tout en monopolisant les défenses de la cellule face aux surcharges en ions métalliques.

4.3.4 Entrée des nanoparticules d'argent dans la cellule

L'entrée des nanoparticules dans les cellules se fait par endocytose comme cela a pu être mis en évidence dans de nombreux types cellulaires. Des images de TEM ont par exemple permis de visualiser des invaginations de la membrane plasmique se formant autour des nanoparticules (Veronesi et al., 2016a). Ce type d'études a été menée sur des macrophages, cellules bien connues pour leur capacité à phagocytter, mais aussi sur des cellules pulmonaires (Seiffert et al., 2015), ovariennes (Jiang et al., 2015), hépatocytaires (Veronesi et al., 2016a) ou sur des organismes modèles comme *Caenorhabditis elegans* (Maurer et al., 2016) ou *Peringia ulvae*. Aucun mécanisme d'endocytose spécifique n'a été identifié à ce jour, pas même pour un type donné de nanoparticules d'argent (taille, forme et enrobage défini). En effet, aucun inhibiteur d'une voie d'endocytose, parmi les plus connues : clathrine, cavéoline ou pinocytose ou phagocytose (Doherty et al., 2009), n'a permis de bloquer complètement l'entrée des nanoparticules d'argent dans les cellules mammifères ou chez les organismes modèles. Le seul moyen d'abolir l'entrée des nanoparticules dans les cellules est de les placer à 4°C, température pour laquelle l'activité métabolique et les transports actifs des cellules mammifères sont arrêtées.

4.3.5 Dissolution endosomale

Une fois endocytée, la corona protéique se dissocie des nanoparticules (Shannahan et al., 2015), laissant les nanoparticules nues et les atomes d'argent à leur surface exposés au milieu endosomal. Simultanément, le processus de maturation de l'endosome en lysosome a lieu, entraînant une diminution du pH dans la vésicule.

Comme il a été montré *in vitro*, l'acidification entraîne la dissolution des nanoparticules par un mécanisme de dissolution oxydative. Des observations faites par microscopie électronique ont mis en évidence sur des coupes de cellules vingt-quatre heures après exposition à des nanoparticules d'argent que la taille des nanoparticules dans les endo-lysosomes diminuait au cours de leur maturation (**Figure 4.6**). Dans le cas de l'assimilation de nanoparticules d'argent de 100 nm, après 24 heures (Veronesi et al., 2016a), les vésicules lysosomales ne contiennent plus que des nanoparticules autour de 20 nm. Il est important de remarquer que l'augmentation de l'acidité dans le milieu endo-lysosomal n'est pas l'unique responsable de la dissolution nanoparticulaire. Au cours de ce processus de maturation, la concentration en chlorure dans les vésicules augmentent à 20 - 30 mmol.L⁻¹ dans les endosomes précoces et jusqu'à 50 - 70 mmol.L⁻¹ dans les endosomes tardifs, dont le pH est respectivement de 7 et 5,5 (Huotari et al., 2011). La dissolution oxydative des nanoparticules d'argent prend donc place en présence de concentrations croissantes de chlorure qui favorise la production d'espèces AgCl_x. L'équilibre entre l'argent sous forme nanoparticulaire et Ag(I) est déplacé vers les espèces solubles car elles sont présentes dans toute la cellule comme cela a été montré par Veronesi et al. (Veronesi et al., 2016a), probablement transportées à travers la membrane endosomale vers le cytoplasme.

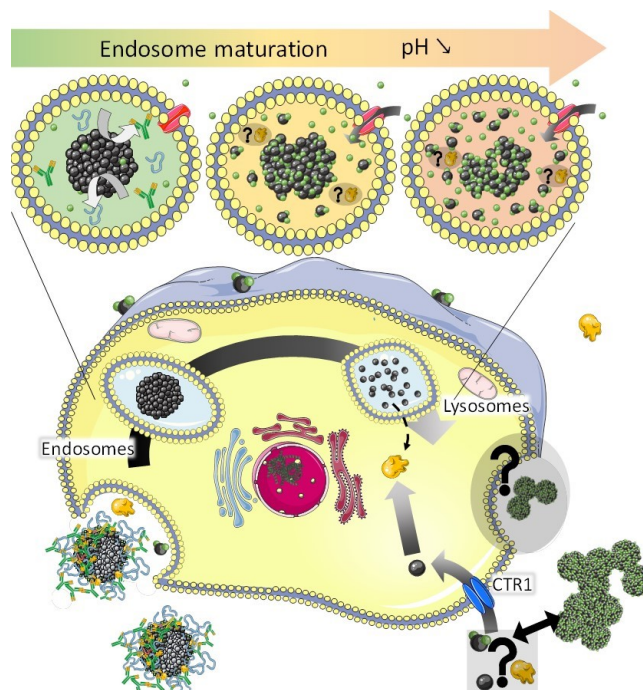


FIGURE 4.6 – Représentation schématique de l'internalisation par une cellule eucaryote et de la dissolution endosomale des nanoparticules d'argent par acidification. (Marchioni et al., 2018b)

4.3.6 La spéciation de l'argent intracellulaire

L'argent intracellulaire se trouve principalement sous deux formes : AgSR_x et $\text{Ag}(0)$ (Jiang et al., 2015; Veronesi et al., 2016a). L'évolution du ratio entre les deux formes diffère en fonction du type cellulaire, du type de nanoparticules et de la dose et du temps d'exposition. Les études par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) ont permis de prouver que la complexation de l'argent que nous retrouvons sous forme d'espèces organothiolées avec une coordination AgS_2 et AgS_3 , correspondent, respectivement, à des complexes avec le glutathion et les MT. De plus, le ratio entre les deux coordinations varie en fonction des conditions (type cellulaire, exposition, ...). Ces résultats démontrent que la dissolution des nanoparticules d'argent et la distribution des différentes espèces de l'argent au sein des cellules sont médiées par des espèces organothiolées, majoritairement le glutathion et les MT à cause de leur abondance dans les cellules soumises à un stress métallique. Les molécules thiolées minoritaires mais possédant un thiol réduit libre complexeront tout aussi bien les ions $\text{Ag}(I)$ libérés par les nanoparticules d'argent, ceci pouvant perturber le métabolisme cellulaire notamment le statut redox.

Ces interprétations des données XAS sont en accord avec les résultats de la quantification d'ARN messager après exposition à des nanoparticules d'argent qui ont mis en évidence une surexpression de la MT et de la Glutamate-cystéine ligase (GCLM) (enzyme limitante dans la biosynthèse du glutathion). L'hypothèse proposée est donc que les ions $\text{Ag}(I)$ libérés des endo-lysosomes se lient en première

instance au glutathion et aux MT exprimées à un niveau basal, déplaçant ainsi les ions Zn(II) (Liu et al., 2017). Les ions Zn(II) libérés vont se lier au facteur de transcription MTF-1 ce qui va permettre la mise en place d'un système de défense face au stress métallique, dont la surexpression de MT. Néanmoins, si la concentration en ions Ag(I) libérés est trop importante, ce système de défense sera dépassé et la capacité des molécules thiolées à exercer leur action de défense de la cellule face au stress oxydatif va se trouver très limitée voire nulle. La concentration des espèces réactives de l'oxygène devrait donc augmenter et entraîner des dommages oxydatifs dans la cellule.

En conclusion, nous pouvons décrire les nanoparticules d'argent comme des chevaux de Troie, qui vont faire entrer une quantité massive d'argent dans les cellules par endocytose. Les nanoparticules d'argent composées d'Ag(0), donc non toxique vont se solubiliser dans les vésicules endosomales et lysosomale qui s'acidifient, et qui va donc libérer des Ag(I), toxiques. Ceux-ci vont être complexés dans le cytoplasme par des molécules thiolées, qui sont impliquées de l'homéostasie des métaux. Ce processus va donc impacter l'homéostasie métallique intracellulaire et entraîner une toxicité. Les nanoparticules d'argent sont isolées de notre organisme par plusieurs barrières : cutanée et intestinal notamment. Cependant lorsque les nanoparticules d'argent se trouvent directement en contact avec les fluides biologiques, comme dans le cas d'une injection ou de l'installation d'un dispositif implantable, les nanoparticules d'argent se retrouvent dans la circulation générale, et en contact avec les cellules. Il est ainsi responsable de prendre en compte les différentes voies d'exposition de notre organisme aux nanoparticules d'argent lors des études toxicologiques, ou du développement de nanomatériaux.

Chapitre 5

Safer-by-design et objectif des travaux

5.1 Maîtrise du risque

Lorsque l'on décrit un risque, il s'agit de la corrélation entre le danger et l'exposition, ce qui est souvent résumé par l'équation suivante : $\text{Risque} = \text{Danger} \times \text{Exposition}$.

Le danger caractéristique d'une substance est déterminé par la dose et la réponse d'un organisme à une exposition aiguë ou chronique à cette dernière (**Figure 5.1**). Cette exposition est dépendante de la protection et de la biodisponibilité de la substance selon la voie d'exposition et la capacité de la substance à être accumulée dans l'environnement ou transloquée dans un organisme (Morose, 2010).

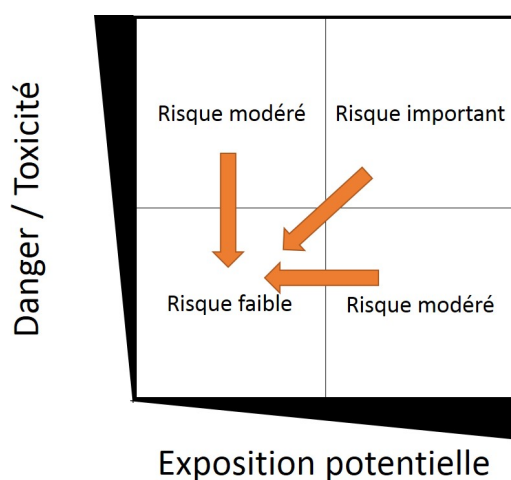


FIGURE 5.1 – Diagramme des risques

De fait, les produits contenant des substances toxiques présentent un risque, de leur production à leur destruction. Ainsi, les nanotechnologies qui sont émergentes et de plus en plus présentes poussent la communauté scientifique à faire face à de nouveaux défis pour minimiser les risques et optimiser les bénéfices de ces nano-objets (Maynard et al., 2006).

Historiquement, lorsqu'un produit arrivait sur le marché il ne lui était demandé que d'être fonctionnel, les risques qu'il présentait étaient identifiés après son utilisation. En cas de danger, il était ensuite retiré du marché ou modifié (avec une inertie parfois importante), jusqu'à l'identification d'un nouveau problème, comme cela a parfaitement été illustré avec l'utilisation de l'amiante. Actuellement, le développement des produits tend à prendre en compte les risques déjà décrits pour proposer les produits les plus sûrs pour les utilisateurs et les travailleurs, alors qu'il serait envisageable d'intégrer un processus de sécurité dans le développement des nouveaux produits. C'est ce que l'on appelle le développement Safer-by-design.

5.2 Nanomatériaux Safer-by-design : définition

Fondamentalement, d'après le Labex SERENADE (Bottero et al., 2017) il est possible de décrire la démarche dite Safer-by-design comme prenant part active à chaque étape du cycle de vie du produit dans :

- Le design d'un nano matériau plus sûr pour la santé humaine et l'environnement dans le but de promouvoir le développement durable et responsable tout en conservant la compétitivité des entreprises impliquées dans la production et les nanotechnologies ;
- La mise en œuvre d'outils métrologiques pour les travailleurs, les populations et les milieux environnementaux ;
- La mise en place de technologies pour la fin de vie des produits : recyclage, gestion des déchets, traitement de l'eau ;
- Le développement d'une nouvelle approche de l'entrepreneuriat en intégrant les résultats sur le marketing, la communication ou l'éthique, qui sont aujourd'hui au cœur de nombreux débats sur les nanotechnologies, afin de façonner une infrastructure de marché durable pour leurs innovations.

Dans le cadre de l'approche dite « Safer-by-design », il est nécessaire de travailler à l'interface des disciplines pour évaluer les risques environnementaux et biologiques et proposer des produits efficaces (ingénierie) dont le développement aura pris en compte les risques d'utilisation, d'exposition (toxicologie) et de destruction (écologie). Ce type de projet implique tous les acteurs d'une équipe travaillant sur la formulation d'un nano-objet car cette démarche vise à réduire l'impact du produit sur l'environnement et l'Homme au cours de son cycle d'utilisation, du fait de la formulation des nanoparticules contenues dans le produit ou par l'incorporation des nanoparticules dans la matrice du produit fini.

Pour atteindre ce but, il est possible de manipuler cinq facteurs : la taille, la composition, la fonctionnalisation, l'encapsulation et la quantité utilisée.

5.3 Les leviers d'action dits « Safer-by-design »

La surface des nano-objets est un paramètre très important car elle augmente exponentiellement avec la diminution de la taille. C'est la principale cause des changements des propriétés de l'élément entre sa forme nanométrique et sa forme micrométrique. Par exemple, les nanoparticules d'argent de petites tailles sont plus actives contre les bactéries que les nanoparticules d'argent de grandes tailles (Raza et al., 2016). De plus la forme des nanoparticules est directement liée à leur toxicité. Il a été montré que les nanoparticules d'argent sphériques sont des agents antibactériens plus actifs que les nano-cubes d'argent à tailles égales, alors qu'ils ont une cytotoxicité similaire, du fait d'une dissolution plus importante des nanoparticules

sphériques qui possède simplement une plus grande surface à diamètre égal (Helminger et al., 2016). Ainsi le développement de nano-sphère sera préféré à celui des nano-cubes pour la production de biocide car pour un effet similaire les nano-cubes seront davantage toxiques.

Dans un second temps, si le matériel employé est toxique, il est envisageable de le remplacer par un autre, qui produira la même fonction sans les effets délétères. La substitution d'un matériel est très délicate car elle nécessite des études approfondies, aussi bien sur l'activité du nouveau produit, sa toxicité, son prix et sur les aspects réglementaires. Il n'est pas rare que cette substitution soit impossible à effectuer. Il est donc nécessaire de concevoir le produit avec le matériau d'origine, en modifiant les autres paramètres de développement Safer-by-design.

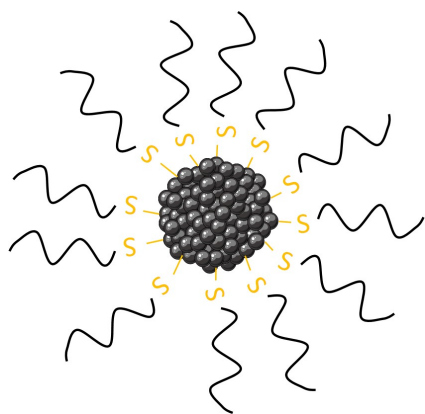


FIGURE 5.2 – Exemple de fonctionnalisation de la surface d'une nanoparticule d'argent par des molécules thiolées

Il est possible de fixer des molécules à la surface de la nanoparticule (Figure 5.2) afin d'en changer les propriétés (Porcaro et al., 2016) et ainsi de conserver les propriétés intéressantes tout en luttant contre, voir en éliminant, les propriétés qui constituent un risque. Afin d'éviter le relargage de nanoparticules lors de l'utilisation d'un produit « nano », la fonctionnalisation de la surface des nanoparticules ou la modification de la matrice qui les entoure peut augmenter les interactions entre les nanoparticules et la matrice.

Dans un dernier temps, la nanoparticule peut être enfermée dans un autre matériau qui sera moins toxique, ce que l'on nomme une « encapsulation », qui peut être illustrée par la stratégie des nanoparticules de type « coeur/coquille » (Paragraphe 2.1.6). Pour finir, un principe qui devrait être utilisé dans toutes les situations serait d'étudier les substances afin de déterminer les doses minimales qui peuvent être incorporées dans un produit pour conserver leurs propriétés afin de diminuer les quantités de substance toxique, il s'agit-là de déterminer l'efficacité matière des substances utilisées.

5.3.1 Limites des principes « Safer-by-design » appliqués aux nanoparticules

Les nanomatériaux diffèrent entre eux par leur composition, taille, forme et même par la voie d'exposition. Il est donc compliqué voire impossible de proposer une méthode de développement Safer-by-design systématique : elle doit être mise en place

au cas par cas. Par exemple, les propriétés optiques des différents nano-objets sont très variables. Les tests s'appuyant sur la lecture de densité optique ne peuvent donc pas être appliqués sur ces nanoparticules. Normaliser ne serait-ce qu'une méthode à employer est déjà en soit un défi conséquent relevé par la communauté scientifique (Hellack et al., 2017) et législatrice (source : *NANoREG*).

La détermination du risque selon le mode d'exposition de chaque nanoparticule est une entreprise fastidieuse, coûteuse et chronophage, ce qui laisse la communauté scientifique et les industriels face à un manque d'information important. La nanotoxicologie est une science très récente et, contrairement aux substances conventionnelles pour lesquelles les méthodes de quantification sont déjà entrées dans les mœurs et où les données collectées sont comparables les unes avec les autres, dans le cas des nano-objets on se retrouve actuellement face à un nombre important de données avec des codes et des nomenclatures qui ne sont pas partagés, ce qui complique grandement la légifération à ce sujet.

Pour pallier ces manques, il a été mis en place des banques de données qui s'implémentent par la participation des différents acteurs (*CEINT NanoInformatics Knowledge Commons*) ainsi que des méthodes de modélisation (Stone et al., 2014). Certaines équipes tendent à proposer des modèles simplifiés basés sur la composition et les propriétés particulières de l'objet comme sa capacité à se dissoudre ou à s'accumuler dans les tissus (*LabEx SERENADE*).

5.4 Objectif de ces travaux de thèse

Fort de ces connaissances, les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans une démarche double, présentant une composante descriptive et une composante productive. Le projet dans lequel se développe mes travaux de thèse est partie prenante d'une dynamique Safer-by-design de développement de nouveaux nanomatériaux, animé par le *LabEx SERENADE*. En effet, il vise à développer un nouvel agent biocide, plus sûr pour l'Homme et l'environnement. La démarche Safer-by-design est ainsi utilisée à plusieurs niveaux. Les études toxicologiques réalisées dans l'équipe ont permis une meilleure compréhension des mécanismes d'entrée et de transformation des nanoparticules d'argent dans la cellule. Cela a nourri l'idée de produire des objets de plus grande taille mais conservant une composante nanoparticulaire. De plus, afin de limiter les transformations dans l'environnement et dans les cellules eucaryotes après endocytose, nous souhaitons produire un nano-objet avec un enrobage fortement associé aux nanoparticules d'argent et protégeant l'ensemble de la partie inorganique de l'objet.

L'Ecoconception de Nouveaux Agents Biocides à base de Nanoparticules d'Argent et d'Enrobage Bio-inspiré est un sujet à l'interface de plusieurs disciplines, proposant de faire cohabiter dans un manuscrit de 150 pages la chimie organique et inorganique, les nanosciences et la production de protéines, la culture cellulaire pro-caryote et eucaryote, la physique des rayonnements X et les sciences analytiques, avec l'objectif final de proposer un agent biocide plus sûr.

Ainsi, le chapitre suivant présentera une étude descriptive de la dissolution des nanoparticules d'argent à pH physiologique par diverses molécules biologiques thiolées, mettant en évidence l'importance de la pré-organisation architectural des biomolécules dans la cinétique de dissolution, ainsi que le nombre de thiols libres. Puis le chapitre 7 présentera une preuve de concept d'un nouvel agent biocide composé de nanoparticules d'argent pontées entre-elles par un ligand thiolé, actifs contre les bactéries mais moins toxique sur les cellules eucaryotes. Dans le dernier chapitre nous proposerons un criblage sur un plus large panel de ligands thiolés afin de comprendre les déterminants permettant le pontage ou la dissolution des nanoparticules d'argent afin de pouvoir optimiser notre nouvel agent biocide.

Résultats

Chapitre 6

Etude de la dissolution des nanoparticules d'argent par des biomolécules thiolées

6.1 Introduction aux travaux de dissolution

Les résultats de ce chapitre sont présentés dans la publication "*Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by bio-relevant molecules*", publiée dans la revue : *Environmental Science : Nano* qui est incluse dans la suite de cette partie.

Comme décrit dans les pages précédentes, la toxicité des nanoparticules d'argent chez les organismes eucaryotes est principalement due aux ions Ag(I) libérés des nanoparticules d'argent présentes dans les vésicules d'endocytose (**Paragraphe 4.3.5**). Cette dissolution au sein des cellules est médiée par différents mécanismes, dont le principal est la diminution du pH au cours de la maturation des endosomes vers les lysosomes (Huotari et al., 2011). De plus, les ions Ag(I), libérés dans toute la cellule, se retrouvent en majorité complexés par des biomolécules thiolées, principalement le glutathion et les MT (Veronesi et al., 2016a) qui sont les plus abondantes dans la cellule en condition de stress métallique, comme par exemple lors de l'exposition aux nanoparticules d'argent (**Paragraphe 4.3.2**). Néanmoins, on trouve de nombreuses biomolécules thiolées dans la cellule. Celles-ci sont de très bons ligands des ions Ag(I) ou Cu(I) (Pearson, 1963), ce qui a été confirmé dans l'équipe par l'étude *in vitro* de la coordination des ions Ag(I) à des biomolécules contenant des thiols et à leurs mimes chimiques (Veronesi et al., 2015). Dans ces travaux, la coordination de l'argent avec des molécules biologiques telles que les MT, le glutathion ou une chaperonne du cuivre a été étudiée. Ces molécules ont montré une très bonne affinité pour les Ag(I) à pH physiologique (7,4). Cependant, la coordination des Ag(I) est plus complexe que celle du cuivre car il a été observé des complexes AgS₂ et AgS₃. Certaines molécules ne forment qu'un seul type de coordination (GSH : uniquement AgS₂) alors que d'autres forment des mélanges AgS₂, AgS₃.

Par contre, il n'y a aucune preuve démontrant l'implication directe de molécules contenant des thiols dans la dissolution intracellulaire des nanoparticules d'argent, alors même que plusieurs études ont décrit l'interaction de biomolécules thiolées avec des nanoparticules d'argent *in vitro*. La plupart de ces études se sont concentrées sur les molécules les plus simples et les plus abondantes biologiquement : la cystéine et le GSH qui ne contiennent qu'un seul thiol (Siriwardana2015). Ces molécules ont un double comportement : elles favorisent la dissolution des nanoparticules d'argent à faible concentration, tandis que des concentrations élevées induisent une agglomération (Gondikas et al., 2012, Afshinnia et al., 2016 ; Bayram et al., 2015). De plus, il a été montré que des protéines contenant des sites de liaison au cuivre avec au moins un thiol libre entraînent la dissolution des nanoparticules d'argent mais avec des comportements très variables vis-à-vis des nanoparticules d'argent. Dans le cas de la métallothionéine, la dissolution est très importante et une structure Ag-MT amorphe a été observée *in vitro* (Liu et al., 2017). Dans le cas de la ceruloplasmine, la protéine forme une corona autour de la nanoparticule tout en entraînant une

dissolution importante alors que dans le cas de l'azurine, il a été démontré que les propriétés rédox de cette protéine favorisent l'oxydation de l'argent de surface et la libération subséquente d'Ag(I) de la nanoparticule (Martinolich et al., 2012).

De ce fait, l'étude de l'impact des thiols libres présents dans les protéines est impossible à dissocier de celui de la structure protéique. Ce que nous avons voulu montrer dans cette étude est le rôle du nombre de thiols dans la dissolution et la stabilité des nanoparticules ainsi que l'impact de la pré-organisation des thiols au sein de la molécule. Pour ce faire et afin de limiter les biais d'interprétation; les ligands utilisés ont été choisis car ils possèdent des caractéristiques précises. Il s'agit soit de la répétition d'un motif (ligands linéaires), soit de molécules induisant une pré-organisation spatiale des thiols (protéines et mimes chimiques de ces mêmes protéines afin d'étudier l'impact du squelette protéique) ce qui permet une plus grande clarté dans l'analyse.

6.1.1 Présentation des ligands linéaires

Le glutathion (**Figure 6.1**), pseudo tripeptide formé d'un acide glutamique, d'une cystéine et d'une glycine (γ -Glu-Cys-Gly), intervient dans le maintien du potentiel rédox de la cellule ainsi que dans la détoxification et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène (Wu et al., 2004). Cette molécule est vitale de par son rôle de tampon rédox au sein de la cellule, ainsi que par sa capacité à complexer les métaux lourds (tels que le mercure, le plomb, etc) par une liaison soufre-métal.

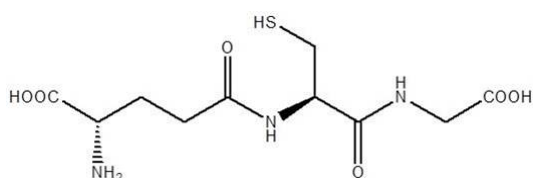


FIGURE 6.1 – Structure du glutathion

Les phytochélatines (**Figure 6.2**) sont des peptides linéaires présents chez les végétaux. Ce sont des polymères du glutathion (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, où n peut varier de 2 à 11 (Mehra et al., 1996). La synthèse de ces polypeptides est induite par la présence de métaux comme l'argent, le cuivre ou le plomb. Dans les cellules végétales elles ont un rôle similaire aux MTs (Clemens et al., 1999). Les phytochélatines (PC) choisies pour cette étude sont :

- La phytochélatine 2 (PC2), qui possède deux thiols, afin de comparer son effet avec i) des molécules linéaires de même motif comprenant un nombre différent de thiol et ii) avec des molécules dont l'architecture interne est pré-organisée bi-dentate, ce qui permet une chélation des ions métalliques;

- La phytochélatine 3 (PC3), qui possède trois thiols, afin de comparer son effet avec des molécules linéaires de même motif comprenant un nombre différent de thiol;
- La phytochélatine 6 (PC6), qui possède six thiols, afin de comparer son effet avec des molécules linéaires de même motif comprenant 6, 3 et 2 fois moins de thiols.

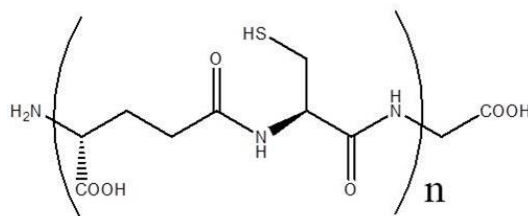


FIGURE 6.2 – Représentation de la structure des phytochélatines, où n varie de 2 à 11 répétitions

6.1.2 Présentation des molécules pré-organisées

Les protéines

La protéine ATX1 (**Figure 6.3**) est une protéine chaperonne du cuivre dans la levure, analogue de la protéine humaine ATOX. ATX1 sert au transfert du cuivre à l'ATPase CCC2, analogue à la protéine humaine ATP7B. ATX1 comprend 72 acides aminés et le site de fixation de l'ion métallique est composé de deux cystéines. Un travail réalisé au sein de l'équipe a permis de démontrer que cette protéine peut chélater des Ag(I) à un pH physiologique (Veronesi et al., 2015).

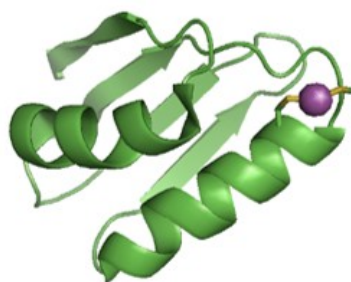


FIGURE 6.3 – Structure de la protéine ATX1. En violet : Ag(I)

Les mimes chimiques

Afin d'étudier l'impact du squelette protéique, un peptide cyclique mimant le site de liaison métallique de ATX1 a été utilisé. Il s'agit de la molécule P² (Pujol et al., 2011b) (**Figure 6.4**). De ce fait, il est possible de s'absoudre de la partie protéique et de limiter les interactions avec les autres résidus. P² a été développé et fourni par l'équipe de Pascale DELANGLE (CEA/INAC/SyMMES/CIBEST).

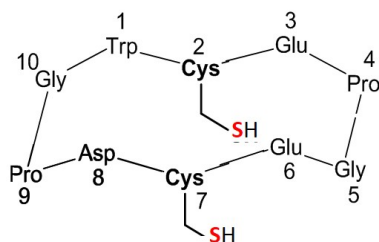


FIGURE 6.4 – Représentation schématique du mime chimique de ATX1 : P²

La coordination de ces diverses molécules avec Ag(I) a été étudiée précédemment et il a été mis en évidence le fait que les Ag(I) forment des complexes Ag(SR)₂ dans le cas d'une liaison avec ATX1, et Ag(SR)₃ dans le cas d'une liaison avec la MT et le mime chimique d'un de ses sites de liaison métallique, L1 alors qu'il a été observé une coordination mixte avec P² (Veronesi et al., 2016a). Dans ce travail avec les nanoparticules d'argent, nous nous sommes placés dans des conditions équimolaires où la concentration en thiolate était la même que la concentration en argent sous toutes ces formes.

Les nanoparticules d'argent n'étant pas stables en présence du ligand L1 et présentant un comportement particulier (**Chapitre 7**), cette molécule ne sera pas présentée dans cette étude de dissolution.

6.1.3 Méthodologie

Pour étudier la dissolution des nanoparticules d'argent en présence de ces ligands thiolés en condition d'aérobiose et d'anaérobiose, un large panel de techniques a été utilisé. La quantification de l'argent dissous au cours du temps a été effectuée par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) comme décrit **paragraphe 10.4.2** en parallèle de l'étude de la stabilité, de l'homogénéité, de la taille et de la surface des nanoparticules, analysées par Dynamic Light Scattering (DLS) comme décrit **paragraphe 10.3.1**, microscopie électronique en collaboration avec Pierre-Henri Jouneau comme décrit **paragraphe 10.3.4** et par le suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible comme décrit **paragraphe 10.6.1**. Afin de corroborer toutes les informations obtenues, une analyse par Asymmetric Flow Field Flow Fractionation couplé à un spectromètre de masse (AF4-ICP-MS), à un détecteur UV et à un MALS (Diffusion de la lumière multi-angle) a été réalisée en collaboration avec Isabelle Worms. Il a ainsi été possible de comparer la quantité d'argent dissous et la taille des nanoparticules d'argent en suspension.

Dans le cas de molécules linéaires répétant le même motif, la vitesse de dissolution augmente avec le nombre de thiols par molécule. Dans le cas d'une molécule pré-organisée comme la protéine ATX1 et son mime chimique, la dissolution est plus

rapide que dans le cas d'une molécule linéaire contenant le même nombre de thiols libres capable de se lier à l'argent. De plus, le squelette protéique d'ATX1 a conduit à une agrégation des nanoparticules, ce qui souligne le fait que la partie protéique entraîne un comportement séparé de celui des thiolates.

Les molécules contenant plusieurs thiols n'avaient jusqu'à présent été que très peu étudiées, alors que le comportement des nanoparticules d'argent avec les molécules thiolées est vraiment diverse. Par ces travaux, l'étude de la dissolution des nanoparticules d'argent par des molécules thiolées est poussée plus loin, et place les bases pour une meilleure compréhension du devenir des nanoparticules d'argent dans des systèmes biologiques ou environnementaux.

PAPER



Cite this: *Environ. Sci.: Nano*, 2018, 5, 1911

Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by bio-relevant molecules†

Marianne Marchioni,^{id}^a Thomas Gallon,^{ab} Isabelle Worms,^{id}^{‡a} Pierre-Henri Jouneau,^c Colette Lebrun,^b Giulia Veronesi,^{id}^a Delphine Truffier-Boutry,^{id}^d Elisabeth Mintz,^a Pascale Delangle,^{id}^b Aurélien Deniaud^{id}^{*a} and Isabelle Michaud-Soret^{id}^{*a}

The widespread use of silver nanoparticles (AgNPs) as biocides in consumer products raises concerns about their toxicity to humans and their environmental impact. The biocidal activity is mediated by the release of Ag(I). However, this metal ion is universally toxic to living organisms. For instance, Ag(I) tightly binds to thiol functional groups that are abundant and essential to any cell type. The first intracellular source of thiol, glutathione, is crucial for the control of the redox balance of cells. Dissolution studies using monothiol-containing biomolecules such as glutathione or cysteine provided controversial results, while the impact of polythiol molecules on AgNP behavior remains unexplored. In order to gain insights into polythiol-assisted AgNP dissolution at constant and equal thiol:Ag molarity, we studied the impact of glutathione, phytochelatin with 2, 3 or 6 thiols, and copper chaperone Atx1 and its metal binding site mimic P², both containing 2 pre-oriented thiols to chelate Cu(I). The AgNP behavior was monitored by various complementary physicochemical approaches. We demonstrated unambiguously that, under aerobic conditions, these molecules favor AgNP dissolution into Ag(I) ions with a rate that increases with the number of thiols per molecule as well as with their pre-orientation. We also observed that AgNP dissolution into Ag(I) soluble species occurs progressively for the whole AgNP population. This work highlights how transformations of AgNPs are triggered by biomolecules and lays the basis for a deeper understanding of their fate in biological/environmental systems.

Received 23rd March 2018,
Accepted 6th June 2018

DOI: 10.1039/c8en00340h

rsc.li/es-nano

Environmental significance

Silver nanoparticles (AgNPs) are increasingly used as biocides in commercial products but their impact on human health and the environment remains puzzling. AgNP toxicity is mainly based on the release of bioavailable Ag(I) species. AgNPs are subject to other transformations during their life cycle and a comprehensive understanding of nanoparticle fate is required for their safer use. It has already been shown that monothiol molecules can induce either AgNP dissolution or agglomeration, while polythiols have not been studied so far. Bio-relevant polythiols from plants or mammals were shown to favor AgNP dissolution into Ag(I) ions at increasing rates with the number of thiols per molecule and their pre-orientation. This work added some clues for a better understanding of AgNP fate in biological/environmental systems.

1. Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) are the most used nanomaterial in terms of number, as they are present in 25 to 30% of the products declared to contain nanomaterials.^{1–3} AgNPs are used as biocides in textiles, food packaging and medical devices such as catheters or wound dressings.^{4,5} The biocidal activity is due to the high toxicity of Ag(I) ions that are released from AgNPs.⁶ This process is driven by AgNP oxidative dissolution,⁷ which requires both oxygen and protons *in vitro*. Three forms of Ag co-exist in aqueous solution: Ag(0) in the NP core, Ag(I) in solution and Ag(I) bound to the NP surface.^{7,8}

AgNPs can thus be considered as a reservoir of Ag(I) for long-lasting biocidal effects in the product of interest and

^a Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, BIG-LCBM, 38000 Grenoble, France.

E-mail: aurelien.deniaud@cea.fr, isabelle.michaud-soret@cea.fr;

Tel: +33 (0)4 38 78 96 51, +33 (0)4 38 78 99 40

^b Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC, SYMMES, F-38000 Grenoble, France

^c Univ. Grenoble Alpes, CEA, INAC-MEM, 38000 Grenoble, France

^d Univ. Grenoble Alpes, CEA, LITEN/DTNM/SEN/L2N, F-38054 Grenoble Cedex 09, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8en00340h

‡ Present address: Department F.-A. Forel for Environmental and Aquatic Sciences, University of Geneva, 66 boulevard Carl Vogt CH-1211 Geneva 4.

their action is due to the progressive silver ion leaching from the NP surface under aerobic conditions.⁸ Molleman *et al.* developed a theoretical model showing that the Ag(I) release in solution is due to oxidative dissolution of OH-bonded surface Ag(I), while it is blocked by the penetration of oxygen radicals into the metallic lattice followed by the formation of stable Ag₆O octahedra involving the first two atomic layers of the NPs.⁹ The interplay between these two phenomena was shown to account for numerous empirical observations, such as the pH dependency of ion release and the stabilizing effect of excess Ag(I) on AgNPs in solution.^{7,9,10} This model is consistent with experimental data showing that low pH and the presence of oxidants favor AgNP dissolution into ions,^{11,12} while chloride is more protective of the NP form¹² as it promotes AgNP agglomeration.

During their life cycle, AgNPs are dispersed in the environment where they are subjected to various transformations. Organisms such as bacteria, plants or animals are thus exposed to several Ag species with different toxic potentials. In soil and wastewater, as has also recently been observed in plants¹³ and in mammals,¹⁴ the main transformation described for AgNPs is sulfidation.^{15–17} This process has been extensively studied and leads to surface passivation that limits Ag(I) bioavailability and therefore toxicity.^{15,18} Studies performed with mammalian cell models showed that AgNPs are endocytosed and further dissolved inside endosomes and lysosomes into Ag(I) soluble species that distribute throughout the cell.^{19,20} The kinetics of AgNP dissolution depends on the cell type,^{20–22} but as observed *in vitro* it is favored by the lysosomal pH decrease. Intracellular Ag(I) species become coordinated by thiol-containing biomolecules, mainly glutathione (GSH) and metallothionein (MT), which are important actors in cellular metal ion homeostasis.^{20–23} These results suggest that Ag(I) might replace Cu(I) or Zn(II) in their native binding sites, in agreement with the fact that thiolates are soft bases that bind tightly to soft acids such as Ag(I) or Cu(I), and with our recent description of Ag(I) coordination to thiol biomolecules and their chemical mimics *in vitro*.²⁴ Although there is no evidence showing the direct involvement of thiol-containing molecules in the intracellular dissolution of AgNPs, several studies described the interaction of thiol-containing biomolecules with AgNPs *in vitro*. Most of them focused on the simplest and biologically abundant molecules, cysteine and GSH that contain only one thiol.¹² These molecules have a dual behavior: they foster AgNP dissolution at low concentrations, whereas higher concentrations induce agglomeration that prevents dissolution.^{12,25–28} Interestingly, some pioneering works also showed that proteins with Cu-binding sites containing at least one exposed thiol trigger AgNP dissolution into ions. In the case of MT, the dissolution is massive and an amorphous Ag–MT structure has been observed *in vitro*,²⁹ while in the case of azurin it has been evidenced that the redox properties of this protein favor surface Ag oxidation and the subsequent Ag(I) release from the NPs.^{29,30}

Nonetheless, the impact of molecules with multiple thiols on the AgNP behavior remains unexplored, although they are

produced by living organisms and offer a wide diversity in terms of the number of thiols as well as the molecular architecture. For instance, plants are able to synthesize GSH linear polymers, named phytochelatins (PC, also named class III metallothioneins) bearing between 2 and 11 thiols,^{31,32} which are involved in metal detoxification and alternatively proposed to be involved in metal homeostasis in plants.^{33,34} PC production can be induced by metal stress including Ag(I), and PCs are able to bind Ag(I).³⁵ In order to understand the mechanisms involved in thiol-assisted AgNP dissolution and therefore to predict AgNP fate in the presence of polythiol molecules, we analyzed this process using biomolecules as well as chemical mimics with various numbers of thiols per molecule and different chemical architectures. We worked in equal Ag:S molarity in order to rule out the dependency on the stoichiometric ratio and investigate the influence of the scaffold geometry, thiol function orientation and chelation properties on the dissolution. We chose a series of linear thiol-containing biomolecules, GSH and phytochelatin2 (PC2), PC3 and PC6 that possess 1, 2, 3 and 6 thiols, respectively. We also used Atx1, a eukaryote copper chaperone, and its metal binding site mimic P², both containing 2 thiols pre-oriented to chelate Cu(I).³⁶ A combination of methods was used to study the behavior of citrate-coated AgNPs in solution in the presence of these molecules. We found that the higher the number of thiols on a linear backbone, the faster the AgNP dissolution rate. Besides, the comparison of the different molecules having two thiols demonstrated that their pre-orientation as tight metal binding sites increases the AgNP dissolution rate and thus highlights that the chelate effect favors AgNP dissolution.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

20 nm citrate-coated AgNPs were purchased from NanoComposix (20 nm citrate BioPure™ silver), GSH was purchased from Sigma and PC2, PC3 and PC6 were purchased from Eurogentec. The synthesis and characterization of the cyclodecapeptide P² ligand were previously described.³⁶ P², GSH, PC2, PC3 and PC6 were resuspended in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4.

2.2. Production of Atx1

Atx1 was produced as described previously.^{24,37} After purification, Atx1 was aliquoted in 40 mM MES buffer, 400 mM NaCl and 10% glycerol, pH 6, flash frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Before AgNP dissolution experiment, Atx1 buffer was exchanged to 10 mM HEPES (pH 7.4) on Nap5 and Nap10 columns (GE-Healthcare). The protein concentration was determined by measuring the absorbance of the Atx1 solution at 280 nm ($\epsilon = 5625 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3. AgNP dissolution kinetics

Prior to each experiment, the concentration of the stock solution of the ligand was determined by free thiol measurement

with Ellman's procedure using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Each free thiol group yields 1 equivalent of 5-thio-2-nitrobenzoic acid ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).³⁸

For dissolution experiments, AgNPs were diluted to 370 μM Ag in HEPES–citrate buffer (10 mM HEPES, 2 mM sodium citrate pH 7). The ligands were added in order to obtain a final concentration of 370 μM thiol functions. The solutions were then incubated at 24 °C, under 400 rpm agitation for the desired incubation time before Ag quantification and AgNP surface plasmon resonance (SPR) signal or dynamic light scattering (DLS) measurements. The list of samples used and their final concentrations are reported in Table S1.†

Experiments under anaerobic conditions were performed in a glove box (Jacomex), with residual oxygen concentration of 0.05 ppm. The SPR signal was measured with an Uvikon XL spectrophotometer connected to the glove box with an optical fiber.

2.4. Separation of AgNPs and Ag(I) species and silver quantification by ICP-AES

At each time-point, 500 μL of AgNP/ligand solutions were loaded on top of a 100 μL cushion of 0.7 M sucrose before centrifugation at 21 000g for 1 h at 20 °C. The supernatant containing soluble Ag(I) species was carefully recovered. Supernatants and pellets were digested in closed tubes overnight at 50 °C by addition of HNO_3 to a final concentration of 25% for the supernatant and a final concentration of 55% for the pellet. Ag was then quantified in each fraction by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) using a Shimadzu ICPE-9800.

The dissolution process follows first-order kinetics that can be mathematically described by the equation:

$$[\% \text{ dissolved Ag(I)}]_t = [\% \text{ dissolved Ag(I)}]_{\text{total}} \cdot (1 - \exp^{-k_{\text{app}}t})$$

In order to determine the pseudo first-order rates (k_{app}) the $\ln(\%$ of remaining AgNPs) was plotted as a function of time. Linear regressions were performed between 0 and 4 hours for the different kinetics except for PC6 where it was done between 0 and 3 hours. The slopes were thus $-k_{\text{app}}$ in h^{-1} for the dissolution kinetics in the presence of the different molecules.

2.5. AgNP SPR signal and DLS measurements

At the desired time-point, the sample was diluted five times in HEPES–citrate buffer and transferred to a quartz cell. The SPR signal of AgNPs was monitored by recording UV-visible absorbance spectra between 600 and 250 nm on a Shimadzu UV 1800 spectrophotometer. DLS measurements were carried out at 25 °C in a UVette (Eppendorf) on a Nanostar instrument (Wyatt) (detailed information is given in the ESI†).

2.6. Scanning transmission electron microscopy

2.6.1. Grid preparation and imaging. 5 μL of the sample was directly deposited onto a nickel grid coated with a carbon film (mesh 300, Agar Scientific/S160 N3). The drop was

then dried in air. Scanning transmission electron microscopy (STEM) micrographs were taken on a Zeiss MERLIN microscope operated at 30 kV, using a solid-state bright-field detector.

2.6.2. STEM micrograph analysis. Micrographs were analyzed in Fiji software.³⁹ For each sample, the diameters of at least 100 individual NPs were measured. The size distribution was plotted and average diameters and standard deviations were determined in mass function.

2.7. AF4-UVD-MALLS-ICP-MS measurement

Asymmetrical flow field-flow fractionation measurements were conducted on GSH, P² and Atx1 containing samples as fully described recently in ref. 40 and in the ESI.† Briefly, a metal free HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used to inject 50 μL of samples that were pre-diluted 20 times in 10^{-4} M NaOH solution (pH 10) which was also used as an eluent for the separation of the nanoparticles inside the trapezoidal channel (Wyatt Technology, Goleta, USA). The Ag elemental content was analyzed on-line thanks to an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS 7700X, Agilent Technologies). A UV detector (UVD) and multi-angle laser light scattering (MALLS) instrument were used here as online indicators of the presence of AgNPs and their potential dissolution or aggregation, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Kinetics of AgNP dissolution into Ag(I) soluble species

In order to analyze AgNP dissolution into Ag(I) species, time-course experiments were performed over 24 hours. The amount of released Ag(I) increased over time in the presence of GSH under conditions with an equimolar amount of Ag and sulfur (S) (Fig. 1A). In order to assess the importance of the amount of thiol in the AgNP dissolution process, the same experiment was performed in the presence of a double amount of GSH in the reaction mixture. A similar rate of Ag(I) release was observed with the two different amounts of GSH during the 24 hour kinetic experiment (Fig. S1†). The use of an equimolar amount of thiol functions in the reaction therefore did not limit the AgNP dissolution process, probably because of the excess of thiols with respect to surface silver atoms already in the 1:1 sample. A one to one Ag:S ratio was thus selected for further experiments.

All the tested molecules induced the time-dependent release of Ag(I) (Fig. 1). The rate of Ag(I) release is faster during the first 1 to 2 hours followed by a slower and continuous Ag(I) release. Finally, the dissolution tended to slowly reach a plateau between 10 and 24 hours of incubation, most markedly for P² and PC6. This trend has been observed also in previous dissolution studies, and was explained as the simultaneous effect of the formation of insoluble AgO species involving the first two atomic layers of AgNPs and of the increased Ag(I) concentration in solution that stabilized the otherwise labile AgOH species.^{9,10,41}

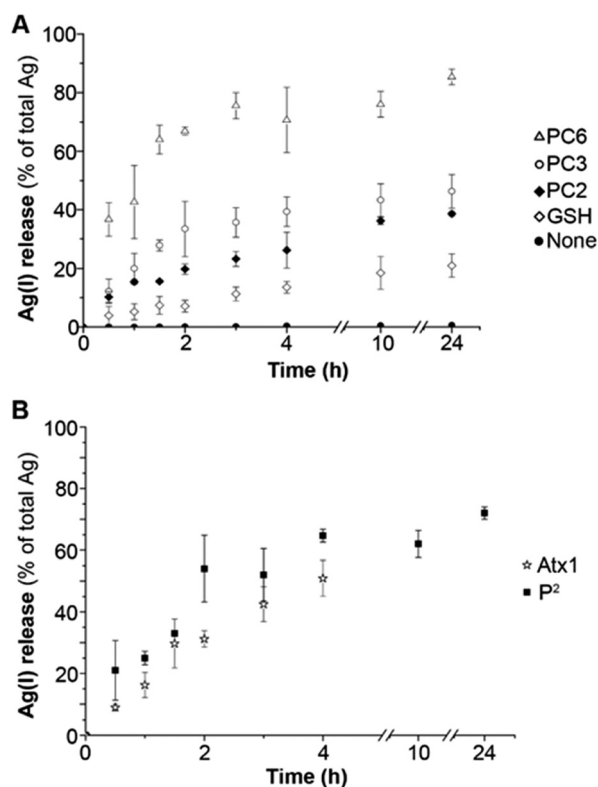


Fig. 1 AgNP dissolution into Ag(I) species in the presence of thiol-containing molecules. Time-dependent measurement of the fraction of Ag(I) released from AgNPs determined by ICP-AES in the presence of GSH, PC2, PC3 and PC6 (A), and P² and Atx1 (B). The fraction of Ag(I) released corresponds to the amount of Ag recovered in the supernatant of the sucrose centrifugation divided by the total amount of Ag recovered in both fractions (supernatant + pellet).

AgNP dissolution into Ag(I) follows first order kinetics and pseudo first-order rate constants were determined in order to compare the reaction induced by the different molecules (Table 1). The comparison of the molecules that contain different numbers of thiol functions on a linear backbone GSH, PC2, PC3 and PC6 showed an increase in the initial dissolution rate with the increase of thiols per molecule (Table 1) leading to more than 10-fold faster AgNP dissolution for PC6 compared to that for GSH. Furthermore, the maximal amount of released Ag(I) (Fig. 1A) also correlates with the number of thiol functions present in the molecules reaching

Table 1 AgNP dissolution rate (k_{app}) for the first hour of incubation of AgNPs with thiol-containing molecules (average of at least 3 independent experiments)

Molecule	k_{app} (h ⁻¹)	r^2	Number of thiol groups per molecule
None	0.001	0.85	—
GSH	0.034	0.96	1
PC2	0.068	0.89	2
PC3	0.121	0.89	3
PC6	0.461	0.94	6
P ²	0.249	0.92	2
Atx1	0.179	0.99	2

85%, 46%, 39% and 21% for PC6, PC3, PC2 and GSH, respectively. The two thiol functions in PC2 are incorporated on a linear backbone, while the cyclodecapeptide P² bears two sulfur atoms pre-oriented to form a tight metal binding site, mimicking the Cu binding loop in the protein Atx1. P² analysis showed a more than three times faster initial AgNP dissolution rate (Table 1) and the maximal dissolution after 24 h doubled compared to PC2 (Fig. 1A and B) that contained the same amount of thiols per molecule. These results highlight the importance of thiol pre-orientation on AgNP dissolution. The influence of the protein backbone has been assessed using Atx1 that inspired the molecule P². Atx1 showed a slightly slower dissolution rate than P² as well as a slightly lower maximal dissolution (Fig. 1B and Table 1). However, these results are based on the fraction of recovered Ag that is lower than the initial amount present in the reaction in the case of Atx1. Indeed, Atx1 also favors AgNP agglomeration that partly sticks to plastic tubes leading to a partial loss of matter. Therefore, the slight difference between P² and Atx1 can be due either to this agglomeration phenomenon or to the protein backbone of Atx1 that would lower AgNP dissolution.

3.2. Evolution of the AgNP SPR signal in the presence of thiol molecules

As noble metal NPs, AgNPs show a characteristic SPR signal with a maximum at 400 nm. This phenomenon occurs when the frequency of photons matches the natural frequency of surface electrons oscillating against the restoring force.⁴² The intensity of the AgNP SPR signal and the wavelength of its maximum give information about the amount of AgNPs in solution, their agglomeration state and their coating.⁴³ In the case of purely monomeric AgNPs, the evolution of the intensity of the SPR peak around 400 nm enables monitoring the kinetics of AgNP dissolution into Ag(I) species. The AgNP SPR signal intensity decreased over time in the presence of GSH with a faster rate in the first 1.5–2 hours (Fig. 2A and B). PC2, PC3 and PC6 induced a time-dependent decrease of the SPR peak with a rate that increased with the number of thiol functions per molecule (Fig. 2B and S2A–C†). The extent of the SPR signal intensity decrease after 24 hour incubation was also higher with a higher number of thiols per molecule. It reached 68%, 43%, 36% and 18% of the initial absorbance at 400 nm with GSH, PC2, PC3 and PC6, respectively. Furthermore, in all the cases the kinetics of dissolution have the same profile with a faster decrease rate in the first 1.5 hours followed by a slower decrease rate and reached a plateau for PC6.

The behavior of AgNPs in the presence of P² and Atx1 was compared with that of PC2 in order to analyze the importance of the thiol function pre-orientation and protein backbone on AgNP dissolution and/or agglomeration mechanisms. In the presence of Atx1, in less than 15 minutes, the SPR signal at 400 nm almost completely disappeared (5% of the signal remaining), a broad peak appeared with a

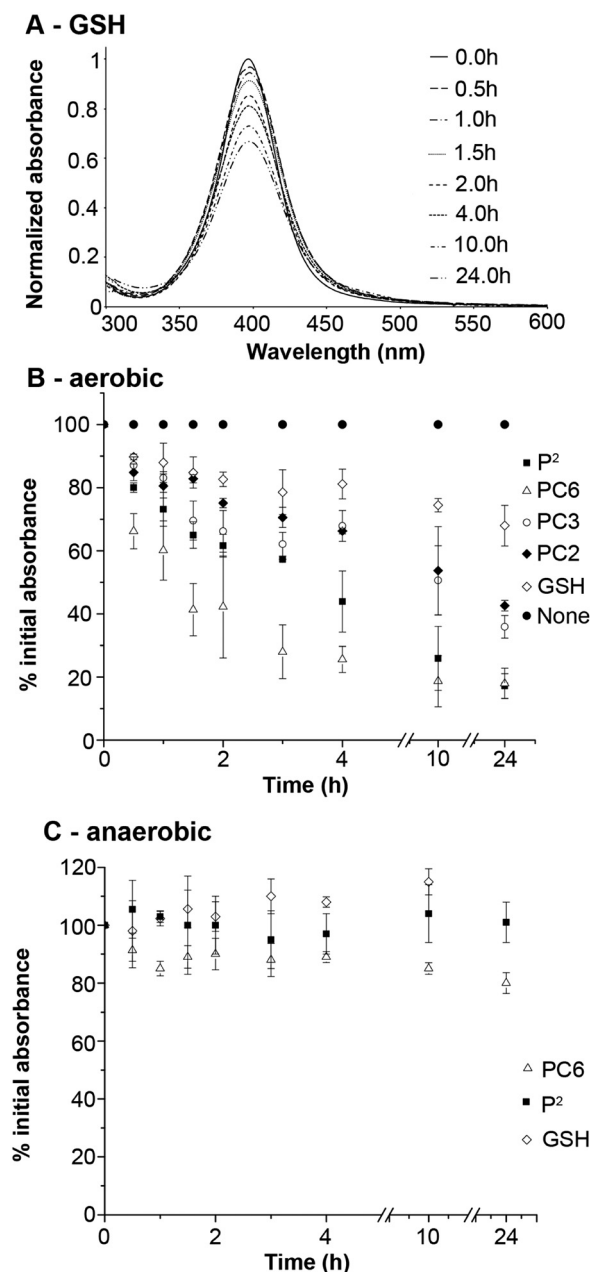


Fig. 2 AgNP SPR signal intensity analysis in the presence of thiol-containing molecules. A) Time-dependent analysis of AgNP SPR spectra in the presence of GSH between 0 and 24 hour incubation. B) Time-dependent analysis of SPR peak intensity in the presence of GSH, P², PC2, PC3 and PC6 under aerobic conditions. C) Time-dependent analysis of AgNP SPR peak intensity in the presence of GSH, P² and PC6 under anaerobic conditions.

maximum around 550 nm (Fig. S3A[†]) and large agglomerates can be visually observed in the tube. Altogether, the data showed that Atx1 rapidly led to the massive agglomeration of citrate-coated AgNPs. By contrast, the cyclodecapeptide P² only induced the time-dependent decrease of the 400 nm AgNP SPR peak (Fig. 2B and S3B[†]), suggesting no AgNP agglomeration or aggregation. Interestingly, the decrease of the AgNP SPR peak was significantly faster with P² than with PC2

and reached an 82% decrease of the initial absorbance after 24 hour incubation (Fig. 2B and S3B[†]). These results confirm that the thiol group pre-orientation favors AgNP dissolution under aqueous aerobic conditions. Therefore, except for Atx1, elemental quantification (Fig. 1A and B) and SPR analysis (Fig. 2B) are consistent and prove that AgNPs become dissolved into Ag(I) soluble species in the presence of thiol-containing molecules.

The evolution of the AgNP SPR signal intensity in the presence of some of these molecules was also studied under anaerobic conditions in order to assess the influence of oxygen on the previously observed phenomenon. For these experiments GSH, P² and PC6 were selected in order to keep a diversity of molecules in terms of the number of thiols and architectures. In the case of GSH and P² no significant decrease in the AgNP SPR signal was observed (Fig. 2C). A slight decrease of the signal appeared within the first hour of incubation of AgNPs with PC6. The normalized optical density decreased rapidly from 1 to 0.8 and then remained stable up to 24 hours of incubation. This decrease may most probably be due to surface effects induced by the AgNP coating by PC6. Altogether, these data show that oxygen is strictly required for thiol-assisted AgNP dissolution. Hypoxic conditions may thus slow down Ag(I) dissolution from AgNPs, while oxidative stress and reactive oxygen species may increase the rate of silver oxidation and Ag(I) release. Altogether, one can suggest that only oxygen is required for AgNP dissolution and then further chemical environments strongly catalyze this process, such as protons and/or thiols.

3.3. Evolution of AgNP diameter in the presence of thiol molecules

In order to monitor the diameter of the particles themselves, *i.e.* the silver core only, STEM analysis was performed (Fig. 3, S4[†] and Table 2).

The size distributions of AgNPs following 24 hour incubation with GSH, P² or PC6 were determined (Fig. 3 and Table 2). These experiments enabled the comparison of ligands leading to fast or slow AgNP dissolution, GSH *versus* P² and PC6. Pristine AgNPs had an average diameter of 20 ± 5 nm. The incubation of citrate-coated AgNPs with P² or PC6 leads to a better dispersion of the NPs on the grid most probably due to the high affinity coating that replaces citrate and thus avoids AgNP agglomeration during grid preparation (Fig. S4A *versus* C and D[†]), particularly for P² that leads to purely monodisperse AgNPs on the grid. The incubation with the three molecules also decreased the dispersion of the AgNP size distribution (Fig. 3 and Table 2). In the case of GSH, the smallest AgNPs (up to 11 nm) almost completely disappeared and the largest ones were only slightly dissolved (Fig. 3 and S4B[†]), leading to a diameter of 19 ± 3 nm. This result showed that AgNP dissolution induced by thiol-containing molecules does not occur at the same rate for AgNPs of different diameters, with the smallest being dissolved faster and/or preferentially. In the case of P² and

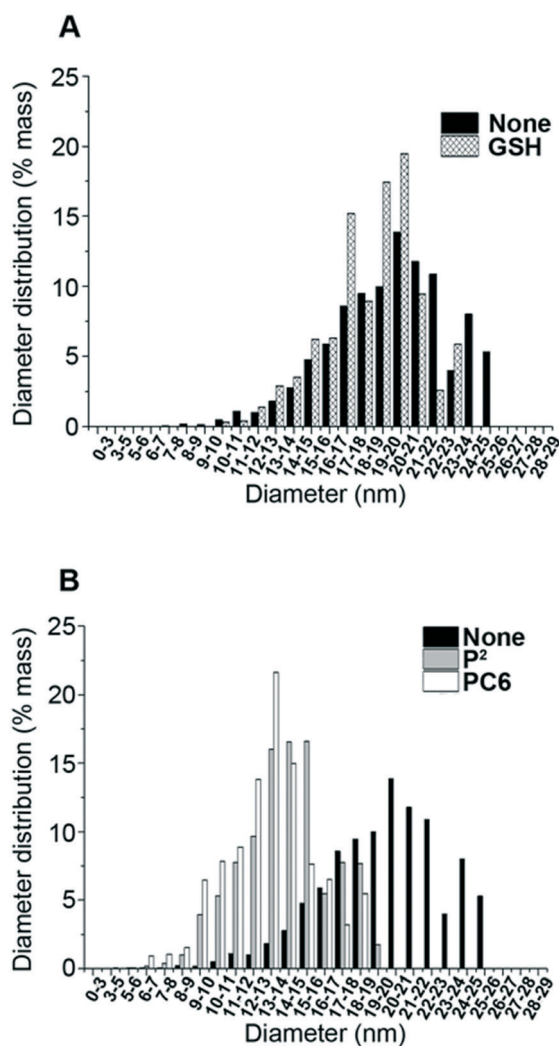


Fig. 3 AgNP size distribution in the presence of thiol-containing molecules. Histograms of AgNP diameters measured from STEM micrographs of input AgNPs and AgNPs with GSH after 24 hour incubation (A), and pristine AgNPs and AgNPs with P² or PC6 after 24 hour incubation (B).

PC6, 24 hour incubation with AgNPs induced a significant decrease of their size, leading to diameters of 15 ± 3 nm and 14 ± 3 nm for P² and PC6, respectively (Fig. 3 and S4C and D†).

In order to corroborate our results, we calculated the average NP diameters expected after 24 hour incubation starting

from the dissolution values measured by ICP-AES (Fig. 1), and compared them to the diameters measured by STEM (Table 2).

We considered a purely monodisperse AgNP stock solution of 20.2 nm in diameter, the average size of the AgNP population. The expected NP diameter d corresponding to the percentage of dissolution experimentally determined by ICP-AES was calculated. In the simplest case of uniform dissolution, the volume V of the partially dissolved NPs can be written as:

$$V = \frac{1}{6} \pi d^3 = x \frac{m}{\rho} \quad (1)$$

where m is the mass of a pristine AgNP, ρ is the density of Ag metal that can be assumed to be applicable for nanoparticulate Ag(0) ($\rho_{\text{Ag}} = 10.5 \text{ g cm}^{-3}$), and x is the fraction of undissolved NPs. The expected diameter d was thus calculated as:

$$d = \sqrt[3]{\frac{6xm}{\pi\rho}} \quad (2)$$

The diameters calculated on the basis of the fraction of dissolution determined by ICP-AES are in agreement within the errors with the average diameters determined from STEM micrographs (Table 2). However, the calculated diameters are smaller than the average values determined by STEM, particularly for the small size NPs. This is probably due to the fact that surface effects become overriding with very small AgNPs since the external AgO layer is non-negligible and less dense than the Ag(0) core. Besides, in mass the diameter distribution is not Gaussian, probably affecting the precision of the calculation.

The influence of different thiol-containing molecules on the AgNP diameter and size distribution was also monitored by DLS (Table 2). This method is complementary to STEM analysis, since DLS provides the hydrodynamic diameter that is indicative of both the core of the NPs as well as their coating. Therefore, the hydrodynamic diameter changes depend not only on AgNP dissolution but also on the size and the extent of binding of the coating molecule. Moreover, DLS is

Table 2 AgNP size in the presence of thiol-containing molecules. AgNP core diameter determined by STEM, theoretical diameter based on ICP-AES results and hydrodynamic diameter and polydispersity index obtained by DLS of input citrate-coated AgNPs and following a 24 hour incubation with the different thiol molecules

Ligand	AgNP core diameter determined by STEM (nm, from distribution in mass)	Theoretical diameter calculated based on ICP-AES AgNP dissolution results (nm)	Hydrodynamic diameter (nm) measured by DLS (mass) after 24 h incubation (polydispersity index)	Molecular weight of the molecules (Da)
None	20.2 ± 4.9 at t ₀	20.2	24.8 (16%) at t ₀	—
GSH	19.1 ± 3.1	18.8 ± 0.3	23.2 (12%)	307
PC2	—	17.1 ± 0.1	20.8 (16%)	540
PC3	—	16.4 ± 0.5	20.6 (10%)	773
PC6	13.7 ± 3.3	10.5 ± 0.5	18.5 (9%)	1469
P ²	14.5 ± 3.1	11.8 ± 0.6	18.7 (7%)	1090

performed in solution and the PDI gives information on the homogeneity of the sample in solution such as signs of agglomeration. The initial particles had a hydrodynamic diameter of 24.8 nm and a polydispersity index (PDI) of 16% (Table 2). These values are higher than expected and this is most probably due to a slight agglomeration of the NPs. This is confirmed by the results obtained with the different thiol molecules that coat the NPs, stabilizing them, resulting in monodispersity and thus decreasing their PDI (Table 2) as already observed on STEM grids (Fig. S4[†]). The measurements after 24 hour incubation showed a decrease in hydrodynamic diameter with all the molecules leading to diameters ranging between 18.5 and 23.2 nm (Table 2). The differences between the molecules appeared limited and did not reflect the extent of AgNP dissolution measured by ICP-AES (Fig. 1). However, taking into account the molecular weight of the ligands (Table 2), in particular for P² and PC6, and their high affinity for AgNPs, one can easily assume a much larger coating layer compared to GSH, for instance. This may explain the minimal decrease in the hydrodynamic diameter with P² and PC6. Therefore, a combined STEM/DLS analysis provides complementary information.

3.4. Progressive AgNP dissolution in the presence of thiol-containing molecules

AF4-UVD-MALLS-ICP-MS experiments were performed in order to separate the different species according to their hydrodynamic sizes after incubation of AgNPs with GSH, P² and Atx1. By minimizing sample handling, this method enables obtaining an integrated multi-parameter measurement that gives an overview of the AgNP colloidal state and dissolution. Without a ligand, AgNPs are eluted at a retention time of 4.7 minutes (Fig. 4A). In the presence of GSH and P², Ag eluted in 2 peaks after 24 hours of incubation. The first peak had a low retention time around 0.6–0.8 minutes without any specific absorbance of AgNPs and should correspond to Ag(I) bound to the thiol molecules (Fig. 4B). The second Ag peak had a retention time around 4.4 and 4.2 minutes for GSH and P², respectively, and was associated with an absorbance signal at 402 nm. Therefore, both GSH- and P²-coated AgNPs eluted before citrate-coated AgNPs. These minute changes in retention behavior can be attributed to the change in AgNP hydrodynamics due to coating exchanges, leading to a better dispersion as already pointed out by DLS and STEM, or due to lower interactions with the membrane. However, under our elution conditions, retention times could hardly be directly related to changes in AgNP primary sizes.⁴⁰ The difference in the absorbance intensity of AgNP peaks is coherent with a decrease in AgNP content when GSH or P² are present. Indeed, the amount of Ag associated with AgNP peaks corresponds to ~85% of the initial total Ag for GSH-AgNPs and ~30% for P²-AgNPs after 24 hour incubation. These results are consistent with the results obtained by ICP-AES measurements (Fig. 1), for which the Ag release from AgNPs was found to be ~20% and ~70% in the presence of GSH and P²,

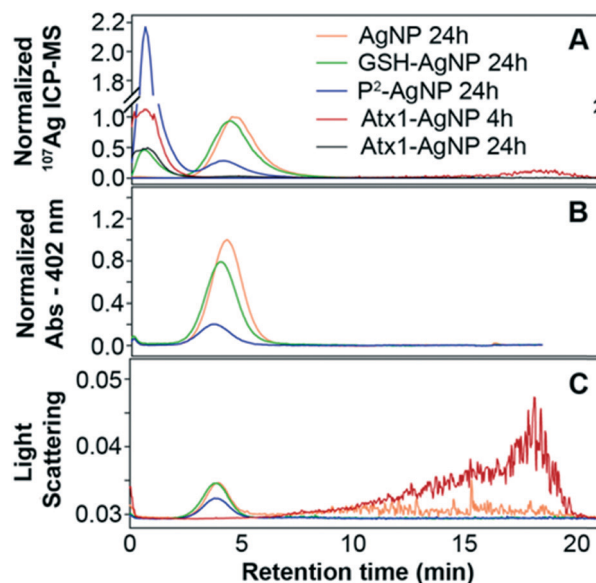


Fig. 4 AF4 analysis of AgNPs in the presence of GSH, P² and Atx1. Fractograms of species from AgNPs incubated with GSH and P² for 24 hours and with Atx1 for 4 hours and 24 hours. The detection is based on ¹⁰⁷Ag by ICP-MS (A); absorbance at 402 nm (B) and light scattering (C).

respectively. In the case of Atx1, the fractograms clearly show an almost complete disappearance of individual AgNPs but a residual Ag signal is observed at high retention times (between 15 and 20 minutes), after only 4 hours of incubation (Fig. 4A). In addition, a broad peak of Ag(I)-Atx1 species was also present at 1–2 minutes retention time but its intensity decreased between 4 and 24 hour incubation times reflecting the loss of material due to adhesion to the plastic tube (Fig. 4A). The high intensity of scattered light observed at the end of the elution (Fig. 4C) supports the formation of AgNP heterogeneous aggregates in the presence of Atx1 for a still unknown reason. This phenomenon thus shows that a protein backbone can affect the interaction with AgNPs and influence their behavior in solution, independent of the dissolution. This agglomeration-prone effect can decrease the AgNP dissolution extent as has already been described with cysteine that does not induce AgNP dissolution but a kind of passivation mechanism.¹⁰ Other one-thiol molecules have been described to protect AgNPs by forming a tight comb-like coating.^{8,44} Therefore, there is a diversity of AgNP reactivity in the presence of thiol-containing molecules which depends on the molecular “scaffold” and which remains difficult to predict.

Altogether, our AF4-UVD-MALLS-ICP-MS data confirmed the trends in the AgNP dissolution process drawn based on other results. Particularly, the combined analysis of STEM, DLS and AF4-ICP-MS data showed a progressive and global decrease of the average diameter of AgNP species in the presence of thiol molecules. Indeed, fairly homogeneous AgNP populations are observed upon thiol-assisted dissolution. The profiles of the AgNP diameter distributions are thus similar all throughout the dissolution process with all AgNPs decreasing in size, which shows that the dissolution occurs

progressively on all AgNPs leading to a decrease in the average diameter and not in the dispersion (Fig. 3). In the case of GSH, the population of smaller AgNPs dissolved preferentially. We managed to catch this event thanks to the slow dissolution in the presence of GSH. This phenomenon probably occurs on a time scale different from the ones we explored with the other thiolate molecules. These results are consistent with the literature that describes a higher extent of dissolution of the smallest AgNPs into Ag(I) species both in water and in acid pH aqueous media.¹¹ Therefore, whether the oxidative dissolution mechanism in place is proton- or thiol-catalyzed, the smallest AgNPs are preferentially dissolved into Ag(I) species.

4. Conclusions

In this work, we analyzed in detail the AgNP behavior in the presence of a series of molecules containing thiol functional groups. The experiments have been performed in equimolar amounts of Ag and S regardless of the molecule and its ability to bind Ag(I). Indeed, some molecules have a higher tendency to coordinate Ag(I) with 2 sulfur atoms, while others favor 3 sulfur coordination. The analysis of linear molecules containing up to 6 thiol functions showed that the higher the number of thiols, the faster the AgNP dissolution. We also compared different molecules with 2 thiols and found that the pre-orientation of the thiol triggered a chelate effect that increased the AgNP dissolution rate.

Besides, the dissolution process combined with the agglomeration-prone mechanism observed with Atx1 could be more general for proteins with solvent-exposed thiol groups. Indeed, we recently showed a similar behavior with MT in the presence of citrate-coated AgNPs.²⁹ In this case, MT induced the formation of amorphous Ag–MT species of large size observed by TEM. Besides, Ag–S rich amorphous structures have already been observed in mammalian cells exposed to AgNPs.⁴⁵ The biomolecules located in these structures have not been identified but the most prominent intracellular thiol-containing molecules following AgNP exposure are GSH and MT.^{20–23} Therefore, one can imagine that the phenomenon observed *in vitro* with Atx1 and MT is similar to what happens inside cells. However, it is not possible to know whether these precipitate-like structures are less toxic to living cells since they trap Ag(I) species or whether they are a long-lasting reservoir of Ag(I) inside cells that could in addition trigger inflammation mechanisms.

In conclusion, this work brings insight into the AgNP dissolution mechanism induced by polythiol molecules, which can lead to a better understanding of the mechanisms underlying AgNP transformations both in the environment and in various organisms.

Contributions

IMS, AD, PD, EM and MM designed this research; MM, TG and IW carried out the experiments; PHJ performed the

STEM experiments; CL synthesized P²; MM, AD, IMS, IW, PD, TG, GV and DB analyzed the data and AD, MM, IMS, PD and GV wrote the paper.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We acknowledge R. Miras for help for Atx1 purification, S. Motellier for AF4 experiment support and F. Rollin-Genetet and C. Vidaud for discussion. This work was funded by the CEA-Toxicology Transversal Program through the NanoSilverSol grant and by the CEA Transversal Programs Toxicology and Nanoscience through the NanoTox-RX grant. This research is part of the LabEx SERENADE (grant ANR-11-LABX-0064) and the LabEx ARCANE (grant ANR-11-LABX-0003-01). MM and IW were supported by the LabEx SERENADE. The AF4-ICP-MS was funded by the EQUIPEX NanoID (grant ANR-10-EQPX-39-01). This work is also supported by the CEA DRF-Impulsion grant FIB-Bio and the Université Grenoble Alpes – AGIR grant NanoSilverSafe.

References

- 1 R-Nano, <https://www.r-nano.fr/?locale=en>, web database.
- 2 M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, Jr., D. Rejeski and M. S. Hull, Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2015, 6, 1769–1780.
- 3 S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberths, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, S. Dekkers, W. H. De Jong, M. van Zijverden, A. J. A. M. Sips and R. E. Geertsma, Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 2009, 3, 109–138.
- 4 K. Chaloupka, Y. Malam and A. M. Seifalian, Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications, *Trends Biotechnol.*, 2010, 28, 580–588.
- 5 K. Mijndonckx, N. Leys, J. Mahillon, S. Silver and R. Van Houdt, Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance, *BioMetals*, 2013, 26, 609–621.
- 6 A. Ivask, A. Elbadawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C. H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J. I. Zink, Y. Cohen, P. A. Holden and H. A. Godwin, Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver, *ACS Nano*, 2014, 8, 374–386.
- 7 J. Liu and R. H. Hurt, Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44, 2169–2175.
- 8 J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani and R. H. Hurt, Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces, *ACS Nano*, 2010, 4, 6903–6913.
- 9 B. Molleman and T. Hiemstra, Surface Structure of Silver Nanoparticles as a Model for Understanding the Oxidative

- Dissolution of Silver Ions, *Langmuir*, 2015, 31, 13361–13372.
- 10 K. Loza, J. Diendorf, C. Sengstock, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Koller and M. Epple, The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 1634–1643.
- 11 T. S. Peretyazhko, Q. Zhang and V. L. Colvin, Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: kinetics and size changes, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, 48, 11954–11961.
- 12 L. Sigg and U. Lindauer, Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide, *Environ. Pollut.*, 2015, 206, 582–587.
- 13 A. E. Pradas Del Real, V. Vidal, M. Carriere, H. Castillo-Michel, C. Levard, P. Chaurand and G. Sarret, Silver Nanoparticles and Wheat Roots: A Complex Interplay, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, 51, 5774–5782.
- 14 D. A. Gonzalez-Carter, B. F. Leo, P. Ruenraroengsak, S. Chen, A. E. Goode, I. G. Theodorou, K. F. Chung, R. Carzaniga, M. S. Shaffer, D. T. Dexter, M. P. Ryan and A. E. Porter, Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H₂S-synthesizing enzymes, *Sci. Rep.*, 2017, 7, 42871.
- 15 C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry and G. E. Brown, Jr., Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46, 6900–6914.
- 16 C. Levard, S. Mitra, T. Yang, A. D. Jew, A. R. Badireddy, G. V. Lowry and G. E. Brown, Jr., Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, 47, 5738–5745.
- 17 C. Levard, B. C. Reinsch, F. M. Michel, C. Oumahi, G. V. Lowry and G. E. Brown, Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 5260–5266.
- 18 T. Miclaus, C. Beer, J. Chevallier, C. Scavenius, V. E. Bochenkov, J. J. Enghild and D. S. Sutherland, Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro, *Nat. Commun.*, 2016, 7, 11770.
- 19 V. De Matteis, M. A. Malvindi, A. Galeone, V. Brunetti, E. De Luca, S. Kote, P. Kshirsagar, S. Sabella, G. Bardi and P. P. Pompa, Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag⁺ ion release in the cytosol, *Nanomedicine*, 2015, 11, 731–739.
- 20 G. Veronesi, A. Deniaud, T. Gallon, P. H. Jouneau, J. Villanova, P. Delangle, M. Carriere, I. Kieffer, P. Charbonnier, E. Mintz and I. Michaud-Soret, Visualization, quantification and coordination of Ag⁺ ions released from silver nanoparticles in hepatocytes, *Nanoscale*, 2016, 8, 17012–17021.
- 21 X. Jiang, T. Miclăuş, L. Wang, R. Foldbjerg, D. S. Sutherland, H. Autrup, C. Chen and C. Beer, Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity, *Nanotoxicology*, 2014, 9, 181–189.
- 22 L. Wang, T. Zhang, P. Li, W. Huang, J. Tang, P. Wang, J. Liu, Q. Yuan, R. Bai, B. Li, K. Zhang, Y. Zhao and C. Chen, Use of Synchrotron Radiation-Analytical Techniques To Reveal Chemical Origin of Silver-Nanoparticle Cytotoxicity, *ACS Nano*, 2015, 9, 6532–6547.
- 23 G. Veronesi, C. Aude-Garcia, I. Kieffer, T. Gallon, P. Delangle, N. Herlin-Boime, T. Rabilloud and M. Carriere, Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages, *Nanoscale*, 2015, 7, 7323–7330.
- 24 G. Veronesi, T. Gallon, A. Deniaud, B. Boff, C. Gateau, C. Lebrun, C. Vidaud, F. Rollin-Genetet, M. Carriere, I. Kieffer, E. Mintz, P. Delangle and I. Michaud-Soret, XAS Investigation of Silver(I) Coordination in Copper(I) Biological Binding Sites, *Inorg. Chem.*, 2015, 54, 11688–11696.
- 25 E. Amato, Y. A. Diaz-Fernandez, A. Taglietti, P. Pallavicini, L. Pasotti, L. Cucca, C. Milanese, P. Grisoli, C. Dacarro, J. M. Fernandez-Hechavarria and V. Necchi, Synthesis, characterization and antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacteria of biomimetically coated silver nanoparticles, *Langmuir*, 2011, 27, 9165–9173.
- 26 A. P. Gondikas, A. Morris, B. C. Reinsch, S. M. Marinakos, G. V. Lowry and H. Hsu-Kim, Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46, 7037–7045.
- 27 K. Siriwardana, A. Wang, M. Gadogbe, W. E. Collier, N. C. Fitzkee and D. Zhang, Studying the Effects of Cysteine Residues on Protein Interactions with Silver Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, 2015, 119, 2910–2916.
- 28 K. Afshinnia, I. Gibson, R. Merrifield and M. Baalousha, The concentration-dependent aggregation of Ag NPs induced by cystine, *Sci. Total Environ.*, 2016, 557–558, 395–403.
- 29 W. Liu, I. A. M. Worms, N. Herlin-Boime, D. Truffier-Boutry, I. Michaud-Soret, E. Mintz, C. Vidaud and F. Rollin-Genetet, Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin: impact on metal substitution by Ag(i), corona formation and enzymatic activity, *Nanoscale*, 2017, 9, 6581–6594.
- 30 A. J. Martinolich, G. Park, M. Y. Nakamoto, R. E. Gate and K. E. Wheeler, Structural and functional effects of Cu metalloprotein-driven silver nanoparticle dissolution, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46, 6355–6362.
- 31 S. Clemens, E. J. Kim, D. Neumann and J. I. Schroeder, Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast, *EMBO J.*, 1999, 18, 3325–3333.
- 32 P. Tennstedt, D. Peisker, C. Bottcher, A. Trampczynska and S. Clemens, Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc, *Plant Physiol.*, 2009, 149, 938–948.
- 33 C. Cobbett and P. Goldsbrough, Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, 53, 159–182.

- 34 M. Pivato, M. Fabrega-Prats and A. Masi, Low-molecular-weight thiols in plants: functional and analytical implications, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014, **560**, 83–99.
- 35 R. K. Mehra, K. Tran, G. W. Scott, P. Mulchandani and S. S. Saini, Ag(I)-binding to phytochelatins, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **61**, 125–142.
- 36 A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz and P. Delangle, Hepatocyte targeting and intracellular copper chelation by a thiol-containing glyco-cyclopeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 286–296.
- 37 R. Miras, I. Morin, O. Jacquin, M. Cuillel, F. Guillain and E. Mintz, Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 195–205.
- 38 G. L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **82**, 70–77.
- 39 J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods*, 2012, **9**, 676–682.
- 40 S. Motellier, N. Pelissier and J. G. Mattei, Contribution of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry and asymmetrical flow field-flow fractionation for the characterization of silver nanosuspensions. Comparison with other sizing techniques, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1348–1358.
- 41 S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller and M. Epple, Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions, *Chem. Mater.*, 2010, **22**, 4548–4554.
- 42 A. Moores and F. Goettmann, The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 1121–1132.
- 43 V. Banerjee and K. P. Das, Interaction of silver nanoparticles with proteins: A characteristic protein concentration dependent profile of SPR signal, *Colloids Surf., B*, 2013, **111**, 71–79.
- 44 F. Porcaro, L. Carlini, A. Ugolini, D. Visaggio, P. Visca, I. Fratoddi, I. Venditti, C. Meneghini, L. Simonelli, C. Marini, W. Olszewski, N. Ramanan, I. Luisetto and C. Battocchio, Synthesis and Structural Characterization of Silver Nanoparticles Stabilized with 3-Mercapto-1-Propanesulfonate and 1-Thioglucose Mixed Thiols for Antibacterial Applications, *Materials*, 2016, **9**, 1028.
- 45 C. Aude-Garcia, F. Villiers, V. Collin-Faure, K. Pernet-Gallay, P.-H. Jouneau, S. Sorieul, G. Mure, A. Gerdil, N. Herlin-Boime, M. Carrière and T. Rabilloud, Different in vitro exposure regimens of murine primary macrophages to silver nanoparticles induce different fates of nanoparticles and different toxicological and functional consequences, *Nanotoxicology*, 2015, 1–11, DOI: 10.3109/17435390.2015.1104738.

Chapitre 7

Preuve de concept : les assemblages de nanoparticules d'argent

7.1 Observations préliminaires et sérendipité

7.1.1 Description principale

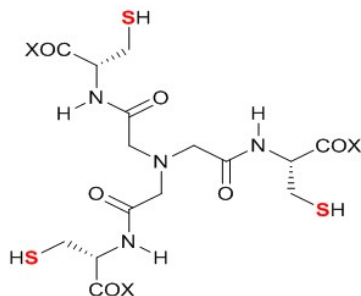


FIGURE 7.1 – Formule chimique du ligand L1. X = O-CH₂-CH₃

Au cours de l'étude précédente, l'un des ligands, la molécule L1, a démontré un comportement très spécifique comparé à l'ensemble des autres molécules utilisées qui entraînent une dissolution des nanoparticules d'argent. Le ligand L1 (**Figure 7.1**), mime chimique d'un site actif de la MT (Pujol et al., 2011a), possède un centre de symétrie C₃ et trois groupements thiolates. En effet, le cuivre(I) est complexé dans les MT par trois cystéines, contrairement aux métallochaperonnes comme ATOX qui complexent le cuivre par deux cystéines. Comme décrit précédemment dans le **paragraphe 4.3.2**, le rôle des MT est de séquestrer les métaux grâce à de très nombreuses fonctions thiols qui offrent une grande modularité en terme de nombres de ligands et de géométrie en fonction du métal à complexer.

Ainsi, comme dans l'étude précédente, les réactions entre les nanoparticules d'argent et L1 ont dans un premier temps été menées à une concentration stœchiométrique 1 : 1 (S : Ag), de 370 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ chacun et dans un tampon Hepes-citrate à pH 7,4. Le devenir des nanoparticules d'argent au cours du temps est suivi par spectroscopie UV-Visible (SPR) (selon la méthode décrite **paragraphe 10.6.1**) et DLS (selon la méthode décrite **paragraphe 10.3.1**), leur dissolution est quantifiée par ICP-AES (selon la méthode décrite **paragraphe 10.4.2**) ainsi que par AF4-ICP-MS (selon la méthode décrite **paragraphe 10.3.3**).

Le signal SPR spécifique des nanoparticules d'argent de 20 nm de diamètre est normalisé à 1 à 400 nm à t₀ (courbe noire). Au cours du temps, le signal SPR diminue (absorbance de 0,75 après 15 minutes de réaction, 0,46 après 30 minutes, 0,28 après 1 heure et 0,16 après 1h15) (**figure 7.2**). Dans le même temps un signal à plus grandes longueurs d'onde apparaît (480 nm après 15 minutes de réaction, 535 nm après 30 minutes, 570 nm après 1 heure et 600 nm après 1h15). L'intensité de ce signal ainsi que la position de son maximum d'absorbance augmente avec la durée d'incubation avec L1, et son intensité croit jusqu'à 1 heure puis le spectre s'aplatit fortement.

En parallèle, les mesures du diamètre hydrodynamique de l'échantillon obtenues par DLS (**Figure 7.3**) montrent que la valeur du diamètre moyen des objets en solution augmente au cours du temps (48 nm de diamètre après 15 minutes de réaction, 140 nm de diamètre après 30 minutes, 240 nm de diamètre après 1 heure et 1000 nm de diamètre après 1h15), de manière synchrone avec l'apparition des signaux SPR à

plus grandes longueurs d'onde.

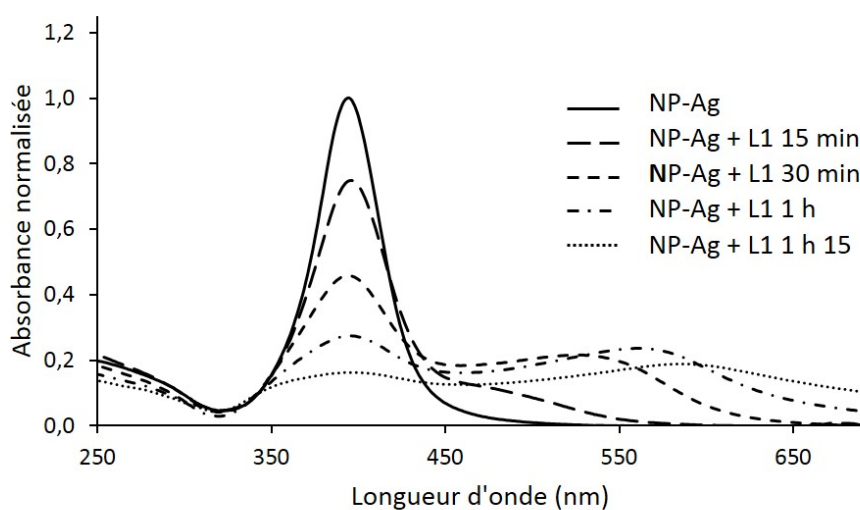


FIGURE 7.2 – Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1, 1 : 1 (S : Ag). Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 15 minutes d'incubation avec L1 (en longs tirets), après 30 minutes d'incubation avec L1 (en tirets courts), après 1 heure d'incubation avec L1 (en alternance points et tirets) et après 1h15 d'incubation avec L1 (en pointillés).

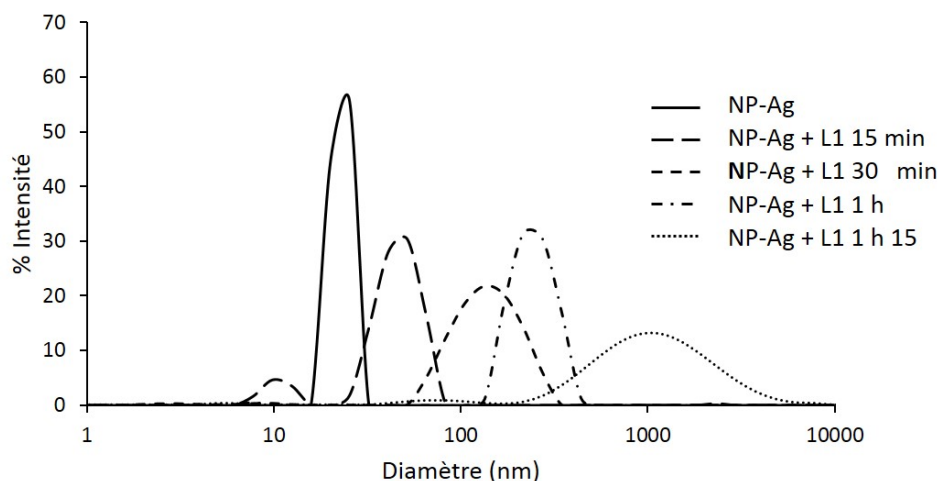


FIGURE 7.3 – Suivi par DLS de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 1 : 1 (S : Ag). Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 15 minutes d'incubation avec L1 (en longs tirets), après 30 minutes d'incubation avec L1 (en tirets courts), après 1 heure d'incubation avec L1 (en alternance points et tirets) et après 1h15 d'incubation avec L1 (en pointillés).

Cette évolution spectrale est également observable d'un point de vue macroscopique. En effet, à l'œil nu (**Figure 7.4**) on observe que la couleur de la suspension

évolue du jaune vers le violet foncé en passant par tous les dégradés de rouge, avant que la suspension ne devienne transparente avec des agrégats visibles au fond du tube après 24 heures de réaction.

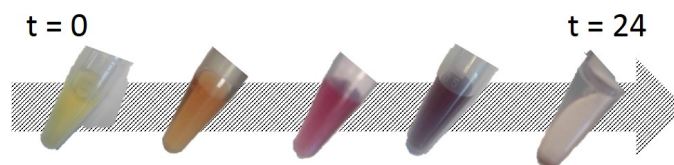


FIGURE 7.4 – Modification de la couleur de la suspension de nanoparticules d'argent au cours du temps après ajout du ligand L1.

La mesure de l'argent dissous et nanoparticulaire au cours de la réaction avec le ligand L1 en condition stœchiométrique 1 : 1 (S : Ag) par ICP-AES est relativement faible, libérant moins de 1 μg sur les 20 μg d'argent nanoparticulaire durant les 4 premières heures (Figure 7.5). Il faut cependant souligner la perte progressive de matière au cours du temps : les résultats sont ici exprimés en masse d'argent mesurée et non pas en pourcentage de dissolution comme dans l'étude précédente. Cette perte est probablement due à une adsorption sur les parois des tubes utilisés pour la réaction, comme nous l'avons déjà observé avec la protéine ATX1 (Marchioni et al., 2018a). Ce type de phénomène a également été décrit dans d'autres travaux menés sur le comportement des nanoparticules d'argent en présence de protéines (Liu et al., 2017).

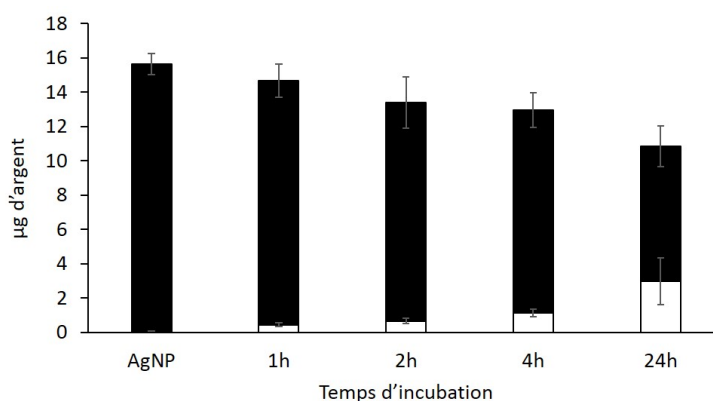


FIGURE 7.5 – Quantification par ICP-AES de l'argent dissous et de l'argent sous forme nanoparticulaire au cours de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 1 : 1 (S : Ag). L'argent sous forme nanoparticulaire est indiqué en noir et l'argent soluble en blanc.

Comme décrit dans l'étude précédente, l'analyse de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 dans un mélange stœchiométrique 1 : 1 (S : Ag) a été effectuée par AF4-ICP-MS (méthode décrite **paragraphe 10.3.3 et 10.4.2**) afin de

corrélér l'augmentation de la taille observée par DLS avec la dissolution analysée par ICP-AES.

Sur la **figure 7.6**, le fractogramme des nanoparticules d'argent est présenté en rouge. Il permet de montrer que ces nanoparticules de 20 nm de diamètre sont éluées à un temps de rétention de 15 minutes et ce pic reste inchangé lorsqu'elles sont incubées 24 heures dans le tampon (courbe noire). Lorsque les nanoparticules d'argent sont mises en présence du ligand L1, on observe plusieurs phénomènes concomitants. Premièrement, le pic spécifique des nanoparticules d'argent à un temps de rétention de 15 minutes diminue de manière graduelle au cours du temps. Deuxièmement, un nouveau pic à un temps de rétention de 11 minutes apparaît. Celui-ci correspond à des espèces solubles d'Ag(I) et ce pic est relativement stable en terme d'intensité au cours du temps. Troisièmement, un nouveau pic apparaît à un temps de rétention de plus en plus grand au cours de l'évolution de la réaction entre les nanoparticules d'argent et L1. Ce pic correspond donc à des espèces de tailles plus grandes que des nanoparticules d'argent de 20 nm et ces espèces grossissent au cours de la réaction, ce qui est comparable à la mesure du rayon hydrodynamique (**Figure 7.3 B**). L'ensemble de ces résultats laisse penser que la molécule L1 permet d'induire le pontage de nanoparticules d'argent entre elles.

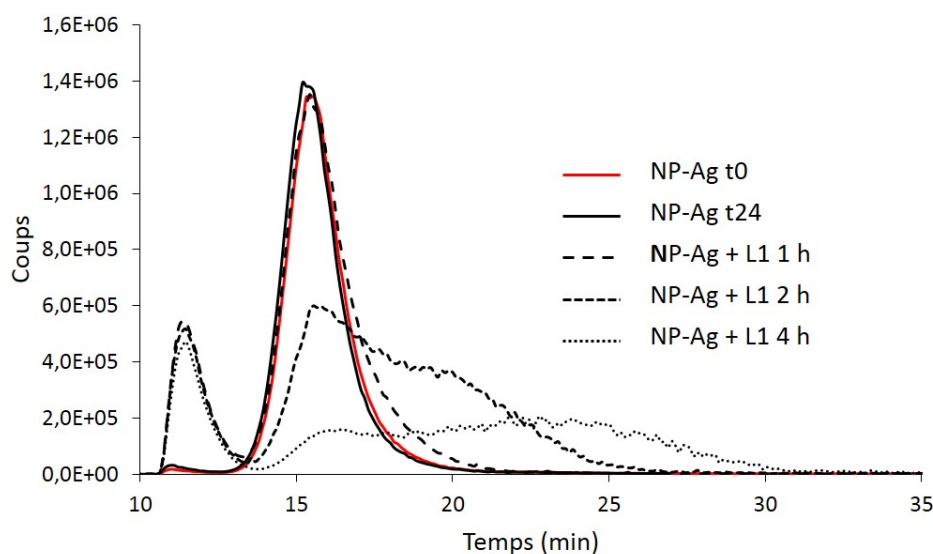


FIGURE 7.6 – Suivi du signal de l'argent par ICP-MS après fractionnement par AF4. Echantillon de nanoparticules d'argent sans ligand (rouge à t0, noir après 24 heures). Echantillon de nanoparticules en présence de L1 après 1 heure (tirets), 2 heures (gros pointillés) et 4 heures (petits pointillés) de réaction avec L1.

Le suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 en concentration stœchiométrique (S : Ag) au cours du temps a également été effectuée par cryomicroscopie électronique à transmission en collaboration avec Amandine Arnould (LITEN/PFNC). Cette technique permet d'éviter les artefacts imputables au

séchage de la solution sur la grille lors de la préparation des échantillons. Ainsi, les espèces observées sont représentatives de leur état en solution. On observe ici la formation de cluster de nanoparticules dans lesquels les nanoparticules d'argent restent bien individualisées (**Figure 7.7 A**). De plus, la taille de ces clusters de nanoparticules augmente au cours du temps d'incubation (**Figure 7.7 B et C**). Ainsi, ces observations par cryo-microscopie électronique confirment les hypothèses établies à partir des résultats de DLS et AF4-ICP-MS apportant la preuve de la formation d'assemblages de nanoparticules d'argent médiée par le ligand L1.

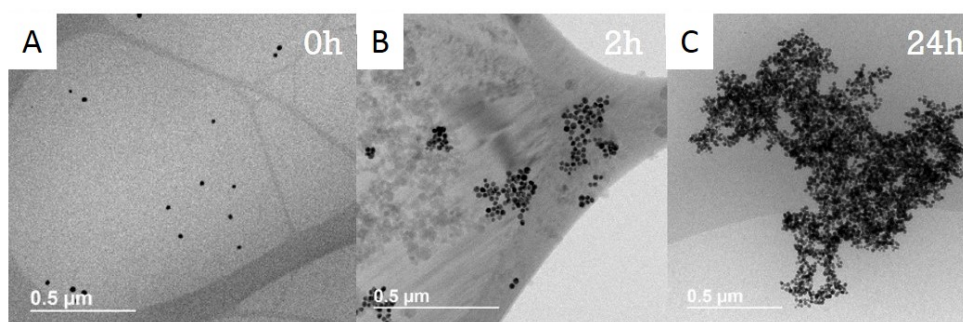


FIGURE 7.7 – Suivi par cryomicroscopie électronique à transmission de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 1 : 1 (S : Ag). (A) : nanoparticules d'argent enrobées de citrate à t0, (B) : nanoparticules d'argent après 2 heures de réaction avec L1 et (C) : nanoparticules d'argent après 24 heures de réaction avec L1.

Ces clusters sont responsables de l'apparition du signal SPR à plus grandes longueurs d'onde (Csete et al., 2014) et d'une diminution du signal spécifique des nanoparticules de 20 nm de diamètre. En effet, les nanoparticules d'argent sont considérées comme des dipôles dont la constante diélectrique est dépendante des dimensions de la particule, de la contribution des électrons libres du système, de l'amortissement de la surface étudiée et de la transition électronique (Noguez, 2007). Dans le cas des nanoparticules d'argent sphériques, on considère qu'elles ne possèdent qu'une seule résonance plasmonique dépendante de leur rayon du fait de leur géométrie symétrique. Lorsque les nanoparticules d'argent sont amenées à se toucher sans s'interpénétrer comme cela est le cas lors d'un phénomène d'agglomération, les oscillations du plasmon le long du nouveau dipôle formé varient, entraînant l'apparition d'un shift vers de plus grandes longueurs d'onde (Amendola et al., 2010).

7.1.2 Cinétique de réaction

Le postulat de cette étude est basé sur cette observation : les clusters observés sont des assemblages de nanoparticules d'argent dont la formation est médiée par une molécule thiolée : L1 (**Figure 7.1**). Cette réaction pourrait donc être contrôlable afin de produire des assemblages de nanoparticules d'argent de tailles définies qui pourront être utilisés s'ils possèdent une activité biocide.

Ainsi, la connaissance de la surface des nanoparticules utilisées dans ces manipulations apparaît comme une nécessité, afin de comprendre la dynamique de réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1. Dans un premier temps, nous avons déterminé la fraction atomique présente à la surface des nanoparticules d'argent de 20 nm.

Pour prendre en compte le vide dans une nanoparticule d'argent, on suppose que la maille cristalline peut être coupée de plusieurs façons : (110), (100), (111). Le calcul d'un Plan Packing Factor (PPF) moyen, qui est la moyenne des Atomic Packing Factor (APF) (la fraction de volume occupée par les atomes dans une maille cristalline) de chaque facette, est effectué en considérant que chaque plan est représenté de manière égale à la surface de la nanoparticule d'argent :

$$PPF_{moyen} = \frac{1}{3} \cdot PPF_{110} + \frac{1}{3} \cdot PPF_{100} + \frac{1}{3} \cdot PPF_{111} \quad (7.1)$$

$$PPF_{moyen} = \frac{1}{3} \cdot 0,56 + \frac{1}{3} \cdot 0,79 + \frac{1}{3} \cdot 0,9 = 0,75 \quad (7.2)$$

On peut écrire deux relations : l'équation (7.3) qui met en relation le nombre d'atomes de surface n et l'équation (7.4) qui met en relation le nombre d'atomes totaux N dans une nanoparticule où N : nombre d'atomes total, n : nombre d'atomes de surface, R : rayon de la nanoparticule et r : rayon d'un atome d'argent.

$$4 \cdot \pi \cdot R^2 = \frac{n \cdot \pi \cdot r^2}{PPF_{moyen}} \quad (7.3)$$

$4\pi R^2$ est la surface du disque projeté d'une nanoparticule d'argent, et πr^2 est la surface du disque projeté d'un atome d'argent

$$\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 = N \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \frac{1}{APF} \rightarrow \frac{R}{r} = \left(\frac{N}{APF} \right)^{1/3} \quad (7.4)$$

On reporte le résultat de l'équation (7.4) dans l'équation (7.3) afin d'obtenir un rapport direct entre le nombre d'atomes de surface n et le nombre d'atomes total dans

une nanoparticule N .

$$n = 4.PPF. \left(\frac{R}{r}\right)^2 = 4.PPF. \left(\frac{N}{APF}\right)^{2/3} \rightarrow n = 4 \frac{PPF}{APF^{2/3}}.N^{2/3} \rightarrow n = 3,67.N^{2/3} \quad (7.5)$$

Pour calculer le nombre d'atomes dans une nanoparticule il y a deux possibilités soit nous tenons compte de la masse théorique d'une nanoparticule d'argent (**équation (7.6)**), soit nous tenons compte du volume théorique d'une nanoparticule d'argent (**équation (7.7)**). Dans le cas de l'**équation (7.7)** nous considérons que la maille unitaire de l'argent métallique contient quatre atomes d'argent par maille de longueur a :

$$N = \frac{M_{Np}}{M_{Ag}} = \rho \cdot \frac{4}{3} \cdot \frac{\pi \cdot r^3 \cdot Na}{M_{Ag}} = \frac{\pi \cdot \rho \cdot Na}{6 \cdot M_{Ag}} \cdot d^2 \rightarrow N = 30,6 d^2 \quad (7.6)$$

Dans ce cas, Na : nombre d'Avogadro $6,0221409 \cdot 10^{23}$, M_{Ag} : masse molaire de l'élément $107,8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, ρ : densité de l'élément $10,5$. Dans le cas du calcul prenant en compte la masse d'une nanoparticule d'argent, pour une nanoparticule d'argent de 20 nm , on obtient donc $244\,800$ atomes d'argent.

$$N = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \frac{R^3}{a^3} \cdot 4 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \frac{d^3}{8} \cdot \frac{4}{a^3} = \frac{\pi 4}{6 a^3} d^3 \rightarrow N = 31,1 \cdot d^3 \quad (7.7)$$

Dans le cas du calcul prenant en compte le volume d'une nanoparticule d'argent, pour une nanoparticule d'argent de 20 nm on obtient donc : $248\,800$ atomes d'argent.

La différence de résultats entre les deux calculs, prenant en compte ou non l'espace mort de la nanoparticule est faible. La fraction d'argent à la surface de la nanoparticules d'argent de 20 nm est de $5,86 \%$ lorsque le calcul est menée en tenant compte de la masse de la nanoparticule et $5,83 \%$ lorsque le calcul est menée en tenant compte du volume.

Poursuivant l'objectif d'un contrôle de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1, les expériences précédentes ont été reproduites en faisant varier les concentrations en soufre. Ainsi les manipulations ont été réalisées à une concentration de soufre de $90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ce qui représente 25% (**Figure 7.8 et 7.9**) et 5% (**Figure 7.10 et 7.11**) de la quantité d'argent total dans le mélange réactionnel. De plus, dans le cas de la plus faible quantité de L1 utilisée (5%), celle-ci correspond à la quantité d'atome d'argent disponible à la surface d'une nanoparticule de 20 nm de diamètre, comme déterminé ci-dessus.

Dans des conditions de stoechiométrie $0,25 : 1$ (S : Ag), la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 induit une évolution du signal SPR de la suspension de nanoparticules similaire à celle décrite pour un ratio $1 : 1$ (S : Ag), mais avec une cinétique plus lente. On observe ainsi une diminution de l'intensité du pic

à 400 nm au cours du temps de 1 à 0,97 après 15 minutes de réaction, 0,81 après 30 minutes, 0,66 après 1 heure, 0,55 après 1 heure et 15 minutes, 0,36 après 2 heures et 0,16 après 3 heures. On observe également l'apparition et l'évolution du second pic vers de plus grandes longueurs d'onde. Ce pic n'est pas réellement visible après 15 minutes de réaction et apparaît à 480 nm après 30 minutes, 495 nm après 1 heure, 530 nm après 1 heure et 15 minutes, 565 nm après 2 heures et 600 nm après 3 heures (**Figure 7.8**).

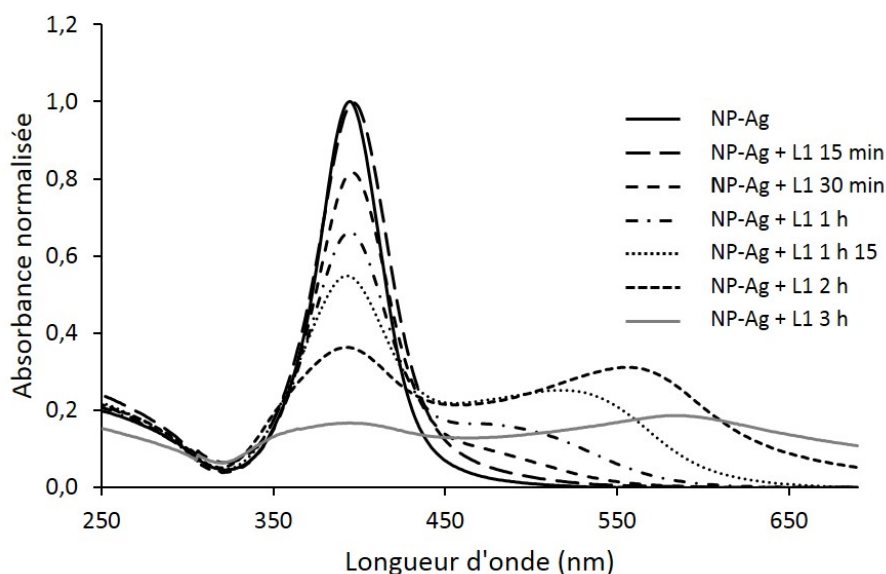


FIGURE 7.8 – Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,25 : 1 (S : Ag). Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 15 minutes d'incubation avec L1 (en longs tirets), après 30 minutes d'incubation avec L1 (en tirets courts), après 1 heure d'incubation avec L1 (en alternance points et tirets), après 1h15 d'incubation avec L1 (en pointillés), après 2 heures d'incubation avec L1 (en pointillés longs) et après 3 heures d'incubation avec L1 (en gris).

Le diamètre hydrodynamique des nano-objets dans l'échantillon à 0,25 : 1 (S : Ag) augmente au cours de la réaction avec L1 de manière similaire à l'apparition du second pic observé en spectroscopie UV-Visible. On mesure ainsi un diamètre moyen de 27 nm après 15 minutes de réaction, 30 nm après 30 minutes, 54 nm après 1 heure, 90 nm après 1 heure et 15 minutes, 250 nm après 2 heures et 500 nm après 3 heures (**Figure 7.9**). La polydispersité des mesures augmente également avec la taille moyenne mesurée.

La réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 à un ratio de 0,05 : 1 (S : Ag) présente également une évolution du signal SPR de la suspension de nanoparticules similaire à celle décrite précédemment mais encore plus lente. L'intensité à 400 nm est stable pendant les trente premières minutes de réaction puis diminue de

1 à 0,86 après 1 heure de réaction, 0,68 après 2 heures, 0,65 après 3 heures, 0,60 après 4 heures, 0,52 après 5 heures et 0,21 après 20 heures ainsi qu'une évolution du second pic vers de plus grandes longueurs d'onde. Ce pic n'est pas réellement visible avant 1 heure de réaction, 490 nm après 2 heures, 520 nm après 3 heures, 525 nm après 4 heures, 535 nm après 5 heures et 570 nm après 20 heures. (**Figure 7.10**).

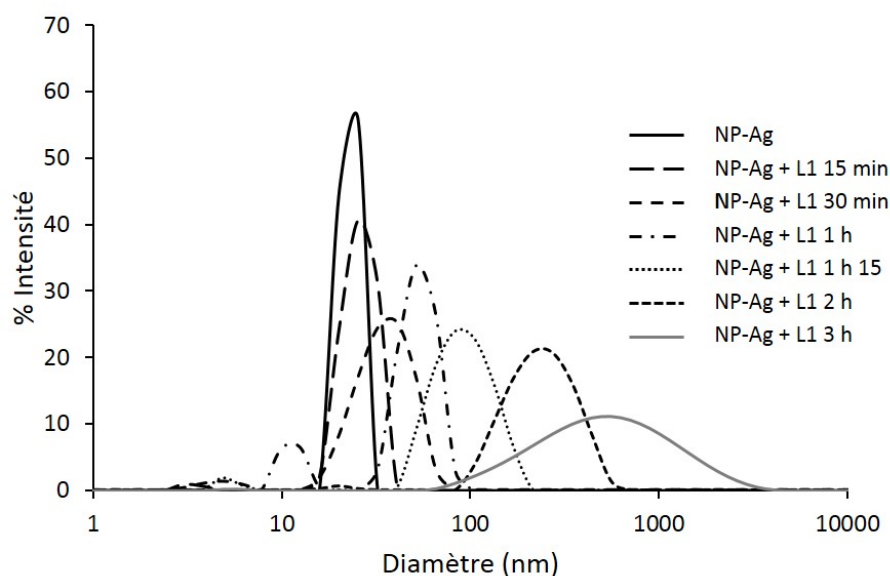


FIGURE 7.9 – Suivi par DLS de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,25 : 1 (S : Ag). Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 15 minutes d'incubation avec L1 (en longs tirets), après 30 minutes d'incubation avec L1 (en tirets courts), après 1 heure d'incubation avec L1 (en alternance points et tirets), après 1h15 d'incubation avec L1 (en pointillés), après 2 heures d'incubation avec L1 (en pointillés longs) et après 3 heures d'incubation avec L1 (en gris).

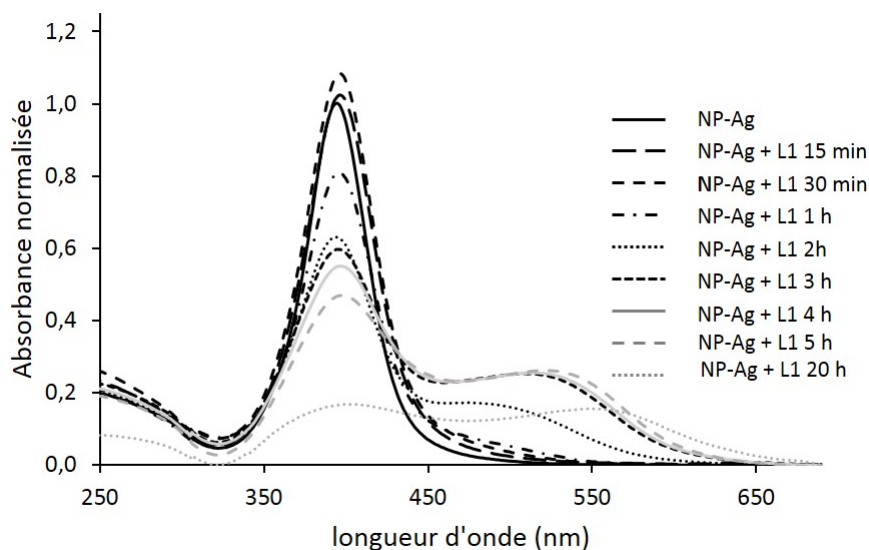


FIGURE 7.10 – Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,05 : 1 (S : Ag). Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 15 minutes d'incubation avec L1 (en longs tirets), après 30 minutes d'incubation avec L1 (en tirets courts), après 1 heure d'incubation avec L1 (en alternance points et tirets), après 2 heures d'incubation avec L1 (en pointillés), après 3 heures d'incubation avec L1 (en pointillés longs), après 4 heures d'incubation avec L1 (en gris), après 5 heures d'incubation avec L1 (en tirets gris) et après 20 heures d'incubation avec L1 (en pointillés gris).

Le diamètre hydrodynamique des nano-objets en suspension dans l'échantillon à un ratio de 0,05 : 1 (S : Ag) augmente au cours de la réaction de manière similaire à l'apparition du second pic observé en spectroscopie UV-Visible. On observe ainsi des espèces de diamètre de 25 nm après 15 minutes de réaction, 26 nm après 30 minutes, 30 nm après 1 heure, 50 nm après 2 heures, 70 nm après 3 heures, 85 nm après 4 heures, 130 nm après 5 heures et 370 nm après 20 heures (**Figure 7.11**).

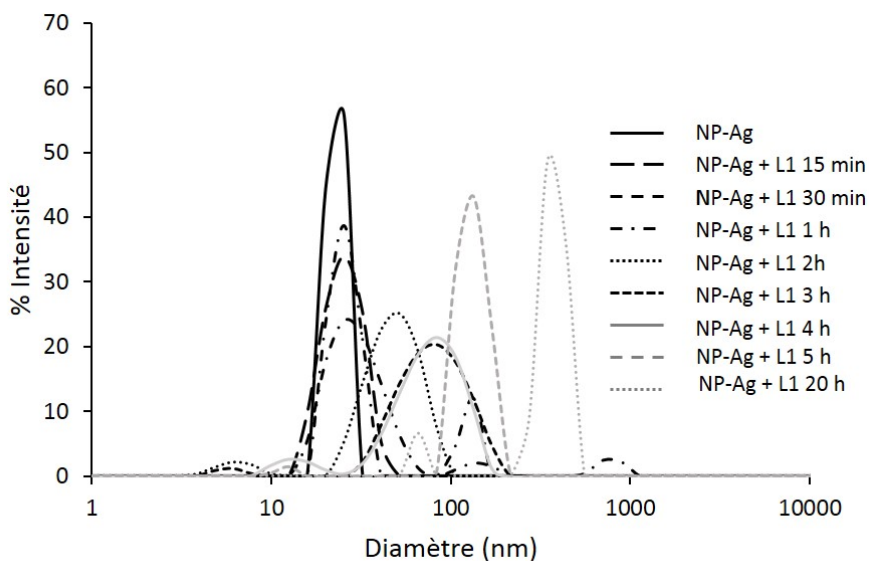


FIGURE 7.11 – Suivi par DLS de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,05 : 1 (S : Ag). Les nanoparticules d'argent à t0 (en noir), après 15 minutes d'incubation avec L1 (en longs tirets), après 30 minutes d'incubation avec L1 (en tirets courts), après 1 heure d'incubation avec L1 (en alternance points et tirets), après 2 heures d'incubation avec L1 (en pointillés), après 3 heures d'incubation avec L1 (en pointillés longs), après 4 heures d'incubation avec L1 (en gris), après 5 heures d'incubation avec L1 (en tirets gris) et après 20 heures d'incubation avec L1 (en pointillés gris).

La réaction contenant 25 % de thiolates par atome d'argent permet de former des édifices de 100 nm de diamètre après 1 heure et 15 minutes d'incubation (**Figure 7.9**), alors qu'un mélange équimolaire produit des édifices d'une taille égale en moins de 30 minutes (**Figure 7.3**), et qu'il nécessite 5 heures de réaction dans le cas d'un mélange contenant 5 % de thiolates (**Figure 7.11**). De plus, il a été mis en évidence que la quantité de thiol dans le mélange réactionnel limite le processus de croissance des édifices. Dans le cadre du mélange réactionnel dont le rapport thiolate/argent est le plus faible, la taille des édifices n'atteint pas 1000 nm. Cependant, la DLS n'est pas une méthode adaptée pour mesurer des édifices de cette taille, mais la mesure du signal SPR met bien en évidence le fait que dans ce cas le second pic n'atteint pas les longueurs d'onde de 600 nm, même après 20 heures d'incubation. De plus, comme c'est observable sur la **figure 7.12**, la suspension de nanoparticules en présence de la plus faible concentration en soufre n'émet pas une coloration aussi intense que la suspension de nanoparticules en présence d'un ratio de 0,25 : 1 (S : Ag). Ainsi il a été mis en évidence que le processus entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 est dépendant du rapport de concentration entre la fonction thiolate et l'argent sous forme nanoparticulaire dans le mélange réactionnel.



FIGURE 7.12 – Photographie d'un échantillon à **gauche** à 0,25 : 1 (S : Ag) et à **droite** à 0,05 : 1 (S : Ag)

Pour les études plus approfondies de caractérisation des propriétés de ces édifices, le ratio de 0,25 : 1 (S : Ag) a été défini comme étant optimal, puisqu'il correspond à une cinétique de réaction assez lente pour être étudiée sans pour autant être limitée.

7.1.3 Stabilisation des édifices

L'hypothèse la plus évidente serait que des liaisons Ag - S permettent la formation des assemblages de nanoparticules d'argent et leur stabilisation. Ainsi les groupements thiols seraient au coeur du processus. Afin de vérifier cette hypothèse, un agent bloquant les thiols libres (**Figure 7.13**) est ajouté au mélange réactionnel contenant les nanoparticules d'argent et le ligand L1. L'iodoacétamide (Smythe, 1936) réagit avec les thiolates selon la réaction suivante :

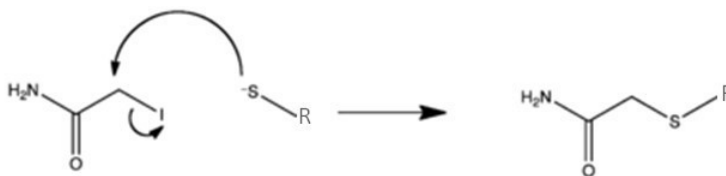


FIGURE 7.13 – Réaction de neutralisation des thiols libres par l'iodoacétamide

Après une heure de réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 dans des conditions de ratio 0,25 : 1 (S : Ag), l'iodoacétamide est ajouté dans le mélange réactionnel, et le suivi du signal SPR au cours du temps souligne le fait que l'intensité du signal aux grandes longueurs d'onde n'évolue plus et cela même après 120 heures d'incubation supplémentaires (**Figure 7.14**). Ces expériences permettent donc de mettre en évidence i) l'implication des thiols dans ce processus, ii) la capacité de contrôler la taille finale des édifices grâce à l'ajout d'iodoacétamide.

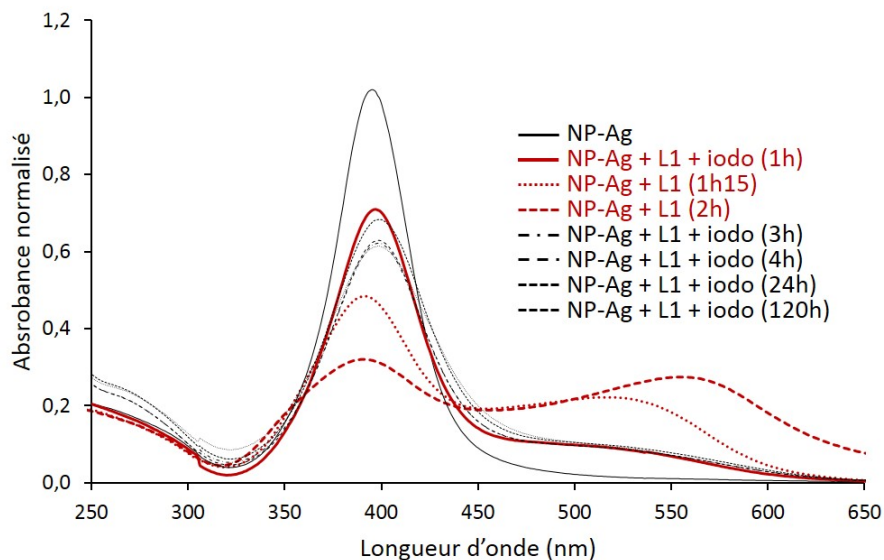


FIGURE 7.14 – Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1 0,25 : 1 (S : Ag) au cours du temps en présence ou en absence d'iodoacétamide ajouté après 1 heure d'incubation. Les nanoparticules d'argent enrobées de citrate à t_0 (en noir), après 1 heure de réaction (en rouge), après 1h15 de réaction (en pointillés rouges), après 2 heures de réaction (en tirets serrés rouge), après 3 heures de réaction et l'ajout d'iodoacétamide (en alternance tirets et pointillés noirs), après 4 heures de réaction et l'ajout d'iodoacétamide (en tirets noirs), après 24 heures de réaction et l'ajout d'iodoacétamide (en tirets serrés noirs) et après 120 heures de réaction et l'ajout d'iodoacétamide (en tirets serrés gris).

Ainsi, des assemblages de nanoparticules d'argent associées entre elles par un réseau de molécules organiques via leurs fonctions thiols peuvent être stabilisés en solution. Dans la suite de ce document nous allons nous concentrer sur la caractérisation architecturale, physicochimique et biologique de ces assemblages de nanoparticules d'argent, qui du fait de leur architecture atypique pourrait avoir un intérêt en tant que potentiel agent biocide.

7.1.4 Comparaison avec un phénomène connu

La réaction d'agglomération des nanoparticules d'argent en présence de glutathion oxydé (**Figure 7.15**) a été observée au cours de ces travaux. Cependant, alors que la réaction équimolaire avec le ligand L1 s'étend sur plusieurs minutes, la réaction équimolaire avec le glutathion oxydé est extrêmement rapide. De manière similaire à L1, la couleur des échantillons évolue au cours de la réaction, passant de jaune à violet foncé.

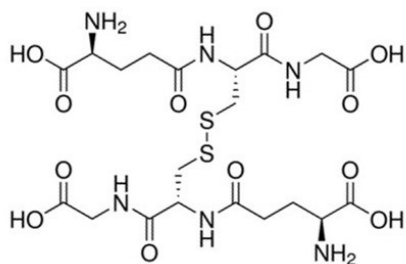


FIGURE 7.15 – Formule chimique du glutathion oxydé

Cependant, lors de la mesure du signal SPR, le déplacement du signal vers les plus grandes longueurs d'ondes n'est pas aussi important qu'attendu (**Figure 7.16 A**) (pour rappel, avant une mesure UV-Visible ou DLS le mélange réactionnel est dilué par 6) et il en va de même avec la mesure du rayon hydrodynamique moyen l'échantillon, qui donne une valeur proche de 20 nm. L'intensité et la couleur du mélange réactionnel avant dilution laisse à penser que la taille devrait être plus importante, comme cela a été observé dans le paragraphe précédent (**Figure 7.16 B**). Lors d'une lecture avec une dilution d'un facteur 2, on peut observer que le signal aux plus grandes longueurs d'ondes est plus important après normalisation et que cela va de pair avec une augmentation du diamètre hydrodynamique moyen (**Figure 7.16 B**). Ces résultats signifient que l'on observe une agglomération des nanoparticules en présence du glutathion oxydé, processus qui serait donc réversible, au contraire des assemblages générés avec L1.

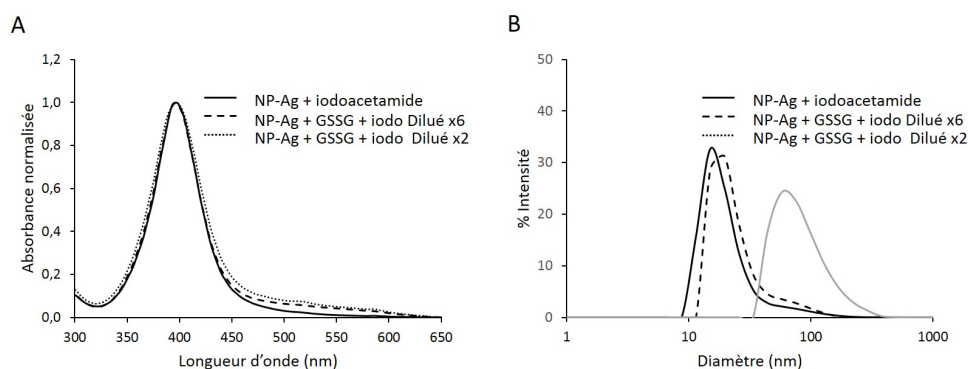


FIGURE 7.16 – Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le glutathion oxydé. Les nanoparticules d'argent sont incubées en présence ou en absence (courbe noire) de GSSG pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite dilué 6 fois (tirets) ou 2 fois (pointillés). Analyse par (A) : spectroscopie UV-Visible et (B) : DLS

Ces observations ont été obtenues quel que soit le temps d'incubation avant la mesure, et donc l'état d'avancement de la réaction entre le glutathion oxydé et les nanoparticules d'argent comme le montre les résultats de la **figure 7.17** obtenues après une incubation de 1 heure avec le GSSG.

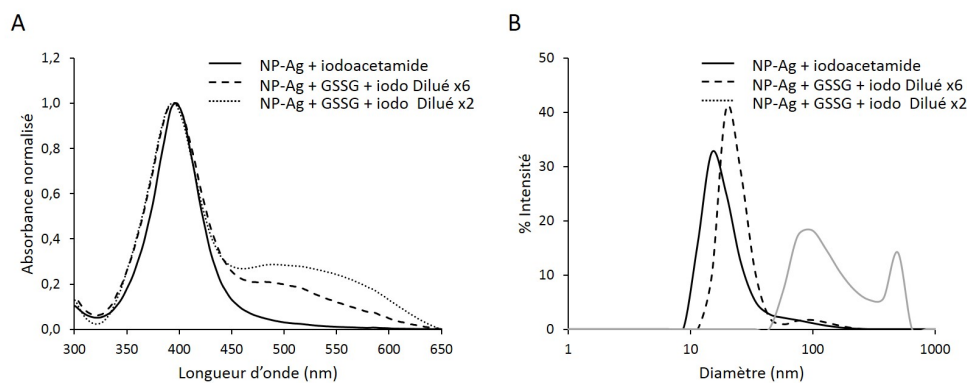


FIGURE 7.17 – Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le glutathion oxydé. Les nanoparticules d'argent sont incubées en présence ou en absence (courbe noire) de GSSG pendant 1 heure. Le mélange est ensuite dilué 6 fois (tirets) ou 2 fois (pointillés). Analyse par (A) : spectroscopie UV-Visible et (B) : DLS

Le phénomène de clustering des nanoparticules peut porter plusieurs noms selon leur état final. Dans le cas d'une agrégation, les nanoparticules sont fusionnées, c'est à dire que les nanoparticules forment des liaisons covalentes entre elles *via* des atomes des nanoparticules elles-même alors que dans le cas d'une agglomération les nanoparticules sont associées entre elles par des liaisons faibles et elles sont donc facilement dissociables. Dans le but de souligner le caractère dissociable de l'édifice formé par le glutathion oxydé, le pH de la suspension de nanoparticule et de GSSG a été augmenté par l'ajout de 50 μL de NaOH (Figure 7.18). On observe bien que l'augmentation du pH de la suspension entraîne une réversion du processus observé par la diminution de l'intensité du signal SPR aux grandes longueurs d'ondes.

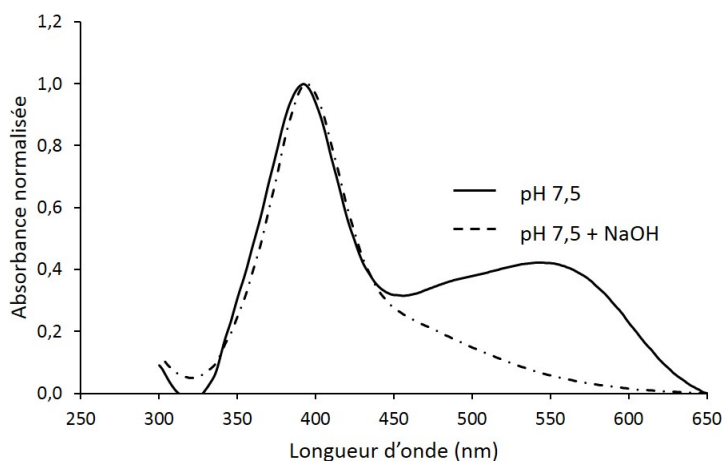


FIGURE 7.18 – Analyse par spectroscopie UV-Visible d'un échantillon de nanoparticules d'argent incubé avec du glutathion oxydé avant (trait plein) et après l'ajout de NaOH (en pointillés)

Ainsi il a été mis en évidence que les édifices formés par le glutathion oxydé et les nanoparticules d'argent ne sont pas stables, et que le processus mis en place est

un processus d'agglomération, contrairement à ce qui a été décrit avec la molécule L1, qui induit un processus d'assemblage des nanoparticules d'argent médié par les thiolates.

7.1.5 Conclusion

De part ces expériences, nous avons mis en évidence que le ligand L1 entraîne la formation d'édifices bien définis formés de nanoparticules d'argent de 20 nm de diamètre, pontées les unes aux autres par le ligand.

La **figure 7.19 A** résume graphiquement l'évolution du signal SPR des échantillons de nanoparticules d'argent en présence de L1. Il est donc ainsi possible de comparer les **figures 7.19 A et B** et de suivre l'augmentation de la taille moyenne des assemblages en fonction de la modification du signal SPR de l'échantillon.

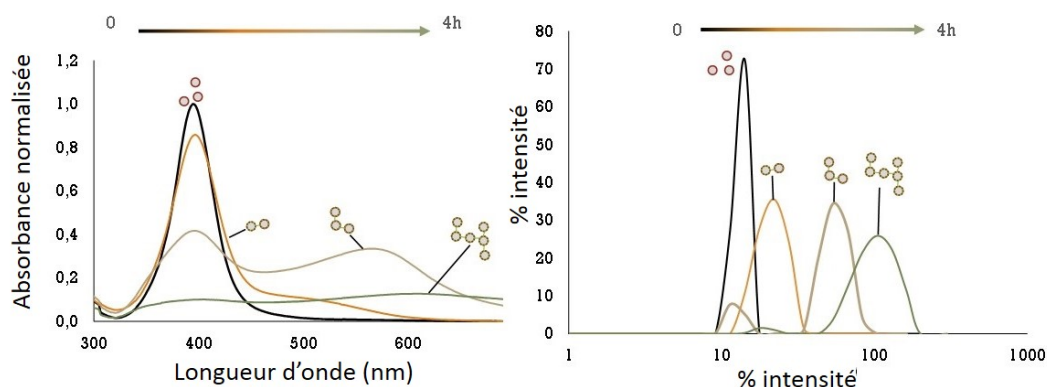


FIGURE 7.19 – Résumé du suivi de la réaction d'assemblage des nanoparticules d'argent avec L1. (A) mesure du signal SPR par spectroscopie UV-Visible et (B) DLS, annoté par des schéma représentatifs de l'évolution des assemblages dans l'échantillon

7.2 Production des échantillons

Afin de pouvoir travailler à plus grande échelle, ce qui est nécessaire à la caractérisation des assemblages, les nanoparticules commerciales ont été substituées par des nanoparticules synthétisées au laboratoire (**Paragraphe 10.1.1**). Les nanoparticules sont produites par réduction chimique d'un sel d'argent (AgNO_3) par un réducteur naturel (l'acide tannique) et stabilisées par le citrate de sodium, comme décrit par Bastús et al., 2014.

7.2.1 Réaction d'assemblage & purification

Selon le protocole décrit au **paragraphe 10.1.2**, $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de soufre sous forme du ligand L1 et $370 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'argent sous forme de nanoparticules d'argent de 20 nm de diamètre sont mis sous agitation à 22°C dans un tampon Hepes-citrate à pH 7,4. L'iodoacétamide en léger excès ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) est ajouté après 1h30 de réaction. Le mélange réactionnel est gardé sous agitation pendant deux heures avant la séparation des assemblages de nanoparticules des déchets produits par la réaction : argent soluble, iodoacétamide en excès et ligand L1 non fixé à une nanoparticule.

7.2.2 Caractérisation des assemblages de nanoparticules d'argent de 40, 60 et 200 nm

Comme on a pu l'observer dans le paragraphe précédent, la distribution de taille des solutions de nanoparticules d'argent qui réagissent avec L1 est de plus en plus large, ainsi des assemblages de différentes tailles cohabitent après le blocage de la réaction par l'ajout d'iodoacétamide. Nous avons séparé trois populations d'assemblages relativement homogènes (**Figure 7.20**) de diamètre moyen 40, 60 et 200 nm, à partir d'une seule préparation. Ils sont stockés à l'obscurité à 4°C dans le tampon Hepes-citrate (pH 7,4). Les propriétés des échantillons ont été plus précisément caractérisées par DLS (**Figure 7.20**), MET (**Figure 7.22**) ainsi que par mesure du signal SPR (**Figure 7.21**) et nanoparticles tracking analysis (NTA) (**Figures 7.23, 7.25 et 7.27**).

Généralités

Les mesures de distribution de taille du rayon hydrodynamique des échantillons d'assemblages de nanoparticules d'argent de 40, 60 et 200 nm ont permis de souligner deux points importants. Dans un premier temps, on observe que la courbe gaussienne des tailles se déplace vers des diamètres de plus en plus élevés alors que la distribution des tailles est relativement large. En effet, si la largeur du pic semble n'augmenter que très peu entre la **figure 7.20 A** et la **figure 7.20 B** et entre la **figure 7.20 B** et la **figure 7.20 C**, il faut rappeler que l'échelle est représentée sous forme logarithmique, ainsi la distribution de taille est bien plus large dans le cas de la **figure 7.20 C** qui représente les assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm que dans le cas de la **figure 7.20 A** qui représente les assemblages de nanoparticules d'argent de 40 nm. Cela met en évidence que la méthode de séparation des échantillons permet de sélectionner une certaine population de taille d'assemblage et pas une taille précise. Dans un second temps, on observe dans les distributions de taille des assemblages de 60 nm et 200 nm (**Figure 7.20 B et C**) qu'une population de 20 nm de diamètre est visible, ce qui met en évidence la présence rémanante de nanoparticules isolées dans les échantillons d'assemblages.

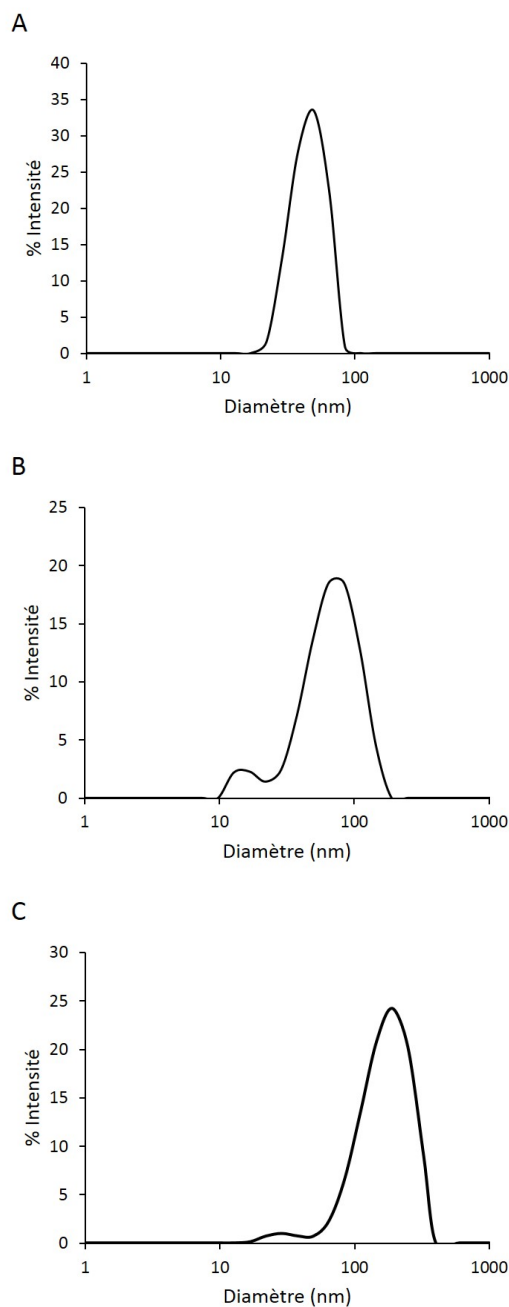


FIGURE 7.20 – Distribution de taille en intensité mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent. (A) : 40, (B) : 60 et (C) : 200 nm après séparation sur gradient de sucre.

Les spectres du signal SPR des assemblages de nanoparticules de différentes tailles montrent que la fraction du spectre spécifique des nanoparticules d'argent dont le maximum est proche de 400 nm diminue par rapport à la fraction située à 550 nm lorsque la taille des assemblages augmente : 70 % pour les assemblages de 40 nm (**Figure 7.21 A**), 60 % pour les assemblages de 60 nm (**Figure 7.21 B**) et 40 % pour les assemblages de 200 nm (**Figure 7.21 C**). Plus la taille des assemblages augmente, plus le spectre s'étend vers les grandes longueurs d'onde. Le retour à la ligne de base du signal SPR des assemblages de nanoparticules d'argent de 40 nm se fait à 750 nm (**figure 7.21 A**) alors que le retour à la ligne de base du signal SPR des assemblages de 60 nm se fait à 800 nm (**Figure 7.21 B**) et qu'il se fait à 870 nm pour ceux de 200 nm (**Figure 7.21 C**). Cela va de pair avec une augmentation du pic présent aux plus grandes longueurs d'ondes (à 550 nm pour les assemblages de 60 nm et à 570 nm pour ceux de 200 nm), qui est bien plus marqué pour les grands assemblages que pour les assemblages de 40 nm, où le signal ressemble d'avantage à un épaulement dont le maximum se trouve à 530 nm.

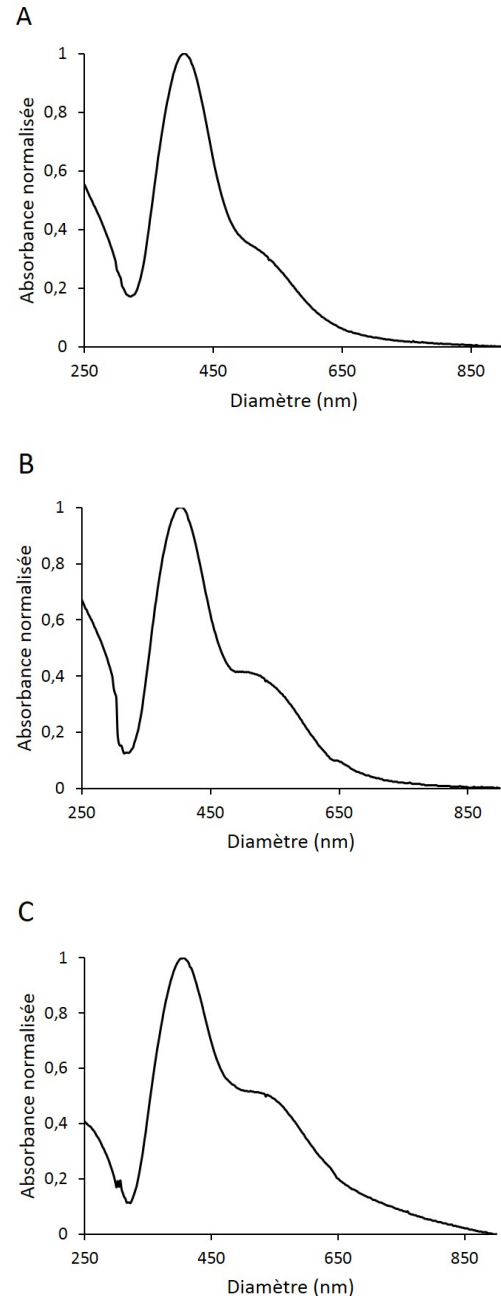


FIGURE 7.21 – Signal SPR des assemblages de nanoparticules d'argent. (A) : 40, (B) : 60 et (C) : 200 nm mesuré par spectroscopie UV-Visible après séparation sur gradient de sucrose.

Les échantillons d'assemblages purifiés ont également été observés en MET comme décrit dans le **paragraphe 10.3.4**. Les grilles ont été préalablement traitées au plasma afin de limiter au maximum les risques d'agglomération imputables au séchage de la solution sur la grille. Ainsi nous avons mis en évidence que les échantillons d'assemblages de nanoparticules d'argent se montrent en MET sous forme de cluster, c'est à dire que l'on voit des paquets isolés de nanoparticules d'argent qui se touchent. Ces clusters sont composés de 2, 3 ou 4 nanoparticules dans le cas des assemblages de nanoparticules de 40 nm (**Figure 7.22 A**) et d'avantage de nanoparticules d'argent dans le cas des assemblages de nanoparticules de 60 nm (**Figure 7.22 B**) et encore plus de nanoparticules dans le cas des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm (**Figure 7.22 C**). On peut également observer sur ces figures que les nanoparticules sont d'une taille relativement semblable et qu'elles sont parfaitement désorganisé les unes par rapport aux autres au sein des édifices.

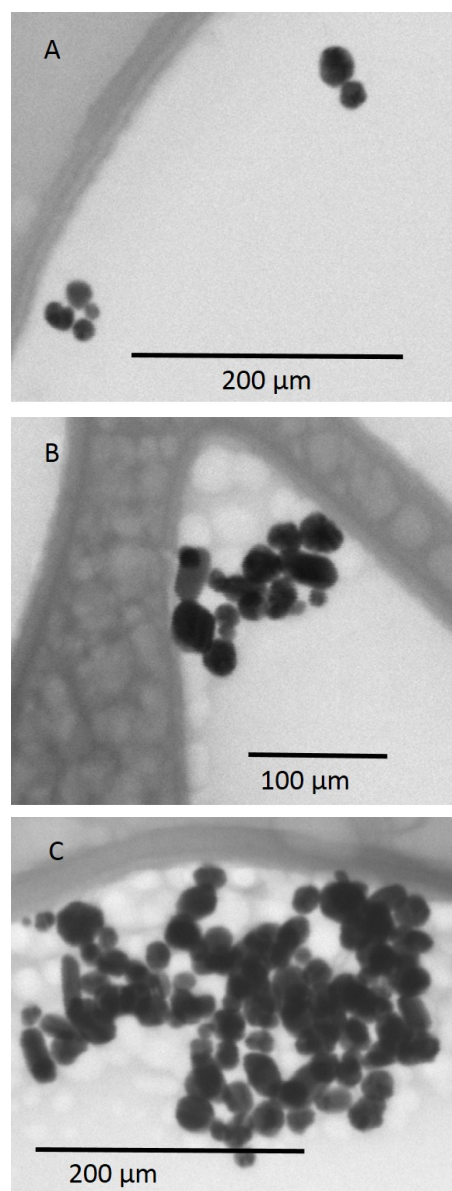


FIGURE 7.22 – Image de MET des assemblages. (A) : 40 nm, (B) : 60 nm et (C) : 200 nm après séparation sur gradient de sucrose.

L'analyse par NTA des échantillons ainsi préparés (**Paragraphe 10.3.2**) ainsi que les observations par MET ont permis la mise en évidence de sous-populations de nanoparticules isolées dans les échantillons d'assemblages de nanoparticules d'argent. Ces sous-populations n'avaient pas pu être observées par DLS du fait premièrement des limites de la technique qui ne permet pas d'analyser les sous-populations dans un échantillon hétérogène et deuxièmement, du fait que les plus grosses espèces génèrent intrinsèquement un signal de diffusion plus fort que les petites.

Assemblages de 40 nm

Dans une suspension d'assemblages de 40 nm, la valeur moyenne du diamètre des nano-objets observée par NTA est de $46,8 \pm 3,2$ nm. Cependant, la population principale (qui représente 47 % des espèces) a un diamètre de $26,2 \pm 1,4$ nm (**Figure 7.23**), il s'agit donc probablement de nanoparticules isolées. La deuxième population principale a une taille moyenne de 37 nm, ce qui correspond à la taille des assemblages mesurés en DLS. La mesure de la distribution de taille de l'échantillon par NTA, ainsi qu'en DLS donne un résultat en nombre d'édifice mesurés, et ne nous informe pas sur le nombre de nanoparticules engagées dans ces édifices.

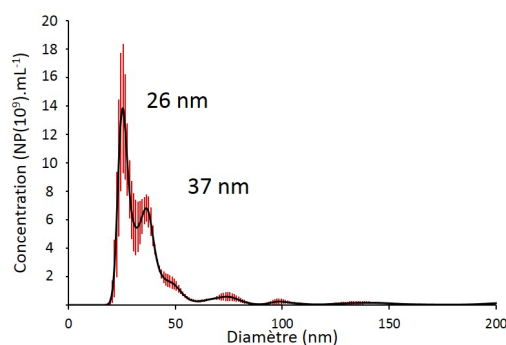


FIGURE 7.23 – Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 40 nm déterminée par NTA. La dispersion de la mesure est représentée en rouge et la moyenne en noir.

C'est pour cette raison que la mesure du nombre de nanoparticules d'argent engagées dans les assemblages de différentes tailles a été effectuée par comptage sur des images prises en MET. Cela a permis de proposer un comptage exprimé de deux façons : i) la distribution de taille des assemblages en nombre d'édifices (équivalent à ce qui est mesuré par la méthode NTA) dans laquelle 59,5 % des édifices contiennent une seule nanoparticule et ii) la distribution du nombre de nanoparticules dans l'échantillon, engagées ou non dans des assemblages, dans laquelle 36,5 % des nanoparticules sont isolées (**Figure 7.24**). Cette double représentation permet d'avoir une analyse plus complète des résultats. Lorsque nous comptons le nombre d'édifices contenant une ou plusieurs nanoparticules, cela permet de dire que parmi les assemblages de 40 nm, la majorité des assemblages contiennent 2 nanoparticules, mais que la majorité, 59,5 % des édifices sont des nanoparticules isolées. Lorsque nous comptons le nombre de nanoparticules, nous voyons que plus de 65 % des nanoparticules de l'échantillon sont engagées dans un assemblage et qu'il y a presque

autant de nanoparticules isolées que de nanoparticules engagées dans un assemblage composé de 2 nanoparticules.

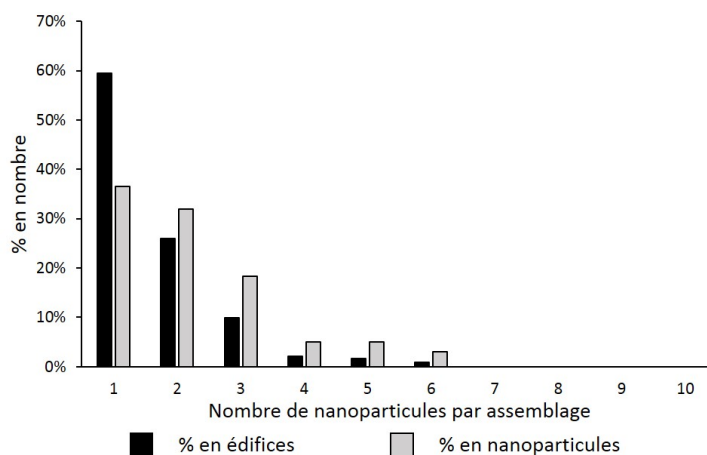


FIGURE 7.24 – Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 40 nm déterminée par MET.

Les valeurs obtenues par NTA ou en comptage par MET ne sont pas strictement équivalentes pour plusieurs raisons dont les principales sont que les mesures ont été effectuées sur différents lots d'assemblage et que le nombre d'édifices mesurés par NTA est de 10^3 à 10^5 fois supérieure. Cependant, il est possible maintenant d'affirmer que les assemblages dont la taille moyenne est de 40 nm contiennent principalement entre 2 et 3 nanoparticules. Ces deux méthodes mettent en évidence que la moitié des nano-objets dans les échantillons d'assemblages de 40 nm sont des nanoparticules d'argent isolées.

Assemblages de 60 nm

Dans une suspension d'assemblages de 60 nm, la valeur moyenne du diamètre des nano-objets mesurée par NTA est de $75,0 \pm 4,0$ nm. La population principale a un diamètre de $33,7 \pm 2,2$ nm (Figure 7.25). On observe plusieurs sous-populations de 47 nm, 57 nm, 71 nm et de plus grande taille mais en quantité bien inférieure. Dans tous les cas, il s'agit d'assemblages de nanoparticules. La mesure par NTA montre également la présence de 8 % de nanoparticules d'argent isolées dans l'échantillon.

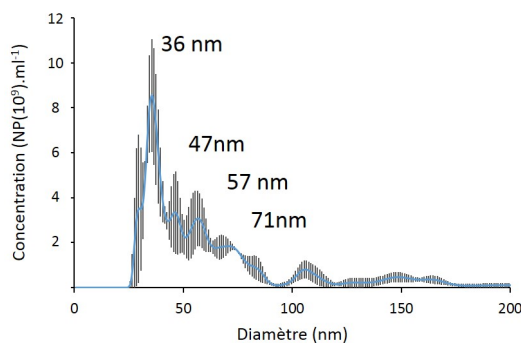


FIGURE 7.25 – Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 60 nm déterminée par NTA. La dispersion de la mesure est représentée en noire et la moyenne en bleue.

Ces résultats sont corrélés avec les mesures faites par MET qui mettent en évidence le fait que i) la population principale d'assemblages est composée de deux à quatre nanoparticules (22 % des édifices, mais uniquement 6 % des nanoparticules de l'échantillon) qui représente des assemblages d'environ 40 nm, puis ii) une seconde population d'assemblages constituée de 5 à 15 nanoparticules (35 % des édifices et 37 % des nanoparticules) et iii) quelques édifices de plus grande taille constitués de 20 à 40 nanoparticules, qui représentent une proportion importante des nanoparticules et forment donc des assemblages de plus grande taille (**Figure 7.26**). Ainsi, la population de taille supérieure pondère la moyenne de la distribution de taille vers de plus grandes tailles. Le comptage par MET retrouve 22,8 % d'édifices nanométriques correspondant à des nanoparticules isolées, soit 2,6 % des nanoparticules de l'échantillon qui ne sont pas engagées dans des assemblages (**Figure 7.26**).

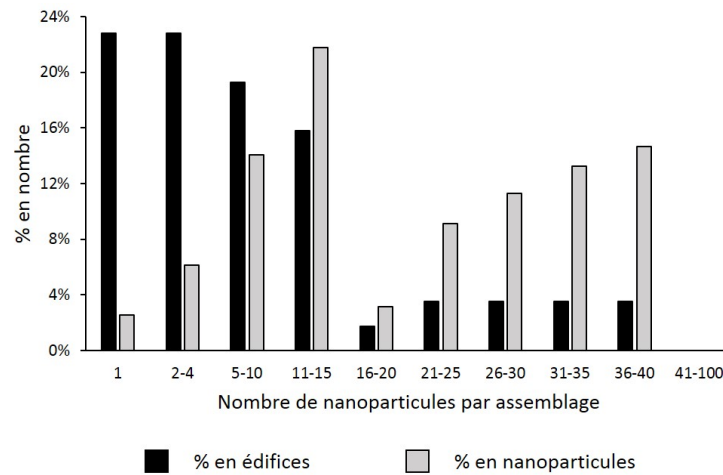


FIGURE 7.26 – Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 60 nm déterminée par MET.

On peut donc affirmer que la majorité des édifices dans un échantillon d'assemblages de nanoparticules de 60 nm sont des assemblages contenant 2 à 4 nanoparticules. Cependant la plus grande proportion des nanoparticules qui sont engagées dans des édifices sont composés de plus de 5 nanoparticules d'argent.

Assemblages de 200 nm

Dans une suspension d'assemblages de 200 nm, la valeur moyenne du diamètre des nano-objets est de $87,8 \pm 8,5$ nm par NTA. La population principale a un diamètre de 38 nm, ce qui est inférieur à ce qui est mesuré par DLS. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la mesure DLS est une mesure en intensité qui augmente le poids des grosses espèces dans la mesure du diamètre d'une population non homogène. Par NTA, cependant on observe bien des populations à 100, 167 et 195 nm dans une concentration supérieure à celle de l'échantillon précédent. La mesure par NTA met en évidence 1,3 % de nanoparticules d'argent isolées (**Figure 7.27**).

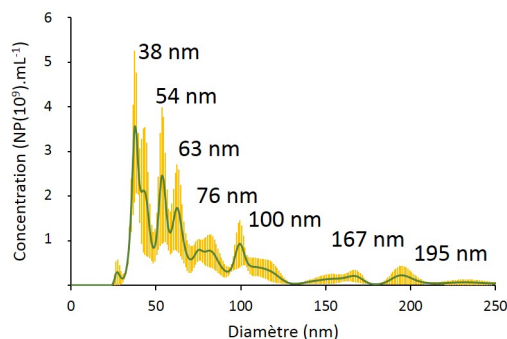


FIGURE 7.27 – Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 200 nm déterminée par NTA. La dispersion de la mesure est représentée en jaune et la moyenne en vert.

Le comptage par MET retrouve 12,5 % d'édifices qui sont des nanoparticules isolées soit 0,6 % des nanoparticules de l'échantillon (**Figure 7.28**). L'analyse par MET met également en évidence la présence de plusieurs populations d'assemblages : i) des petits assemblages constitués de deux à quatre nanoparticules, qui représentent 2 % des nanoparticules de l'échantillon et qui correspondent à la population de 38 nm mesurée en NTA ; ii) des assemblages contenant 5 à 15 nanoparticules, qui représentent 6 % des nanoparticules de l'échantillon et qui correspondent aux espèces de 54, 63 et 76 nm de diamètre en NTA ; iii) des assemblages contenant entre 16 et 30 nanoparticules qui représentent 31 % des nanoparticules de l'échantillon puis iv) des assemblages contenant 35 à 60 nanoparticules, représentant les assemblages de la plus grande taille observé qui représentent 25 % des édifices et 60 % des nanoparticules de l'échantillon.

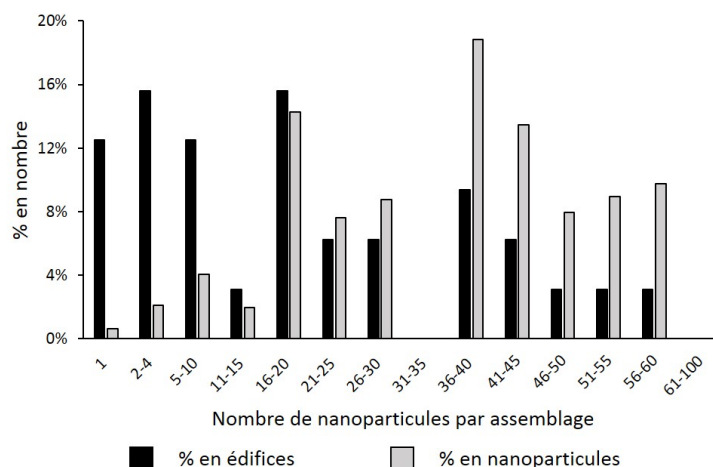


FIGURE 7.28 – Distribution de taille des populations présentes dans les assemblages de 200 nm déterminée par MET.

En superposant les données (Figure 7.29) on peut voir que la séparation sur le gradient de sucrose discontinu n'est pas optimale. On retrouve dans les échantillons d'assemblage de 40 nm des nanoparticules isolées et dans les échantillons d'assemblages de 60 nm des assemblages de 40 nm. Dans les assemblages de 200 nm la fraction d'édifices de 40 nm diminue. Bien que les valeurs mesurées par NTA et par MET diffèrent à cause des raisons expliquées ci-dessus, la tendance générale reste la même : la quantité de nanoparticules isolées diminue lorsque la taille des assemblages augmente, ce qui est cohérent au vu de la méthode de séparation utilisée.

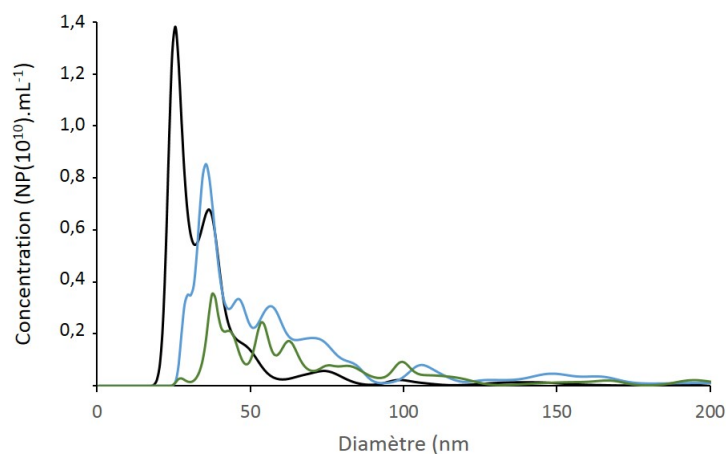


FIGURE 7.29 – Superposition des distributions de taille des populations présentes dans les assemblages. 40 nm en noir, 60 nm en bleu et 200 nm en vert.

En conclusion, nous pouvons dire que suite aux comptages effectués en MET, les assemblages de 40 nm contiennent en majorité entre 2 et 6 nanoparticules (Figure 7.24), ceux de 60 nm entre 5 et 40 nanoparticules (Figure 7.26), et ceux de 200 nm entre 20 et 60 nanoparticules (Figure 7.28).

7.3 Description architecturale : physico-chimie des assemblages

7.3.1 Potentiel zêta

Les mesures du potentiel zêta ont été réalisées comme décrit dans le **paragraphe 10.5.3**.

Les nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate synthétisées au laboratoire ont un potentiel zêta de - 35 mV, ce qui est suffisant pour stabiliser les particules en solution (**Figure 7.30 A**). Les assemblages de 200 nm ont, quant à eux, un potentiel zêta de - 27 mV ce qui est très légèrement inférieur aux nanoparticules seules. Dans le cas des assemblages de nanoparticules (**Figure 7.30 B**), le profil de la mesure du potentiel zêta est différent des nanoparticules (**Figure 7.30 A**) ou des anions citrate seuls (**Figure 7.30 C**). On n'observe plus qu'un seul pic très fin et symétrique, contrairement aux nanoparticules seules et aux anions citrate qui possèdent deux pics. Cela montre bien qu'à la surface des nanoparticules d'argent se trouve une couche de citrate alors que la surface des assemblages semble différente. Cependant, seul le potentiel zêta des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm a été mesuré, il sera nécessaire de mesurer le potentiel zêta des assemblages de nanoparticules de 40 nm et de 60 nm pour voir si ces résultats sont généralisables à tous les assemblages.

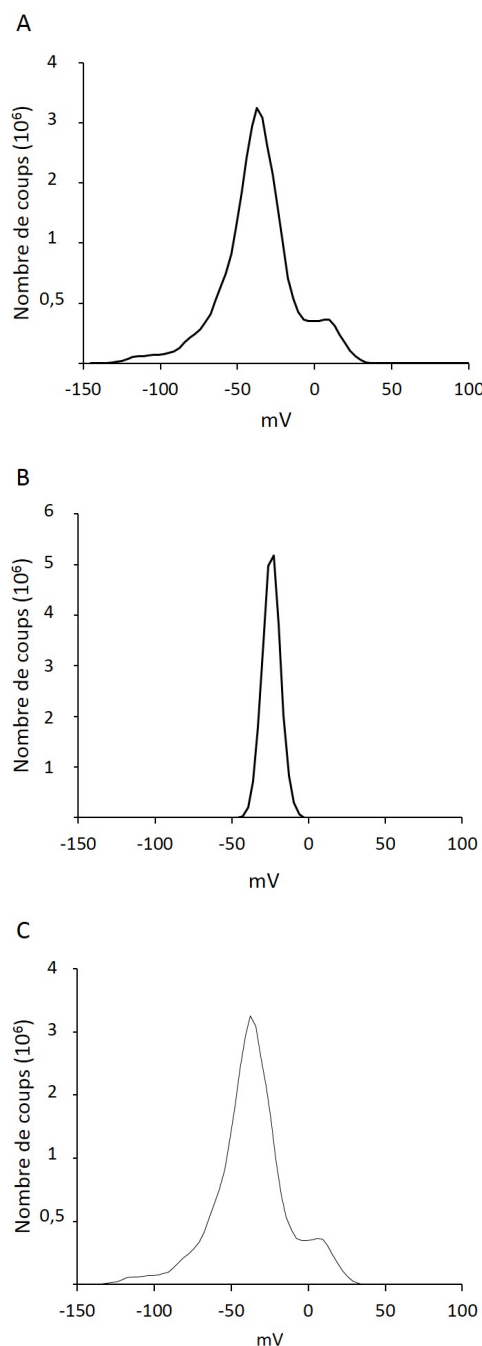


FIGURE 7.30 – Mesure du potentiel zêta. (A) : des nanoparticules enrobées de citrate, (B) des assemblages de 200 nm dans le tampon Hepes-citrate et (C) : du tampon Hepes-citrate

7.3.2 Caractérisation des liaisons stabilisant l'assemblage par XPS

Les données présentées précédemment nous permettent d'imaginer qu'à la surface des nanoparticules d'argent engagées dans les assemblages se trouve le ligand L1, qui possède trois thiols. Ces fonctions pourraient être responsables de la liaison du ligand aux nanoparticules. L'analyse des énergies de liaison (BE) des orbitales du soufre, du carbone et de l'argent à la surface des assemblages a été effectuée par XPS, en collaboration avec Giulia Veronesi (LCBM) et Chiara Battocchio (Universita Roma Tre), dans le but de démontrer que les soufres du ligand L1 sont engagés dans une liaison avec l'argent de surface des nanoparticules. La technique XPS permet de sonder uniquement les atomes de surface d'un matériau et de sélectionner l'élément d'intérêt, ainsi il s'agit donc de la technique de choix pour répondre à notre questionnement.

Pour ces expériences uniquement deux tailles d'assemblages ont été analysées par XPS : des petits assemblages de 40 nm de diamètre, et des assemblages de 80 nm, taille intermédiaire entre 60 et 200 nm préparés comme décrit dans le **paragraphe 10.5.1**. L'utilisation de petits assemblages a été préférée car l'XPS est une technique de surface et l'on peut donc penser qu'il est plus simple d'analyser la surface de la nanoparticule dans un petit assemblage plutôt que dans un grand. De plus, nous avons utilisé le rayonnement synchrotron pour ces expériences, cela afin d'améliorer la limite de détection et maximiser la résolution en énergie, ce qui permet de discriminer par exemple les différents modes de liaison du soufre à la surface des nanoparticules d'argent (Battocchio et al., 2012).

Analyse des orbitales C1s

Les spectres au niveau du coeur C1s des assemblages de nanoparticules d'argent ont montré une composante principale à BE de 284,70 eV (**Figure 7.31**), ce qui indique qu'une grande quantité d'atomes de carbone aromatique est présente dans l'échantillon. Ce signal est attribué à l'acide tannique (**Figure 7.32**), ajouté comme réducteur dans la préparation des assemblages. Une fraction d'acide tannique est donc toujours présente dans les deux types d'assemblage de nanoparticules analysés. Les deux composantes spectrales de faible intensité individuelle correspondent à la détection de la présence de L1 car elles sont spécifiques de la structure chimique du ligand (C-S, C-N, RCOOMe et RCONH).

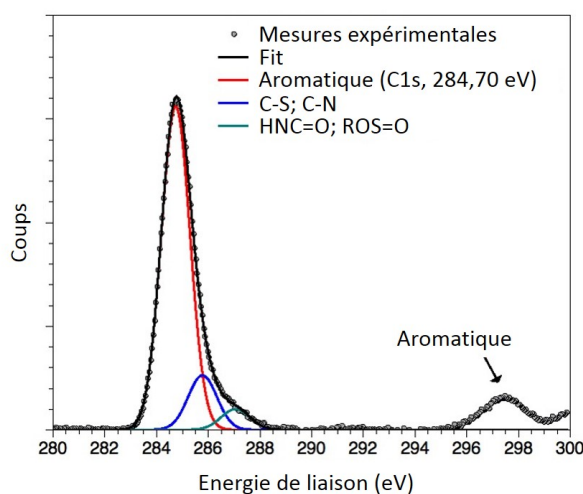


FIGURE 7.31 – Spectre de l’assemblage de 80 nm : modélisation expérimentale et courbe gaussienne spécifique des différentes fonctions : C-S et C-N (bleu), RCOOMe et RCONH (vert) et carbone aromatique (rouge)

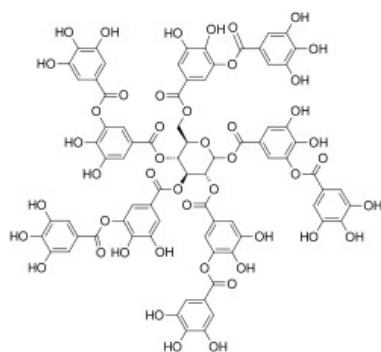


FIGURE 7.32 – Formule de l’acide tannique et ses 60 carbones aromatiques

Analyse des orbitales S2p

Nous avons mesuré les spectres XPS du niveau de coeur S2p afin de révéler les modes de liaison du soufre dans les assemblages (**Figure 7.33**). La déconvolution des signaux XPS en courbes gaussiennes a permis de déterminer et quantifier la part des composantes principales du soufre dans les échantillons (**Tableau 7.1**). Pour les deux tailles d’assemblages étudiées, les valeurs de BE observées sont similaires : les écarts de BE entre chaque espèce mesurée sont tous supérieurs à 0,22 eV, pouvoir de résolution dans nos conditions expérimentales (**Tableau 7.1**). Quelle que soit la taille des échantillons, on observe que le soufre y est présent sous quatre formes i) lié à l’argent dans une coordination sp (161,30 eV), ii) lié à l’argent dans une coordination

sp^3 (162,1 eV), iii) sous forme thio-éther (163,2 eV) et iv) engagé dans un pont disulfure (164,0 eV).

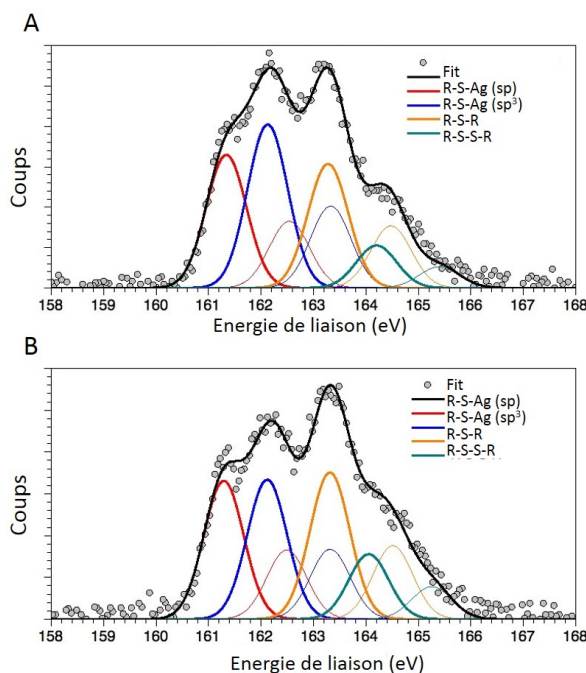


FIGURE 7.33 – Déconvolution en courbes gaussiennes des signaux XPS suite à l'excitation d'un électron de coeur S2p. Les composantes gaussiennes sont attribuées au soufre lié à l'argent, dans une géométrie sp (rouge), ou sp^3 (bleu), ainsi qu'aux thio-éthers (jaune) et aux ponts disulfures (vert), d'assemblages de (A) : 40 et (B) : 80 nm

Tableau 7.1 – Analyse semi-quantitative et attribution des atomes de soufre dans les échantillons d'assemblages de 40 et 80 nm

Echantillon	$S_{2,p\frac{3}{2}}$ BE(eV)	FWHM (eV)	% atomique	Attribution
40 nm assemblage	161,33	0,83	29,4	R - S - Ag (sp)
	162,11	0,83	35,4	R - S - Ag (sp^3)
	163,20	0,83	24,8	R - S - R'
	163,92	0,83	10,4	RS - SR
.....
80 nm Assemblage	161,30	0,83	28,0	R - S - Ag (sp)
	162,12	0,83	28,6	R - S - Ag (sp^3)
	163,29	0,83	29,1	R - S - R'
	164,00	0,83	14,3	RS - SR

Le soufre lié à l'argent est mesuré à deux valeurs différentes de BE : proche de 161,30 eV qui est caractéristique d'une coordination sp elle-même caractéristique des coordinations « hollow » (**Figure 7.34 A**) et proche de 162,12 eV qui est caractéristique d'une coordination sp^3 dites « on-top » (**Figure 7.34 B**) (Sellers et al., 1993).

La liaison d'un atome de soufre à une surface métallique fait intervenir plusieurs atomes métalliques. Cependant, dans le cas d'une liaison dite « on top », la liaison entre le soufre et l'argent est principalement due à une composante σ entre les orbitales p de l'atome de soufre et les orbitales 5s de l'argent ainsi que d'une très faible composante π et est donc principalement concentrée sur un seul atome et d'une nature davantage *ionique*. Dans le cas d'une liaison dite « hollow » la composante π est plus importante et la seconde couche d'atome contribue à la liaison. Ce type de liaison fait intervenir les orbitales p du soufre et s, p et d de l'argent. Cette liaison est davantage *covalente* et est la plus fréquemment trouvée sur les surfaces (111). La propagation de l'énergie de valence atomique de l'argent est relativement large ce qui permet la diffusion des orbitales du soufre entre les atomes d'argent et permet la fixation de type « hollow » (Sellers et al., 1993). Cependant, cela dépend du type de surface : les surfaces (111) ou (100) n'offrent pas la même abondance de fixation de type « hollow » car la distance entre les atomes d'argent et de soufre n'est pas la même : 1,973 Å pour une surface (111) et 1,955 Å pour une surface (100). Une nanoparticule sphérique présente plusieurs types de facettes, il est donc difficile de proposer un modèle simple pour expliquer ces résultats.

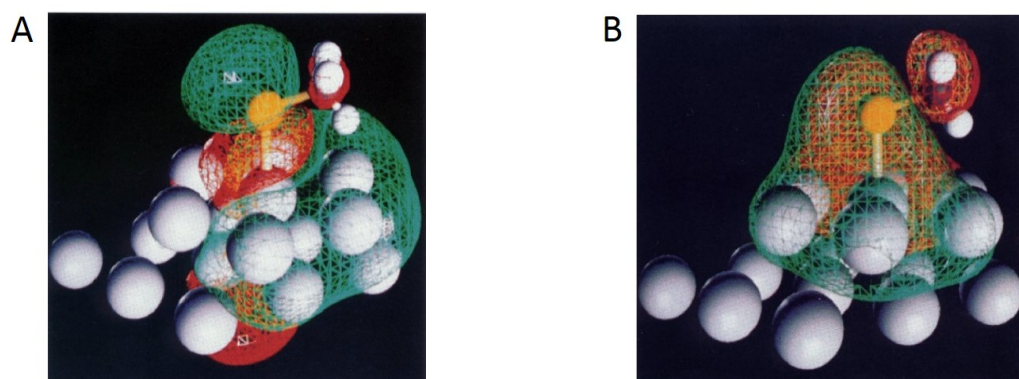


FIGURE 7.34 – Modélisation de la liaison entre un thiol (S-CH_3) et une facette (111) d'argent. Dans la géométrie (A) sp dites « Hollow » et (B) sp^3 dite « On top », d'après Sellers et al., 1993. Les atomes d'argent (gris), de soufre (orange), de carbone (noir) et d'hydrogène (blanc).

Les deux tailles d'assemblages possèdent des valeurs d'énergie de liaison du soufre à l'argent très proches : 161,33 eV pour l'hybridation sp et 162,11 eV pour l'hybridation sp^3 dans les assemblages de 40 nm et 161,30 eV pour l'hybridation sp et 162,12 eV pour l'hybridation sp^3 dans les assemblages de 80 nm. Les écarts d'énergie de liaison entre chaque espèce mesurée sont tous supérieurs au pouvoir de résolution (0,22 eV) (**Tableau 7.1**). Dans les échantillons, la fraction de soufre liée aux atomes d'argent de surface sous forme « hollow » est majoritaire (35,4 % dans l'échantillon d'assemblages de 40 nm et 28,6 % dans l'échantillon d'assemblages de 80 nm) et la proportion de soufre lié aux atomes d'argent est de 64 % des soufres

totaux dans les assemblages de 40 nm et 56,6 % des soufres totaux dans les assemblages de 80 nm ce qui prouve et souligne le fait que la majorité des atomes de soufre du ligand L1 sont liés à la surface des nanoparticules d'argent. Ces expériences de XPS permettent donc de prouver l'existence de la liaison entre les thiolates du ligand L1 et les atomes d'argent de la surface des nanoparticules (**Figure 7.35**).

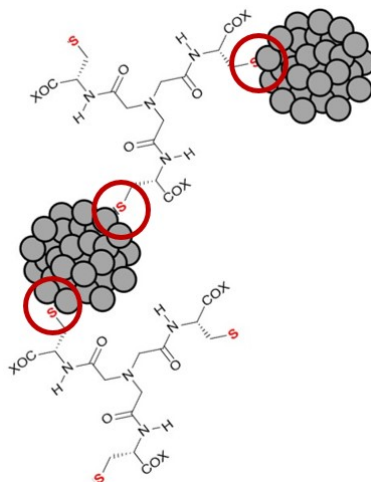


FIGURE 7.35 – Représentation schématique de la liaison entre les nanoparticules d'argent et le ligand L1.

La fraction de soufre engagée dans une liaison thio-éther (« R - S - R ») est décrite par une énergie de liaison de 163,20 eV dans les assemblages de 40 nm et 163,29 eV dans les assemblages de 80 nm. Cette liaison thio-éther est caractéristique du blocage des thiols libres par l'iodoacétamide (**Paragraphe 7.1.3**). La fraction de soufre engagée dans la liaison thio-éther est plus élevée dans les assemblages de 80 nm : 29,1 % que dans les assemblages de 40 nm : 24,8 %. L'écart entre les deux valeurs est plus ou moins significatif si nous considérons que l'erreur associée aux valeurs quantitatives extraites du fit des signaux XPS est égale à 5 % (Castle, 1984). Une hypothèse envisageable pour expliquer ce phénomène serait qu'après la première couche de L1 fixé à la surface des nanoparticules d'argent, les groupes -SH sont plus exposés à l'iodoacétamide pour des raisons stériques. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être confirmée par d'autres techniques. Le blocage des thiols libres et donc de la réaction est donc confirmé par la présence des thio-éthers dans les assemblages (**Figure 7.36**).

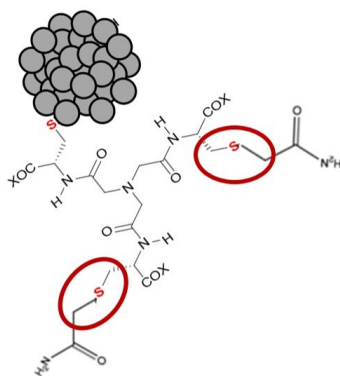


FIGURE 7.36 – Représentation schématique de la liaison entre le ligand L1 et l'iodoacétamide.

Quelle que soit la taille des échantillons, une fraction de soufre est engagée dans la formation de ponts disulfure (Figure 7.37). Cela est due à la réaction d'oxydation entre deux ligands L1. Les réactions étant réalisées en aérobiose, la présence de ponts disulfures n'est pas surprenante mais soulève un certain nombre de questions sur la leur importance dans la formation et la stabilisation des assemblages. La fraction de soufre engagée dans la formation d'un pont disulfure est inférieure à celle des autres contributions (Tableau 7.1 et Figure 7.33). L'augmentation du pourcentage de soufre engagés dans des ponts disulfure dans les assemblages de plus grandes tailles (14,3 % dans les assemblages de 80 nm et 10,4 % dans les assemblages de 40 nm) permet de proposer que les assemblages pourraient croître *via* les ponts disulfures. Il serait donc nécessaire de reproduire ces manipulations en milieu réducteur afin d'en savoir davantage sur le mécanisme de formation de ces assemblages. De plus, il faut garder à l'esprit qu'une fraction minoritaire des Ag(I) mesurés peuvent également être simplement liés aux sulfures du ligand L1 sans pour autant être des atomes de surface de la nanoparticule.

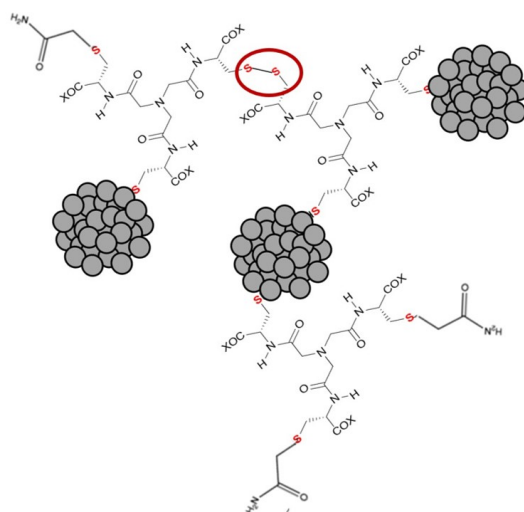


FIGURE 7.37 – Représentation schématique de la liaison entre deux ligands L1.

Analyse des orbitales Ag3d

Les signaux XPS dus à l'excitation du niveau de coeur Ag3d ont été mesurés et les données concernant les atomes d'argent recueillies sur les nanoparticules d'argent de 20 nm montrent que le signal Ag3d semble d'avantage fin et symétrique (**Figure 7.38**). Les deux échantillons d'assemblages de nanoparticules d'argent présentent tous les deux le même pourcentage d'Ag(I) à leur surface, soit 6,6 % pour les assemblages de 40 nm et 6,8 % pour les assemblages de 80 nm (**Tableau 7.2**). Selon la littérature (Molleman et al., 2017), les nanoparticules d'argent présentent une à deux couches d'atomes oxydés à leur surface. Les calculs théoriques du nombre d'atomes à la surface des nanoparticules d'argent donnent 5,8 % d'atomes d'argent à la surface d'une nanoparticules d'argent de 20 nm. Ainsi, l'analyse des données XPS permet de souligner le fait que les nanoparticules d'argent engagées dans un édifice d'assemblage présentent toujours une couche entière d'atomes oxydés à leur surface. Le ligand L1 n'a donc pas arraché la totalité de l'Ag(I) pendant le processus d'assemblage ou n'empêche pas l'oxydation de surface des nanoparticules dans l'assemblage.

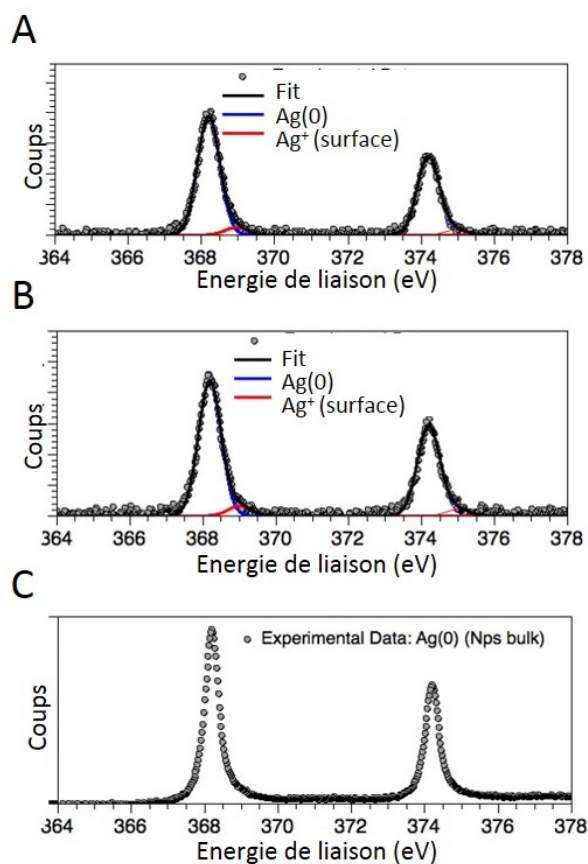


FIGURE 7.38 – Déconvolution en courbes gaussiennes du signal XPS Ag3d. En bleu la composante Ag(0) et en rouge la composante Ag(I) des (A) assemblages de 40 nm, (B) 80 nm et (C) des nanoparticules enrobées de citrate.

Tableau 7.2 – Analyse semi-quantitative et attribution des atomes d'argent dans les échantillons d'assemblages de 40 et 80 nm

Echantillon	S2p _{3/2} BE(eV)	FWHM (ev)	% atomique	Attribution
40 nm assemblage	368,20	0,71	93,4	Ag ⁰
	368,96	0,71	6,6	Ag ⁺
.....
80 nm Assemblage	368,20	0,73	93,2	Ag ⁰
	369,02	0,73	6,8	Ag ⁺

Il est important de garder à l'esprit lorsque l'on interprète ces données que l'XPS est une technique de surface et sous-estime de fait les signaux issus des éléments plus profonds, de sorte que les pourcentages atomiques sont donc approximatifs.

7.3.3 Analyse des assemblages par XANES au seuil du soufre

Le soufre est omniprésent dans l'environnement, présentant une large variété d'espèces et d'états d'oxydation, de - II sous forme de sulfures à + VI sous forme de sulfates. Du fait des raisons énoncées ci-dessus, une seconde campagne d'analyse des sulfures engagés dans les édifices d'assemblage a été effectuée. Afin d'analyser la totalité des sulfures dans les échantillons d'assemblages, la technique du XANES (**Paragraphe 10.7.1**), au seuil du soufre a été utilisée.

Les échantillons

La ligne ID21 de l'ESRF offre un faisceau monochromatique de rayons X dans la gamme d'énergie dites "de rayons X tendres" c'est à dire 2 - 9 keV. Cela permet d'effectuer des mesures de spectroscopie d'absorption des rayons X au seuil du soufre (S K-edge = 2,472 keV). Un équipement cryogénique est nécessaire pour ce genre de mesures afin de préserver la spéciation de l'élément d'intérêt. Pour effectuer des mesures sur des échantillons en solution, il est possible de préparer les échantillons de deux façons : i) cryogéniser une goutte de l'échantillon ou ii) faire sécher la suspension sous un flux d'azote. Sur une solution contenant du glutathion, nous avons mis en évidence que le mode de préparation de l'échantillon n'influe pas sur la spéciation du soufre. En effet, les pics obtenus sont les mêmes malgré une différence d'amplitude (**Figure 7.39**). Cela est dû au fait que l'échantillon séché est d'avantage concentré et donc augmente l'effet d'auto-absorption des rayons X. Ainsi le reste des échantillons a été préparé par la cryogénisation d'une goutte des échantillons.

Dans un premier temps, nous avons mesuré une solution de GSH réduite et une solution de GSH - Ag en condition stoechiométrique 1 : 1 (S : Ag). La première mesure (en rouge sur la **figure 7.40**) a montré le pic caractéristique des fonctions R - SH à 2473,7 eV, comme déjà décrit dans la littérature. La liaison du soufre au métal (**Figure 7.40**) induit un décalage du pic vers une plus basse énergie : 2473,2 eV,

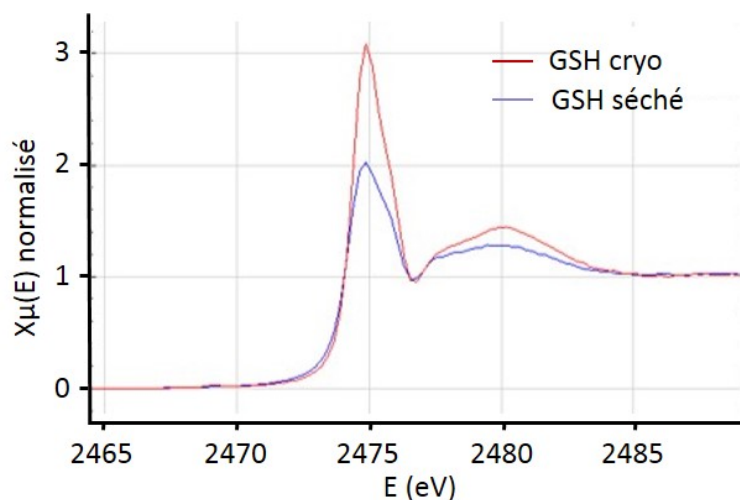


FIGURE 7.39 – Comparaison de spectres XANES (au seuil K du soufre) d'un échantillon de glutathion réduit selon la préparation de l'échantillon. En bleu plusieurs gouttes séchées sous azote, en rouge une goutte cryogénisée

due au fait de la déprotonation du soufre et à la liaison au métal (en vert sur la **figure 7.40**). La forme du spectre change ainsi en conséquence du changement de géométrie de coordination du soufre lors de la liaison au métal. Dans un second temps nous avons mesuré deux tailles d'assemblage sous la forme de gouttes cryogénisées : 40 et 200 nm puis nous les avons comparés aux spectres standards dont la spéciation du soufre est déjà connue, ici il s'agit du sulfure d'argent (Ag_2S) et du glutathion libre et lié à l'argent.

La **figure 7.40** montre que le pic principal pour les assemblages est centré à 2472,9 eV, très proche de la valeur mesurée pour le complexe Ag-GSH de 2473,2 eV. Cette valeur est bien plus basse que la valeur assignée aux espèces sous forme R - S - H de 2473,7 eV. Ces résultats suggèrent que, dans les assemblages, une majorité des thiols des ligands L1 sont déprotonés et probablement liés à l'argent. Cependant, le spectre des assemblages diffère de celui du complexe Ag - GSH dans lequel l'argent se trouve sous forme de $(\text{R} - \text{S})_2 - \text{Ag}$. Cela est probablement dû à une géométrie de coordination des atomes de soufre différente dans les assemblages. En effet, les atomes de soufre sont liés à la surface de la nanoparticule et ne possèdent donc pas les mêmes degrés de liberté que lorsqu'ils se lient à des ions Ag(I) en solution (Veronesi et al., 2015). De plus la forme du spectre des assemblages diffère de celle du spectre Ag-GSH, ce qui montre bien que le ligand L1 n'a pas arraché les atomes d'argent à la surface des nanoparticules pour former un complexe stable Ag - S - R. Cela suggère que les groupements thiols du ligand L1 sont en grande majorité liés à la surface des nanoparticules d'argent.

La **figure 7.40** résume les résultats de cette expérience. La comparaison des signaux de l' Ag_2S (spectre noir) et des assemblages de nanoparticules d'argent de 40

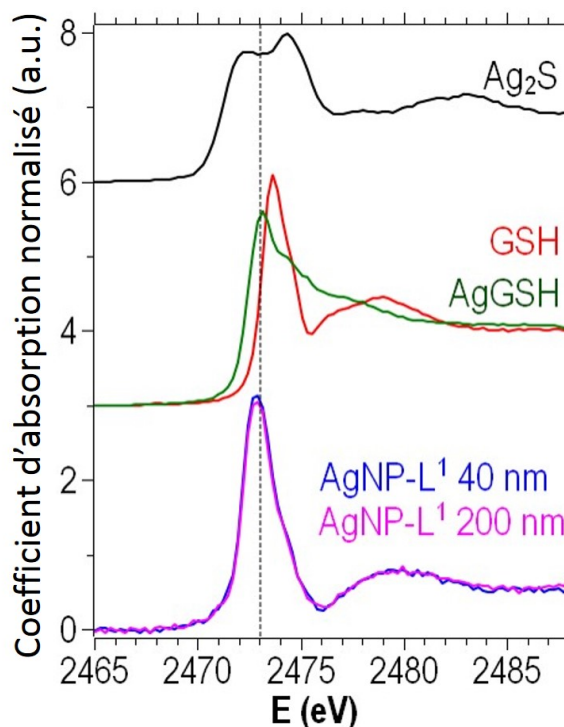


FIGURE 7.40 – Traitement des signaux du XANES au seuil du soufre. Comparaison entre un standard de sulfuration (courbe noire) et du GSH engagé dans une liaison avec l'Ag(I) (courbe verte) ou libre (courbe rouge) avec des assemblages de petite et grande taille (courbe bleu et rose)

et 200 nm (bleu et rose) montre que le soufre présent dans les échantillons d'assemblages ne correspond pas à de l'Ag₂S. Ainsi, nous avons la preuve que le ligand L1 n'entraîne pas la sulfuration de l'échantillon d'assemblage. Pour aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats, il est nécessaire de souligner le fait que les spectres des assemblages de différentes tailles sont identiques. Ce qui signifie que la coordination du soufre est la même indépendamment de la taille des assemblages, ce qui montre donc que les assemblages croissent de façon isotrope jusqu'à l'arrêt de la réaction par l'ajout d'iodoacétamide. Nous avons de ce fait cherché à reproduire les spectres des assemblages en faisant l'hypothèse qu'il s'agissait d'une combinaison linéaire des spectres du GSH (représentatif de l'espèce R - SH), du Ag - GSH (représentatif de l'espèce Ag - S - R) et de l'Ag₂S, mais sans succès, ce qui met en évidence que le soufre dans les assemblages n'est pas un mélange de ces espèces. Plus probablement, il s'agirait d'un mélange d'espèce d'Ag_{surface} - S ou le soufre serait lié aux atomes d'argent de surface de la nanoparticule soit en géométrie « on-top » soit en géométrie « hollow ». Pour démontrer cela il faudrait i) déconvoluer les pics des assemblages selon des spectres de référence des espèces chimiques présentes dans l'échantillon, ii) modéliser l'édifice et déterminer *ab initio* le spectre de la structure envisagée. Dans tous les cas, les références de ce genre d'architecture ne sont pas encore connues et la modélisation de la fixation du soufre sur la surface non plane

d'une nanoparticule n'est pas simple à appréhender d'après nos collaborateurs.

Les analyses de XANES ont mis en évidence que la grande majorité des soufres se trouvaient donc à la surface des nanoparticules car les signaux mesurés sont essentiellement ceux du soufre lié à de l'argent. En gardant à l'esprit le fait que les espèces présentes dans une quantité inférieure à 10 % ne sont que très difficilement détectables en XAS, et que cette méthode permet de sonder l'intégralité des soufres présents dans un échantillon et non pas uniquement ceux présents à la surface, nous pouvons dire que les pourcentages d'attribution obtenus par XPS sont représentatifs de toutes les espèces présentes, malgré une surestimation des espèces présentes dans les 5 premiers nanomètres de l'échantillon.

7.3.4 Analyse de l'extrême surface par ToF-SIMS

L'analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS, technique décrite **paragraphe 10.5.2**) est utilisée afin de caractériser l'extrême surface des assemblages. L'échantillon est analysé pixel par pixel, ce qui permet d'établir une cartographie chimique de l'échantillon analysé. La **figure 7.41** représente la cartographie élémentaire de l'argent d'un échantillon de nanoparticules d'argent enrobées de citrate.

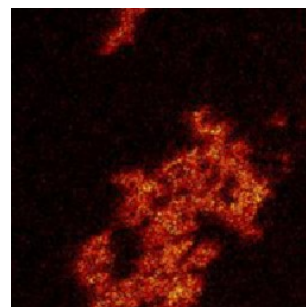


FIGURE 7.41 – Cartographie élémentaire de l'argent sur des nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate déposées sur un wafer de silicium.

Contrairement à l'analyse des nanoparticules d'argent enrobées de citrate, il n'a pas été possible d'établir une cartographie spatiale de l'élément argent des assemblages car il n'a pas été détecté en quantité suffisante dans ces échantillons. En effet, dans l'échantillon de nanoparticules d'argent enrobées de citrate, en mode positif, l'argent est détecté à hauteur de 400 000 coups pour ^{107}Ag et 250 000 coups pour ^{109}Ag (**Figure 7.42 A**). Dans l'échantillon d'assemblage de 40 nm on ne mesure aucun signal d'argent (**Figure 7.42 B**) et dans les assemblages de 200 nm ^{107}Ag n'est pas détecté et un signal pour ^{109}Ag est détecté à hauteur de 2 200 coups (**Figure 7.42 C**). Les analyses en ToF-SIMS en mode positif permettent également de détecter des dimères et des trimères chargés de type $[2\text{M}+\text{H}]$ et $[3\text{M}+\text{H}]$, ce qui est observable sur la **figure 7.43** où un signal est détecté à des m/z de 322, 324, 325 et 326 (**Figure 7.43 A**). Ces signaux sont ceux de trimères d'Ag composés des différents isotopes de l'argent dans différentes proportions et ne sont encore une fois détectés que pour les nanoparticules d'argent et pas pour les assemblages. Le ToF-SIMS étant une technique d'analyse de l'extrême surface d'un échantillon (1 à 2 nm), ces résultats montrent que L1 forme un enrobage qui couvre complètement la surface des nanoparticules d'argent. En effet, seules les premières couches atomiques sont

arrachées par le faisceau d'ions.

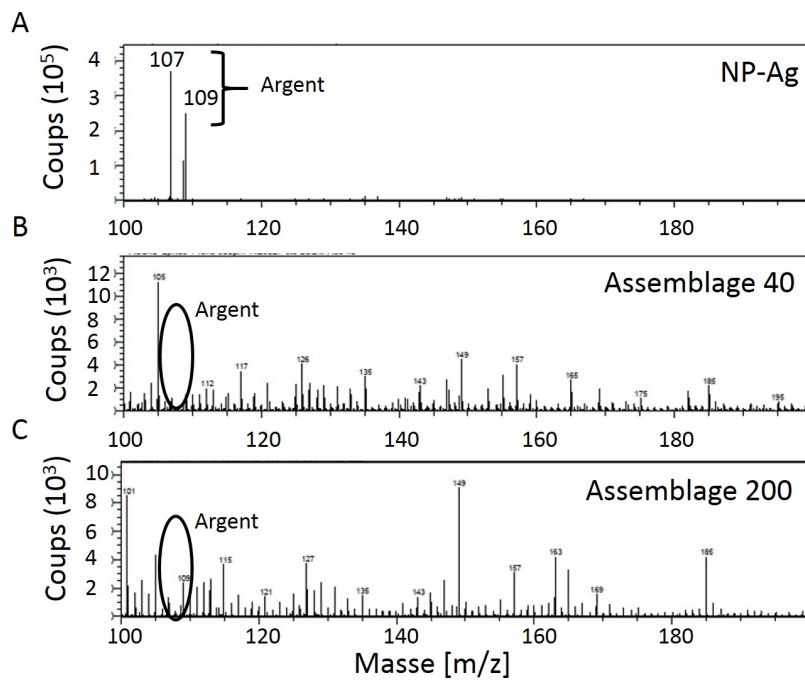


FIGURE 7.42 – Analyse par ToF-SIMS pour des m/z entre 100 et 200 en mode positif. (A) : nanoparticules d'argent de 20 nm, (B) : assemblages de nanoparticules d'argent de 40 et (C) : 200 nm

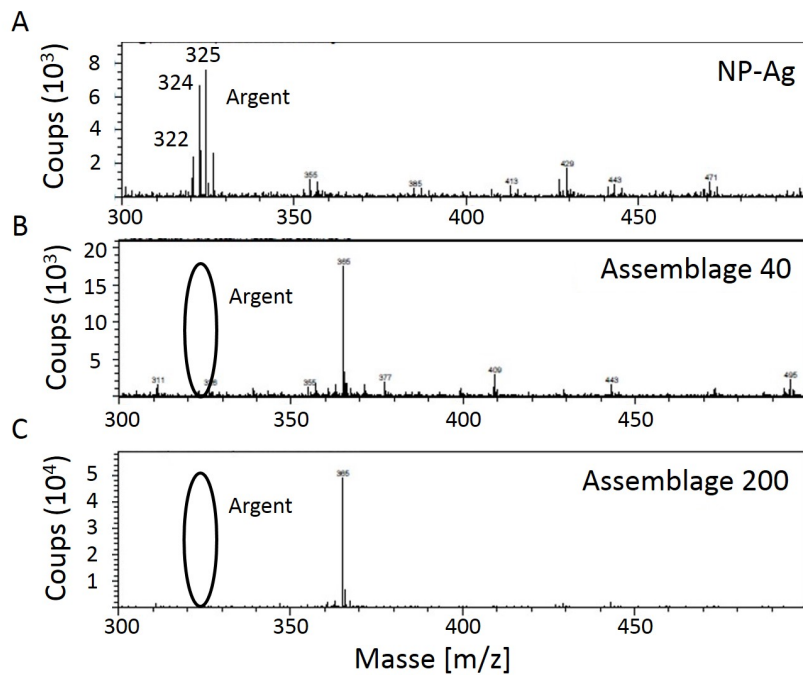


FIGURE 7.43 – Analyse par ToF-SIMS pour des m/z entre 300 et 500 en mode positif. (A) : nanoparticules d'argent de 20 nm, (B) : assemblages de nanoparticules d'argent de 40 et (C) : 200 nm

Dans un second temps, le soufre présent dans les assemblages et permettant la liaison à la surface des nanoparticules d'argent ainsi que le contrôle de la taille des édifices a été recherché en mode négatif. Dans la **figure 7.44 A** on observe un pic à un m/z de 32 à hauteur de 50 000 coups qui est l'élément soufre présent dans la molécule L1 déposée sur le support. Sur les **figures 7.44 B et C** qui représentent les mesures sur les échantillons d'assemblages de 40 et 200 nm respectivement, deux pics très faibles à un m/z de 32 de moins de 10 000 coups sont observés. Ces informations couplées aux résultats obtenus en XPS montrent que le soufre présent dans les assemblages est principalement engagé dans une liaison avec la surface des nanoparticules. En effet, par ToF-SIMS, aucun atome d'argent n'est détecté, ce qui signifie que la couche organique entourant les nanoparticules est trop épaisse, les atomes de soufre étant directement liés (à plus de 60 % d'après les analyses XPS) à la surface des nanoparticules d'argent. Il est donc logique qu'ils soient moins détectés car ils se trouvent à une profondeur trop importante dans l'échantillon.

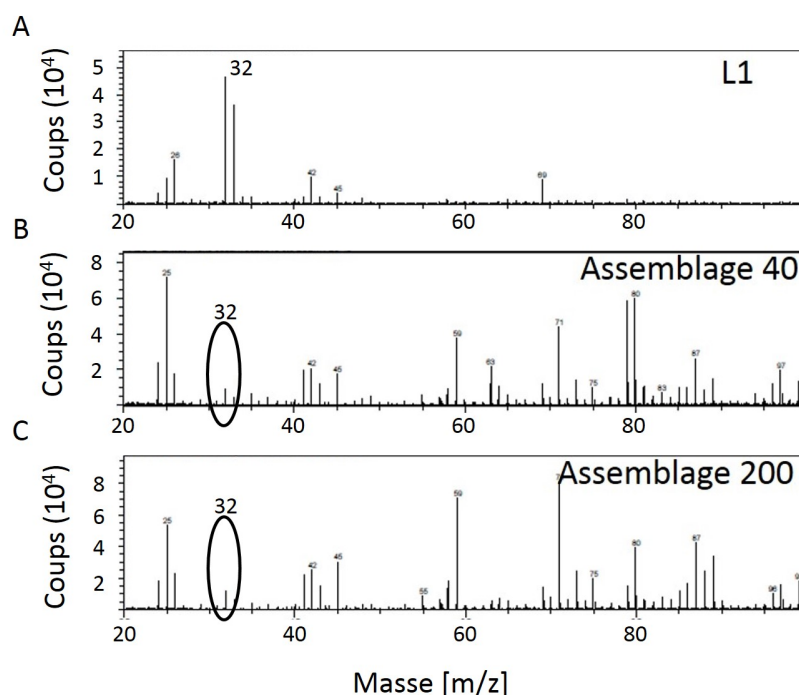


FIGURE 7.44 – Analyse par ToF-SIMS en mode négatif. (A) : ligand L1, (B) : assemblages de nanoparticules d'argent de 40 et (C) : 200 nm

7.3.5 Quantification du soufre engagé dans les assemblages de nanoparticules d'argent

Quantification des thiols présents dans les assemblages par la méthode d'Ellman

La quantification du soufre engagé dans la structure des assemblages n'a pas pu être effectuée comme les précédents dosages du soufre (**Chapitre 6**) avec le réactif d'Ellman : le DTNB. En effet, la mesure des thiols par cette méthode est basée sur la lecture de l'absorbance de la solution après réaction des thiols avec le réactif DTNB.

Le composé TNB^{2-} libéré absorbe à 411 nm. Or, cette longueur d'onde est au milieu du spectre du signal SPR des nanoparticules d'argent et donc des assemblages en contenant (**Figure 7.45**). La variation du signal d'absorbance pour une concentration des échantillons de $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$ est trop faible (voir axe des **figure 7.45**, ordonnées de droite) par rapport à l'intensité du signal des nanoparticules.

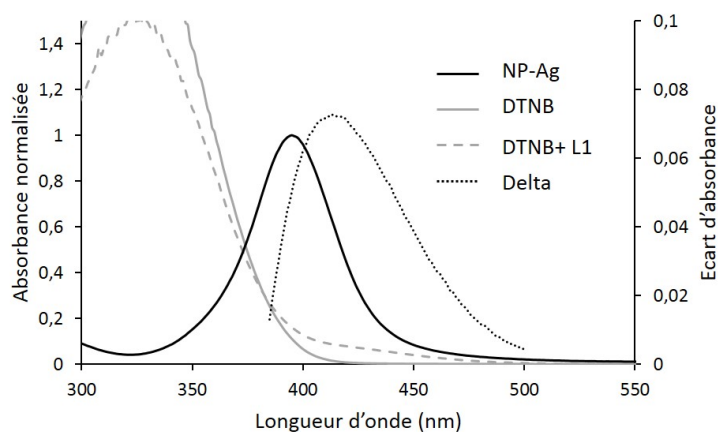


FIGURE 7.45 – Comparaison entre l'intensité du signal avant (courbe grise) et après (courbe grise en tiret) la réaction du DTNB avec une concentration de $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de L1, superposé au signal SPR des nanoparticules d'argent à une concentration de $370 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (en courbe noire). En pointillés noirs, la variation de l'intensité du signal lors de la réaction avec le DTNB se référant à l'échelle de droite

Pour cette raison, le dosage des sulfures dans les assemblages a été effectué par analyse élémentaire par ICP-AES.

Méthodologie

Le soufre engagé dans les échantillons d'assemblages est en trop faible quantité pour réaliser un dosage direct par ICP-AES. Pour cette raison nous avons procédé à une quantification par la méthode des ajouts dosés (**Paragraphe 10.4.2**).

Mesure sur des assemblages

Les mesures ont été effectuées sur des assemblages de 40, 60 et 200 nm. A l'exception des assemblages de 200 nm, chaque mesure a été effectuée trois fois (**Tableau 7.3**). Dans les échantillons de nanoparticules d'argent enrobées de L1 on mesure en moyenne $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de soufre et $3,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ d'argent. Dans les échantillons d'assemblages de 40 nm on obtient en moyenne $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de soufre et $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ d'argent, dans ceux de 60 nm $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de soufre et $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ d'argent, et dans ceux de 200 nm $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de soufre et $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ d'argent.

Le ratio entre le soufre et l'argent a été calculé pour permettre une analyse plus fine (**Tableau 7.3**) :

- Nanoparticules d'argent enrobée de L1 : 7,7 % de soufre ;
- Assemblages de 40 nm : 5,6 % de soufre ;
- Assemblage de 60 nm : 6,8 % de soufre ;
- Assemblage de 200 nm : 7,2 % de soufre.

Présenté ainsi on observe que le rapport entre le soufre et l'argent dans les différents échantillons est du même ordre de grandeur.

Tableau 7.3 – Quantification du soufre (à 180,7 nm) et de l'argent (à 338,3 nm) dans les échantillons de nanoparticules enrobées de L1, d'assemblages de 40 nm, 60 nm et 200 nm

Echantillon	[Ag] mol.L ⁻¹	ecartype	[S] mol.L ⁻¹	ecart-type	Ratio $\frac{S}{Ag}$
NP-Ag-L1	3,1.10 ⁻⁴	4,8.10 ⁻⁵	2,3.10 ⁻⁵	8,6.10 ⁻⁶	7,7 %
.....
Assemblage 40 nm	4,0.10 ⁻⁴	1,18/10 ⁻⁴	2,2.10 ⁻⁵	3,6.10 ⁻⁶	5,6 %
.....
Assemblage 60 nm	3,4.10 ⁻⁴	3,89.10 ⁻⁵	2,3.10 ⁻⁵	1,9.10 ⁻⁶	6,8 %
.....
Assemblage 200 nm	2,5.10 ⁻⁴	1,4.10 ⁻⁴	1,83.10 ⁻⁵	2,83.10 ⁻⁷	7,2 %

Il n'est cependant pas possible de tirer d'avantage de conclusion du fait des écart-types importants au sein de chaque mesure, qui ne permettent pas d'obtenir des différences significatives entre la quantité de soufre engagée dans les petits et dans les grands assemblages et les grands.

Les études précédentes par XPS (**Paragraphe 7.3.2**) ont permis de déterminer que 60 % des soufres à la surface des assemblages sont impliqués dans une liaison Ag-S (**Tableau 7.1**). Ainsi, sur la totalité des soufres engagés dans les échantillons d'assemblages mesurés, il est possible de dire que 60 % d'entre eux sont liés à la surface des nanoparticules d'argent qui constituent ces assemblages, ce qui entraîne :

- Nanoparticules d'argent enrobée de L1 : 4,6 % de soufre ;
- Assemblages de 40 nm : 3,4 % de soufre ;
- Assemblage de 60 nm : 4,1 % de soufre ;
- Assemblage de 200 nm : 4,3 % de soufre.

Bien que la la quantité de soufre liés à la surface des nanoparticules est plus importante dans les nanoparticules isolée, la valeur des soufres potentiellement liés à la surface des nanoparticules d'argent augmente faiblement avec la taille des assemblages.

De fait, le rapport entre la quantité de soufre potentiellement liée à la surface des nanoparticules dans les assemblages et la quantité d'argent présent dans les assemblages est inférieur à 5 % (**Tableau ??**). Or, il a été déterminé par calcul que le

pourcentage d'atome d'argent disponible à la surface des nanoparticules d'argent de 20 nm est de 5,8 %. De par les mesures XPS nous savons que les thiols peuvent se lier aux atomes des deux premières couches atomiques des nanoparticules. Nous pouvons ainsi supposer qu'environ la moitié des atomes d'argent disponible à la surface de chaque nanoparticule est engagée dans une liaison avec le ligand L1. Cela est en adéquation avec les résultats de ToF-SIMS qui suggéraient que l'enrobage organique autour des nanoparticules d'argent impliquées dans les assemblages soit très dense (**Paragraphe 7.3.4**)

7.4 Activité biologique

Préalablement aux tests biologiques, il est nécessaire de caractériser les nano-objets dans les milieux biologiques afin d'étudier leurs stabilités et caractéristiques et ce dans le but de décrire ce que la cellule « voit » lorsqu'elle est exposée aux nanoparticules d'argent ou aux assemblages. Pour cela, nous avons suivi l'évolution du diamètre hydrodynamique ainsi que le signal SPR des nanoparticules d'argent enrobées de citrate ainsi que des assemblages de 40, 60 et 200 nm dans les différents milieux biologiques que nous utilisons.

7.4.1 Caractérisation et stabilité dans les milieux biologiques

La stabilité des nanoparticules et des assemblages a été suivie par DLS et SPR dans le **Milieu MD (Paragraphe 7.4.2)** qui est un milieu de culture bactérien minimum utilisé pour la détermination de l'activité biocide, dans le **Milieu MEM** supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) qui correspond au milieu de culture cellulaire utilisé pour les cellules HepG2, ainsi que dans le **tampon HEPES-CITRATE**. Ainsi, il a été mis en évidence que les nanoparticules d'argent conservaient une taille moyenne constante au cours du temps dans le tampon HEPES-citrate et dans le milieu de culture bactérien (**Figure 7.46**). De même, le signal SPR reste identique mais son intensité diminue au cours du temps. Cependant, dans le milieu de culture cellulaire riche en protéines, les nanoparticules d'argent s'agglomèrent pour former des espèces de plus grande taille. Un comportement atypique est observé en spectroscopie uV-Visible avec l'apparition d'un pic aux alentours de 570 nm lors de l'ajout des nanoparticules d'argent dans le milieu MEM + 10 % SVF mais qui disparaît par la suite (**Figure 7.47**).

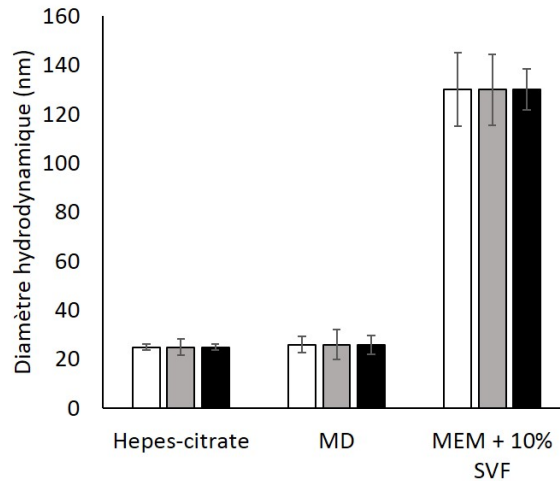


FIGURE 7.46 – Evolution de la taille mesurée par DLS de nanoparticules d’argent enrobées de citrate au cours du temps dans différents milieux. Dans le tampon Hepes-citrate, le milieu MD et le milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en blanc), 15 heures (en gris) et 24 heures (en noir)

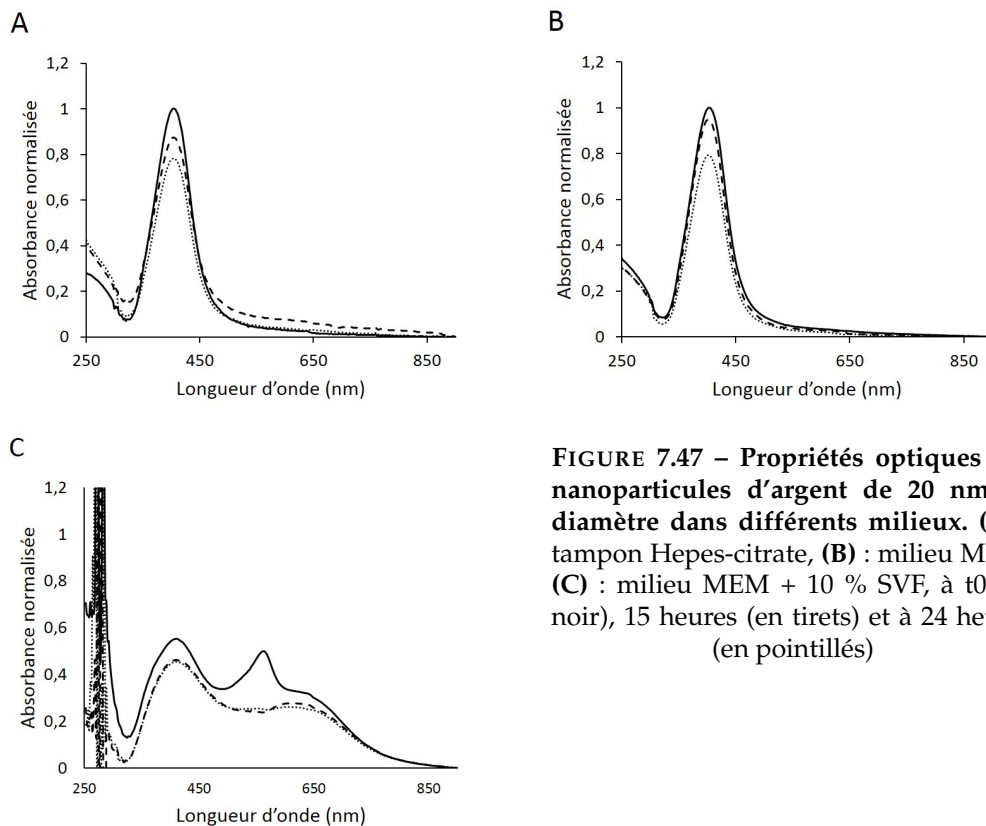


FIGURE 7.47 – Propriétés optiques des nanoparticules d’argent de 20 nm de diamètre dans différents milieux. (A) : tampon Hepes-citrate, (B) : milieu MD et (C) : milieu MEM + 10 % SVF, à t0 (en noir), 15 heures (en tirets) et à 24 heures (en pointillés)

Les assemblages de nanoparticules d’argent de 40 nm présentent un comportement différent. Dans le milieu Hepes-citrate, la taille des assemblages augmente au cours du temps, passant de 36 nm à t0 à 208 nm à t24h. (Figure 7.48) et l’on observe sur la figure 7.48 que le signal spécifique des nanoparticules d’argent autour de 400 nm diminue au cours du temps (absorbance de 1 à t0 à 400 nm, 0,71

à 15 heures, 0,63 à 24 heures) alors que le pic aux plus grandes longueurs d'onde continue d'évoluer vers de plus grandes longueurs d'onde (520 nm à t₀, 550 nm à 15 heures et 575 nm à 24 heures), ce qui est symptomatique d'une augmentation de taille de l'édifice nanoparticulaire d'une manière similaire à la croissance des assemblages, comme si le processus continuait une fois sous agitation à 400 rpm à 22°C dans le tampon Hepes-citrate. Dans le milieu MD, la taille des assemblages de nanoparticules d'argent de 40 nm augmentent légèrement de 50 nm à t₀ à 80 nm à t₂₄ heures (**Figure 7.48**). Cela est directement corrélé à la mesure du signal SPR de ces assemblages dans le milieu de culture bactérienne (**Figure 7.49 B**) puisqu'il n'y a pas d'évolution du signal vers de plus grandes longueurs d'onde (540 nm à t₀, 545 nm à 14 heures et 540 nm à 24 heures). Cependant, on voit bien que le signal est de moins en moins intense à toutes les longueurs d'onde (absorbance de 1 à t₀, 0,78 à 15 heures et 0,71 à 24 heures). Dans le milieu MEM + 10 % SVF, la taille des assemblages augmente instantanément à 110 nm (**Figure 7.48**), comme les nanoparticules d'argent enrobées de citrate dans ce milieu (**Figure 7.46**). La taille n'évolue pas au cours du temps comme pour les nanoparticules enrobées de citrate. De même que le signal SPR des assemblages de 40 nm dans le milieu de culture cellulaire qui n'évolue pas, à l'exception du signal à 570 nm (**Figure 7.49 C**).

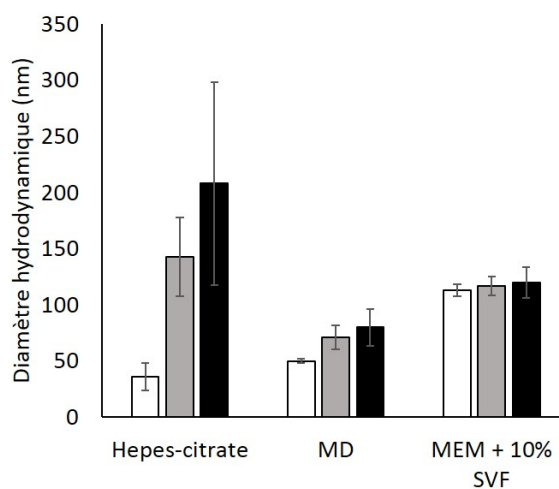


FIGURE 7.48 – Evolution de la taille mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent de 40 nm au cours du temps dans différents milieux. Dans le tampon Hepes-citrate, le milieu MD et le milieu MEM + 10 % SVF à t₀ (en blanc), 15 heures (en gris) et 24 heures (en noir)

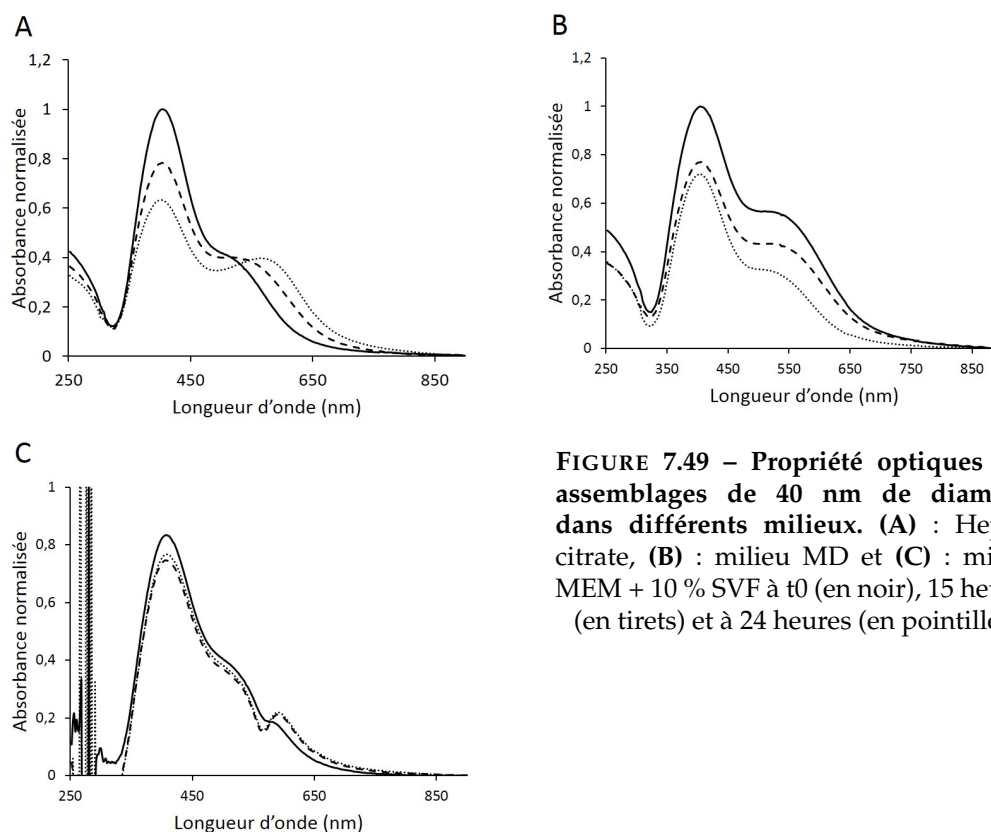


FIGURE 7.49 – Propriété optiques des assemblages de 40 nm de diamètre dans différents milieux. (A) : Hepes-citrate, (B) : milieu MD et (C) : milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en noir), 15 heures (en tirets) et à 24 heures (en pointillés)

Les assemblages de 60 nm ont une taille relativement stable dans le milieu Hepes-citrate, ils augmentent de 60 nm à t0, à 80 nm à 24 heures (**Figure 7.50**), ce qui n'est pas significatif au vu de la dispersion de taille. La mesure SPR dans ce tampon met cependant en évidence que le signal aux plus grandes longueurs d'onde augmente au cours du temps (530 nm à t0, 560 nm à 15 heures et 560 nm à 24 heures) alors que l'intensité du signal autour de 400 nm diminue (absorbance de 1 à t0, 0,8 à 15 heures et 0,8 à 24 heures) ce qui est caractéristique de l'augmentation de taille des assemblages (**figure 7.51 A**). Cette augmentation de taille est bien moins importante que celle des assemblages de 40 nm dans le même tampon. Cela permet de penser que les assemblages de 60 nm continuent à croître très lentement dans le tampon Hepes-citrate sous agitation à 400 rpm à 22°C. Dans le milieu MD, la taille des assemblages de 60 nm reste stable jusqu'à 24 heures (**Figure 7.50**). La mesure du signal SPR montre une très légère augmentation de la longueur d'onde maximale d'absorption (530 nm à t0, 550 nm à 15 heures et 550 nm à 24 heures) ainsi qu'une diminution de l'intensité du signal du premier pic à 400 nm au cours du temps (0,85 à 15 heures et 0,75 à 24 heures) (**Figure 7.51 B**). Dans le milieu MEM + 10 % de SVF, la taille des assemblages augmente immédiatement et reste stable au cours du temps : 145 nm de diamètre à t0 et 150 nm de diamètre à 24 h) (**Figure 7.50**), ce qui est directement corrélé à la stabilité du signal SPR dans ce milieu, à l'exception d'une légère inflexion autour de 550 nm qui tend à disparaître au cours du temps (**Figure 7.51 C**). Dans les milieux MEM + 10 % SVF et MD, l'intensité du signal diminue légèrement au cours du temps.

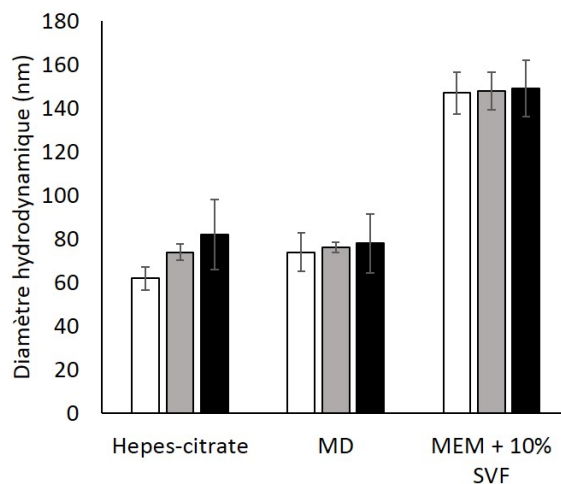


FIGURE 7.50 – Evolution de la taille mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent de 60 nm au cours du temps dans différents milieux. Dans le tampon Hepes-citrate, le milieu MD et le milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en blanc), 15 heures (en gris) et 24 heures (en noir)

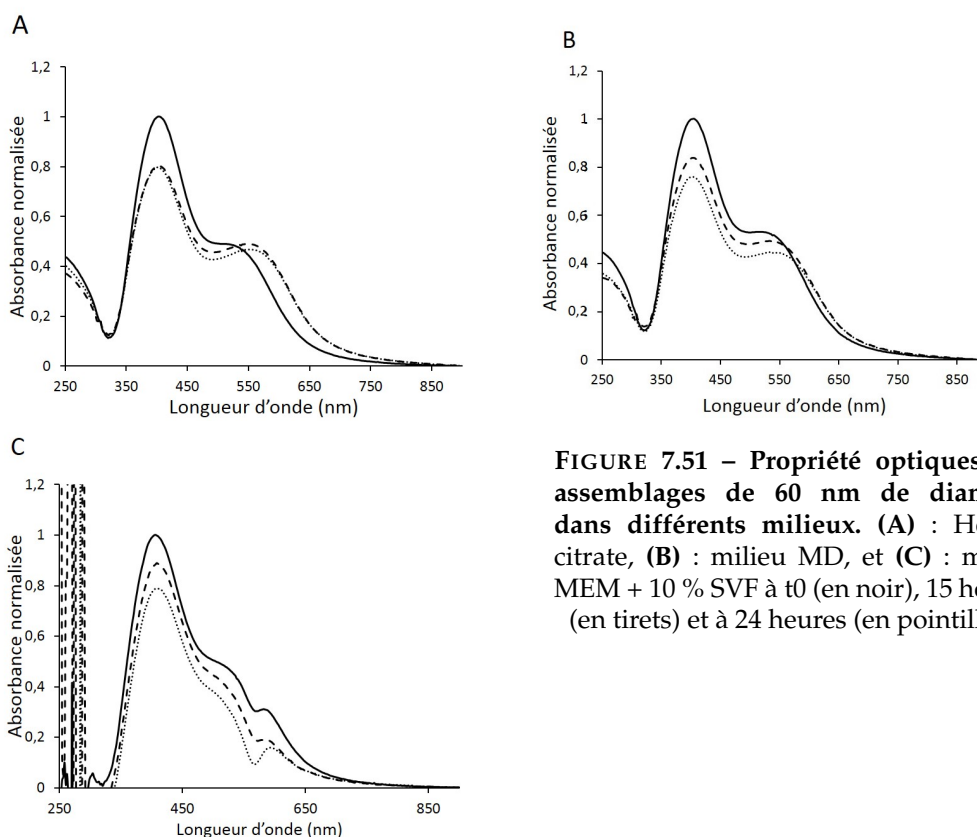


FIGURE 7.51 – Propriété optiques des assemblages de 60 nm de diamètre dans différents milieux. (A) : Hepes-citrate, (B) : milieu MD, et (C) : milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en noir), 15 heures (en tirets) et à 24 heures (en pointillés).

La taille des assemblages de 200 nm dans le tampon Hepes-citrate augmente de 180 nm à t0 jusqu'à 270 nm à 24 h (**Figure 7.52**), et le second pic du signal SPR évolue vers de plus grandes longueurs d'onde (550 nm à t0, 560 nm à 15 heures et 575 nm à 24 heures) (**Figure 7.53 A**). De plus le signal à 400 nm diminue (absorbance de 1 à t0, 0,75 à 15 heures et 0,55 à 24 heures) ce qui laisse penser que comme pour

les assemblages de 40 et 60 nm, la réaction d'assemblage continue dans le tampon Hepes-citrate à 400 rpm et 22°C. Cependant, dans le milieu MD, la taille est stable (136 nm de diamètre à t0 et 141 nm à 24 heures) (**Figure 7.52**) et le signal SPR diminue légèrement au cours du temps (absorbance de 1 à t0, 0,8 à 15 heures et 0,72 à 24 heures) tandis que le second pic se déplace légèrement (575 nm à t0 et 590 nm à 24 heures) (**figure 7.53 B**). Dans le milieu MEM + 10 % de SVF, une observation similaire est faite, exception faite de l'intensité du signal SPR qui ne diminue pas (**figure 7.53 C** courbe en pointillés).

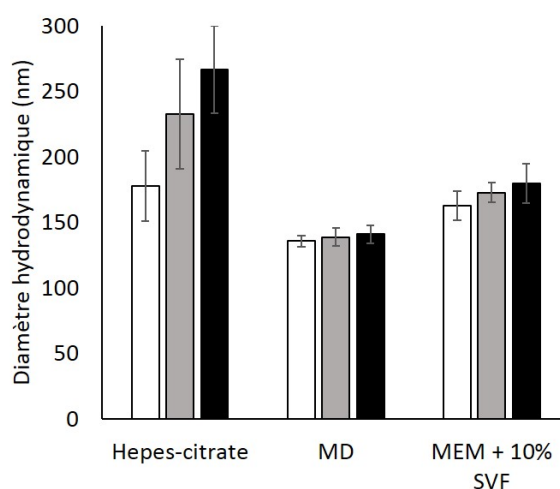


FIGURE 7.52 – Evolution de la taille mesurée par DLS des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm au cours du temps dans différents milieux. Dans le tampon Hepes-citrate, le milieu MD et le milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en blanc), 15 heures (en gris) et 24 heures (en noir).

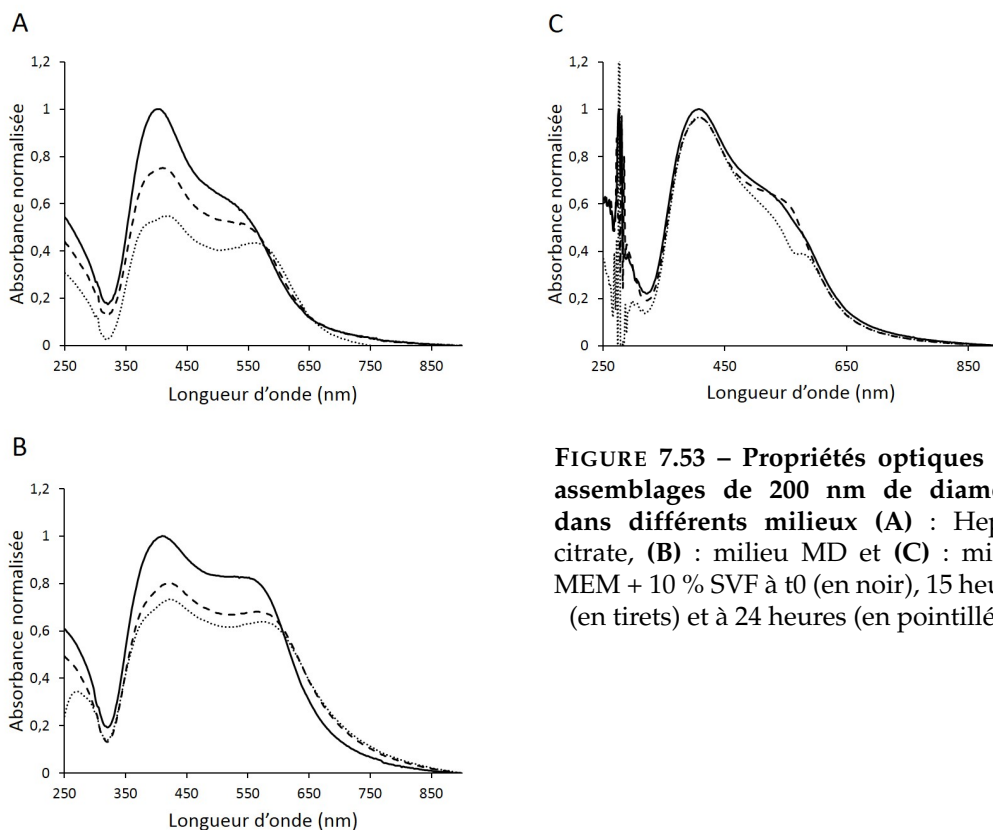


FIGURE 7.53 – Propriétés optiques des assemblages de 200 nm de diamètre dans différents milieux (A) : Hepes-citrate, (B) : milieu MD et (C) : milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en noir), 15 heures (en tirets) et à 24 heures (en pointillés).

En conclusion, dans le tampon Hepes-citrate, les assemblages de nanoparticules d'argent sont moins stables sous agitation, en particulier les assemblages de 40 nm. La stabilité des assemblages dans le milieu MD peut être due à la force ionique qui diffère d'un milieu à l'autre, imposant une géométrie différente aux assemblages de nanoparticules et modifiant la sphère de solvatation autour des assemblages ce qui entraîne une modification de la valeur mesurée ainsi qu'une très faible évolution du signal SPR des assemblages se déplaçant vers de plus grandes longueurs d'onde (**Figures 7.49 B, 7.51 B, et 7.53 B**). Dans tous les milieux, le signal spécifique des nanoparticules autour de 400 nm dans les assemblages diminue graduellement au cours du temps ce qui semble correspondre à une dissolution progressive de l'objet ou à une perte de matériel par adsorption sur les plastiques ou également à un accroissement de la taille de l'édifice, en particulier dans le milieu Hepes-citrate. Enfin, les assemblages de nanoparticules d'argent semblent plus stables que les nanoparticules d'argent enrobées de citrate dans le milieu de culture cellulaire.

7.4.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différents nano-objets

L'étude de l'activité bactéricide à 37°C des assemblages à été menée sur la souche bactérienne *E.coli* 1655 dans le milieu de culture liquide Minimum Davis (MD). Dans ce milieu ne contenant pas de chlorure les nanoparticules d'argent enrobées de citrate et les assemblages de nanoparticules d'argent de différentes tailles sont relativement stables. Les CMI des assemblages ainsi obtenues sont comparées avec celles des nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate. Cela a permis de montrer que les CMI des assemblages sont 7 à 20 fois supérieures à celles des nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate. De plus, la CMI augmente très légèrement pour les assemblages de 200 nm par rapport aux assemblages de 40 et 60 nm (**Tableau 7.4**).

Tableau 7.4 – CMI des nanoparticules d'argent de différentes tailles et des assemblages de nanoparticules d'argent de différentes tailles sur *E.coli*.

Taille (nm)	Objet	CMI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
20	Nano	$0,7 \pm 0$
40	Nano	$0,7 \pm 0$
60	Nano	$2,9 \pm 0$
.....
40	Assemblage	$5,2 \pm 3,2$
60	Assemblage	$5,9 \pm 3,6$
200	Assemblage	$12,7 \pm 1$

Si l'on procède à une comparaison par objets de même taille, dans le cas des objets de 40 nm, les assemblages sont 7 fois moins actifs que les nanoparticules. Dans le cas des objets de 60 nm, les assemblages sont 2 fois moins actifs (**Tableau 7.4**). La synthèse de nanoparticules d'argent de 200 nm enrobées de citrate n'ayant pas été réalisée, il n'est pas possible de les comparer avec des assemblages de 200 nm. Néanmoins, ces derniers sont 2 fois moins bactéricides que les autres assemblages.

Les rapports en nombre entre les nanoparticules isolées et les assemblages de 40 et 60 nm sont respectivement de 47 % (**Figure 7.23**) et 8 % (**Figure 7.25**), soit 5 fois moins de nanoparticules isolées dans l'échantillon d'assemblages de 60 nm que dans l'échantillon d'assemblages de 40 nm alors que leurs effets biocides sont de 5,2 et 5,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ce qui est similaire. On peut également souligner le fait qu'entre une suspension contenant 100 % de nanoparticules enrobées de citrate et une solution contenant 47 % de nanoparticules isolée, soit la moitié, la CMI des suspensions augmente de 0,73 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ à 5,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ soit 7 fois supérieures (**Tableau 7.4**). Ainsi nous pouvons dire que l'activité biocide des échantillons d'assemblages n'est pas due au

nombre de nanoparticules isolées présentes dans l'échantillon, mais bien aux d'assemblages.

En conclusion, l'augmentation de la CMI et donc la diminution de l'activité biocide est en partie due à l'augmentation de la taille des objets ainsi qu'à un effet d'enrobage, et ne peut pas être imputé au nombre de nanoparticules isolées restant dans les échantillons d'assemblage.

7.4.3 Origine de la différence d'activité bactéricide entre les nanoparticules d'argent et les assemblages

L'action biocide des nanoparticules d'argent dépend de leur capacité à libérer des ions Ag(I) dans le milieu (**Chapitre 3**). Ainsi, dans le but de comprendre les différences d'action bactéricide entre les nanoparticules d'argent et les assemblages, la quantité d'argent qu'ils libèrent en solution doit être déterminée. Une première campagne de mesures a été initiée, mais les répétitions n'ayant pas encore été effectuées, les résultats ne peuvent pas être présentés dans ce manuscrit de thèse.

Il n'est dès lors pas possible de conclure sur la différence d'activité bactéricide qui pourrait être due à une perte d'efficacité induite par la présence de l'enrobage, ou à une diminution de la surface réactive dans les assemblages.

7.4.4 Toxicité sur cellules eucaryotes

Etude de la cytotoxicité sur les cellules HepG2

Dans un premier temps, afin de déterminer la toxicité de ces nouveaux objets, la cytotoxicité des assemblages a été étudiée en comparaison avec la cytotoxicité des nanoparticules les composant et avec des nanoparticules d'argent enrobées de citrate de 40 et 60 nm, comme décrit dans le **paragraphe 10.8.2**.

Ces expériences ont été réalisées sur la lignée d'hépatocarcinome HepG2, le foie étant l'organe dans lequel s'accumule l'argent et les autres xénobiotiques. Pour cela la viabilité de cellules HepG2 après 24 heures d'incubation avec les assemblages de nanoparticules ou les nanoparticules d'argent enrobées de citrate a été déterminée par un comptage suite à une coloration des cellules au bleu Trypan. Les nanoparticules s'avèrent être plus toxiques que les assemblages de la même taille. La DL_{50} pour les nanoparticules d'argent de 40 nm est de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ alors que la DL_{50} des assemblages de 40 nm n'a pas pu être atteinte car nous n'avons pas pu dépasser la dose de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Il en est de même avec les assemblages de 60 nm, quand bien même la valeur de la viabilité cellulaire est plus faible à $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, l'écartype est plus important (**Figure 7.54**).

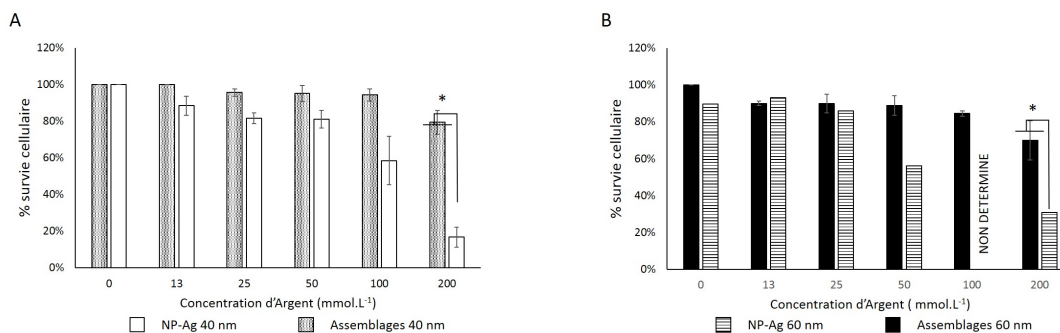


FIGURE 7.54 – Cytotoxicité des nanoparticules d'argent et des assemblages sur des cellules HepG2. (A) : assemblages de 40 nm (pointillés gris) et nanoparticules d'argent de 40 nm (blanc) et (B) : assemblages de 60 nm (noir) comparés à des nanoparticules d'argent de 60 nm (hachurés).

L'échelle de production des assemblages ne nous a pas permis d'obtenir un stock qui soit au moins concentré à 4-5 mmol.L⁻¹ ce qui serait un minimum pour pouvoir tester des concentrations de 400-500 μ mol.L⁻¹ sur les cellules. Il est néanmoins clair que les assemblages de nanoparticules sont beaucoup moins toxiques pour les cellules eucaryotes que les nanoparticules seules.

Les assemblages présentent tous une toxicité moindre que les nanoparticules d'argent, quelle que soit la taille de ces dernières. En superposant les courbes de survie des cellules HepG2, il n'est pas possible de discriminer les différents assemblages entre eux (**figure 7.55**). Ils semblent présenter un profil de toxicité similaire jusqu'à 200 μ mol.L⁻¹ d'argent. Il est donc nécessaire d'essayer d'aller au-delà de cette concentration d'assemblage pour observer une toxicité significative pour les cellules HepG2.

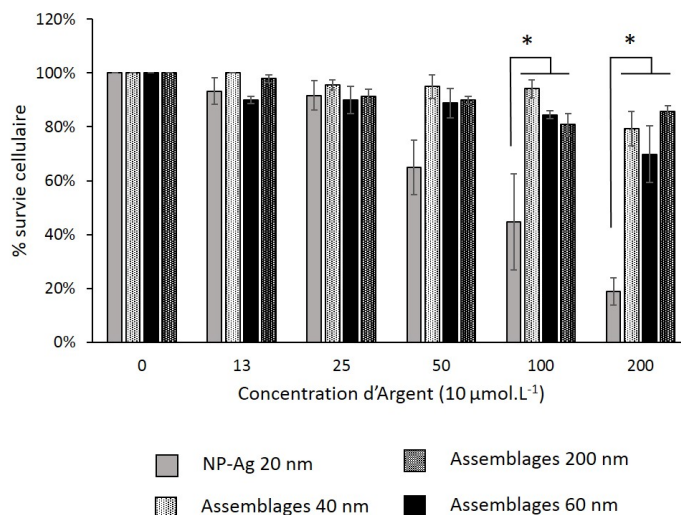


FIGURE 7.55 – Comparaison de la cytotoxicité sur cellules HepG2, des nanoparticules d'argent de 20 nm enrobées de citrate et des assemblages. Nanoparticules d'argent de 20 nm (gris), assemblages de 40 nm (pointillés gris), assemblages de 60 nm (noir) et assemblages de 200 nm (pointillés noirs).

7.4.5 Origine de la différence de toxicité entre les nanoparticules d'argent et les assemblages de nanoparticules

Test d'entrée de l'argent dans les cellules eucaryotes HepG2

Dans le but d'expliquer la différence de toxicité entre les nanoparticules d'argent enrobées de citrate et les assemblages composés de ces mêmes nanoparticules, la quantification de l'argent internalisé par les cellules HepG2 à une concentration unique non-toxique de 25 μmol.L⁻¹ a été effectuée comme décrit dans le **paragraphe 10.8.3**.

Il a ainsi été mis en évidence que quelle que soit la taille ou le type de nano-objet incubé avec les cellules HepG2, la quantité d'argent retrouvée à l'intérieur des cellules est similaire (**Figure 7.56**). En effet, les assemblages de 40 nm, 60 nm et 200 nm sont internalisés à hauteur de 0,30 μg.10⁶ cellules, 0,24 μg.10⁶ cellules et 0,21 μg.10⁶ cellules alors que les nanoparticules qui les composent sont internalisés à hauteur de 0,24 μg.10⁶ cellules, ce qui est du même ordre de grandeur.

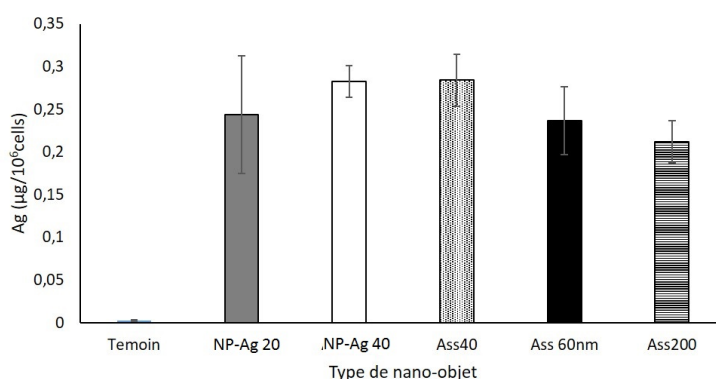


FIGURE 7.56 – Quantification de l’argent absorbé par les cellules suite à une exposition aux nanoparticules d’argent ou aux assemblages de nanoparticules d’argent.

Il n’est donc pas possible d’expliquer la différence de toxicité par une diminution de l’internalisation de l’argent par les cellules lorsqu’elles sont exposées aux assemblages. Il a été préalablement décrit que l’argent entrainé dans les cellules de façon majoritaire sous forme nanoparticulaire par des mécanismes d’endocytose. Fort de la description au préalable de la stabilité des assemblages dans le milieu de culture cellulaire, il est possible de proposer que les assemblages sont internalisés par les cellules et qu’ils sont probablement moins dissous par ces dernières.

Devenir des nanoparticules d’argent et des assemblages dans les cellules HepG2

Dans cette optique, nous avons étudié le devenir des nanoparticules d’argent et des assemblages de 200 nm *in cellulo* par nanoXRF en collaboration avec Giulia Veronesi (à l’ESRF, Grenoble) (**Paragraphe 10.7.2**). Le nanoXRF est la seule technique assez sensible pour permettre la détection de l’argent ionique dans les cellules.

Dans le but d’observer des cellules vivantes, les cellules HepG2 ont été incubées avec une concentration non toxique de 25 µmol.L⁻¹ d’argent sous forme nanoparticulaire ou sous forme d’assemblages puis fixées et incluse en résine. Des coupes de cellules ont été analysées par microscopie de fluorescence des rayons X comme décrit dans le **paragraphe 10.7.2**.

Dans un premier temps, des champs larges ont été analysés à basse résolution (1 µm en x et y, **Figures 7.57, 7.58 et 7.59**) afin d’observer la distribution de l’Ag dans de nombreuses cellules exposées aux nanoparticules d’argent ou à des assemblages de 200 nm. Les régions dans lesquelles se trouvent des nanoparticules seules ou des assemblages sont généralement clairement identifiées sur une carte élémentaire de l’Ag en échelle linéaire où elles correspondent aux spots très intenses (rouge/jaune) tel que l’on en observe en nombre important sur la **figure 7.57 C**. On peut également

les observer sous forme de points rouges dans les cartes en 2 couleurs (**Figure 7.57 B**).

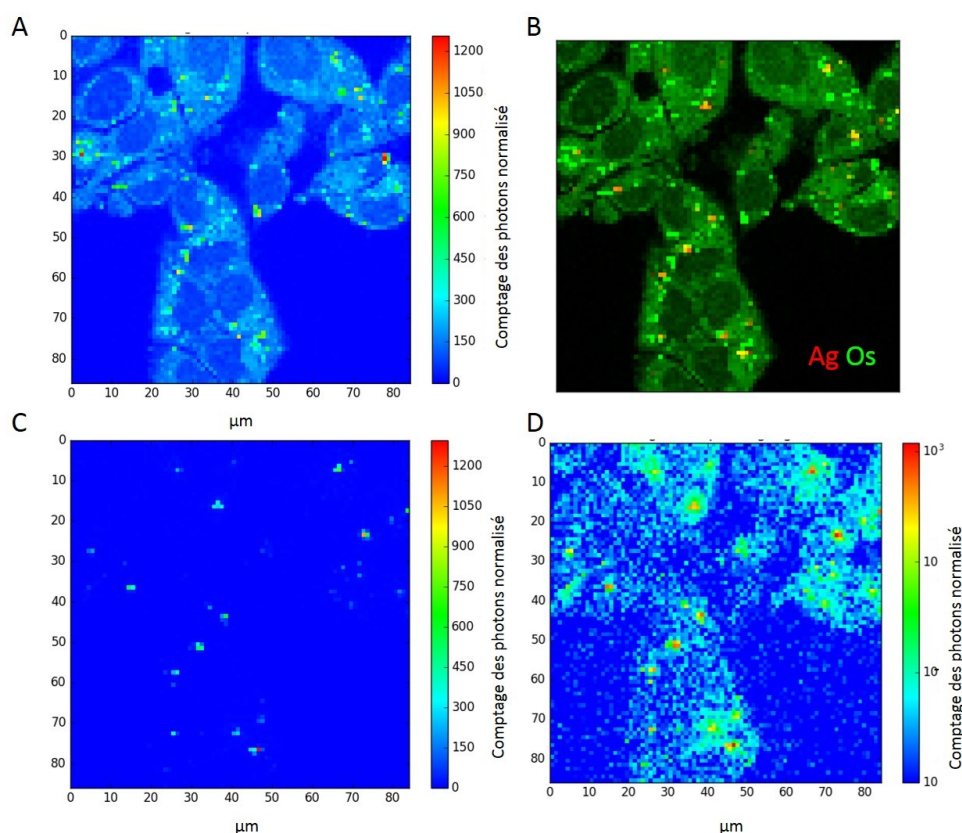


FIGURE 7.57 – Observation par XRF du devenir des nanoparticules d'argent dans les cellules HepG2. (A) : carte Os de l'échantillon en fausses couleurs, (B) : carte en double couleur Os (en vert) et Ag (en rouge), (C) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs linéaire en fonction de l'intensité du signal de l'Ag, (D) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs logarithmique en fonction de l'intensité du signal de l'Ag (de 0 photon en bleu à 10³ photons en rouge).

A l'inverse, nous n'observons que quelques spots d'argent dans le cas de cellules exposées aux assemblages de 200 nm (**Figures 7.58 B - C et 7.59 B - C**). De plus, les cartes de l'élément Ag en échelle logarithmique permettent de mettre en évidence l'argent dissous autour des zones des cellules qui contiennent des nanoparticules (**Figure 7.57 D**), signal qui reste du niveau du bruit de fond dans le cas de cellules exposées à des assemblages (**Figures 7.58 D et 7.59 D**). Cette analyse à basse résolution met en évidence qu'il y a beaucoup moins d'objets endocytés dans le cas de l'exposition de cellules HepG2 à des assemblages en comparaison avec les nanoparticules d'argent.

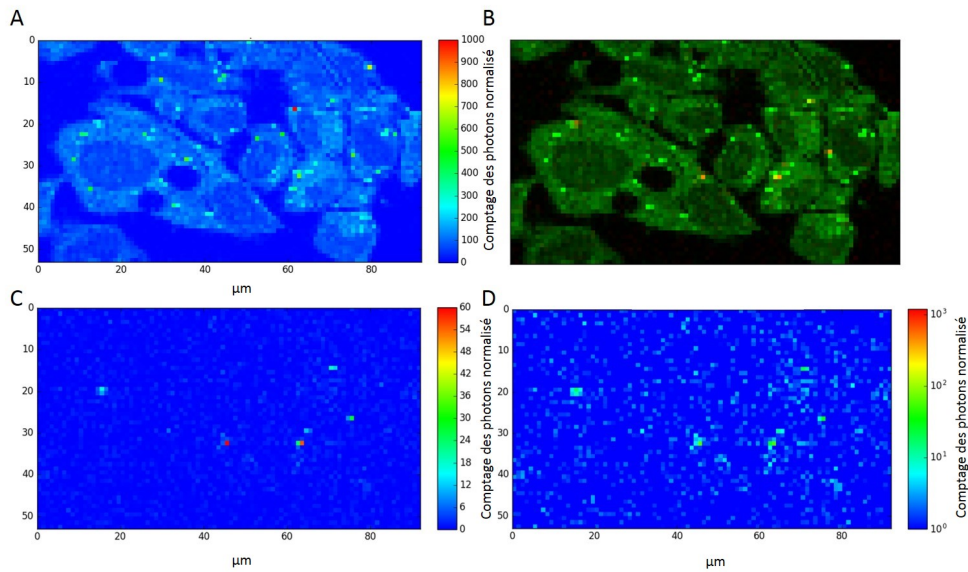


FIGURE 7.58 – Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d’argent de 200 nm dans les cellules HepG2. (A) : carte Os de l’échantillon en fausses couleurs, (B) : carte en double couleur Os (en vert) et Ag (en rouge), (C) : carte de l’Ag avec une échelle en fausses couleurs linéaire en fonction de l’intensité du signal de l’Ag, (D) : carte de l’Ag avec une échelle en fausses couleurs logarithmique en fonction de l’intensité du signal de l’Ag (de 0 photon en bleu à 10^3 photons en rouge).

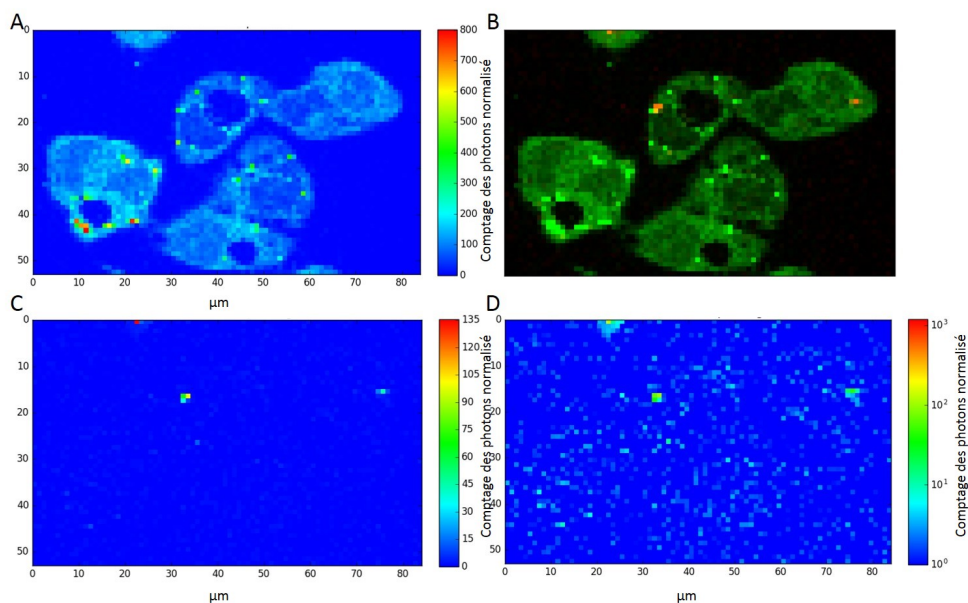


FIGURE 7.59 – Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d’argent de 200 nm dans les cellules HepG2. (A) : carte Os de l’échantillon en fausses couleurs, (B) : carte en double couleur Os (en vert) et Ag (en rouge), (C) : carte de l’Ag avec une échelle en fausses couleurs linéaire en fonction de l’intensité du signal de l’Ag, (D) : carte de l’Ag avec une échelle en fausses couleurs logarithmique en fonction de l’intensité du signal de l’Ag (de 0 photon en bleu à 10^3 photons en rouge).

Afin de comparer plus finement le devenir des nanoparticules d'argent par rapport aux assemblages de 200 nm dans les cellules HepG2, nous avons acquis des cartes de cellules individuelles à haute résolution (100x100nm², **Figures 7.60, 7.61 et 7.62**). Comme cela a déjà été analysé et publié par l'équipe (Veronesi et al., 2016b) les nanoparticules d'argent se retrouvent localisées dans des endosomes ou lysosomes dans d'Ag(I) dans toute la cellule qui donne un signal spécifique de l'Ag plus faible et dans toute la cellule (**Figure 7.60 D** en bleu/vert).

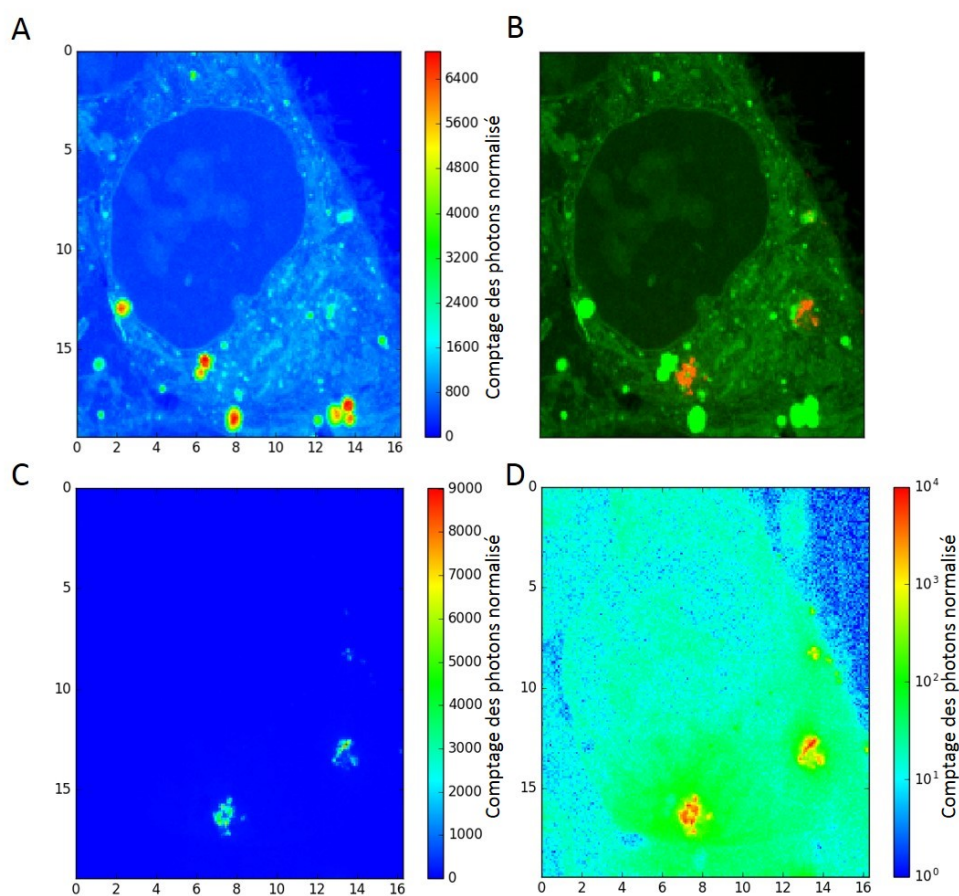


FIGURE 7.60 – Observation par XRF du devenir des nanoparticules d'argent dans les cellules HepG2 à haute résolution. (A) : carte Os de l'échantillon en fausses couleurs, (B) : carte en double couleur Os (en vert) et Ag (en rouge), (C) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs linéaire en fonction de l'intensité du signal de l'Ag, (D) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs logarithmique en fonction de l'intensité du signal de l'Ag (de 0 photon en bleu à 10⁴ photons en rouge).

Dans le cas des assemblages, nous avons choisi deux cellules dans lesquelles des assemblages avaient été détectés à basse résolution. Dans la première cellule, quelques zones d'intensité intermédiaire en argent sont visualisées (**Figures 7.61 B - C**) et de manière corrélée, l'intensité du signal correspondant aux espèces d'Ag(I) est à peine supérieure au bruit de fond de l'extérieur de la cellule (**Figure 7.61 D**).

Dans une seconde cellule, des assemblages produisant un signal d'argent aussi fort que dans le cas des nanoparticules d'argent est observé (**Figures 7.62 B-C**) ce qui génère un signal correspondant aux espèces Ag(I) significatif mais qui semble être d'un ordre de grandeur en dessous par rapport à l'exposition aux nanoparticules d'argent (**Figure 7.62 D**). Malheureusement, nous n'avons pas pu analyser suffisamment de cellules pour étudier précisément la cinétique de dissolution des assemblages dans les cellules mais leur dissolution intracellulaire pourrait être moins rapide que celle des nanoparticules d'argent.

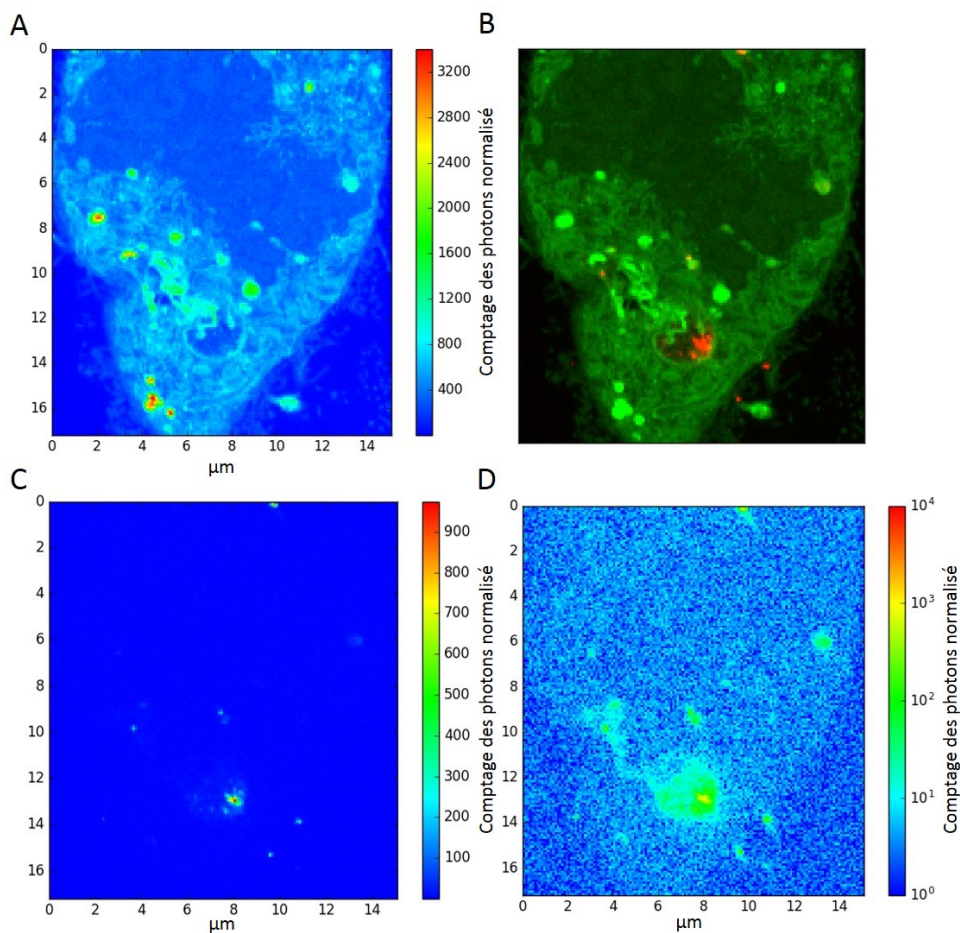


FIGURE 7.61 – Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm dans les cellules HepG2 à haute résolution. (A) : carte Os de l'échantillon en fausses couleurs, (B) : carte en double couleur Os (en vert) et Ag (en rouge), (C) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs linéaire en fonction de l'intensité du signal de l'Ag, (D) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs logarithmique en fonction de l'intensité du signal de l'Ag (de 0 photon en bleu à 10^4 photons en rouge).

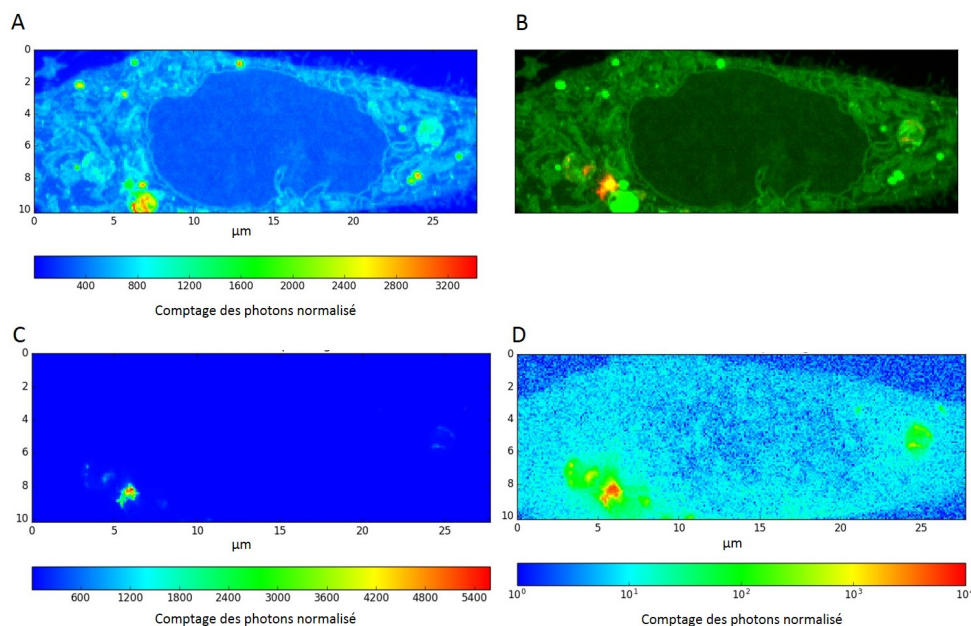


FIGURE 7.62 – Observation par XRF du devenir des assemblages de nanoparticules d'argent de 200 nm dans les cellules HepG2 à haute résolution. (A) : carte Os de l'échantillon en fausses couleurs, (B) : carte en double couleur Os (en vert) et Ag (en rouge), (C) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs linéaire en fonction de l'intensité du signal de l'Ag, (D) : carte de l'Ag avec une échelle en fausses couleurs logarithmique en fonction de l'intensité du signal de l'Ag (de 0 photon en bleu à 10⁴ photons en rouge).

En conclusion, bien que préliminaires, ces expériences sur la visualisation du devenir des assemblages laissent penser que ceux-ci ne sont pas endocytés par toutes les cellules pour une raison qui n'est pas encore identifiée. Etant donné la quantité d'argent que représente un seul assemblage par rapport à une nanoparticule de 20 nm, on comprend aisément que l'endocytose d'assemblages simplement par quelques cellules pourrait expliquer les résultats obtenus par ICP-AES lors de la quantification de l'internalisation des assemblages par les cellules HepG2 (**paragraphe précédent**). La compréhension de cet effet potentiel sur l'entrée dans les cellules paraît donc particulièrement intéressante pour le développement de nano-objets Safer-by-design.

Etude de la corona protéique

Les assemblages de nanoparticules sont internalisés dans les cellules au même niveau que les nanoparticules d'argent enrobées de citrate en terme de quantité d'argent, nous avons dans un premier temps cherché à analyser la corona protéique qui a un rôle important dans l'entrée et la toxicité des nanoparticules d'argent dans les cellules (pour revue : Marchioni et al., 2018b). La quantification des protéines présentes dans la corona protéique autour des nanoparticules et des assemblages a donc

été réalisé selon le protocole décrit **paragraphe 10.8.5** par un dosage au BCA : BiCinchoninic Acid.

i) Validation de l'utilisation du test BCA

Le test BCA est basé sur l'interaction du cuivre et d'un agent complexant. L'argent et le cuivre étant proches, il est nécessaire de vérifier que l'argent libéré par les nanoparticules ou les assemblages (**Paragraphe 7.4.3**) n'interfère pas avec la mesure. Pour cela, une gamme d'AgNO₃, allant de 0 à 4 µg d'Ag est soumise au test micro-BCA sans ajout de protéine (**Figure 7.63**). Le signal d'absorbance à 562 nm augmente de manière linéaire avec la concentration en argent mais reste cependant minime comparé aux valeurs attendues pour un test BCA classique en présence de protéines. Pour information, cette valeur est reportée en pointillés sur les graphiques suivants.

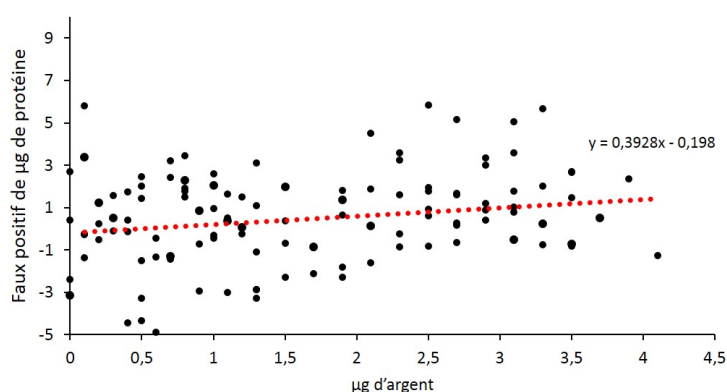


FIGURE 7.63 – Quantification de la réponse du test BCA à une concentration croissante d'AgNO₃ : détermination de la limite des faux positifs.

Les protéines des corona des nanoparticules d'argent sont analysées sur gel SDS-PAGE. On observe des profils protéiques similaires dans tous les cas, montrant que les mêmes protéines du sérum s'adsorbent sur les assemblages et les nanoparticules (**Figure 7.64**). Ainsi, on peut voir que la bande spécifique de l'albumine à 65 kDa est la plus intense et la seule clairement identifiée dans les différents échantillons de protéines associées aux nanoparticules ou aux assemblages. Cependant, il faut prendre en compte le fait que l'albumine est de loin la protéine la plus abondante dans le mélange MEM + 10 % de SVF. Il est possible que les protéines se fixent de manière non spécifique sur les nanoparticules mais la quantité des autres protéines est trop faible pour que l'on puisse révéler d'autres bandes. Les différences ne semblent pas importantes, l'analyse qualitative de la corona protéique n'a pas été investiguée plus avant. Dans la suite de cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'analyse

quantitative de la corona.

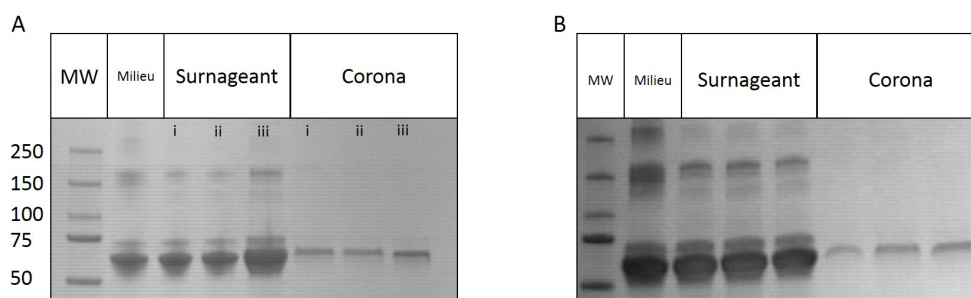


FIGURE 7.64 – Analyse qualitative des protéines de la corona des nanoparticules d'argent Gel SDS-PAGE des nanoparticules d'argent incubées dans du milieu MEM enrichi à 10 % de SVF pendant 1 heure à 37°C. Les nanoparticules sont séparées du milieu par centrifugation puis la quantité de protéines autour des nanoparticules est déterminée par dosage BCA. Dans chaque puits (A) : 5 et (B) : 10 µg de protéines sont déposées. Ainsi il est possible de comparer les protéines présentes dans le milieu MEM + 10 % de SVF (milieu), dans le surnageant du milieu MEM + 10 % (surnageant) et dans la corona des nanoparticules enrobées de citrate (Corona). (i) : 1 µg d'Ag (ii) : 2,5 µg d'Ag (iii) : 5 µg d'Ag.

Il est ensuite nécessaire de prendre en compte le fait que les assemblages de nanoparticules d'argent, contrairement aux nanoparticules d'argent enrobées de citrate, sont stables dans le milieu de culture. En effet, après le lavage par centrifugation, la suspension des assemblages à doser présente donc toujours une couleur spécifique à son état de suspension nanoparticulaire, comme cela est observable sur la **figure 7.65 A**. Les manipulations précédentes en ToF-SIMS (**Paragraphe 7.3.4**) ont mis en évidence que, contrairement aux nanoparticules d'argent enrobées de citrate, les assemblages sont entièrement recouverts d'une couche organique. On peut comparer cela aux nanoparticules d'argent enrobées de PVP, qui sont également stables dans un milieu de culture riche en protéines (Veronesi et al., 2016b) et gardent également leur couleur spécifique en suspension après l'incubation dans un milieu riche en protéines (**Figure 7.65 B**). Ce raisonnement sous-tend l'utilisation des nanoparticules d'argent enrobées de PVP comme modèle dans cette étude.

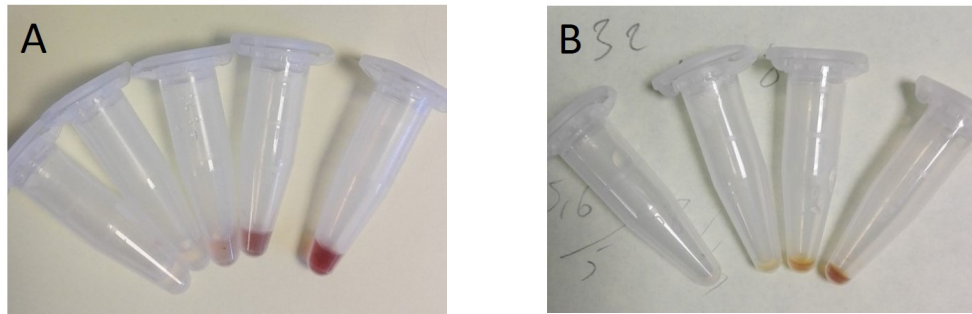


FIGURE 7.65 – Suspension de (A) : nanoparticules d'argent enrobées de PVP et (B) : des assemblages de 60 nm repris dans le tampon Hepes-citrate après à 1 heure d'incubation dans le milieu MEM + 10 % SVF. Les échantillons sont présentés en concentration croissante en argent de gauche à droite.

Le signal SPR des nanoparticules d'argent enrobées de PVP (410 nm) interfère avec la mesure BCA, ce qui met en évidence une potentielle présence de protéines sur des nanoparticules d'argent enrobées de PVP qui n'ont pas été incubées avec des protéines. Il en va de même avec les assemblages. Afin de prouver que cette mesure est erronée, un gel SDS-PAGE a été effectué avec des nanoparticules d'argent PVP et des assemblages qui n'ont pas été mis en présence de protéines mais dont le test BCA indiquait une présence de protéines.

On observe bien sur la **figure 7.66** que dans les puits où se trouvent les nanoparticules d'argent enrobées de PVP, les nanoparticules d'argent enrobées de L1, les assemblages de 40 nm et les assemblages de 60 nm, il n'y a pas de bande de protéines alors que les dépôts ont été effectués pour une quantité équivalente à 10 μ g de protéines dosées selon un dosage BCA. Cela met bien évidence le fait que les assemblages de nanoparticules d'argent ainsi que les nanoparticules d'argent enrobées de PVP interfèrent avec le dosage BCA.

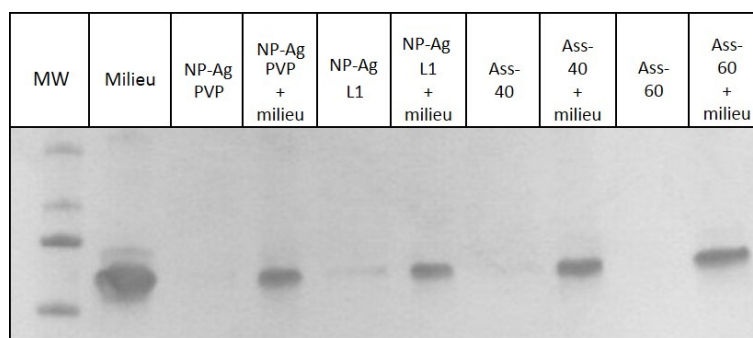


FIGURE 7.66 – Analyse par Gel SDS-PAGE des protéines de la corona des nanoparticules d'argent enrobées de PVP et des assemblages de nanoparticules d'argent. Après une heure d'incubation dans le milieu MEM + 10 % SVF ou dans du tampon HEPES-citrate. Les protéines présentes dans les échantillons sont dosées par BCA et l'équivalent de 10 μ g de protéines est déposé dans chaque puits.

Afin de quantifier la présence des protéines à la surface des nanoparticules d'argent enrobées de PVP et des assemblages, des puits dits « blancs » ont donc été réalisés, contenant la même concentration en argent de nanoparticules et d'assemblages que les échantillons mesurés, ce qui permet alors de soustraire l'intensité mesurée par le test au BCA due aux nanoparticules d'argent ou aux assemblages de nanoparticules.

ii) Résultats

L'analyse quantitative des protéines présentes autour des nanoparticules enrobées de citrate et des assemblages a permis de déterminer que la quantité de protéines dans la corona était proportionnelle à la quantité de nanoparticules dans le milieu (**Figure 7.67**). Cela permet de souligner dans un premier temps ce qui a déjà été décrit dans la littérature : les nanoparticules d'argent enrobées de citrate accumulent davantage de protéines à leur surface sous forme de corona que les nanoparticules d'argent enrobées de PVP. En effet, pour 5 μg de nanoparticules enrobées de citrate, la corona protéique représente 20 μg de protéine (**Figure 7.68**), alors que pour la même quantité de nanoparticules enrobées de PVP, la corona protéique représente moins de la moitié : 6,3 μg .

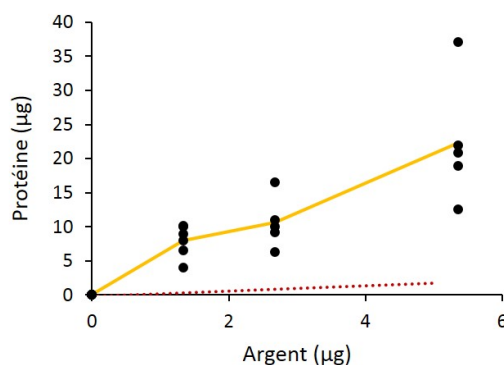


FIGURE 7.67 – Evolution de la quantité de protéines dans la corona des nanoparticules d'argent enrobées de citrate en fonction de la quantité d'argent.

Dans un second temps, il a été mis en évidence que la quantité de protéines présentes dans la corona formée autour des assemblages est plus faible que la quantité de protéines présentes autour des nanoparticules enrobées de citrate qui forment ces assemblages. Les valeurs sont relativement proches entre elles, quelle que soit la taille de l'assemblage ; 40 nm : 7,3 μg , 60 nm : 8,5 μg et 200 nm : 8,9 μg de protéines pour 5 μg d'argent (**Figure 7.68**). Ces valeurs sont proches de la quantité retrouvée autour des nanoparticules d'argent enrobées de PVP qui est de 6,3 μg .

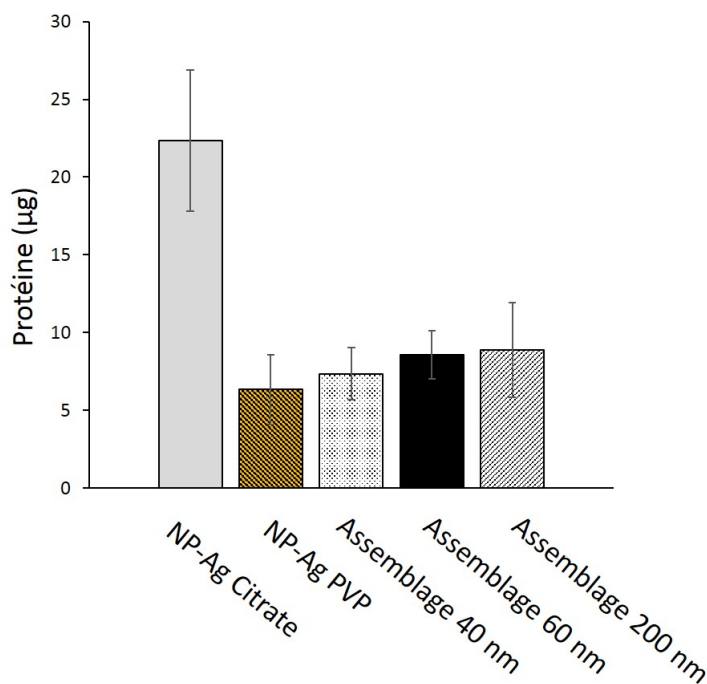


FIGURE 7.68 – Comparaison de la quantité de protéines engagées dans la formation de la corona protéique des différents nano-objets pour une quantité de 5 µg d'argent.

7.4.6 Conclusion sur la toxicité eucaryote des assemblages des nanoparticules

Par ces différentes expériences : étude de la cytotoxicité, étude de l'internalisation des assemblages par les cellules, étude de la dissolution *in cellulo* et de la formation de la corona protéique, il est possible de poser quelques conclusions ainsi que les bases pour une discussion plus approfondie.

Les assemblages de nanoparticules d'argent, quelle que soit leur taille, se sont révélés moins cytotoxique que les nanoparticules dont ils sont constitués. Cependant, aucune DL_{50} n'a pas pu être déterminée car les concentrations nécessaires pour ces expériences n'ont pas été atteintes dans la production des échantillons. Ensuite, il a été mis en évidence que ce soit suite à une exposition aux assemblages de nanoparticules d'argent, ou aux nanoparticules d'argent, l'absorption de l'argent par les cellules est du même ordre de grandeur. Cependant, les manipulations de nano-XRF ont souligné le fait que dans le cas d'une exposition aux assemblages de nanoparticules d'argent, moins de cellules internalisaient des assemblages que dans le cas d'une exposition aux nanoparticules d'argent à la même concentration.

Il est néanmoins nécessaire de préciser que pour une concentration égale en argent, le nombre d'objet disponible est bien moindre dans le cas d'un échantillon d'assemblage que dans le cas d'un échantillon de nanoparticules d'argent.

7.5 Nanoparticules d'argent isolées enrobées de L1

Nous avons montré que les nanoparticules d'argent qui ont été incubées avec le ligand ne sont pas toutes engagées dans des assemblages. En effet, après séparation sur un gradient discontinu de sucrose, nous récupérons une fraction de nanoparticules d'argent de 20 nm de diamètre dont le signal SPR est élargi par rapport au signal SPR des nanoparticules d'argent enrobées de citrate (**Figure 7.69 A**), ce qui est spécifique d'une forte quantité de ligands organique fixés à la surface de la nanoparticule (Peng et al., 2010). La mesure du rayon hydrodynamique de la suspension de nanoparticules indique un élargissement de la distribution et un déplacement vers de plus grandes tailles (**Figure 7.69 B**) probablement dû au déplacement du citrate à la surface des nanoparticules remplacé par le ligand L1. Ce phénomène pouvait être attendu étant donné l'affinité nettement plus importante des thiols pour Ag(I) par rapport aux carboxylates des anions citrate.

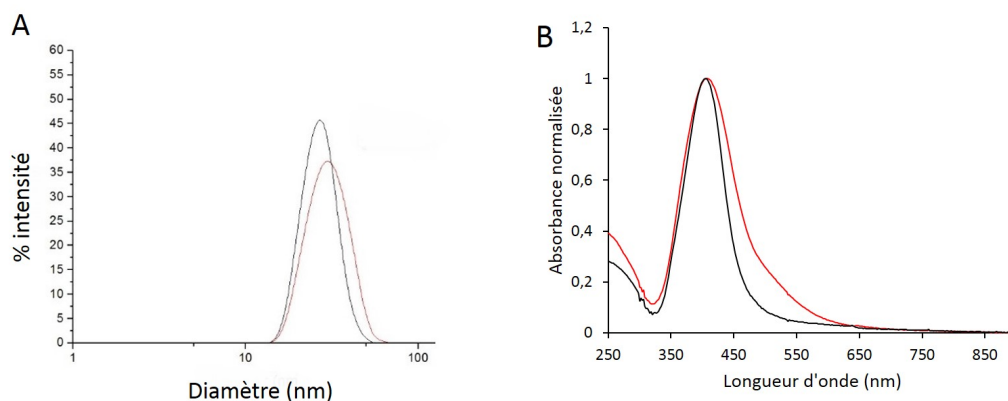


FIGURE 7.69 – Caractérisation des nanoparticules d'argent enrobées de L1 (courbe rouge) comparé à des nanoparticules enrobées de citrate (courbe noire) par (A) : distribution de taille déterminée par DLS et (B) : spectroscopie UV-visible.

La caractérisation ainsi que la stabilité des nanoparticules d'argent enrobées de L1 a été analysée dans les différents milieux utilisés, c'est à dire le tampon Hepes-citrate, le milieu MD et le milieu MEM + 10 % SVF. Dans le citrate à 22°C sous 400 rpm d'agitation, la taille des nanoparticules d'argent enrobées de L1 augmente au même titre que celle des assemblages (**Paragraphe 7.4.1**) : à t₀ les nanoparticules font 25 nm de diamètre, 65 nm après 15 heures d'incubation et 85 nm après 24 heures (**Figure 7.70**). Ceci est corrélé avec l'apparition progressive en spectroscopie UV-Visible d'un second pic à de plus grandes longueurs d'onde, inexistant à t₀ mais présent à 15 heures et 24 heures à 500 nm. Le pic à 400 nm diminue également du fait de l'apparition du second pic : absorbance de 0,6 après 15 heures et 0,55 après 24 heures (**Figure 7.71-A**).

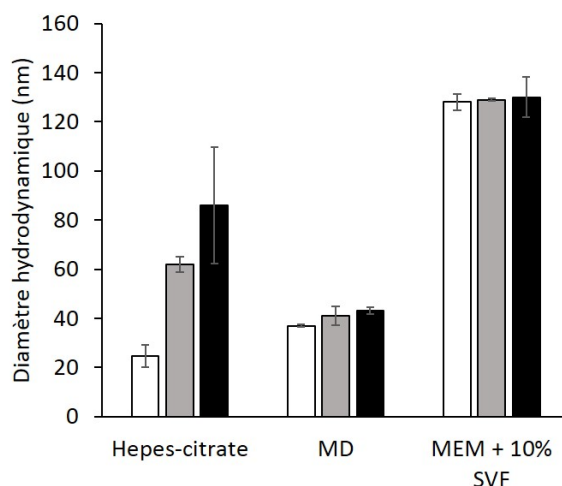


FIGURE 7.70 – Evolution de la taille mesurée par DLS des nanoparticules d'argent enrobées de L1 au cours du temps dans différent milieux. Dans le tampon Hepes-citrate, le milieu MD et le milieu MEM + 10 % SVF à t0 (en blanc), 15 heures (en gris) et 24 heures (en noir).

Dans le milieu de culture bactérienne, les nanoparticules d'argent enrobées de L1 ne montrent pas d'augmentation de taille : 37 nm à t0, 42 nm après 15 heures et 43 nm après 24 heures. L'augmentation de taille à t0 dans le milieu MD par rapport à la taille à t0 dans le tampon Hepes-citrate est similaire à ce que nous avons déjà observé pour les assemblages de nanoparticules d'argent et qui est probablement due à une augmentation de la sphère de solvation (**Figure 7.70**). La stabilité des nanoparticules d'argent enrobées de L1 dans le milieu de culture bactérien est également observable par le suivi du signal SPR (**Figure 7.71 B**) où aucun pic secondaire n'apparaît alors que le signal à 400 nm diminue, ce qui montre la dissolution des nanoparticules d'argent ou l'adsorption sur les plastiques de ces dernières. Les nanoparticules enrobées de L1 s'agglomèrent dans le milieu MEM enrichi à 10 % de SVF et forment des édifices de 130 nm de diamètre relativement stables (**Figure 7.70**) ce qui est également vérifiable avec la mesure du signal SPR des nanoparticules dans le milieu MEM + 10 % de SVF (**Figure 7.71 C**) où le signal à 400 nm diminue peu au cours du temps (absorbance de 0,92 après 24 heures d'incubation).

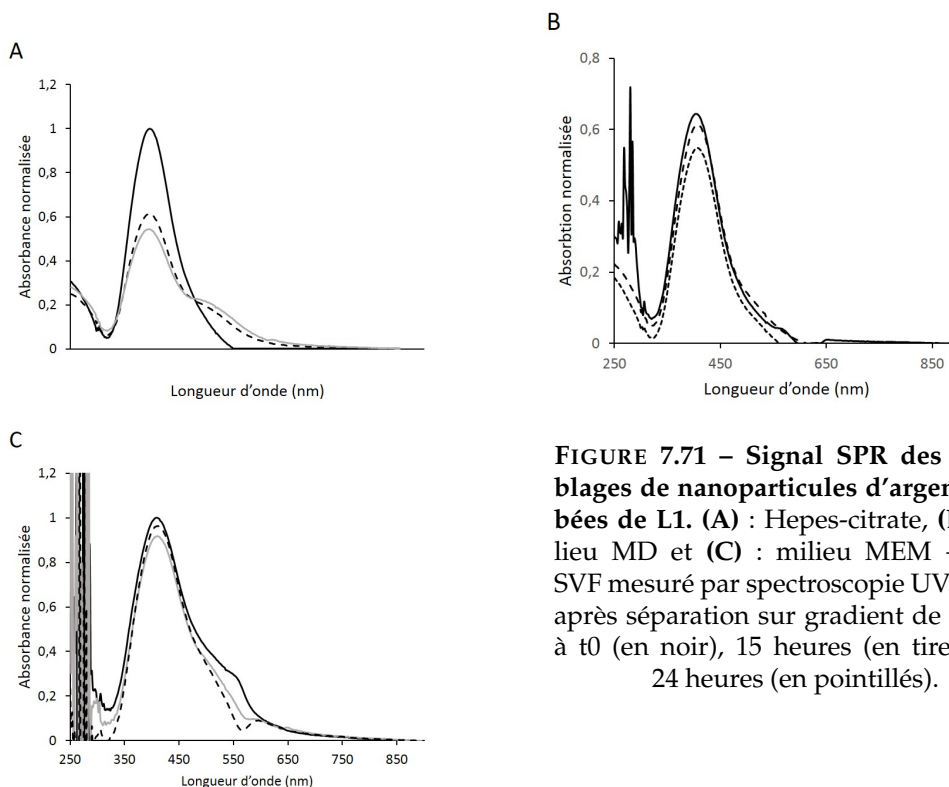


FIGURE 7.71 – Signal SPR des assemblages de nanoparticules d'argent enrobées de L1. (A) : HEPES-citrate, (B) : milieu MD et (C) : milieu MEM + 10 % SVF mesuré par spectroscopie UV-Visible après séparation sur gradient de sucrose à t0 (en noir), 15 heures (en tirets) et à 24 heures (en pointillés).

Cette stabilité dans le milieu MEM + 10 % SVF est également observée sur la **figure 7.72**, où la coloration jaune des nanoparticules est toujours visible à la suite d'une re-suspension dans le tampon HEPES-citrate après une incubation d'une heure dans le milieu MEM + 10 % de SVF riche en protéines. Le dosage des protéines engagées dans la corona protéique autour des nanoparticules d'argent enrobées de L1 a mis en évidence qu'elle était similaire à celle autour des assemblages, $6,2 \mu\text{g}$ pour $5 \mu\text{g}$ d'argent.

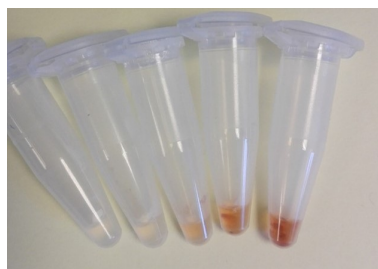


FIGURE 7.72 – Re-suspension des nanoparticules enrobées de L1 dans le tampon HEPES-citrate après incubation dans le milieu MEM + 10 % SVF pendant 1 heure. Les tubes sont présentés dans un ordre de concentration croissante en argent de gauche à droite.

Ces nanoparticules enrobées de L1 peuvent présenter un intérêt biocide au même titre que les assemblages. Cependant leur étude a été plus tardive et aucune donnée d'activité biocide ou de cytotoxicité n'a été acquise pour le moment.

7.6 Déclinaison autour du même squelette organique

Le travail présenté dans le **chapitre 7** est centré sur la molécule L1, tripode mimant la complexation des métaux par la métallothionéine. Cependant, ce tripode présente une fonction ester qui risque d'être hydrolysée dans des conditions physiologiques. Afin de conférer une meilleure stabilité aux assemblages dans le cas d'une utilisation *in vivo*, il est nécessaire d'étudier ce processus avec des molécules potentiellement plus robustes. Nos collaborateurs avaient préalablement synthétisés deux molécules possédant le même squelette organique mais dont la fonction ester avait été substituée par une fonction acide ou amide, qui devrait être plus stable *in vivo* (Pujol, 2010).

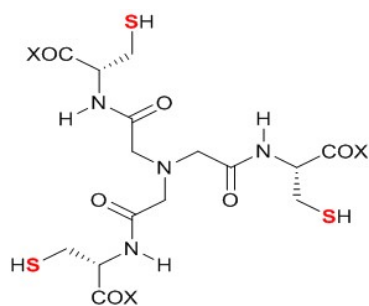


FIGURE 7.73 – Formule du ligand L2.
X = NH₂

Le ligand contenant la fonction acide n'étant pas disponible, les études ont été menées sur le ligand nommé L2 (**Figure 7.73**) pour lequel X = NH₂. Contrairement au ligand L1, le ligand L2 est soluble dans l'eau. De plus, on observe une diminution du pKa des fonctions thiolates du ligand L2 par rapport au ligand L1 car le groupement OEt est plus électro-attracteur que le groupement NH₂; de fait, les thiols sont plus acides. Les manipulations avec le ligand L2 ont été effectuées dans

les mêmes conditions équimolaires 1 : 1 (S : Ag) dans le tampon Hepes-citrate. Cependant, la réaction est si rapide que la totalité des nanoparticules sont assemblées en objets micrométriques avant même que la mesure par spectroscopie UV-Visible puisse être réalisée. Ainsi la réaction a été menée à un ratio de 0,25 : 1 (S : Ag), c'est-à-dire une concentration de 90 μmol.L⁻¹ de soufre, donc 30 μmol.L⁻¹ de ligand et 370 μmol.L⁻¹ d'argent. La réaction a été suivie par la mesure du signal SPR des nanoparticules d'argent en présence du ligand (**Figure 7.74**). Cela a permis de montrer que les assemblages sont formés beaucoup plus rapidement avec L2 qu'ils ne sont formés avec le ligand L1. En effet, sur la **figure 7.74** on observe qu'après 2 minutes de réaction à 0,25 : 1 (S : Ag), la réaction est au même niveau qu'avec le ligand L1 à 0,25 : 1 (S : Ag) après 30 minutes. A 5 minutes de réaction avec le ligand L2 la réaction est aussi avancée qu'après 1 h avec L1 et la réaction se termine avec la précipitation des assemblages de nanoparticules après 12 minutes de réaction. La réaction est trop rapide pour être bloquée par l'iodoacétamide, qui comme cela a été décrit dans le **paragraphe 7.1.3** nécessite 30 minutes de réaction pour bloquer complètement les thiols libres.

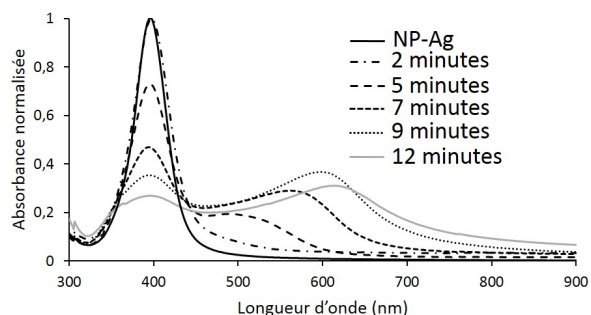


FIGURE 7.74 – Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L2 à un rapport 0,25 : 1 (S : Ag) par spectroscopie UV-Visible. Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 2 minutes d'incubation avec L2 (en tirets/pointillés), après 5 minutes (en tirets), après 7 minutes (en tirets longs), après 9 minutes (en pointillés) et après 12 minutes (en gris).

La réaction a ensuite été menée à une concentration de $37 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de soufre c'est-à-dire un rapport 0,1 : 1 (S : Ag). On observe sur la **figure 7.75** que la cinétique de réaction pour un rapport de 0,1 : 1 (S : Ag) est très similaire à la réaction à un rapport de 0,25 : 1 (S : Ag), exception faite de l'avancement de la réaction qui est retardé de 1 à 2 minutes. La réaction a également été testée à 4°C en chambre froide afin de ralentir sa cinétique. Le temps de réaction est cependant similaire dans ces conditions. Aucun résultat n'est présenté pour cette manipulation car l'étude en chambre froide était préliminaire et le spectrophotomètre n'a pas été déplacé. La réaction est suivie à l'oeil nu par l'observation du changement de couleur de la solution de nanoparticules de jaune à rouge puis transparent avec un précipité noir.

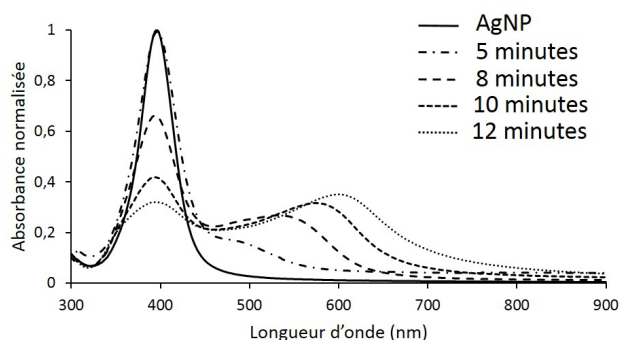


FIGURE 7.75 – Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand L2 à un rapport 0,1 : 1 (S : Ag) par spectroscopie UV-Visible. Les nanoparticules d'argent à t_0 (en noir), après 5 minutes d'incubation avec L2 (en tirets/pointillés), après 8 minutes (en tirets), après 10 minutes (en tirets longs) et après 12 minutes (en pointillés).

Dans un dernier temps, malgré la difficulté à suivre la réaction, nous avons étudié la stabilité des assemblages formés avec L2. La vitesse de réaction ne permet pas de travailler sur la taille des assemblages et de ce fait, l'iodoacétamide est ajouté au mélange réactionnel avec L2 juste avant l'ajout de nanoparticules. La réaction est ralentie puis les assemblages sont séparés du mélange réactionnel comme décrit dans le **paragraphe 10.1.2**. Ils sont ensuite stockés comme les nanoparticules d'argent, à l'obscurité à 4°C dans le tampon Hepes-citrate.

L'observation du signal SPR des assemblages médiés par L2 après une semaine de stockage met en évidence que la réaction d'assemblage a continué (**Figure 7.76**). En effet, l'intensité du pic à 400 nm continue de décroître et passe d'une absorbance de 0,6 à t_0 à 0,4 après 1 semaine de stockage. De plus, le signal à plus grandes longueurs d'onde spécifique des assemblages de plus grande taille continue d'évoluer, passant d'un maximum à 500 nm à t_0 à un maximum à 600 nm après 1 semaine à 4°C. Les assemblages ont donc continué à croître pendant le stockage après blocage avec l'iodoacétamide.

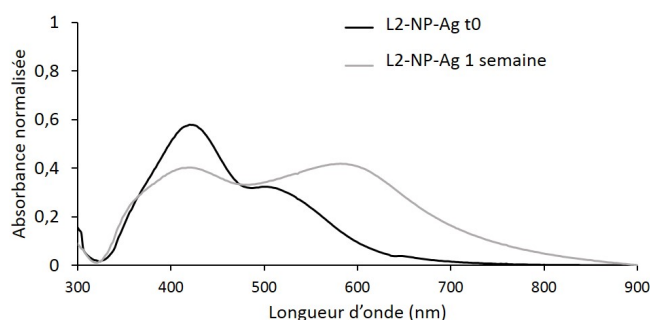


FIGURE 7.76 – Suivi du signal SPR d'un échantillon d'assemblage de nanoparticules d'argent pontées par L2 après une semaine de stockage. Les assemblages bloqués à t_0 (en noir) et après une semaine de stockage à 4°C à l'obscurité (en gris).

Pour tenter de comprendre l'origine d'une différence si importante dans la réaction entre les ligands L1 et L2 avec les nanoparticules d'argent, une série de manipulation de XPS au synchrotron ELETTRA (Trieste) a été effectuée pour mesurer une éventuelle liaison N - Ag. En effet, l'unique différence entre ces deux ligands est la substitution de l'ester de L1 par une fonction amide, modifiant ainsi légèrement le pKa des fonctions thiolates du ligand. Les données de cette manipulation sont actuellement en cours de traitement.

Du fait de la difficulté à produire des assemblages stables d'une taille définie, les manipulations avec le ligand L2 n'ont pas été poursuivies.

7.7 Conclusion

Le ligand L1 a montré un comportement spécifique en présence de nanoparticules d'argent entraînant la formation d'édifices formés de nanoparticules d'argent qui se touchent mais ne s'interpénètrent pas. Ces édifices ont été caractérisés par XPS, XANES, ToF-SIMS, mesure de taille par DLS et potentiel zêta. Ils sont formés de nanoparticules d'argent pontées les unes aux autres par un ligand organique thiolé, le ligand L1 et médiés par des liaisons Ag - S. Ces assemblages de nanoparticules conservent les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, c'est-à-dire la capacité à libérer des ions Ag(I) ainsi qu'une signature SPR spécifique selon la taille et l'arrangement spatiale des nanoparticules d'argent les unes par rapport aux autres dans l'édifice. Le ligand L1 agit ici comme un enrobage robuste, recouvrant l'intégralité des nanoparticules d'argent et limitant la formation de la corona autour de ces nano-objets.

Ces assemblages ont un intérêt biologique par le fait qu'ils présentent une activité biocide, mais également une toxicité réduite pour les cellules eucaryotes. Afin d'expliquer cette différence de toxicité, l'internalisation des assemblages au sein des cellules a été quantifiée, puis le devenir des assemblages dans les cellules a été observé par XRF. Cela a permis de conclure que la quantité d'argent internalisé par les cellules exposées à une même concentration d'argent non toxique est très proche pour les nanoparticules d'argent enrobées de citrate et les assemblages. Nous ne pouvons pas conclure quant à la dissolution des assemblages dans les hépatocytes car seulement deux cellules ont pu être analysées à haute résolution. Néanmoins, la dissolution de ceux-ci pourrait être moins importante que celle des nanoparticules isolées. De plus il a été mis en évidence que moins de cellules incorporaient des édifices composé d'argent dans le cas d'une exposition aux assemblages, ce qui peut conduire à une viabilité plus élevée.

L'étude de l'intérêt biologique des nanoparticules isolées enrobées par L1 est toujours en cours d'investigation.

L'étude des assemblages formés par le ligand hydrosoluble L2 ne conduisant pas à la formation d'assemblages stables a été arrêté, au profit de l'étude d'autres ligands thiolés, présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 8

Des PEG-polythiols pour des assemblages plus versatiles

8.1 Déclinaison du projet

La preuve de concept décrite dans le chapitre précédent repose sur une molécule, le ligand L1. Cette molécule a montré un comportement très spécifique et intéressant avec les nanoparticules, que nous souhaitons décliner sur un plus large panel de molécules afin d'obtenir une meilleure compréhension du phénomène. De plus, les nanoparticules d'argent sont déjà largement utilisées (**Paragraphe 2.1.3**), alors que la molécule L1 n'a jamais été commercialisée, bien que cette famille de molécules soit protégée par un brevet (Delangle et al., 2010) et actuellement dans des études industrielles afin de développer un médicament pour traiter les effets de surcharge en cuivre induite par la maladie de Wilson (**Paragraphe 4.3.2**). Afin de reproduire le processus avec un autre type de ligand et parfaire la compréhension de ce mécanisme d'assemblage et donc d'élargir le champ des possibles dans cette étude, nous proposons ici un criblage sur des molécules commerciales contenant des thiols et dont l'architecture est connue. Ceci afin de déterminer le potentiel d'autres ligands à produire des assemblages de nanoparticules d'argent.

8.1.1 L'utilisation des Poly Ethylène Glycol (PEGs) dans l'industrie

Les PEGs sont déjà largement utilisés comme espaceurs ou en tant qu'enrobage en nanomédecine car ils sont biocompatibles (Harris et al., 2003). Ce sont des polymères non toxiques, non immunogéniques, non antigéniques et très solubles dans l'eau. Ces molécules sont déjà validées par les instances sanitaires (Veronese et al., 2005). Elles présentent de nombreux avantages et sont également utilisées en nanomédecine pour le développement de nouveaux agents anticancéreux (Cheng et al., 2013), et dans des médicaments déjà sur le marché comme par exemple, un traitement de l'hépatite C (Bailon et al., 2001 : Pegasys©) ou de la sclérose en plaque (Plegridy©).

La chimie des PEG est largement maîtrisée (Roberts et al., 2012) et l'on trouve maintenant toutes sortes de PEGs modifiés sur le marché, entre autres des PEGs thiolés, linéaires ou branchés, qui pourraient être utilisés pour induire des mécanismes d'assemblages des nanoparticules d'argent.

8.2 PEGs utilisés pour l'étude

Pour le criblage, six polymères PEGs ont été sélectionnés. Trois polymères possédant deux fonctions thiols à l'extrémité d'une chaîne linéaire composé d'un nombre n d'itérations du motifs éthylène glycol (**Figure 8.1**) :

- 300 g.mol⁻¹ (nommée 2S300) soit $n = 4$ itérations du motif (CH₂CH₂O) entre deux thiols ;
- 2000 g.mol⁻¹ (nommée 2S2K) soit $n \approx 42$ itérations du motif (CH₂CH₂O) entre deux thiols ;
- 10000 g.mol⁻¹ (nommée 2S10K) soit $n \approx 224$ itérations du motif (CH₂CH₂O) entre deux thiols.

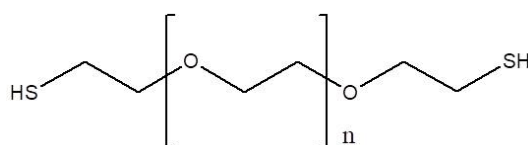


FIGURE 8.1 – Structure d'un polymère PEG contenant deux thiols.

Deux polymères contenant quatre thiols à l'extrémité d'un polymère branché ont été sélectionnés (**Figure 8.2**) :

- 2000 g.mol⁻¹ (nommée 4S2K) soit $n \approx 18$ itérations du motif (CH₂CH₂O) entre deux thiols ;
- 10000 g.mol⁻¹ (nommée 4S10K) soit $n \approx 108$ itérations du motif (CH₂CH₂O) entre deux thiols.

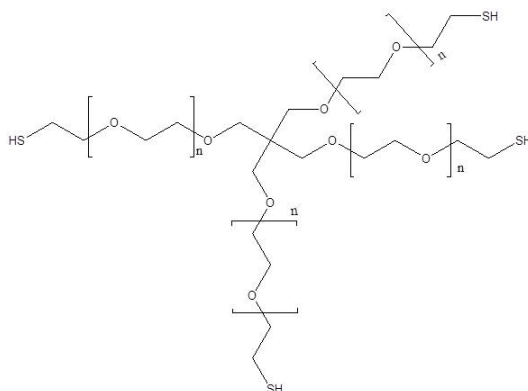


FIGURE 8.2 – Structure d'un polymère PEG contenant quatre thiols.

Un polymère branché contenant huit thiols d'une taille de 10000 g.mol⁻¹ (**Figure 8.3**, nommée 8S10K) soit $n \approx 52$ itérations du motif (CH₂CH₂O) entre deux thiols.

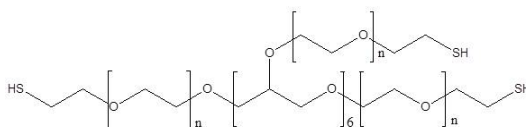


FIGURE 8.3 – Structure d'un polymère PEG contenant huit thiols.

Les manipulations ont été menées dans des conditions stœchiométriques 1 : 1 (S : Ag). Les mesures de DLS ont été menées comme décrit dans le **paragraphe 10.3.1**, les mesures de spectroscopie UV-Visible ont été menées comme décrit dans le **paragraphe 10.6.1** et les mesures de dissolution par ICP-AES ont été menées comme décrit dans le **paragraphe 10.4.2**. Dans cette étude, comme présenté ci-après, quatre comportements différents ont été mis en évidence : i) les ligands qui entraînent une dissolution simple des nanoparticules, ii) les ligands qui entraînent la formation d'un enrobage, iii) les ligands qui entraînent un phénomène d'assemblage et iv) les ligands qui entraînent des assemblages et une dissolution.

8.2.1 Les ligands qui entraînent une dissolution simple des nanoparticules d'argent

En présence du ligand 2S2K, l'intensité du signal SPR à 400 nm diminue au cours du temps : absorbance de 0,87 après 30 minutes de réaction, 0,75 après 1 heure, 0,65 après 2 heures et 0,52 après 4 heures (**Figure 8.4 A**). Cela est directement corrélé à la dissolution des nanoparticules, qui est de 15 % après 30 minutes de réaction, 22 % après 1 heure, 35 % après 2 heures et 42 % après 4 heures (**Figure 8.4 B**). La mesure de la distribution de taille des nanoparticules d'argent montre que la taille moyenne des nanoparticules est toujours similaire à une dizaine de nanomètres près, probablement du fait de la fixation des PEG de grande taille à la surface des nanoparticules d'argent (**Figure 8.4 C**).

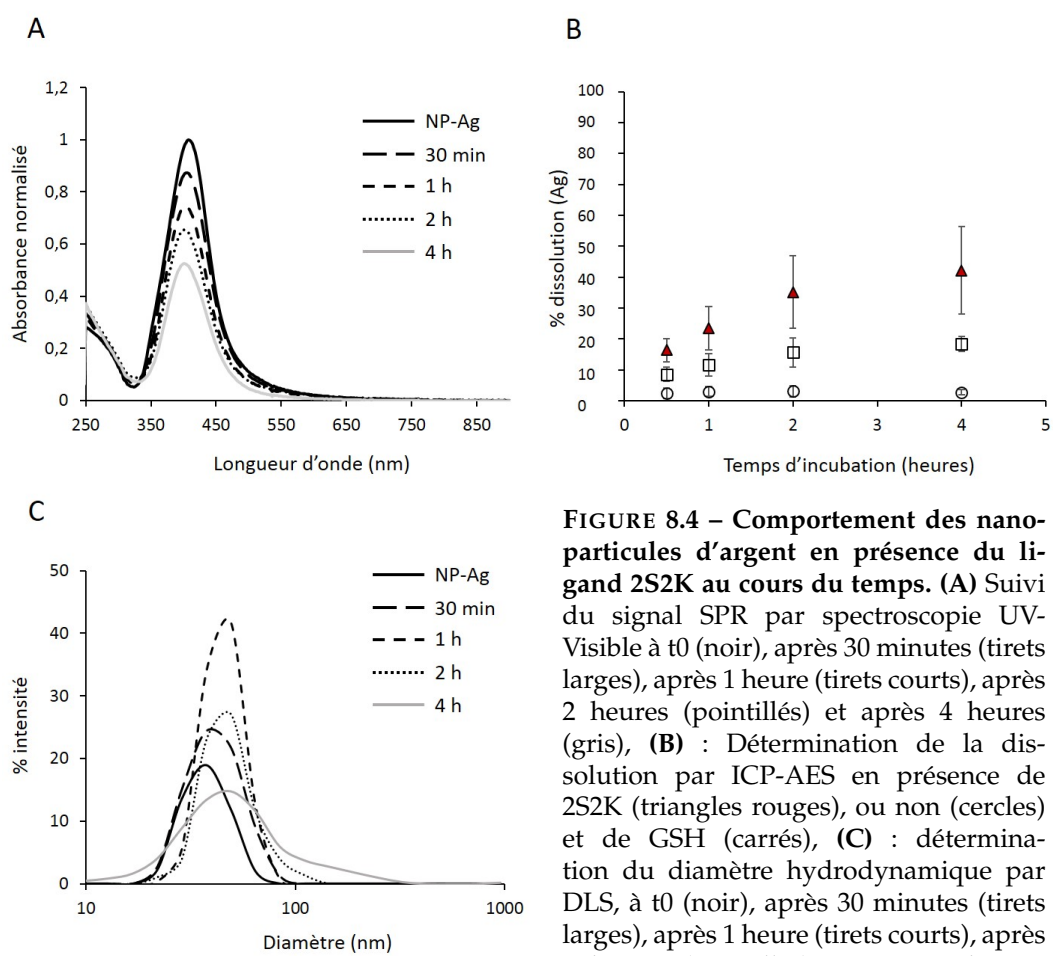


FIGURE 8.4 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S2K au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), **(B)** : Détermination de la dissolution par ICP-AES en présence de 2S2K (triangles rouges), ou non (cercles) et de GSH (carrés), **(C)** : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris).

La **figure 8.5** montre le suivi de la dissolution des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S2K et confronte les résultats à la dissolution des nanoparticules par le ligand 2S2K en présence d'iodoacétamide, un agent bloquant les thiols libres, ajouté en conditions stœchiométriques au soufre après 30 minutes d'incubation. Ainsi, on observe le fait que les échantillons dans lesquels l'iodoacétamide a été ajouté ne présentent plus d'évolution de la dissolution après 30 minutes. On voit par contre, une diminution à 4 heures. Les manipulations n'ayant pas été effectuées en triplicat, il n'est pas possible de déterminer si cette diminution à 4 heures est significative ou non.

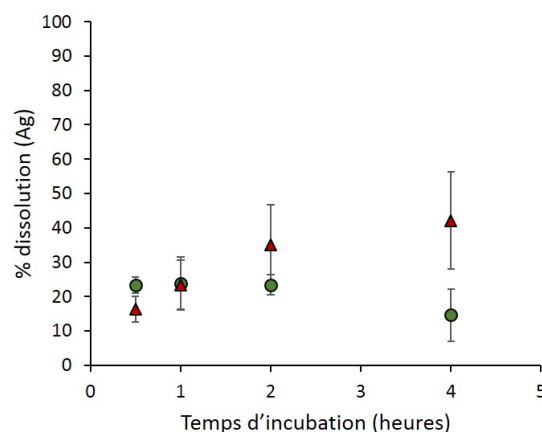


FIGURE 8.5 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S2K et de l'iodoacétamide. Détermination de la dissolution des nanoparticules d'argent par le ligand 2S2K par ICP-AES en présence (rond vert) ou en absence (triangle rouge) d'iodoacétamide.

Ainsi, le ligand 2S2K ne permet pas la formation d'assemblages mais entraîne une dissolution des nanoparticules d'argent médiée par les thiols.

8.2.2 Les ligands qui forment un enrobage autour des nanoparticules d'argent

En présence du ligand 4S2K, le pic à 400 nm du signal SPR des nanoparticules d'argent diminue au cours des 30 premières minutes pour atteindre une absorbance de 0,85 puis reste stable. Cependant, le maximum du pic est décalé de 7 nm vers de plus grandes longueurs d'onde (**Figure 8.6 A**). Le suivi de la dissolution des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S2K montre que la dissolution de ces dernières n'est pas plus importante que la dissolution des nanoparticules d'argent enrobées de citrate (**Figure 8.6 B**). La mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules reste constant au cours du temps, si ce n'est une légère augmentation de la dispersité (**Figure 8.6 C**).

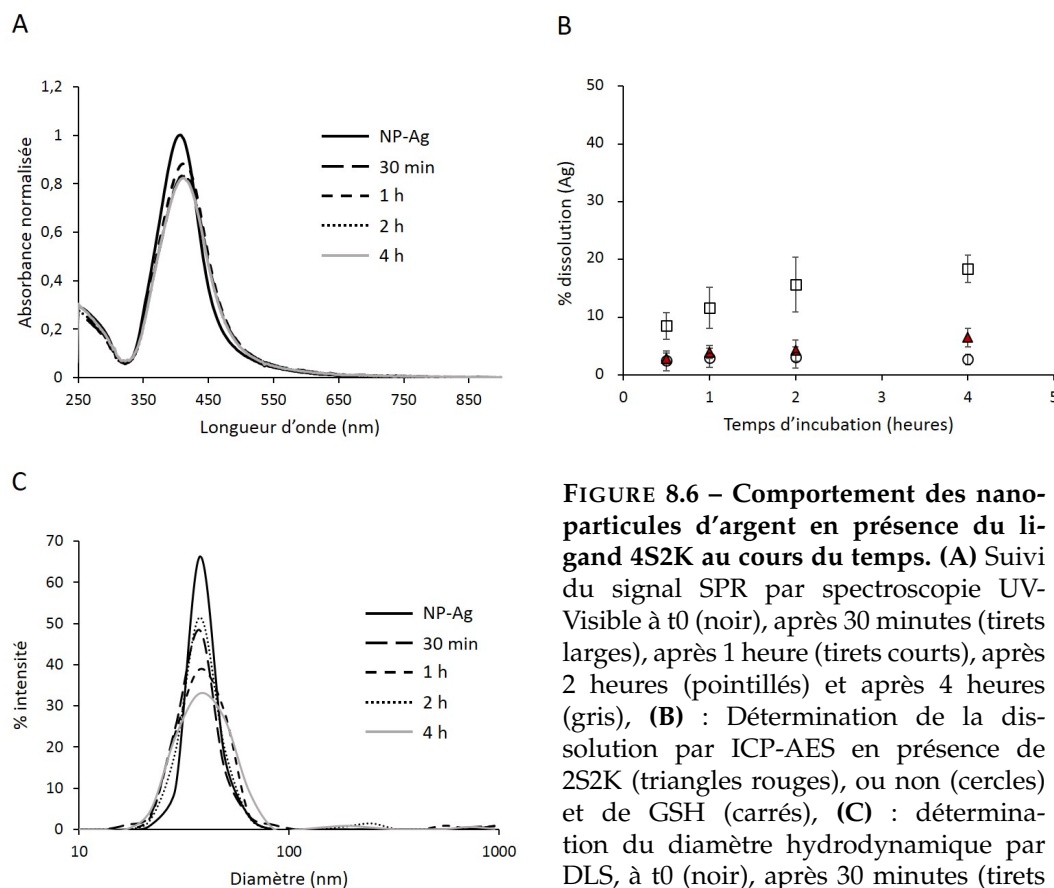


FIGURE 8.6 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S2K au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), **(B)** : Détermination de la dissolution par ICP-AES en présence de 2S2K (triangles rouges), ou non (cercles) et de GSH (carrés), **(C)** : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le ligand 4S2K a déplacé le citrate de la surface des nanoparticules et stabilise les nanoparticules sans les dissoudre en ions.

8.2.3 Les ligands qui forment des assemblages entre les nanoparticules

Trois ligands entraînent une réaction similaire avec les nanoparticules d'argent : les ligands 2S300, 2S10K et 8S10K.

Le ligand 2S300

A une concentration stoechiométrique 1 : 1 (S : Ag), la réaction entre le ligand et les nanoparticules est extrêmement rapide, le signal SPR à 400 nm a complètement disparu après 30 minutes d'incubation (**Figure 8.7 A**). De plus, la dissolution des nanoparticules au cours du temps en présence du ligand 2S300 n'est pas supérieure à la dissolution des nanoparticules seules (**Figure 8.7 B**). Cependant, la mesure de la distribution de taille du diamètre hydrodynamique de l'échantillon de nanoparticules en présence du ligand 2S300 au cours du temps montre bien une augmentation

importante de la taille des nano-objets en suspension, et ce dès les 30 premières minutes (≈ 300 nm) (**Figure 8.7 C**).

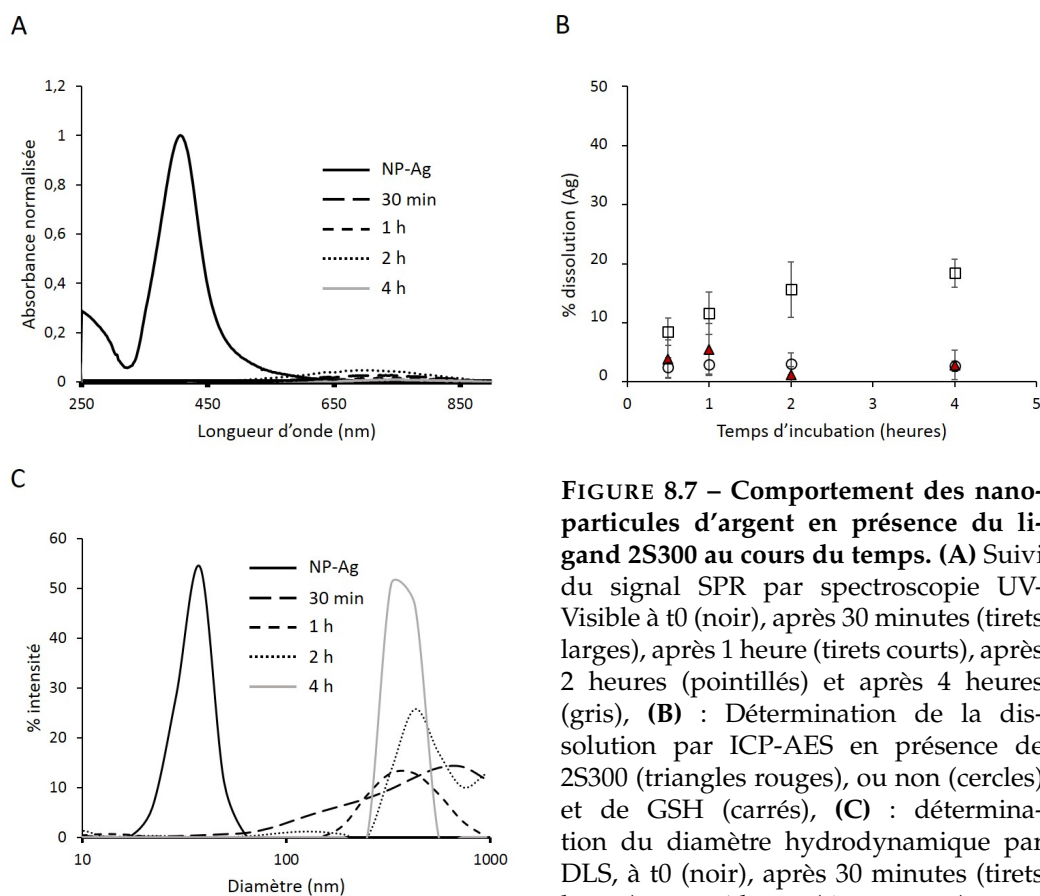


FIGURE 8.7 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S300 au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), **(B)** : Détermination de la dissolution par ICP-AES en présence de 2S300 (triangles rouges), ou non (cercles) et de GSH (carrés), **(C)** : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris).

La réaction est trop rapide pour être étudiée finement. Les expériences ont donc été réalisées à une concentration en soufre plus faible c'est à dire un ratio 0,1 : 1 (S : Ag). On observe dans ce cas que la diminution du pic à 400 nm du signal SPR des nanoparticules en présence du ligand 2S300 diminue progressivement et est corrélé à l'apparition d'un second pic dont le maximum se déplace vers de plus grandes longueurs d'onde (**Figure 8.8 A**). Cette apparition d'un second pic est associée à une augmentation du diamètre hydrodynamique de l'échantillon au cours du temps (**Figure 8.8 B**). Cette réaction rapide dénote d'un comportement très similaire à celui du ligand L2 (**Paragraphe 7.6**).

Des manipulations préliminaires avec l'iodoacétamide dans ces conditions ont été effectuées. Il semblerait que l'ajout d'iodoacétamide après 30 secondes de réaction bloquerait le processus d'assemblages, mais cela mérite une investigation approfondie.

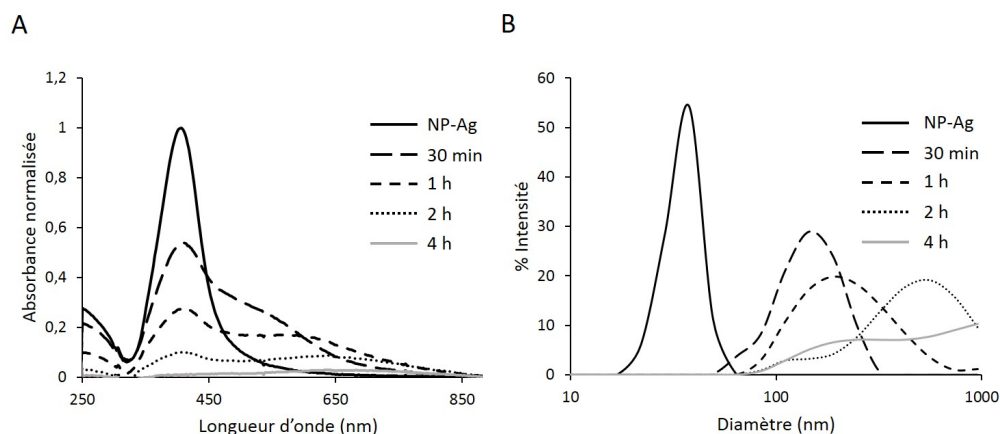


FIGURE 8.8 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S300 0,1 : 1 (S : Ag) au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), **(B)** : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris).

2S10K

En présence du ligand 2S10K, le signal SPR à 400 nm des nanoparticules diminue rapidement pour atteindre une absorbance de 0,79 après 30 minutes de réaction puis lentement au cours du temps, jusqu'à 0,73 après 4 heures. De plus, on observe bien qu'entre les nanoparticules d'argent enrobées de citrate et les nanoparticules d'argent qui ont réagi avec le ligand 2S10K, le maximum du pic se déplace de 3 nm vers les plus grandes longueurs d'onde, ce qui atteste du déplacement du citrate par le PEG (**Figure 8.9 A**). Dans un second temps, l'observation du spectre SPR de ces échantillons met en évidence que, dès les 30 premières minutes d'incubation, le spectre s'élargit. Le ligand 2S10K n'entraîne pas davantage la dissolution des nanoparticules que les nanoparticules enrobées de citrate seules (**Figure 8.9 B**). De plus, après l'ajout du ligand, le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'argent dans l'échantillon double voire triple, c'est-à-dire qu'il se trouve entre 60 et 90 nm de diamètre (**Figure 8.9 C**).

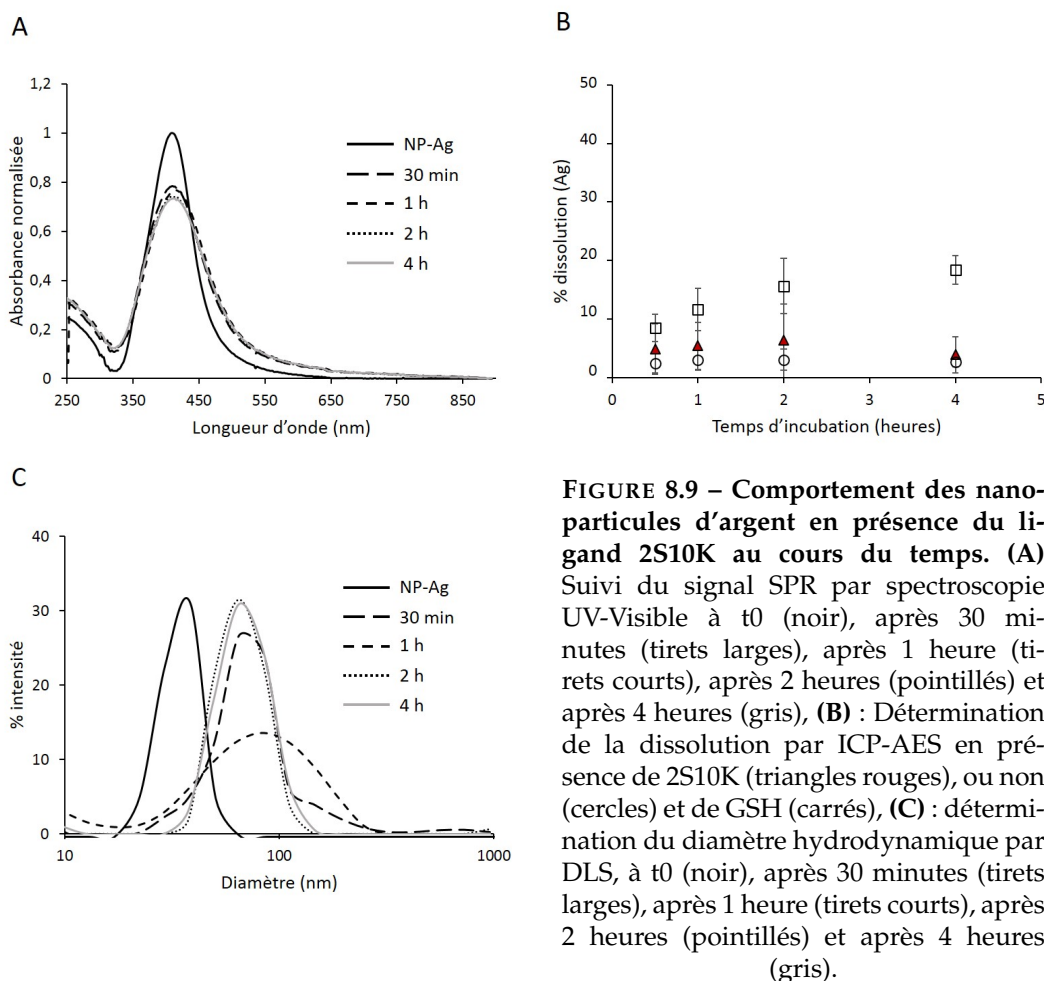


FIGURE 8.9 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 2S10K au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), **(B)** : Détermination de la dissolution par ICP-AES en présence de 2S10K (triangles rouges), ou non (cercles) et de GSH (carrés), **(C)** : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris).

Cette augmentation de taille ne peut pas être uniquement due à la formation d'un enrobage autour des nanoparticules. Ces informations permettent de conclure que l'élargissement du pic du signal SPR est dû au rapprochement des nanoparticules, augmentant donc la taille des objets de l'échantillon. Cependant, la taille ne semble pas évoluer davantage comme cela a pu être observé avec le ligand précédent (2S300) ou avec les ligands L1 et L2.

8S10K

En présence du ligand 8S10K l'intensité du signal SPR à 400 nm diminue progressivement : absorbance de 0,85 après 30 minutes de réaction, 0,76 après 1 heure, 0,74 après 2 heures et 0,6 après 4 heures. De plus, le pic s'élargit après l'ajout du ligand et le maximum du pic se déplace de 7 nm vers les grandes longueurs d'onde, ce qui est un indicateur du déplacement du citrate par le PEG à la surface de la nanoparticule d'argent (**Figure 8.10 A**). Il est à noter que le dosage de la dissolution des nanoparticules d'argent par le ligand 8S10K a mis en évidence le fait que la dissolution n'était pas supérieure à celle des nanoparticules seules (**Figure 8.10 B**). Ainsi, la diminution du signal SPR n'est pas due à la dissolution des nanoparticules. Dans un dernier

temps, la mesure DLS de l'échantillon au cours du temps montre que le diamètre des nano-objets dans l'échantillon double, voire triple après l'ajout du ligand 8S10K (**Figure 8.10 C**).

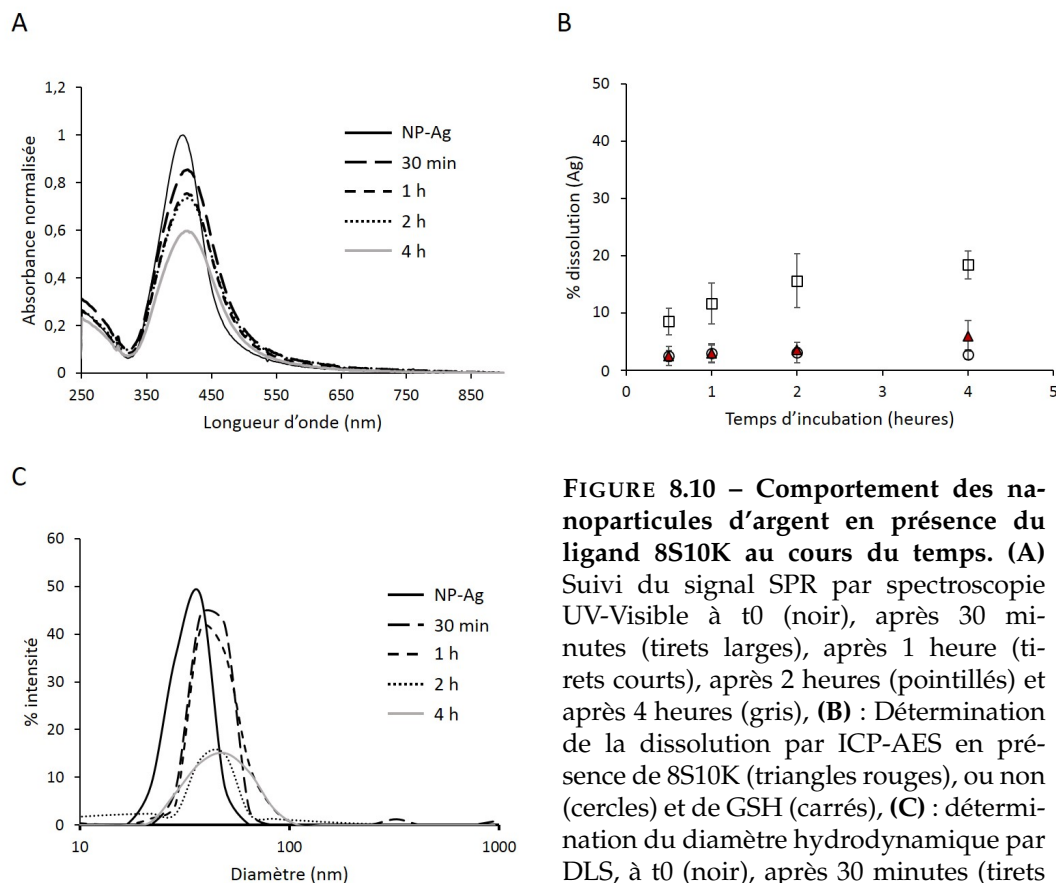


FIGURE 8.10 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 8S10K au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), **(B)** : Détermination de la dissolution par ICP-AES en présence de 8S10K (triangles rouges), ou non (cercles) et de GSH (carrés), **(C)** : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris).

L'unique façon de suivre la réaction est le suivi de la diminution de l'intensité du signal SPR à 400 nm car la distribution de taille mesurée en DLS augmente après 30 minutes d'incubation puis ne semble plus évoluer et le ligand 8S10K n'entraîne pas de dissolution (**Figure 8.11**). Le suivi du signal après l'ajout de l'iodoacétamide après 30 minutes d'incubation avec les nanoparticules permet de voir qu'il n'y a pas de diminution de l'intensité après trente minutes d'incubation (absorbance de 0,8 après 30 minutes de réaction et 0,8 après 4 heures de réaction), contrairement à la réaction sans blocage de thiols (0,85 après 30 minutes de réaction et 0,6 après 4 heures de réaction).

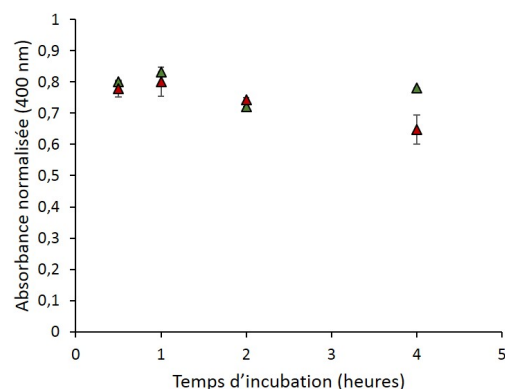


FIGURE 8.11 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 8S10K et de l'iodoacétamide. Suivi de la diminution de l'intensité du signal SPR à 400 nm des nanoparticules d'argent en présence du ligand 8S10K par spectroscopie UV-Visible (triangle rouge) en présence ou en absence (triangle vert) d'iodoacétamide.

Ainsi, nous observons que le blocage des thiols libres bloque l'évolution de la réaction entre le ligand 8S10K et les nanoparticules d'argent. C'est à dire que la liaison entre le PEG et les nanoparticules d'argent est bloquée, stoppant donc la formation de nouveaux édifices.

Conclusion

Parmi les trois ligands formant de potentiels édifices formés de plusieurs nanoparticules, seul le ligand 2S300 montre un profil SPR proche de celui observé précédemment avec L1 et L2. Les ligands 2S10K et 8S10K montre un profil similaire, à la différence que l'intensité à 400 nm du signal SPR des nanoparticules en présence du ligand 8S10K continue à diminuer au cours du temps. De plus, la largeur à mi-hauteur du pic à 400 nm est plus large en présence de 2S10K (106 nm) qu'en présence du ligand 8S10K (101 nm) (la largeur du pic à mi-hauteur des nanoparticules d'argent enrobées de citrate est de 76 nm). Cet élargissement du pic peut être dû au rapprochement des nanoparticules d'argent se touchant, mais séparé par une fine couche conductrice. Cependant certains ligands utilisés ont une taille relativement grande, à l'exception du ligand 2S300, ce qui peut expliquer que l'apparition d'un second pic n'ait pas lieu pour les ligands 2S10K et 8S10K malgré la diminution de l'intensité du pic à 400 nm fréquemment associé à l'apparition du second pic à de plus grandes longueurs d'onde. En effet, ce second pic n'apparaît que lorsque la distance séparant les deux nanoparticules est inférieure à 5 nm. Au delà de cette taille, seuls les effets électromagnétiques de la nanoparticule sont pris en compte (Amen-dola et al., 2010).

Ainsi nous pouvons dire que les ligand 2S300 et 8S10K entraîne une formation continue d'édifice engageant plusieurs nanoparticules, contrôlable par l'ajout d'un agent bloquant les thiols libres. Cependant le ligand 2S10K, ne semble pas entraîner une formation continue, mais davantage une stabilisation des nanoparticules sous forme de cluster de nanoparticules.

8.2.4 Les ligands qui entraînent la formation d'assemblages et une dissolution

En présence du ligand 4S10K l'intensité du signal SPR à 400 nm diminue progressivement : absorbance de 0,74 après 30 minutes de réaction, 0,72 après 1 heure, 0,69 après 2 heures et 0,60 après 4 heures. Le pic n'est pas plus large après l'ajout du ligand mais on observe l'apparition d'un épaulement proche de 650 nm 30 minutes après l'ajout du ligand et qui persiste jusqu'à 4 heures d'incubation (**Figure 8.12 A**). Le suivi de la dissolution des nanoparticules en présence du ligand par ICP-AES a mis en évidence le fait que le ligand entraîne une dissolution supérieure à celle induite par le glutathion : 18 % après 30 minutes et 50 % après 4 heures de réaction (**figure 8.12 B**). Trente minutes après l'ajout du ligand 4S10K, le diamètre hydrodynamique moyen double voire triple puis reste constant au cours du temps, malgré une augmentation de la polydispersité (**figure 8.12 C**).

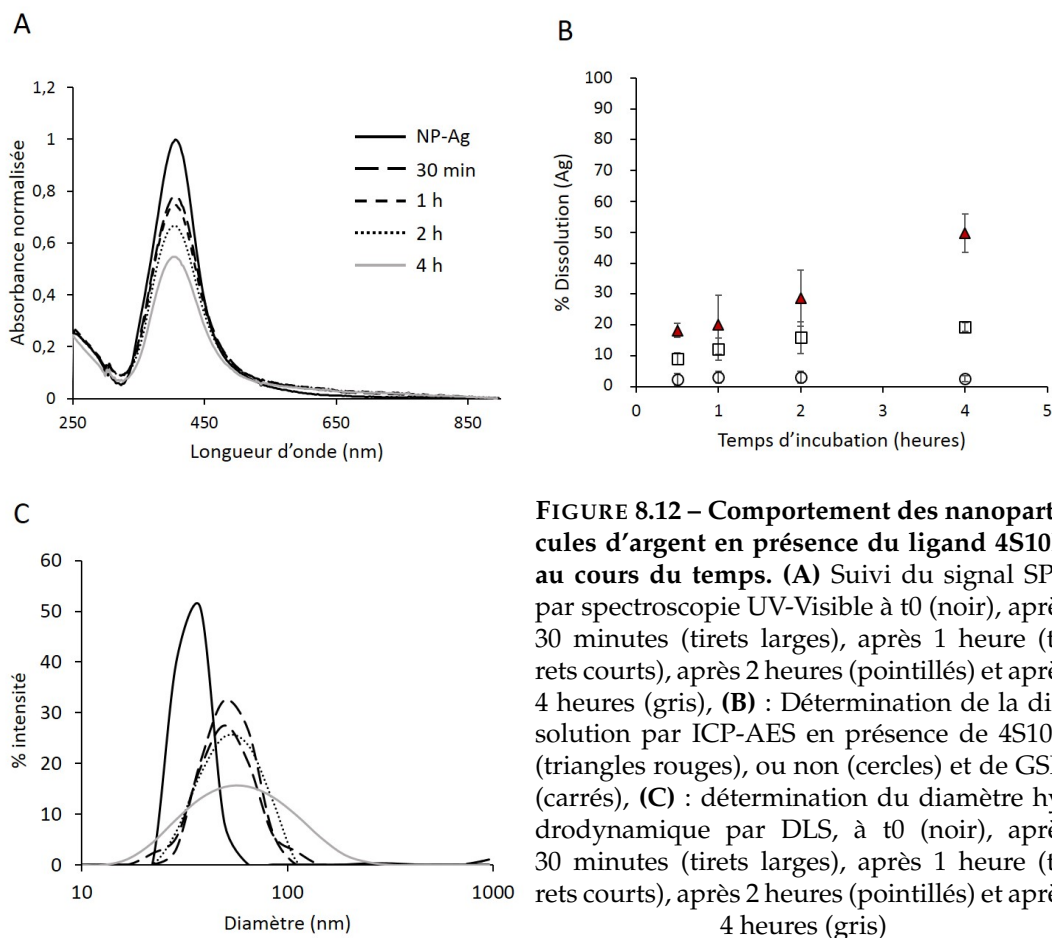


FIGURE 8.12 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S10K au cours du temps. (A) Suivi du signal SPR par spectroscopie UV-Visible à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris), (B) : Détermination de la dissolution par ICP-AES en présence de 4S10K (triangles rouges), ou non (cercles) et de GSH (carrés), (C) : détermination du diamètre hydrodynamique par DLS, à t_0 (noir), après 30 minutes (tirets larges), après 1 heure (tirets courts), après 2 heures (pointillés) et après 4 heures (gris)

De plus, l'observation en MET d'un échantillon de nanoparticules d'argent après 1 heure d'incubation avec le ligand 4S10K a montré des édifices composés de plusieurs nanoparticules d'argent de 20 nm (**Figure 8.13 A**) entourées de nanoparticules d'argent de petites tailles (**Figure 8.13 B**) qui peuvent illustrer à la fois un assemblage de nanoparticules d'argent et une dissolution des nanoparticules d'argent périphériques. Sur ces observations, on voit bien qu'il y a un espace conséquent entre les nanoparticules d'argent, probablement du aux chaînes de PEG. Il serait intéressant de vérifier par MET couplé à de l'EDX que cet est effectivement composé de molécules contenant des thiols. Cet espace entre les nanoparticules peut permettre d'expliquer l'absence du second pic SPR observé proche de 550 nm.

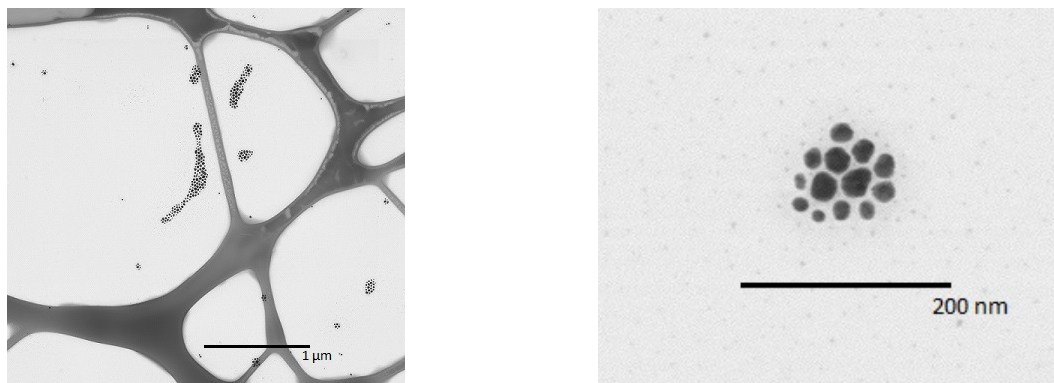


FIGURE 8.13 – Image de MET des nanoparticules d'argent après 1 heure d'incubation avec le ligand 4S10K. (A) : en champ large, (B) : en zoom sur un édifice de plusieurs nanoparticules

L'ajout d'iodoacétamide 30 minutes après le début de l'incubation met en évidence i) que la diminution de l'intensité du signal SPR à 400 nm est stoppée à 30 minutes (absorbance de 0,90 après 30 minutes de réaction et 0,85 après 4 heures de réaction) et que la dissolution des nanoparticules d'argent est également stoppée (5 % après 30 minutes de réaction et 7 % après 4 heures de réaction en présence d'iodoacétamide) (Figure 8.14).

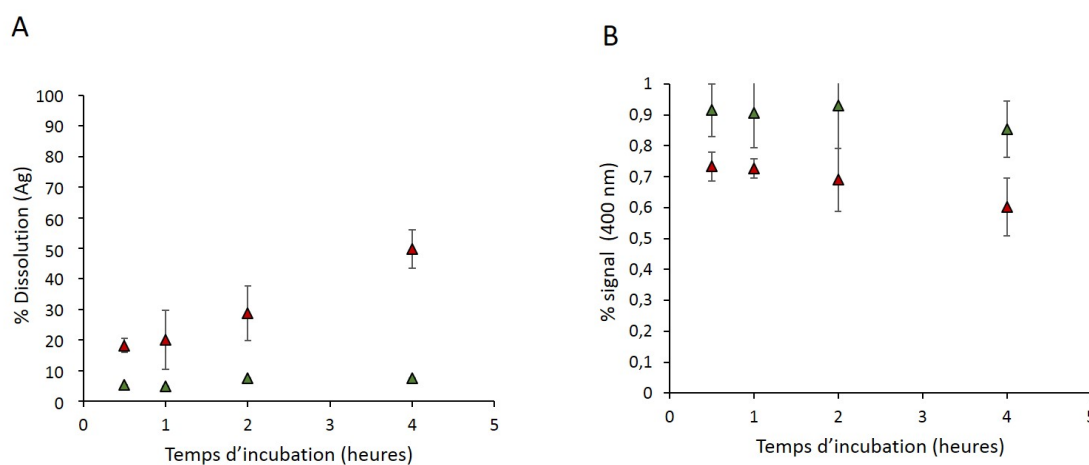


FIGURE 8.14 – Comportement des nanoparticules d'argent en présence du ligand 4S10K. Suivi de la réaction entre les nanoparticules d'argent et le ligand 4S10K en présence (triangles verts) ou en absence (triangles rouges) d'iodoacétamide, ajouté après 30 minutes d'incubation. (A) : Détermination de la dissolution des nanoparticules d'argent au cours de ces réactions par ICP-AES et (B) Evolution de l'intensité du signal SPR à 400 nm mesuré par spectroscopie UV-Visible.

Le ligand 4S10K semble donc induire un processus d'assemblage et de dissolution des nanoparticules qui peut être stoppé par le blocage des thiols libres.

8.3 Conclusion

Le comportement des différents ligands est résumé dans le **Tableau 8.1**.

Tableau 8.1

Processus	ligand
Enrobage	4S2K
.....
Dissolution	2S2K
.....
	2S300
Assemblage	2S10K
	8S10K
.....
Dissolution et assemblage	4S10K

Les ligands utilisés entraînent donc des comportements différents qui nécessitent d'être plus longuement investigués afin, par exemple, de mieux caractériser la liaison Ag-S pour les différents ligands en présence de nanoparticules d'argent. En effet, la compréhension de ces différents phénomènes : dissolution et assemblage passe nécessairement par une étude de cette liaison au niveau de la surface des nanoparticules. Cependant, dans presque tout les cas, l'implication des thiolates dans ces processus a d'ores et déjà été mise en évidence.

Contrairement à ce que nous pensions observé, il a bien été mis en évidence par cette étude préliminaire que le nombre de thiols et la longueur des chaînes ne permettait pas de prédire un type de comportement précis. Il est donc nécessaire, de prévoir des expériences XPS, comme présentées dans le **chapitre 7.3.2** dans le but de déterminer le type de coordination impliqué dans la liaison entre les soufres et les argents de surface des nanoparticules d'argent pour ces différents ligands. Ce type de criblage, composé de molécules symétriques et déjà bien connues, serait un excellent modèle pour décrire très précisément ce qui permet aux ligands d'enrober, de solubiliser ou de lier les nanoparticules d'argent entre-elles.

De plus, les édifices formés par ces ligands, une fois purifiés, seront testés sur les bactéries *E. coli* puis sur des hépatocytes, afin de déterminer dans un premier temps s'ils peuvent être intéressants en temps que biocide, au même titre que les assemblages formés par L1 et dans un second temps s'ils sont moins toxiques.

Chapitre 9

Conclusion

Les travaux de ce manuscrit se découpent en trois grands chapitres :

Les études de dissolutions décrites dans le **chapitre 6** ont permis de souligner trois grands points : i) la dissolution des nanoparticules d'argent par des biomolécules thiolées nécessite la présence d'oxygène, ii) la cinétique de dissolution des nanoparticules d'argent par des celles-ci est directement corrélée à la pré-organisation des molécules (les protéines ou les molécules capables de chélater les ions métalliques entraînent une dissolution plus rapide), iii) le nombre de thiols par molécule est directement corrélé à la cinétique de dissolution des nanoparticules qui augmente avec le nombre de thiols. Ces études *in vitro* peuvent servir de base à une réflexion sur la dissolution des nanoparticules d'argent *in vivo*. En effet, la dissolution des nanoparticules d'argent à l'intérieur des cellules a déjà été étudiée par TEM et nano-XRF. Dans ces études menées dans notre équipe, l'internalisation des nanoparticules dans les endosomes et les lysosomes d'hépatocyte et leurs dissolutions progressives ont été mises en évidence, comme cela a également été décrit dans le **paragraphe 7.4.5** (Veronesi et al., 2016b). Plusieurs études de l'équipe ont également montré que les ions Ag(I) relargués dans le cytoplasme des cellules exposés à des nanoparticules d'argent sont complexés à des molécules thiolées (Veronesi et al., 2015). Cependant, pour pouvoir décrire précisément la dissolution des nanoparticules d'argent dans la cellule, il est au préalable nécessaire de prouver que ces biomolécules thiolées se trouvent dans les vésicules endosomales, et ne complexent pas tout simplement les ions Ag(I) excrétés des vésicules suite à une dissolution médiée par l'acidité de la vésicule.

Dans le **chapitre 7**, les travaux se sont concentrés sur le développement d'une preuve de concept basée sur l'observation d'un comportement original entraîné par l'interaction entre des nanoparticules d'argent et un mime chimique d'un site de fixation métallique d'une métallothionéine. Au cours de ces travaux, la réaction entre le ligand et les nanoparticules a été contrôlée et les interactions ligand - nanoparticule d'argent ont été décrites à l'aide de différentes méthodes. Ainsi il a été montré que les assemblages de nanoparticules d'argent sont médiés par une liaison Ag - S et sont entièrement recouverts d'une couche organique. Le comportement des molécules thiolées envers les nanoparticules d'argent est pluriel, comme nous l'avons décrit dans le cadre de la revue (Marchioni et al., 2018b). Des études XPS menées par notre collaboratrice Chiara Battocchio a souligné le fait que deux ligands, le 3-Mercapto-1-Propansulfonate et le 1-Thiogluucose, qui se fixent et stabilisent les nanoparticules d'argent, le font via une liaison Ag - S de type sp (BE = 161,4 eV) c'est à dire « hollow », majoritairement covalente. Ces ligands ne semblent pas former de liaison de type sp³, majoritairement ionique. Dans cette étude, les composés formés de nanoparticules d'argent et d'un enrobage organique lié par des liaisons Ag - S montrent une activité biocide sur plusieurs souches bactériennes. Cependant dans

ces travaux, l'activité biocide des nanoparticules d'argent modifiées n'est pas comparée à celle des nanoparticules seules (Carlini et al., 2016). Une autre étude menée sur des nanoparticules d'argent fonctionnalisées par une molécule thiolée, l'acide 11-mercaptopundecanoïque, met en évidence que l'activité biocide de ces dernières est nulle. Dans ce travail, la spéciation du soufre n'a pas été analysée (Liu et al., 2010a). Dans le cadre de notre étude, les assemblages de nanoparticules sont 7 à 20 fois moins biocides que les nanoparticules d'argent enrobées de citrate de 20 nm, mais ils possèdent une réelle activité biocide.

Ces assemblages se sont également révélés moins cytotoxiques sur les cellules eucaryotes HepG2 que les nanoparticules d'argent qui les composent, malgré le fait qu'ils étaient autant absorbés par ces dernières que les nanoparticules d'argent, et qu'ils semblent également se dissoudre *in vivo*. Cependant, à concentration égale en argent, le nombre d'édifice nanoparticulaire diminue, ce qui peut expliquer en grande partie cette diminution de toxicité, tout comme pour les nanoparticules d'argent de grande taille (Gliga et al., 2014). En effet, moins de cellules endocytent des assemblages, et donc moins de cellules sont exposées à l'argent, comme avec les nanoparticules de grande taille. Mais contrairement aux nanoparticules de grande taille, les assemblages de nanoparticules sont stabilisés par un squelette organique qui peut être modifié, ce qui permettrait une meilleure fixation aux dispositifs médicaux par exemple, et donc limiterait le relargage de nanoparticules d'argent dans les fluides biologiques, et donc l'exposition de l'organisme aux nanoparticules d'argent et à leurs sous-produits. Un article sur ces travaux est actuellement en cours de rédaction.

Dans un dernier temps, une étude prospective a été réalisée dans le but de mieux comprendre pourquoi certaines molécules thiolées entraînent la dissolution des nanoparticules, et d'autres, un phénomène d'assemblage. Le criblage, décrit **chapitre 8** a été réalisé sur un panel de 6 PEG thiolés. Cela a permis de souligner que le comportement des nanoparticules d'argent en présence d'un ligand n'était pas déterminable par le nombre de thiols présents sur la molécule, ou par la distance entre les thiols. Ce travail a été publié dans le journal *Environmental Science : Nano* en juin 2018 (Marchioni et al., 2018a). Néanmoins, l'apparition d'un second pic dans le signal SPR dans le cas des assemblages de nanoparticules d'argent dépend de la taille du ligand reliant les nanoparticules (Cha et al., 2016). En dehors de ça, des comportements variés ont été mis en évidence, comme la formation d'édifices composés de nanoparticules d'argent organisées (**Paragraphe 8.3, Figure 8.13**), l'enrobage des nanoparticules d'argent par le ligand (**Paragraphe 8.2.2**), ou la dissolution des nanoparticules d'argent par les ligands (**Paragraphe 8.2.1**). Ces études étant préliminaires, aucune conclusion précise ne peut être faite, et ces travaux doivent être approfondis.

Cependant, ce large éventail de comportement permet d'améliorer notre compréhension sur les phénomènes de dissolution et d'assemblage des nanoparticules d'argent par des molécules thiolées. A terme ces travaux et notamment l'étude de la coordination de la liaison Ag - S par XPS, pourraient permettre d'expliquer pourquoi un certain type de molécule thiolée entraîne la dissolution d'une nanoparticule d'argent, alors qu'une autre entraîne sa stabilisation. En effet, dans le **paragraphe 7.3.2** il a été mis en évidence dans les assemblages que la liaison Ag - S se présentait avec une composante sp (hollow) principalement covalente, et une composante sp³ (on-top) principalement ionique. Ces deux types de liaison ne présentent pas la même stabilité. Il serait intéressant d'investiguer les liaisons Ag - S d'une phytochélatine, par exemple PC6, qui entraîne une cinétique de dissolution extrêmement rapide, ainsi que celle des différents PEG thiolés. Il est possible de comparer le ligand 2S2K qui possède 2 thiols libres et qui entraîne une dissolution des nanoparticules d'argent (**Paragraphe 8.2.2**), aux phytochélatines 2 qui possèdent 2 thiols libres également et qui entraînent une dissolution des nanoparticules d'argent plus ou moins similaire (**Chapitre 6**). Il serait intéressant de pouvoir comparer le comportement entraîné par le ligand 4S10K c'est à dire une dissolution accompagnée de la formation d'assemblages, à celui entraîné par les phytochélatines 3 et 6 qui entraînent une dissolution simple plus élevée des nanoparticules d'argent. Cela pourrait permettre de souligner l'impact de la coordination de la liaison Ag - S dans le comportement des ligands thiolés sur les nanoparticules d'argent.

En conclusion, durant ces travaux, la compréhension de l'interaction complexe entre les molécules thiolées et les nanoparticules d'argent a été amendée, et une preuve de concept de nouveaux biocides à base d'assemblages de nanoparticules d'argent et médiées par les liaison Ag - S a été développée.

Chapitre 10

Matériels et méthodes

10.1 Production des nanoparticules d'argent et des assemblages de nanoparticules d'argent

10.1.1 Production des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent sont produites au laboratoire par réduction d'AgNO₃ par l'acide tannique (Sigma) en présence de citrate (Bastús et al., 2014). Ainsi 100 mL d'une solution aqueuse contenant 2 mmol.L⁻¹ de citrate de sodium et 50 nmol.L⁻¹ d'acide tannique sont portées à ébullition sous agitation à 800 rpm dans un réacteur de synthèse Electrothermal OS6250. La solution est ensuite ramenée à 90°C. Une succession d'ajout (5 fois 200 µL) d'une solution d'AgNO₃ à 25 mmol.L⁻¹ est effectuée toutes les cinq minutes. La solution transparente prend progressivement une teinte jaune translucide (Bastús et al., 2014).

La purification des nanoparticules d'argent est réalisée par trois centrifugations successives de 1 heure à 9 000 g. Après chaque centrifugation, le culot est repris dans une solution aqueuse de citrate de sodium à 2 mmol.L⁻¹. Une suspension de nanoparticules d'argent monodispersées de 20 nm de diamètre est ainsi obtenue (Figure 10.1) et caractérisée par DLS, UV-Visible et MET.

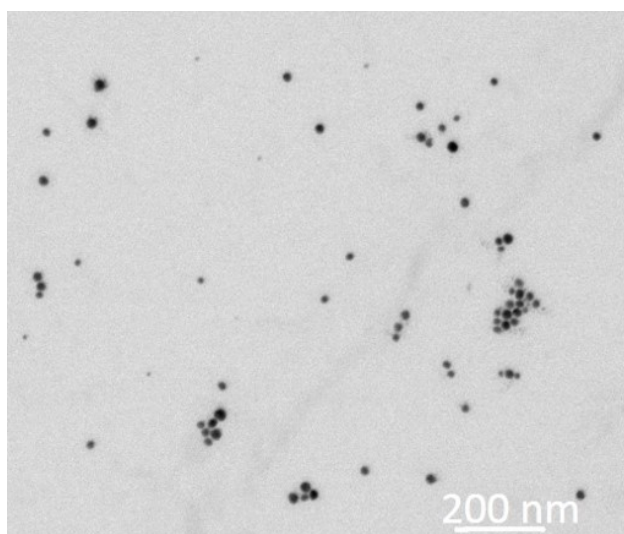


FIGURE 10.1 – Image de MET de nanoparticules d'argent enrobées de citrate de 20 nm de diamètre synthétisées au laboratoire

10.1.2 Production des assemblages de nanoparticules d'argent

Quatre-vingt-dix µmol.L⁻¹ de thiol sous forme le L1 et 370 µmol.L⁻¹ d'argent sous forme de nanoparticules de 20 nm de diamètre sont mis sous agitation à 22°C dans un tampon Hepes-citrate à pH 7,4. L'iodoacétamide en léger excès (100 µmol.L⁻¹) est ajouté après 1h30 de réaction. Le mélange réactionnel est gardé sous agitation pendant deux heures avant la séparation des assemblages de nanoparticules des autres composés restant en solution en fin de réaction : argent soluble, iodoacétamide en

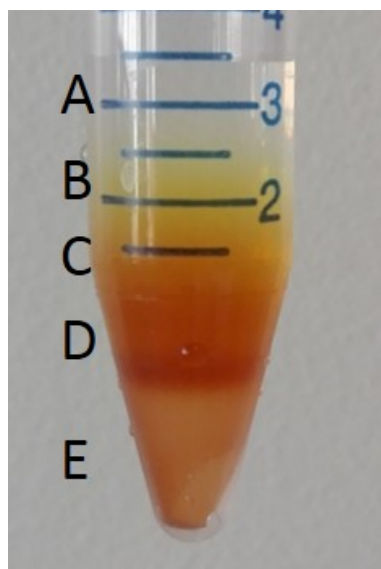


FIGURE 10.2 – Photo de la séparation des assemblages de nanoparticule d'argent après centrifugation. (A) : iodoacétamide, L1, Ag(I); (B) : nanoparticules d'argent enrobées de L1; (C) : assemblage de nanoparticules de 40 nm; (D) : assemblage de nanoparticules de 60 nm et (E) : assemblage de nanoparticule de 200 nm

excès et ligand L1 non fixé à une nanoparticule.

Les mesures DLS et AF4 ont montré que les populations de taille des assemblages de nanoparticules d'argent étaient très hétérogènes (**Figure 7.19**). Ainsi, pour obtenir des populations d'assemblages de tailles relativement homogènes, une séparation est effectuée sur un gradient de sucrose discontinu ($50 \mu\text{L}$ à $2,3 \text{ mol.L}^{-1}$, $50 \mu\text{L}$ à $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$, $100 \mu\text{L}$ à $1,15 \text{ mol.L}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$ à $0,9 \text{ mol.L}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$ à $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tube falcon de 15 mL. Le mélange hétérogène d'assemblages ($500 \mu\text{L}$) est déposé au-dessus du gradient de sucrose qui est ensuite centrifugé à $4\,400 \text{ g}$ pendant 20 minutes.

Après centrifugation, il est possible de discriminer visuellement les assemblages de différentes tailles grâce à leur couleur : les plus rouges étant les plus grands et les plus avancés dans le gradient. Ainsi, on peut récupérer délicatement dans les fractions séparé sur le gradient (**Figure 10.2**) les nanoparticules d'argent qui ne sont pas engagées dans des assemblages, puis successivement des populations d'assemblages de différents diamètres moyens, d'abord autour de 40 nm, puis de 60 nm, et enfin de 200 nm. Chaque population d'assemblages isolée est ensuite rincée par trois lavages successifs dans le tampon Hepes-citrate afin d'éliminer le sucrose.

10.2 Production de protéine

10.2.1 Production de la protéine ATX1

ATX1 a été produite selon un protocole mis au point précédemment au laboratoire (Veronesi et al., 2015; Miras et al., 2008). Les bactéries *E. Coli* M15 transformées avec le plasmide pQE16ATX1 sont inoculés dans 10 mL de milieu LB contenant 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ampicilline et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycin, utilisé pour sélectionner les bactéries transformées. Après une nuit de culture, un millilitre de la solution bactérienne est utilisée pour inoculer 500 mL de milieu Terrific Broth. Une fois une D.O. de 5 atteinte, 500 mL de milieu Terrific Broth sont ajoutés, et la température de la culture bactérienne est ramenée à 15°C. L'induction de l'expression d'ATX1 est effectuée par l'ajout de 2 mM d'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). La culture est ensuite replacée à 37°C jusqu'à ce que la D.O. 600 atteigne 3. Les bactéries sont ensuite collectées.

Le culot bactérien est resuspendu dans un tampon (100 mmol.L^{-1} NaH_2PO_4 , 1 mmol.L^{-1} de fluorure de phénylméthylsulfonyl, 1 mmol.L^{-1} EDTA et un cachet d'anti protéase EDTA - free (Roche©) pour 50 mL) à pH 6 à 0°C. Cette suspension est ensuite soniquée dans la glace pendant 4,5 minutes avec des pulses à 165 W de 0,5 secondes toutes les 7 secondes. Les protéines solubles extraites des bactéries sont ensuite récupérées dans le surnageant d'une centrifugation à 100 000 g pendant 30 minutes à 4°C.

Afin de faire précipiter la plus grande partie des protéines, le pH est ajusté à 3,25 par l'ajout au goutte à goutte de H_3PO_4 à 5 % dans la glace. La solution est ensuite placée sous argon pendant 1 h puis centrifugée à 100 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Du NaCl en poudre est ajouté au surnageant afin d'atteindre une concentration de 400 mmol.L^{-1} ainsi que du TCEP à une concentration finale de 1 mmol.L^{-1} puis le pH du surnageant est ajusté à 6 par l'ajout de NaOH 5 mol.L^{-1} .

La solution est ensuite concentrée jusqu'à 800 μL sur des vivaspin 20 (5 kD-PES) (Sartorius) pendant 2 heures à 4500 g à 4°C puis sur des vivaspin 6 (5 kD-PES) pendant 1 h30 à 3 500 g à 4°C.

Les 800 μL de la solution protéique sont déposés au sommet d'une colonne de gel filtration sephadex G50 équilibrée dans un tampon 100 mmol.L^{-1} d'acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES), 400 mmol.L^{-1} NaCl, 1 mmol.L^{-1} TCEP à pH 6. Les protéines sont éluées à 1 mL.min^{-1} , des fractions de 2 mL sont collectées puis analysées sur gel SDS-PAGE afin de sélectionner les fractions contenant la protéine ATX1 pure. Celles-ci sont ensuite concentrées jusqu'à 1 mL avec un vivaspin 20. Enfin, le réducteur (TCEP) est éliminé grâce à deux passages successifs sur colonnes Nap10 (GE-Healthcare) sur lesquels le tampon est échangé pour un tampon

de congélation (40 mmol.L⁻¹ MES, 400 mmol.L⁻¹ NaCl, 10 % glycérol) à pH 6. La solution de protéines est finalement aliquotée en fractions de 50 à 100 µL puis congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C.

Avant les expériences de dissolution des nanoparticules d'argent, ATX1 est décongelée et le tampon est échangé pour un tampon HEPES 10 mmol.L⁻¹ à pH 7,4 sur une colonne Nap5 puis une Nap10 (GE-Healthcare). La concentration de la protéine est déterminée par la mesure de l'absorption de la solution protéique à 280 nm, $\epsilon = 5\,625 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et la concentration en thiols réduits est déterminée à l'aide du DTNB par la méthode d'Ellman.

10.3 Analyse de la taille, forme et homogénéité

10.3.1 Diffusion dynamique de la lumière : DLS

Principe

La mesure par diffusion de lumière (DLS) est une méthode analytique utilisée en routine pour mesurer le rayon hydrodynamique de particules en suspension et peut être appliquée aux suspensions colloïdales telles que les nanoparticules. Cette mesure est basée sur la diffusion de la lumière générée par le mouvement brownien des particules en solution. Le signal de diffusion est traité selon les paramètres statistiques suivants : l'analyse cumulative des données dynamiques de diffusion de la lumière est un moyen de déterminer des informations générales concernant une répartition des taux de décroissance exponentielle. Par exemple, la moyenne et la largeur de la répartition des taux de décroissance, qui peuvent être exprimées en termes de distribution des tailles. Cela revient à ajuster les données de la distribution de l'intensité lumineuse, qui est une distribution Gaussienne des taux de corrélation (proportionnelle à 1/rayon).

Une mesure DLS permet ainsi de déterminer la distribution des rayons hydrodynamiques des particules présentes dans la solution analysée (Mitrano, 2017). Le rayon hydrodynamique (Rh) (**Figure 10.3**) est l'équivalent du rayon d'une sphère solide et de sa sphère de solvatation qui aurait la même diffusion de lumière que l'objet mesuré.

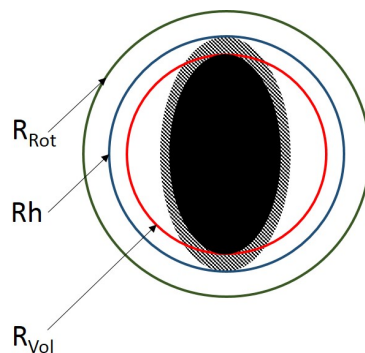


FIGURE 10.3 – Représentation schématique des différents rayons d'une particule où R_{Vol} représente le rayon de l'objet, R_h représente le rayon hydrodynamique de l'objet et de son enrobage et R_{Rot} représente le rayon giratoire

Le rayon hydrodynamique mesuré par DLS est la valeur maximale du pic de la distribution en taille des objets présents dans l'échantillon. La distribution de taille d'un échantillon (**Figure 10.4**) représente la manière dont les rayons hydrodynamiques des particules sont dispersés ce qui se traduit graphiquement par un ou plusieurs pics. La polydispersité d'un groupe de particules présent dans un échantillon correspond à la largeur du pic de la distribution de taille. La polydispersité est exprimée en un pourcentage (% Pd), qui correspond à la polydispersité divisée par la valeur moyenne du pic.

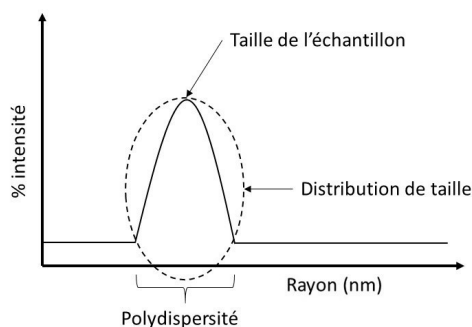


FIGURE 10.4 – Distribution de taille obtenue en DLS obtenue par mesure DLS

Interprétation des mesures

Une mesure DLS consiste en une compilation d'acquisitions de diffusion de lumière d'un même échantillon, qui sont moyennées et corrélées (*DynaPro NanoStar User's Guide 2009*). Le temps d'une acquisition est un facteur que l'on impose en fonction de plusieurs paramètres tels que la taille attendue des particules mesurées ou la concentration de l'échantillon. Les échantillons contenant peu de nano-objets de grande taille ou peu concentrés nécessitent des acquisitions plus longues pour un

résultat précis, voir correct.

i) Distribution monomodale :

L'échantillon A ne contient qu'un seul type de particule. Les particules peuvent donc être considérées comme virtuellement identiques par leur taille. On considère qu'un échantillon est monomodale et monodisperse s'il n'y a qu'un seul pic et que le pourcentage de polydispersité (% Pd) est inférieur ou égale à 15 %. (**Figure 10.5 A**).

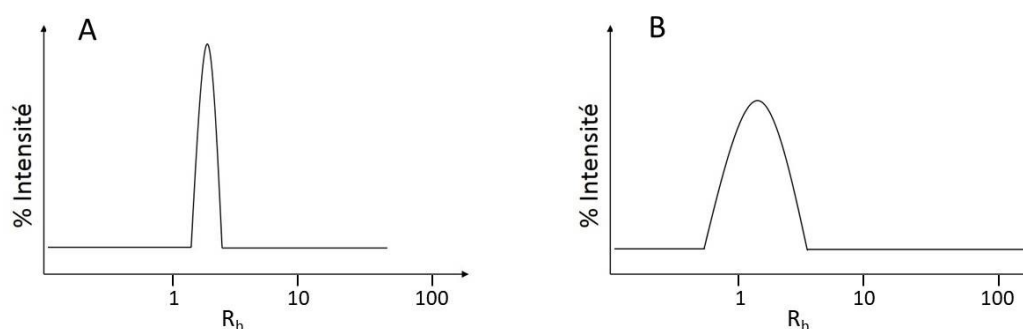


FIGURE 10.5 – Représentation graphique de résultats obtenus par DLS. (A) : une distribution monomodale monodisperse, (B) : une distribution monomodale polydisperse

L'échantillon B contient quant à lui des particules de différentes tailles. Cependant la différence de taille des particules entre elles est inférieure à un facteur cinq. Ainsi l'analyse de l'échantillon conduit à une distribution avec un pic unique mais plus large (**Figure 10.5 B**).

ii) Distribution multimodale :

L'échantillon contient deux types de particules dont les tailles respectives ont un rapport supérieur à cinq. Dans ce cas, l'analyse des données permet de déterminer le rayon hydrodynamique et le pourcentage de polydispersité des deux populations de particules. L'analyse des données peut également mettre en évidence que chacune des populations de particules est mono- (**Figure 10.6 A**) ou poly-disperse (**Figure 10.6 B**).

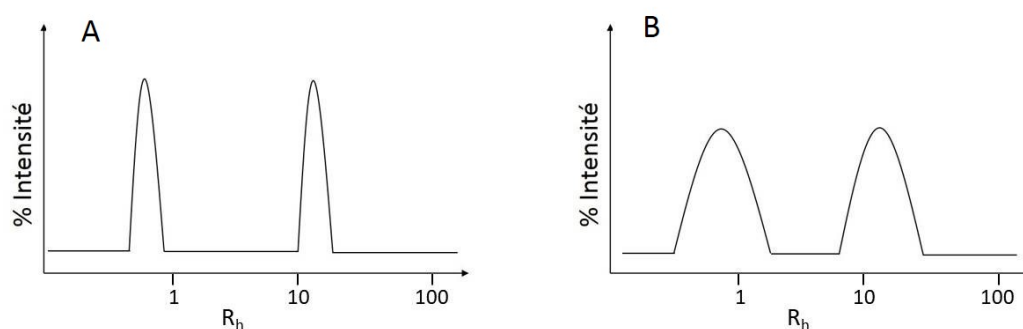


FIGURE 10.6 – Représentation graphique de population multimodale (A) : d’une distribution multimodale avec des populations de particules monodisperses et (B) : d’une distribution multimodale avec des populations de particules polydisperses

Limites :

Lors de l’interprétation de données de DLS, il est nécessaire de garder à l’esprit que les distributions en taille obtenues ne sont pas une mesure directe de l’objet étudié, mais sont issues du traitement statistique de mesures de diffusion de la lumière. Ainsi, chaque paramètre de la distribution est à prendre en compte, à savoir que la distribution en taille d’une même mesure exprimée en masse d’objet, en nombre d’objet ou en intensité de signal ne sera pas la même. En effet, plus un objet est de grande taille, plus son signal de diffusion sera intense. De ce fait, quelques objets de grandes tailles génèrent beaucoup de signal de diffusion.

Partie expérimentale

La solution de nanoparticules à $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à mesurer est diluée cinq fois dans le tampon dans lequel les nanoparticules sont en solution. Cent μL de cette dilution sont transférés dans une UVette (Eppendorf). Le signal DLS est mesuré 10 fois à 25°C sur l’appareil Nanostar (Wyatt), chaque mesure consistant en 10 acquisitions de cinq secondes. L’analyse des données est effectuée via le logiciel Wyatt fourni avec le matériel. L’autocorrélation de l’intensité du signal diffusé est déterminée selon l’équation :

$$G(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} I(t) I(t - \tau) dt \quad (10.1)$$

Où $I(\tau)$ est l’intensité du signal de diffusion détectée en fonction du temps. Les valeurs mesurées sont analysées par le logiciel Dynamics (propriété de Wyatt), traitées dans le logiciel Origin et mises en forme dans Excel.

10.3.2 Nanoparticles Tracking Analysis : NTA

Le nanoparticle tracking analysis (NTA) est une méthode moins répandue à l’heure actuelle qui permet d’obtenir une distribution de taille des objets présents dans une

solution tout comme la DLS (Mehrabi et al., 2017). Elle est basée sur le suivi du mouvement brownien de chaque particule grâce à une caméra qui suit le mouvement des objets en solution. A l'aide de la relation de Stokes-Einstein (*NanoSight Range* 2014), un algorithme permet de déterminer le diamètre hydrodynamique de chaque particule à partir de la mesure de son coefficient de diffusion en solution. L'atout du NTA par rapport à la DLS est de permettre la détermination du rayon hydrodynamique de chaque particule individuellement (comme avec un microscope), ce qui permet d'obtenir une distribution réelle des particules en fonction de leur diamètre et non une moyenne globale de la population quelle que soit son homogénéité. Les deux techniques utilisent ainsi le même principe physique de manière orthogonale.

Partie expérimentale

Dans le cadre de ces travaux, les échantillons sont préparés de sorte à contenir autour de 10^{11} particules par millilitre dans une solution de citrate à 2 mmol.L^{-1} . Trois acquisitions de 60 secondes chacune sont réalisées à 25 images par seconde. Pendant les acquisitions, la solution est illuminée par un laser bleu de longueur d'onde 405 nm.

10.3.3 Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AFFFF ou AF₄)

Dans le cas d'un échantillon non homogène constitué de différents types de populations nanoparticulaires, l'AF₄ permet la séparation des différentes populations avant leur analyse grâce à différents détecteurs présents en sortie du canal d'AF₄ : ICP-MS, MALLS, RI, UV-Visible, etc (Lespes, 2016).

L'AF₄ permet la séparation des différents analytes selon leur taille, sans utilisation de phases solides qui peuvent interagir avec les nanoparticules analysées. Ici l'échantillon est injecté (**figure 10.7 A**) dans un canal schématisé dans la **figure 10.8**. Une fois injecté, l'échantillon est premièrement soumis à une force verticale qui pousse les analytes contre la membrane constituant la paroi inférieur du canal (**Figure 10.7 B**). Du fait du mouvement brownien des nanoparticules celles-ci se retrouvent séparées selon leur taille : les plus petites sont le plus au centre du canal alors que les plus grosses sont proches de la membrane. Une deuxième force est ensuite imposée secondairement dans le sens du canal afin de faire avancer les particules vers sa sortie (**Figure 10.7 C**) : de par les effets de capillarité, la vitesse d'élution est plus rapide au centre du canal et plus lente contre la membrane, ainsi les analytes de petites tailles qui sont plus proches du centre sortiront en premier du canal, suivis par les plus gros.

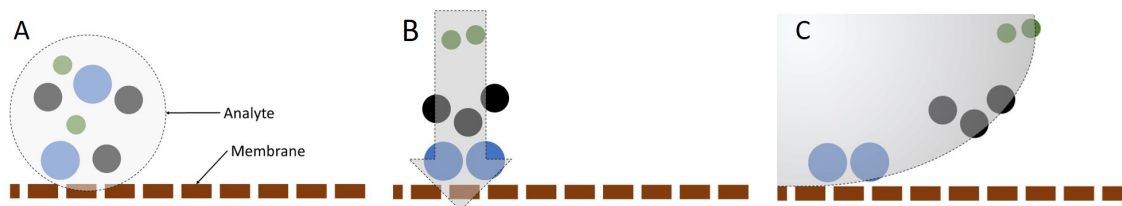


FIGURE 10.7 – Schéma du processus de séparation par AF₄. (A) : injection des analytes dans le canal, (B) : flux vertical d'éluant qui va pousser les analytes contre la paroi de la membrane et (C) : flux horizontal d'éluant qui va entraîner les analytes vers la sortie du canal.

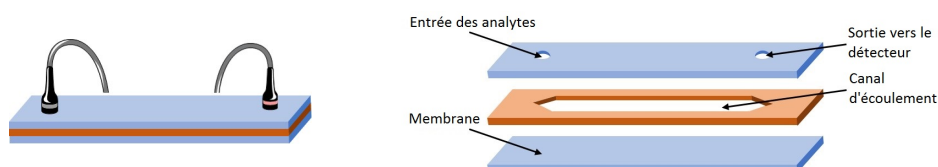


FIGURE 10.8 – Représentation schématique d'un canal d'AF₄

Cette méthode de séparation est ensuite complétée par tout un panel interchangeable de méthode de détection, dont les plus courantes sont les détecteurs UV-visible, DLS, MALLS et ICP-MS permettant une analyse du signal UV et SPR des analytes, une étude de la taille des échantillons *via* le DLS et le détecteur MALLS, une étude de la forme des échantillons *via* le détecteur MALLS et une analyse élémentaire des analytes par ICP-MS (Neubauer, 2011).

Cependant, malgré l'attrait de cette méthode, le travail en amont d'une analyse nécessite pour chaque type d'échantillon un développement de méthodes analytiques fastidieuses et compliquées. De plus, la méthode nécessite une connaissance précise de l'analyte car l'enrobage et la charge des analytes peuvent favoriser une interaction avec la matrice et modifier l'éluion des particules. Il ne s'agit donc pas d'une méthode de première intention, malgré ses avantages permettant une multi-détection en ligne après la séparation des analytes.

Partie expérimentale

Cinquante μL d'échantillon pré-dilué vingt fois dans du NaOH $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 9 sont injectés dans une HPLC (1260 infinity, Agilent Technology). Cette HPLC est utilisée comme une pompe pour le solvant qui sert à la séparation des nanoparticules dans le canal trapézoïdal (Wyatt technology). Pour ce faire, une membrane d'une limite de 1 kDa constituée de cellulose régénérée (Postnova analytics) est utilisée comme zone d'accumulation. Le logiciel Eclipse (Wyatt technology) est utilisé pour contrôler l'HPLC et donc pour contrôler une diminution exponentielle du flux d'éluant de 1 mL.min^{-1} à 0 L.min^{-1} en 20 min afin de séparer des nanoparticules de 20 à 180 nm de diamètre. Un détecteur d'absorbance UV-Visible à 402 nm (UV-detector

VWD-G1314B, Agilent Technology) ainsi qu'un détecteur MALLS (Dawn Heleos II, Wyatt technology) sont connectés avant le spectromètre de masse (ICP-MS 7700x, Agilent Technology). Le signal de l'argent est mesuré et analysé selon un étalonnage externe effectué par des standards ioniques dans 2 % de HNO₃. Les valeurs sont ensuite traitées avec le logiciel Origin.

10.3.4 Microscopie électronique

La microscopie électronique en transmission (MET) consiste en la détection d'électrons qui ont traversé un échantillon dans toute son épaisseur (**Figure 10.9**). Ainsi cette méthode permet d'obtenir une image des objets étudiés avec un contraste dû à l'interaction des électrons avec la matrice étudiée. Plus l'objet est dense et donc arrête les électrons et plus le contraste sera important. Par exemple, les nanoparticules d'argent engendrent un fort contraste par rapport à des nanoparticules organiques. Cette méthode offre une très haute résolution, permettant d'aller jusqu'à moins de 10 Angstroms de résolution. Une image de MET permet ainsi d'avoir un rendu visuel sur la taille, la morphologie et l'homogénéité des nanoparticules observées. De plus, ce type de microscope peut être couplé à une analyse EDX, permettant une analyse élémentaire de l'échantillon et donc d'obtenir une cartographie élémentaire de la nanoparticule et de son enrobage (**Chapitre 10.4.1**).

En MET il n'est possible d'observer qu'une coupe fine, car les électrons doivent traverser l'échantillon. La microscopie électronique à balayage (MEB) permet une observation à plus basse énergie, ce qui permet une observation en profondeur par la dispersion des électrons à la surface de l'échantillon (**Figure 10.9**). Cependant, cela ne permet pas d'observer des particules aussi petites qu'en TEM ni des échantillons organiques qui nécessiteront un traitement préalable pour les rendre davantage conducteur.

La microscopie ne permet l'analyse que d'une petite partie d'un échantillon, celle qui est déposée sur la grille de microscopie. De ce fait il ne s'agit pas de la méthode idéale pour faire des quantifications. De plus, la préparation de l'échantillon peut influencer sur l'analyse. Par exemple le séchage de l'échantillon sur la grille peut entraîner une agglomération des nanoparticules et créer un artefact. Pour palier à cela, des méthodes de préparation alternative mais moins triviales existent telle que la cryofixation qui consiste à plonger l'échantillon dans un liquide cryogénique, l'éthane liquide, afin de figer son état, ce qui permet d'observer l'échantillon tel qu'il existe en solution. Cependant ce type de préparation est lourd et n'est pas mis en place dans tous les laboratoires de microscopie électronique.

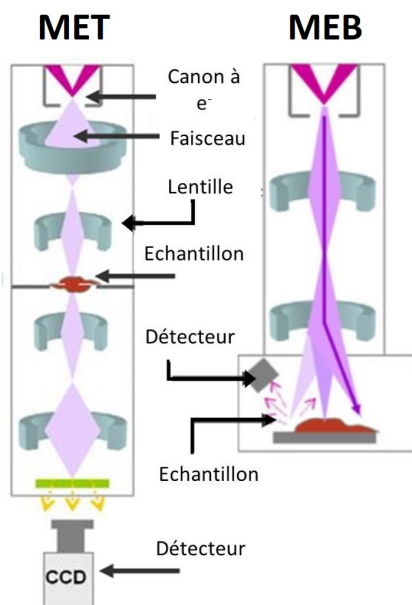


FIGURE 10.9 – Schéma représentant la colonne d'un microscope électronique à transmission (MET) et d'un microscope électronique à balayage (MEB)

Partie expérimentale

Pour le comptage des études de dissolution, 5 μL de l'échantillon à observer ont été déposés sur une grille de nickel recouverte d'un film de carbone (Mesh 300, Agar Scientific / S160N3) et laissé sécher à l'air libre. Les comptages sont effectués sur au moins 100 objets.

Dans le cas des assemblages de nanoparticules, les grilles de nickel recouvertes d'un film de carbone à trou ont été traitées préalablement par un plasma pour les rendre hydrophobes et limiter l'agglomération des nanoparticules lors du séchage à l'air libre. Les comptages sont effectués sur 600 nanoparticules. Les observations ont été réalisées sur un microscope MERLIN (ZEISS) à 30 kV en collaboration avec Pierre-Henri Jouneau (PFNC). Les images ont été traitées dans le logiciel FIJI (FIJI).

10.4 Analyse la élémentaire

10.4.1 Spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X : EDX

La spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (EDX) couplée à la microscopie électronique consiste à analyser les rayons X émis par un échantillon placé sous le faisceau d'électrons du microscope électronique. Cela permet la détermination de la composition chimique de l'échantillon analysé. Le traitement du rayonnement émis lors de l'interaction entre les rayons X et la matière de l'échantillon est retranscrit sous forme de spectres où apparaissent des photons caractéristiques

des éléments présents dans l'échantillon ce qui permet une analyse élémentaire de celui-ci. (Mitrano et al., 2017).

10.4.2 Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP)

La spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) est une méthode d'analyse qui permet de mesurer les éléments chimiques d'un échantillon. L'échantillon à doser est injecté dans un plasma d'argon, où les atomes de l'échantillon sont excités par la forte température de la torche à plasma (entre 6 000 à 8 000 K). L'échantillon à analyser est introduit dans le plasma sous forme nébulisé grâce à un dispositif pneumatique ou ultrasonique, ce qui nécessite une préparation préalable à l'analyse car les analytes ne peuvent être analysés s'ils ont une taille supérieure au micromètre. Ainsi, les échantillons sont d'abord minéralisés dans de l'acide (HNO_3 , H_2O_2 , HCl , ...). Une fois excités dans le plasma, les éléments peuvent être analysés de deux manières différentes.

La spectrométrie d'émission optique (ICP-AES ou OES) détecte les photons émis par les atomes excités lorsqu'ils retournent à leur état fondamental. L'énergie de ces photons et donc leur longueur d'onde est spécifique de chaque élément, et l'intensité du signal est mesurée et quantifiée. La spectrométrie de masse (ICP-MS) détecte les éléments en fonction de leur vitesse, directement corrélé à leur masse atomique. Cette méthode est beaucoup plus précise et sensible que la précédente.

Partie expérimentale

Avant analyse, l'échantillon est minéralisé par incubation durant toute une nuit à 50°C dans une solution de HNO_3 de concentration finale entre 10 % et 65 %. Les éléments à quantifier sont analysés par un ICP-AES ICPE-9800 Shimadzu. La quantification est réalisée grâce à une gamme étalon d'un standard Ag (Sigma) à une longueur d'onde de 338,3 nm dilué dans une solution de HNO_3 de même concentration que celles des échantillons analysés. L'ensemble des mesures d'ICP-AES est également corrigé par un étalon interne, Yb à 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les concentrations des solutions de la gamme étalon s'étendent de 10 à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour l'Ag et de 5 à 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le soufre. Les valeurs sont analysées avec le logiciel ICPEsolution launcher.

Quantification de l'argent dissous : La dissolution des nanoparticules est déterminée par la mesure de l'argent sous forme nanoparticulaire et de l'argent sous forme soluble. Les formes soluble et nanoparticulaire sont séparées par une centrifugation de 1 h à 21 000 g à 22°C suite à un dépôt de 500 μL de l'échantillon sur un coussin de 100 μL de sucrose à 0,7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Le culot correspond aux formes particulaires et le surnageant aux espèces d'argent soluble. Les fractions sont analysées

indépendamment les une des autres par ICP-AES.

Quantification du soufre engagé dans les édifices d'assemblage :

Méthode : La quantification du soufre engagé dans les édifices d'assemblage est déterminée par la mesure de l'argent dans les assemblages et du soufre à une longueur d'onde de 180,7 nm. Deux tubes falcon de 15 mL contenant 200 μL des échantillons à doser sont minéralisés par incubation durant toute une nuit à 50°C dans une solution de 350 μL d' HNO_3 à 65 %. Avant l'analyse ICP, 1,8 et 2,4 μg de soufre élémentaire (Sigma) sont ajoutés puis dilués à 6 mL avec de l'eau MilliQ, afin d'obtenir une concentration finale ajoutée de 300 et 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Développement de la méthode : Le soufre engagé dans les assemblages est, d'après les analyses XPS, principalement engagé dans une liaison avec un argent de surface d'une nanoparticule d'argent. Ainsi, dans un échantillon classique de 370 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'argent de 500.10⁻⁶ L, dans une situation où chaque argent de surface serait lié nous trouverions, 18,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de soufre, soit 2,96 μg de soufre. Ainsi dans un échantillon de mesure d'ICP de 6 mL la concentration mesurée serait de 69 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Cependant chaque échantillon fourni quatre échantillons d'assemblages :

- Les nanoparticules d'argent enrobée de L1 ;
- Les assemblages de 40 nm ;
- Les assemblages de 60 nm ;
- Les assemblages de 200 nm.

Si les nano-objets possèdent la même quantité de soufre, cela ferait 17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de soufre par échantillon. Soit une concentration d'une valeur en deçà de la limite de quantification du soufre qui est très haute. Pour pouvoir quantifier le soufre sans augmenter l'échelle de production des assemblages, nous avons procédé par une méthode de mesure dite « d'ajouts dosés ». C'est à dire qu'une quantité connue de soufre est ajoutée dans les échantillons mesurés.

Pour valider l'approche, deux concentrations de soufre à mesurer ont été choisies : 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, qui est la concentration moyenne de soufre supposée dans les assemblages, et 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, qui est le double de cette valeur. Des triplicats d'échantillons dont la concentration en glutathion est de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sont préparés à partir d'une solution de 1 mmol.L⁻¹ de glutathion. Ces solutions sont minéralisées durant la nuit dans 350 μL de HNO_3 à 65 % à 65°C. Les solutions sont ensuite complétées à 6 mL avec de l'eau MilliQ et des quantités connues de soufre élémentaire sont ajoutées, dont les concentrations sont de 50, 100, 200, 300 et 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Des triplicats de solutions des concentrations ajoutées sont ensuite préparés. Ces échantillons sont mesurés à la longueur d'onde 180,7 nm avec une droite d'étalonnage allant de 0 à 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

La différence entre les valeurs mesurées des différents échantillons et les concentrations ajoutées de soufre doivent nous donner les valeurs de soufre sous forme de glutathion minéralisé c'est à dire $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ (**Figures 10.10 et 10.11**). En pointillé, la régression linéaire de la moyenne de ces valeurs est tracée, dont l'équation de la droite est indiquée sur le graphique : $y = 0,0109x + 16,313$ pour $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $y = 0,0068x + 42,992$ pour $40 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les données obtenue avec $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de GSH sont assez variables et donc peu fiables. Il faudrait donc utiliser des échantillons contenant au moins $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de soufre pour utiliser cette méthode de dosage.

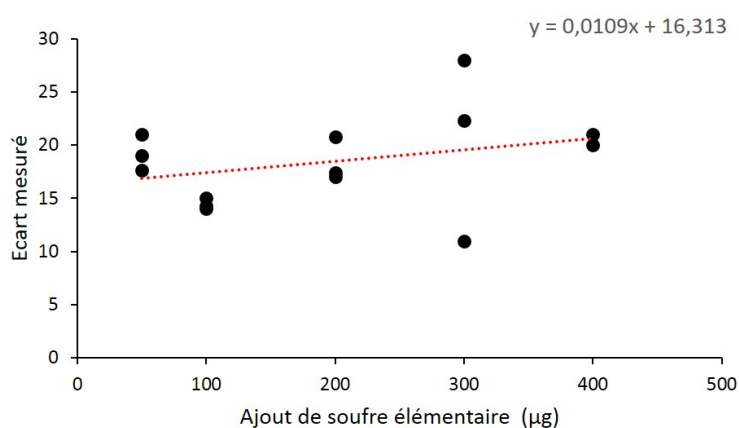


FIGURE 10.10 – Mesures répétées d'un échantillon contenant $20 \mu\text{g}$ de soufre sous forme de GSH avec des ajouts dosés de soufre élémentaire.

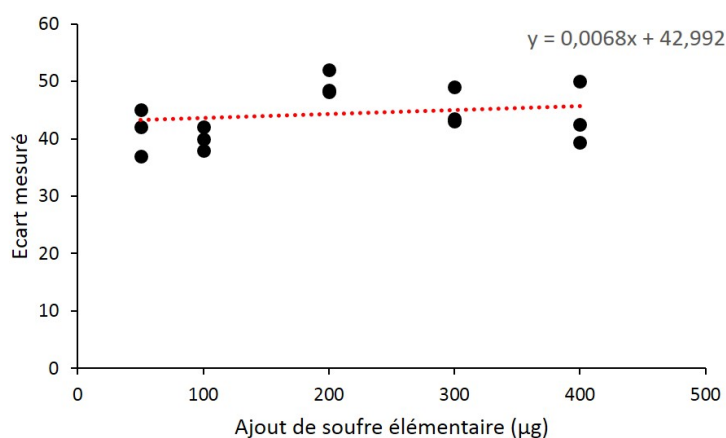


FIGURE 10.11 – Mesures répétées d'un échantillon contenant $40 \mu\text{g}$ de soufre sous forme de GSH avec des ajouts dosés de soufre élémentaire

10.5 Analyse de la surface

10.5.1 XPS

La spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS), également connue sous le nom de spectroscopie électronique pour l'analyse chimique (ESCA), est une technique d'analyse de surface très utilisée car elle permet d'obtenir des informations sur la physico-chimie des éléments en surface d'un échantillon. En effet, celui-ci est irradié par un rayonnement X monochromatique qui entraîne l'émission de photoélectrons dont les énergies de liaison sont caractéristiques des éléments et de leurs spéciations chimiques (1s pour le carbone, l'oxygène ou l'azote, 2p pour le soufre, 3d pour l'argent) (Carlini et al., 2016). Cette méthode extrêmement qualitative permet également d'effectuer des études semi-quantitatives car elle ne fournit des informations que sur les 5 premiers nanomètres d'un échantillon. Cette technique permet de différencier l'argent ionique de l'argent cristallin ou les sulfates des ponts disulfures.

Partie expérimentale

Les mesures XPS ont été effectuées dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Chiara Battocchio de l'université italienne Roma Tre. Les expériences de XPS ont été réalisées sur la ligne BACH (Beamline for Advanced DiCHroism) au synchrotron ELETTRA (Trieste, Italie). Une goutte d'échantillon a été déposée sur des wafers de silicium recouvert d'une couche d'or puis laissée sécher à l'air libre. Les données XPS ont été collectées par transmission de l'analyseur fixe (énergie passante = 30 eV). L'énergie photonique (PE) de 596 eV a été utilisée pour acquérir des niveaux de coeur C1, S 2p, Ag 3d, O1 et N1. Le pouvoir de résolution ainsi obtenu est de 0,22 eV. L'étalonnage de l'échelle d'énergie a été effectué en faisant référence à l'énergie de liaison au niveau Ag 3d⁵ situé à 368,20 eV.

10.5.2 ToF-SIMS

L'analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol ou bien, Time of Flight secondary ions mass spectroscopy (ToF-SIMS) fournit des informations élémentaires et moléculaires de l'extrême surface de matériaux solides. La profondeur moyenne d'analyse pour une mesure ToF-SIMS est d'environ 1 nm.

Une mesure de ToF-SIMS est réalisée en abrasant la surface d'un échantillon avec un faisceau d'ions qui provoque l'émission d'ions secondaires et de groupes d'ions de la surface des échantillons. Un détecteur de masse à temps de vol est utilisé pour mesurer la masse exacte des ions et des amas émis afin de déterminer la nature chimique des ions de surface. Le faisceau d'ions utilisé pour décaper la surface de

l'échantillon est focalisé sur une zone de l'échantillon et peut ainsi en scanner l'ensemble pour obtenir une cartographie complète des espèces. Après analyse par spectrométrie de masse il est donc possible de proposer une reconstruction des éléments et/ou des fragments organiques présents dans l'échantillon.

Partie expérimentale

Les échantillons ont été préparés de la même manière que pour les analyses XPS. Une goutte d'échantillon a été déposée sur des wafers en silicium puis laissée sécher à l'air libre. Les mesures ont été réalisées sur un appareil Physical Electronics TRIFT III ToF-SIMS avec un faisceau ionique pulsé à 22 keV d' Au^+ , en collaboration avec le Dr Didier Léonard, à l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon.

10.5.3 Potentiel zêta

Lorsqu'une particule est en mouvement dans un liquide, elle s'entoure d'ions organisés en une « double couche électrique ». Une partie des ions s'accroche à la particule, l'autre partie des ions forme une couche non liée. Un « plan de cisaillement » délimite ces deux couches. C'est la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et le plan de cisaillement qui définit le potentiel zêta. Ce potentiel représente la mesure de l'intensité de répulsion ou d'attraction électrostatique entre les particules et décrit donc une dispersion, agrégation ou floculation. Le potentiel zêta représente donc la charge électrique d'une particule formée par une masse d'ions qui l'entourent lorsqu'elle est en suspension ou en solution.

En pratique, nous considérons une suspension de nanoparticules comme stable lorsque le potentiel zêta mesuré est supérieur à 30 mV ou inférieur à -30 mV. Cependant, la mesure du potentiel zêta est toujours corrélée à la nature du tampon/solvant utilisé pour la suspension. En effet, une force ionique élevée entraînera une compression de la double couche ionique, ce qui fera diminuer le potentiel zêta. De plus, une mesure de potentiel zêta dans une solution ne contenant aucun électrolyte sera caduque.

Partie expérimentale

Les mesures du potentiel zêta des échantillons de nanoparticules et d'assemblages de nanoparticules ont été effectuées à une concentration de 0,1 g.L⁻¹ d'argent dans des cuves DTS1060 (Malvern) et à 25°C. Les mesures ont été réalisées sur un appareil ZetaSizer de Malvern. La valeur obtenue résulte de deux cents acquisitions dont le modèle de calcul choisi est le modèle Smoluchowski (Sze et al., 2003). Les valeurs sont analysées par le logiciel fourni avec l'appareil.

10.6 Analyse Mixte

10.6.1 Signal SPR

Le plasmon représente l'oscillation collective d'une charge libre dans un métal et peut être considéré comme une sorte de vague de plasma (Mogensen et al., 2014). La charge électrique positive dans le métal est fixe et l'électron libre peut se déplacer. Un champ électrique externe appliqué à partir d'une source lumineuse provoque le mouvement des électrons libres à la surface du métal, ces électrons vont vibrer collectivement, provoquant ainsi des plasmons de surface.

Etant donné que les électrons sont également des particules possédant une charge électrique, leur vibration génère un champ électrique. Lorsque le champ électrique de la vibration des électrons libres et celui du champ électrique externe appliqué (par exemple, les ondes électromagnétiques) résonnent ensemble, le phénomène résultant est appelé résonance des plasmons de surface et a lieu à la surface du métal. Cependant, si la lumière irradie une solution qui contient des nanoparticules métalliques dispersées de plus petites tailles que la longueur d'onde de la lumière incidente, alors, selon le champ électrique de la lumière, l'écart produit un électron libre à la surface du métal. En conséquence, des parties différentes de champ électrique apparaissent sur la surface des nanoparticules et peuvent être considérées comme une polarisation. Une telle résonance de plasmons localisée est appelée résonance de plasmons de surface localisée (LSPR).

Le spectre d'absorption d'une nanoparticule métallique sphérique est caractérisé par la résonance de Mie de fréquence ω_0 suivant l'équation suivante :

$$\epsilon_s(\omega_0) = 2\epsilon_m \quad (10.2)$$

Où $\epsilon_s(\omega_0)$ est la fonction diélectrique de la particule métallique et ϵ_m est la fonction diélectrique du milieu entourant la particule métallique.

Concrètement, dans le cas des nanoparticules d'argent, un signal intense est observable dans le spectre UV-Visible aux alentours de 400 nm. La position du maximum d'intensité de ce signal renseignera sur la taille, la forme et l'enrobage des nanoparticules présentes dans l'échantillon (Amendola et al., 2010).

Partie expérimentale

Les solutions de nanoparticules de $370 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à analyser ont été diluées 5 fois et $100 \mu\text{L}$ de la dilution ont été placés dans une cellule en quartz de trajet optique de 1 cm. Le signal SPR est mesuré dans l'UV-Visible entre 250 et 900 nm sur un

spectrophotomètre UV 1800 Shimadzu à température ambiante. Le signal est traité par la suite par le logiciel UV-probe fourni avec l'appareil.

10.7 Approches synchrotron

10.7.1 X-ray Absorption Near Edge Structure

La technique XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure, ou Spectroscopie de structure proche du front d'absorption des rayons X) est une méthode d'analyse spectroscopique par absorption de rayons X qui utilise le rayonnement synchrotron sur un intervalle d'énergie d'environ 100 eV. Ainsi cette technique apporte des informations sélectives sur un élément déterminé : dans notre cas, le soufre. En effet, le large éventail des états d'oxydation du soufre peuvent être discriminés par cette technique.

Le rayonnement X d'une source synchrotron est très intense avec une large gamme d'énergie continuellement variable, allant de quelques centaines d'eV à plusieurs centaines de keV. Un échantillon exposé aux rayons X absorbe une partie du rayonnement et de l'intensité $I_0(E)$ du faisceau incident avec l'énergie E , est réduite à $I(E)$ selon la loi de Beer selon :

$$\text{Log}[I_0(E) / I(E)] = (\mu(E) / \rho) x \quad (10.3)$$

Où $\mu(E)$ est le coefficient d'absorption linéaire exprimé en cm^{-1} , ρ est la densité exprimée en g.cm^{-3} et x est la masse surfacique exprimée en g.cm^{-2} de l'échantillon. L'absorption diminue généralement avec l'augmentation de l'énergie des rayons X. Des augmentations soudaines d'absorption se produisent lorsque l'énergie des rayons X est suffisante pour exciter l'énergie de liaison d'un électron du noyau d'un élément. Les pics d'absorption du soufre se produisent à 2472 eV (électron 1s, K), 230,9 eV (électron 2s, L1), 163,6 eV (électron 2p_{1/2}, L2) et 162,5 eV (électron 2p_{3/2}, L3), et correspondent à la création d'un photoélectron dans les orbitales 1s, 2s, 2pK et 2p3 (Jalilehvand, 2006). La technique XANES mesure le coefficient d'absorption des rayons X en fonction de l'énergie, grâce à l'analyse de sa structure fine, il est ainsi possible de déterminer à quel(s) degré(s) d'oxydation se trouvent les soufres dans les assemblages.

Partie expérimentale

Les solutions de nanoparticules à analyser sont dans un premier temps déposées sur un carré de 0,5 cm² d'Ultralene© (qui est un film de polymère de 4 μm d'épaisseur transparent aux rayons X) dans une chambre d'azote. Ceux-ci sont par la suite soit séchés sous un flux d'azote et enrichis trois fois, fixés dans le porte-échantillon puis plongés dans un bain d'azote liquide avant d'être placés sur la ligne d'analyse. Il est également possible de déposer une goutte de la solution à analyser entre deux

Ultralene© dans le porte-échantillon et de le plonger dans l'azote liquide dans la chambre d'azote. Les deux méthodes ont été utilisées dans ces travaux.

L'énergie du faisceau de rayons X a été balayée dans la gamme 2,46- 2,52 keV grâce à un monochromateur de silicium (III). Les spectres ont été acquis en fluorescence avec un détecteur SDD. Toutes les analyses ont été effectuées à la température de 100 K, dans un cryostat refroidi à l'azote liquide.

Les mesures ont été effectuées sur la ligne ID21 de l'ESRF en collaboration avec Giulia Veronesi.

10.7.2 L'imagerie de fluorescence des rayons X (XRF)

L'imagerie de fluorescence des rayons X (XRF) est une technique d'analyse élémentaire basée sur l'absorption des rayons X par les électrons de cœur des atomes présents dans un échantillon, suivie par l'émission de rayons X dits de fluorescence suite à la de-excitation de l'atome vers l'état fondamental. Les rayons X émis ont une énergie caractéristique de l'atome de provenance, c'est pourquoi l'analyse de l'émission de fluorescence par un échantillon permet de déterminer sa composition élémentaire. L'imagerie hyperspectrale consiste à balayer une région d'intérêt avec un faisceau de rayons X focalisé, de façon à enregistrer un spectre d'émission des rayons X pour chaque pixel de la carte. La déconvolution des pics du spectre XRF permet donc d'obtenir des images de distribution élémentaire pour chaque élément présent. Quand le faisceau de rayons X est obtenu par rayonnement synchrotron, il est très intense (jusqu'à 10^{11} photons/s) et il peut être focalisé jusqu'à quelques dizaines de nanomètres dans les instruments de pointe. C'est pourquoi il se prête à la recherche d'éléments trace (concentrations de l'ordre du ppm ou moins) sur des petits échantillons tels que des cellules.

Partie expérimentale

Les expériences d'imagerie par fluorescence des rayons X ont été effectuées sur la ligne de lumière ID16B-NA de l'ESRF (collaboration avec Vanessa Tardillo Suarez et Giulia Veronesi) (Martínez-Criado et al., 2016). Le faisceau de rayons X a été réglé à l'énergie fixe de 29.6 keV et focalisé à $60 \times 50 \text{ nm}^2$ avec un miroir de Kirkpatrick-Baez. Le signal de fluorescence émis par l'échantillon a été mesuré avec un détecteur SDD. Les images hyperspectrales ont été acquises en balayant l'échantillon dans le plan focal des rayons X avec un pas de $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}^2$ (champ de vue large, plusieurs cellules à la fois) ou $100 \times 100 \text{ nm}^2$ (images à haute résolution sur cellule unique) et 500 ms/point de temps d'intégration.

Les images hyperspectrales ont été traitées avec le logiciel PyMCA (Solé et al., 2007) afin d'obtenir des images de distribution des éléments d'intérêt dans les régions choisies.

10.8 Analyse de la toxicité des nanoparticules d'argent et assemblages de nanoparticules d'argent

10.8.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice de croissance (CMI)

La détermination de la CMI de croissance est effectuée sur une souche *Escherichia Coli* K12 1655. Une pré-culture bactérienne est démarrée 24 heures avant la culture en plaque 96 puits. Afin de déterminer les CMI, la croissance des bactéries en présence ou en absence de nanoparticules d'argent ou d'assemblages est réalisée en plaque 96 puits et l'absorbance à 600 nm est suivie dans un lecteur de plaque TECAN au rythme d'une mesure toutes les 15 minutes pendant 15 heures à 37°C. A t0, la plaque est remplie avec des dilutions successives des solutions de nanoparticules d'argent et d'assemblages diluées de 2 en 2 avec une concentration de départ de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en argent et des bactéries à une D.O. de 0,01 dans tous les puits de la plaque.

Il est ainsi possible de tracer les courbes de croissance bactérienne au cours du temps pour les différentes concentrations de nanoparticules et d'assemblages et de déterminer en fonction du retard ou de l'absence de croissance la Concentration Minimale Inhibitrice. Ces manipulations sont effectuées dans un milieu minimum : le **Milieu MD** qui est composé de : K_2HPO_4 : 3,07 mmol.L^{-1} , KH_2PO_4 : 1,57 mmol.L^{-1} , $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$: 7,57 mmol.L^{-1} , citrate (Na) : 1,94 mmol.L^{-1} , Glucose 0,1 g.L^{-1} , Sulfate de magnésium : 0,1 g.L^{-1} à pH 7,4.

10.8.2 Mesure de la viabilité cellulaire

Les manipulations sont effectuées sur une lignée cellulaire d'hépatocarcinome, la lignée HepG2. La culture des cellules est effectuée dans des boîtes de Petris de 10 cm de diamètre dans un milieu de culture MEM (Sigma) enrichi de 10 % de Serum de Veau Foetal (SVF) à 37°C et en présence de 5 % de CO_2 . Vingt-quatre heures avant de mettre les cellules en présence des nanoparticules d'argent et des assemblages de nanoparticules d'argent, des plaques 12 puits sontensemencées à raison de $0,2 \cdot 10^6$ cellule. mL^{-1} par puits et incubées à 37°C. Les nanoparticules ou les assemblages de nanoparticules d'argent sont ensuite mis en présence des cellules à des concentrations de 200, 100, 50, 25 et 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pendant 24 h à 37°C. Après 24h, les cellules sont récoltées après avoir été trypsiné (pour les décoller de la boîte) et rincer avec du milieu MEM + 10 % SVF (pour éliminer la trypsine) par centrifugation. La viabilité

de la totalité des cellules est ensuite mesurée sur trois aliquots de cellules comptées en présence de bleu Trypan à l'aide d'un compteur de cellules BioRad TC20.

10.8.3 Mesure de l'entrée d'argent dans les cellules HepG2

Les expériences sont réalisées sur des cellules HepG2 dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre. La concentration en argent choisie pour l'exposition des cellules est une concentration unique non toxique pour tous les objets testés : $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ce choix permet de normaliser avec précision les quantités d'argent mesurées par ICP-AES par rapport au nombre de cellules récupérées. En effet, dans ces circonstances cette normalisation n'est pas affectée par une mort cellulaire importante et variable entre les conditions analysées. Les cellules sont mises en présence des nanoparticules d'argent ou des assemblages de nanoparticules d'argent pendant 24 heures à 37°C . Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS pour enlever les nanoparticules d'argent présentes sur les membranes des cellules, trypsinées, centrifugées (3 minutes à 1200 rpm) et resuspendues dans 1 mL de PBS. Un aliquot de cellules est compté en présence de bleu Trypan. Les cellules sont centrifugées une nouvelle fois (3 minutes à 1200 rpm) et le culot cellulaire est resuspendu dans du HNO_3 65 %. La solution est incubée toute la nuit à 50°C pour minéraliser les cellules et les nanoparticules d'argent qu'elles contiennent. La quantité d'argent dans chaque échantillon est ensuite déterminée par ICP-AES (**Paragraphe 10.4.2**) et normalisée par le nombre de cellules vivantes dans chaque échantillon.

10.8.4 Préparation des échantillons pour les analyses XRF

Pour les expériences de XRF, les cellules HepG2 sontensemencées dans des Lab-Tek (Nunc) 24 heures avant exposition à $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'argent sous forme de nanoparticules d'argent ou d'assemblages. Après 24 heures d'exposition, les cellules sont fixées toute une nuit à température ambiante dans un mélange (1 : 1) de 4 % paraformaldéhyde, 0,4 % glutaraldéhyde dans $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ PHEM pH 7,2 et milieu complet de culture cellulaire. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon PHEM à pH 7,2 et fixées pendant 30 minutes avec 2 % paraformaldéhyde, 0,2 % glutaraldéhyde dans $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ PHEM pH 7,2 puis post-fixées avec 1 % OsO_4 dans du PHEM $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite déshydratées par remplacement graduel de l'eau par l'éthanol. Les cellules sont ensuite incluses dans une résine epoxy (kit Sigma-Aldrich). Des coupes de 400 nm sont réalisées avec un ultra-microtome Leica UC7 équipé d'un couteau diamant DiATOME 35° et déposées sur des supports XRF en Si_3N_4 .

10.8.5 Analyse de la corona protéique

La formation de ce qui est appelé la « hard corona », qui est constituée de protéines fixées par des interactions multiples à la surface des nanoparticules d'argent

est dépendante du temps et a lieu pendant la première heure d'incubation des nanoparticules d'argent dans un milieu riche en protéines (**Paragraphe 4.2.4**).

Les nanoparticules et assemblages analysés sont incubés 1 heure dans 500 μL de milieu MEM enrichi à 10 % de SVF à 37°C et agités à 400 rpm en présence d'une quantité de 5,5 μg d'argent. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 37°C et les culots sont repris dans 200 μL de tampon Hepes-citrate, re-suspendus et centrifugés à nouveau dans les mêmes conditions, afin d'éliminer toute trace de protéines n'étant pas liées aux nanoparticules.

L'étude quantitative de la corona protéique est effectuée par un test BCA (Thermo) sur les culots qui est un dosage colorimétrique des protéines basé sur la complexation du cuivre avec l'acide bicinchoninique. Les complexes formés absorbent la lumière à 562 nm. L'étude qualitative est effectuée par la séparation d'une quantité égale de protéines engagées dans une corona sur un gel SDS-PAGE à gradient 4 - 20 % en acrylamide après coloration à l'instant BLUE (expedon).

10.8.6 Stabilité des assemblages de nanoparticules d'argent dans différents milieux

Les nanoparticules d'argent et les assemblages de nanoparticules sont incubés dans 500 μL de chaque milieu dans un tube Eppendorf à 22°C et soumis à une agitation de 400 rpm, la concentration finale en argent étant de 74 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les mesures de DLS et du signal SPR sont effectuées selon les durées des protocoles des tests biologiques, c'est à dire à 0, 15 et 24 heures. Avant chaque mesure de signal SPR, un blanc est effectué avec le milieu utilisé.

Annexe A

Revue publiée au cours de la thèse :
Silver nanoparticle fate in
mammals : Bridging *in vitro* and *in*
***vivo* studies**



Review

Silver nanoparticle fate in mammals: Bridging *in vitro* and *in vivo* studiesMarianne Marchioni^a, Pierre-Henri Jouneau^b, Mireille Chevallet^a, Isabelle Michaud-Soret^a, Aurélien Deniaud^{a,*}^a Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, BIG, CBM, F-38000 Grenoble, France^b Univ. Grenoble Alpes, CEA, INAC-MEM, 38000 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 September 2017

Accepted 5 March 2018

Available online 26 March 2018

Keywords:

Silver nanoparticles

Sulfur

Chloride

Silver speciation

Electron microscopy

Cellular imaging

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) are exponentially used in various consumer products including medical devices. This production leads to an increasing human exposure to silver in different forms. Indeed, AgNPs are subject to various transformations in aqueous aerobic conditions that trigger the production of Ag(I) species. The main environmental transformation produces the non-toxic species silver sulfide. Transformations occurring in mammals are more diverse and mainly depend on the interaction of AgNPs with thiol, chloride and proteins. Any of these species have a different impact on AgNPs and induces AgNP dissolution into Ag(I) species, aggregation and/or stabilization. The transformations occurring also depend on the exposure route. The main one is dietary but medical exposure is also growing with the massive use of nanosilver as biocide in medical devices. For the former, AgNP modifications and Ag distribution has been extensively studied using *in vitro* and *in vivo* models, while data related to medical use of nanosilver are scarce. However, most of the *in vitro* and *in vivo* data often remain inconsistent. In this review, we describe both *in vitro*, *in cellulo* and *in vivo* data about AgNP transformations, silver speciation and biodistribution. We try to reconcile all these data and describe the latest methods for the future studies of AgNP fate in mammals.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1.	Introduction and background	119
1.1.	Silver nanomaterial generalities	119
1.2.	AgNP behavior in biological media and species-related toxicity	119
1.3.	AgNP human exposure and open questions related to the future use of AgNPs	120
2.	AgNP reactivity, transformations and Ag speciation from <i>in vitro</i> studies	121
2.1.	General reactivity	121
2.1.1.	Environmental transformations	121
2.1.2.	Argyria symptom is based on a sulfidation mechanism	121
2.2.	Organothiol-Ag species	121
2.2.1.	Reactivity of Ag(I) in solution with organothiol molecules	121
2.2.2.	Reactivity of AgNPs with organothiol molecules	121
2.2.3.	Ag(I) complexation by organothiol molecules in the cellular context	122

Abbreviations: 3MPS, 3-mercapto-1-propanesulfonate; AF₄, asymmetrical flow field-flow fractionation; AgNM, silver nanomaterial; AgNP, silver nanoparticle; Ag₂S, silver sulfide; BSA, bovine serum albumin; CRM, confocal reflectance microscopy; CSE, cystathionine γ -lyase; Ctr1, copper uptake protein 1; Cys, cysteine; EDX, energy dispersive X-ray spectroscopy; EFSA, European Food Safety Authority; EMSD, elemental mass size distribution; FIB-SEM, focused ion beam – scanning electron microscope; GCLM, glutamate cysteine ligase modifier; GIT, gastro-intestinal tract; GSH, glutathione; IgG, immunoglobulin G; JRC, joint research centre; K_{sp} , solubility-product constants; MT, metallothionein; MTF1, metal regulatory transcription factor 1; NLS, nuclear localization signal; PCR, polymerase chain reaction; PDI, polydispersity index; Pen, Penicillamine; PVP, polyvinylpyrrolidone; ROS, reactive oxygen species; SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy; SIM, structured illumination microscopy; SOD1, superoxide dismutase 1; SP-ICP-MS, single particle inductively coupled plasma mass spectrometry; SPR, surface plasmon resonance; STEM, scanning transmission electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy; XANES, X-ray absorption near edge structure; XAS, X-ray absorption spectroscopy; XRF, X-ray fluorescence.

* Corresponding author at: UMR 5249 CEA-CNRS-UGA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France.

E-mail address: aurelien.deniaud@cea.fr (A. Deniaud).

2.3.	Ag-Chloride species	123
2.4.	Ag-Protein species: AgNP corona and Ag(I)-protein complexes	123
2.4.1.	<i>In vitro</i> characterization of AgNP corona	123
2.4.2.	AgNP dissolution versus stabilization in biological media	123
2.4.3.	Influence of the corona on AgNP cellular uptake and toxicity	124
3.	Hypothesis for AgNP fate at the level of the organism	124
3.1.	AgNP fate in the gastro-intestinal tract	125
3.1.1.	Simulated gastro-intestinal tract	125
3.1.2.	<i>In vivo</i> experiments	125
3.2.	AgNP fate in blood	126
3.2.1.	Differences in AgNP fate in blood between ingestion and parenteral exposures	126
3.2.2.	AgNP transformations in a context mimicking wound dressings	126
4.	AgNP fate at the cellular scale	127
4.1.	AgNP cellular uptake mechanisms	127
4.2.	Possible cellular entry mechanisms for the different Ag(I) species	128
4.3.	Intracellular AgNP fate	128
4.3.1.	Endosomal AgNP dissolution	128
4.3.2.	Chloride and sulfur binding to AgNPs in endosomes	128
4.3.3.	What type of Ag(I) species can be present inside endosomes?	129
4.3.4.	AgNP sulfidation can occur in mammals in specific cell types or biological context	130
4.3.5.	AgCl crystal is a source of bioavailable Ag(I)	130
4.3.6.	AgNPs and their by-products cellular excretion mechanisms	130
4.4.	Mitochondrial and nuclear localization of AgNPs	131
4.4.1.	Conventional electron microscopy analysis	131
4.4.2.	Optical versus electron microscopy	131
4.5.	Summary for AgNP fate at the cellular level	131
5.	Future developments for imaging and characterization of AgNP fate <i>in cellulo</i>	132
5.1.	Three dimensional EM-based method	132
5.2.	Optical microscopy, towards high resolution imaging of NPs	133
5.3.	Methods for size and speciation analysis from complex samples	133
6.	Conclusion	134
	Acknowledgments	134
	Fundings	134
	References	134

1. Introduction and background

1.1. Silver nanomaterial generalities

Silver is used as biocide since antiquity, and its “nano” form has been developed and increasingly used since the nineties [1]. Silver nanomaterials (AgNMs) are widely used to preserve consumer and medical products thanks to their prolonged release of Ag(I) species, e.g. in clothing [2], home appliances [1], food industry [3] as well as in medical fields [4] (for review see [5]). Moreover, the physical properties of AgNMs, photophysical in particular, also lead to their increased use for various applications: sensors [6–9], electronic devices [10], etc. Various Ag shapes can be produced, rods, stars, wires [11], plates, but the most common is probably the sphere, named Ag nanoparticle (AgNP).

Whatever the shape, AgNMs are constituted of an Ag(0) core synthesized by the reduction of Ag(I) ions using chemical or physico-chemical processes [12,13]. The former process uses reductants such as citrate, alone or in the presence of additives that help to control AgNM size and shape [14,15]. The latter can be done by photophysical reduction for instance [16]. Alternative solutions, considered as greener processes, have massively developed in the last years (for review see [17,18]). They use cellular extracts from different organisms, such as plants or bacteria, to perform Ag(I) reduction in order to produce AgNMs. An organic coating, weakly bound to the surface, is generally added to stabilize these AgNMs. The most common coatings for conventional AgNPs are polyvinylpyrrolidone (PVP) and citrate. The former is a polymer highly stabilizing the NPs by steric hindrance, while the latter is a small organic molecule in dynamic equilibrium with citrate in solution and therefore easily exchangeable.

A recent review highlights the complexity of metal speciation studies in biological fluids in cases of well-known metals, such as Cu and Pt [19]. AgNMs are also highly sensitive to the surrounding environment, and particularly to the redox potential of the media since oxidative conditions easily trigger the oxidation of Ag(0) at the surface of the material into Ag(I). On the contrary, Ag(I) can be reduced to Ag(0) under light illumination. Therefore, the high reactivity of Ag makes these AgNMs subject to a wide variety of transformations, especially under aerobic situation in aqueous media, typical of environmental and biological conditions [5,20]. The diversity of Ag species produced in these conditions makes difficult to perform relevant studies of AgNM toxicity. AgNPs are indeed subject to various transformations in the environment before organism absorption and the life-cycle of the nanomaterial has to be taken into account in toxicological studies. It has been described that sulfidation of AgNPs is the major process occurring environmentally [21,22] (for review see [23]). Several studies have quantified the release of AgNPs and Ag(I) ions from functionalized materials and consumer products such as textiles, food packaging or medical devices but they provide a very wide range of values from 10 µg up to 2 mg of released Ag per gram of product (for review see [5]). It is therefore difficult to use these information to direct study of their impact on Human and the environment. It also explains why the study of AgNM fate in environmental and biological media is still an intense field of research.

1.2. AgNP behavior in biological media and species-related toxicity

Nanotoxicology studies are also plethora [24–29] but the conditions used are rarely relevant to real exposure levels, as well as to the type of species organisms are exposed to (for review see

[5,30]). Indeed, mainly pristine AgNPs and Ag(I) salt effects are compared. *In vitro*, cellular and animal models have all their constraints, limitations and advantages and it is often difficult to reconcile all the *in vitro* and cellular data with whole organism results. The best model currently used for toxicity studies in order to recapitulate the complete transformation processes of AgNPs in Human is the use of animal models, usually rodents.

The main transformations described for AgNPs in environmental or biological contexts in the current literature are summarized in Fig. 1. First of all, in aerobic conditions AgNPs in solution are covered by an Ag(I) layer in equilibrium with Ag(I) species in solution. Oxidative dissolution mechanisms can favor AgNP dissolution into Ag(I) species (Fig. 1A). Oppositely, the presence of sulfide or chloride leads to the formation of silver sulfide (Ag₂S) and silver chloride (AgCl_x) (Fig. 1C and D), respectively, because of their very low solubility constants. These processes drastically limit Ag(I) bioavailability and therefore toxicity. Finally, in biological media the presence of high concentration of proteins leads to the formation of a protein corona surrounding the AgNP. This last phenomenon is the only one that is not specific to AgNP but occurs for all types of NPs. The three other mechanisms are due to specific physico-chemical properties of Ag. In terms of toxicity, there is a major trend to state for bioavailable Ag(I) being the main if not the only toxic species for organisms in all kingdoms of life. Ag₂S is a non-toxic Ag species and can be considered as a scavenger of bioavailable Ag(I), results that corroborate the former hypothesis. Besides, thiols have high affinity for Ag(I) and they are abundant in biological media. Organothiol-Ag(I) are therefore the main form of soluble Ag(I) in cells (Fig. 1B). In this review, we will describe in details the conditions of appearance/disappearance of these different species based on *in vitro* studies. This will help us, combined with data from the literature, to develop hypothesis about their occurrence in mammals following different exposure modes, ingestion and parenteral administration.

1.3. AgNP human exposure and open questions related to the future use of AgNPs

For the normal population, the major exposure route to be considered is dietary, coming from multiple sources of food and water

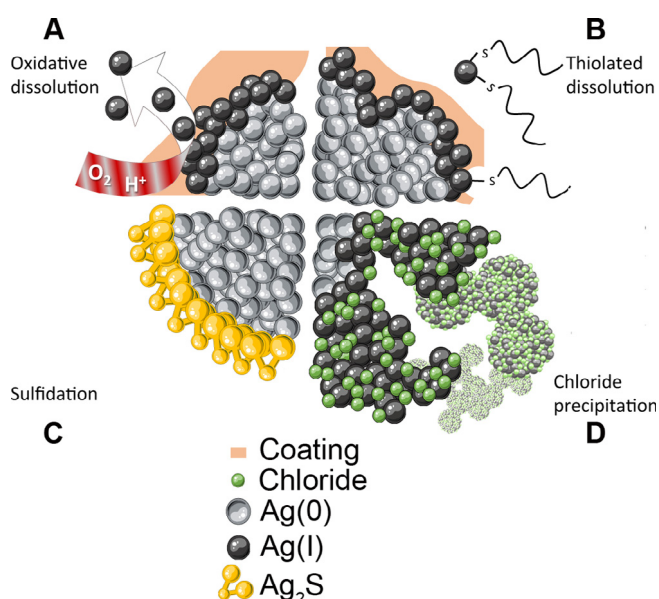


Fig. 1. Scheme of the main AgNP transformations occurring in biological media. (A) Oxidative dissolution process enabling Ag(I) release in solution, (B) thiol-assisted AgNP dissolution, (C) AgNP passivation due to Ag sulfidation, (D) chloride-induced AgNP transformation.

contamination as well as from the food additive E174. It remains difficult to evaluate accurately the level of exposure, although studies estimated daily intake between 0.4 and 80 μg of Ag in any form [23,31,32]. A recent report on the E174 for the European Food Safety Authority (EFSA) illustrates this difficulty as the authors concluded that “the relevance of the available toxicological studies to the safety evaluation of silver as a food additive E 174 could not be established” [33].

However, studies mainly based on *in vitro* experiments tend to describe AgNP fate in the gastro-intestinal tract (GIT) and the impact of the mucus and digestive enzymes [34,35]. This pathway is particularly harsh and can lead to heavy transformations of AgNPs before absorption by the intestine. Inhalation and dermal exposure are also possible but are probably more limited to specific cases such as occupational exposure and the level of exposure in this kind of situation are, to the best of our knowledge, not known. Finally, medical devices containing AgNMs are widely used, and thus constitute a major route of exposure, for population under specific medical care. The exponential increase of their use should alert for the future. Different forms of nanosilver are used for medical applications: wound dressings, especially for burns, catheters, cardiac implants, bone cements (for review see [36]). The presence of AgNMs inhibits bacterial growth but it also has anti-inflammatory properties that favors wound healing. This massive medical use of AgNMs is also raising concerns. It favors the development of silver-resistant bacterial strains in hospitals that could lead to a critical situation in the upcoming years ([37] and for review see [38,39]). Indeed, it has been shown that silver resistance determinants are widely spread among environmental and clinically relevant bacteria and they are often located on mobile genetic elements, facilitating their spread [40,41]. Moreover, we do not have a clear vision of the impact of nanosilver and its by-products on patients with various and heavy diseases requiring long-term and/or frequent hospitalization, such as cancers, transplantation, etc. In these applications some AgNPs as well as other Ag species can be released directly to blood or lymphatic streams that provide the maximal absorption rate with, first, a direct exposure to circulating cells and second a maximal retrieval in the liver. For instance, it has been shown *in vivo* an increase in platelet and erythrocytes aggregation and some thrombosis [42,43]. Argyria symptoms have also been observed in the case of burn treatment [44], which corresponds to high exposure levels. Overall, this kind of medical exposure has been neglected in nanotoxicology studies, while it is of broad relevance.

In the case of AgNPs, nanotoxicology studies barely rely on relevant exposure scenarios. However, several groups have recently initiated works at non-toxic concentration of AgNPs in order to understand their impact on cell functions at levels closer to the real life [45]. These studies are anyway still far from realistic dietary exposure and only medical exposure could fit this level. Nanotoxicology studies improved a lot since the last 10 years both in terms of exposure scenarios, biological models and analysis methods, in particular NP characterization, sensitivity of the detection and imaging technologies. However, there are still gaps between *in vitro*, *in cellulo* and *in vivo* experiments and there is a need to take into considerations silver speciation in toxicology studies.

In this review, we analyze *in vitro* silver nanoparticle transformations and silver speciation, and corroborate it with the analysis of AgNP transformations in simulated biological media, such as GIT or blood. We also describe AgNP fate in mammalian cell models and try to place this in the perspective of the whole organism context. We will critically draw advantages and drawbacks of the different techniques described in the literature in order to alert on possible over- and/or mis-interpretation. Finally, we highlight recent advances in imaging, speciation analysis and cell biology methodology that can lead to further breakthrough in future

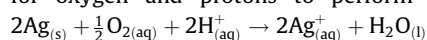
studies that will have to take into considerations *in vitro* and *in vivo* data in order to deliver reliable understanding of AgNP toxicity in mammals.

2. AgNP reactivity, transformations and Ag speciation from *in vitro* studies

2.1. General reactivity

2.1.1. Environmental transformations

In the environment and in organisms, AgNPs are in aqueous media and in contact with different ions and molecules. In this kind of media and in aerobic conditions, it has been shown that AgNPs are subject to an oxidative dissolution process leading to the release of Ag(I) species [46,47]. This process has been nicely described by Liu et al. [46] that demonstrated the requirement for oxygen and protons to perform the following reaction:

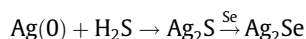
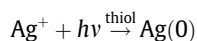


They have also observed the co-existence of three Ag species in aqueous media: (i) Ag(0) in the NP, (ii) Ag(I) bound to the NP surface and (iii) Ag(I) in solution [46]. Numerous studies have been performed in order to analyze the impact of molecules present in the environment and in living being on AgNP behavior in aqueous solution. The most striking and opposite phenomenon were observed with oxidants and sulfide. Hydrogen peroxide [48,49] or ozone [47] induce AgNP dissolution into Ag(I), while sulfide leads to AgNP surface sulfidation and thus passivation [21]. The latter is almost irreversible since the solubility-product constants (K_{sp}) of silver sulfide, Ag_2S , is $6 \cdot 10^{-51}$ M [22,50]. This process has been described as the main transformation occurring for AgNPs in soils [51,52] and has been described only in some specific processes in mammals (see Section 3.4).

2.1.2. Argyria symptom is based on a sulfidation mechanism

Sulfidation is occurring in skin and is typical of the grayish color observed in argyria, where Ag, S and Se are co-localized in Ag-rich granules [53,54]. Liu et al. recapitulate this process *in vitro* [55]. They showed in the first step the photoreduction of Ag(I) under UV irradiation in the presence of thiol in the form of glutathione (GSH) or proteins.

This reaction produces zerovalent AgNPs that further react most probably with surrounding sulfides to form Ag_2S -NPs. The presence of Se in argyria deposits could be explained by a solubility of Ag_2Se fourteen orders of magnitude lower than Ag_2S , although Se has a very low abundance compared to S. The authors thus proposed an exchange reaction between Ag_2S and Se.



Mammals could also be exposed to already sulfidized AgNPs through food contamination, in particular from vegetables. In this review, we will only describe AgNP transformations following organism uptake. AgNP behavior has been extensively studied *in vitro* in different conditions that can be related to environmental or biological ones. In biological fluids, three main categories of species can be considered for the interaction with AgNPs and its by-products: (i) thiol-containing molecules, (ii) halide and in particular chloride, and, (iii) peptides/proteins and other biomolecules. Many studies explored the impact of one type of species on AgNP behavior but a strong interconnection exists between these three types of species that triggers dissolution, stabilization or agglomeration of the NPs. They will thus increase or decrease Ag(I) release. These data enable to build models for AgNP fate after mammal

intake *via* different exposure routes such as ingestion or parenteral administration that we will try to describe in the Section 3 of this review.

2.2. Organothiol-Ag species

2.2.1. Reactivity of Ag(I) in solution with organothiol molecules

Thiols are soft Lewis bases which possess high affinity for soft acids such as Ag(I) and Cu(I). For example, GSH and cysteine (Cys) that possess one thiol group (Fig. 2A and B) and are abundant intracellularly and in biological fluids have affinities in the picomolar range for Ag(I) [56]. Therefore, in these conditions, as long as free reduced thiols are present, no free Ag(I) can be present in the cell, similarly to what has been shown for copper [57]. To extend our knowledge on Ag(I) binding to thiol-biomolecules towards multi-thiol-containing molecules, we recently described its binding at physiological pH to different biomolecules which contain 1, 2 or 3 thiols including proteins as well as their chemical mimics [58]. We found that Ag(I) can be coordinated by 2 or 3 sulfur atoms. GSH and Atx1 [59], a copper chaperone that possesses a two-thiol copper binding site, trigger the formation of purely AgS_2 complexes, while the pseudo-peptide P³ [60,61] (Fig. 2C) that mimics Atx1 binding site leads to a mixture of AgS_2 and AgS_3 complexes. We also studied the metallothionein (MT) [62], a Cys-rich protein involved in metal detoxification highly overexpressed upon AgNP exposure [24,29], and its mimic the tri-cysteine molecule, named L¹ [63] (Fig. 2D). Interestingly, MT provides a mixed $\text{AgS}_2/\text{AgS}_3$ coordination, while L¹ is the only pure AgS_3 ligand we identified. Ag(I) gives thus a more variable coordination chemistry compared to Cu(I) that forms more defined complexes with the same molecules [63,64]. The coordination of Ag(I) with the thiolate groups of Cys, GSH and Penicillamine (Pen, Fig. 2E) has also been characterized but in less relevant alkaline solution [65]. In this study, Ag coordination and polymerization capabilities have been analyzed at different ligand to Ag ratios. GSH always formed mononuclear complexes with an AgS_2 coordination mode, while Cys made large complexes with one bridging sulfur in an AgS_3 coordination environment. Ag(I)-Pen had a mixed coordination with the predominance of AgS_2 .

2.2.2. Reactivity of AgNPs with organothiol molecules

Similarly to Ag(I) binding, thiol containing molecules bind tightly to AgNP surfaces that are covered by Ag(I). This binding forms a NP coating that stabilizes them well dispersed in solution. However, depending on the molecule and its chelating power, it can drive AgNP dissolution by grasping Ag(I) surface atom or it can protect the NP from dissolution. This latter phenomenon has been described in the case of AgNP surface functionalization with different molecules such as 11-mercaptoundecanoic acid, allylmercaptan, 3-mercapto-1-propanesulfonate (3MPS) and 1- β -thio-D-glucose (Fig. 2F–I) that most probably arrange as a comb, as schematized in [47], forming a protective layer surrounding the nanoparticle [47,66,67] with a limited dynamic. Liu et al. directly correlated the biocide activity with the kinetic of Ag(I) release from differentially functionalized AgNPs. While sulfidation is usually considered to trigger AgNP passivation, the authors found a lower Ag(I) release rate when they modified AgNPs with 11-mercaptoundecanoic acid [47]. It is anyway not very clear in the different studies whether AgNP surface becomes sulfidized, *i.e.* Ag_2S , or simply bound to thiol, *i.e.* AgSR_x . Indeed, the more conclusive experiment to prove Ag_2S formation would be electron diffraction that is not always achievable and therefore rarely done.

With the most common thiol molecules, such as GSH and Cys, in diluted aqueous solutions and without salt, the colloidal stability of AgNP solution is increased but thiols favor the release of Ag(I) species from the NP [49,68–70]. Besides, Gondikas et al. observed

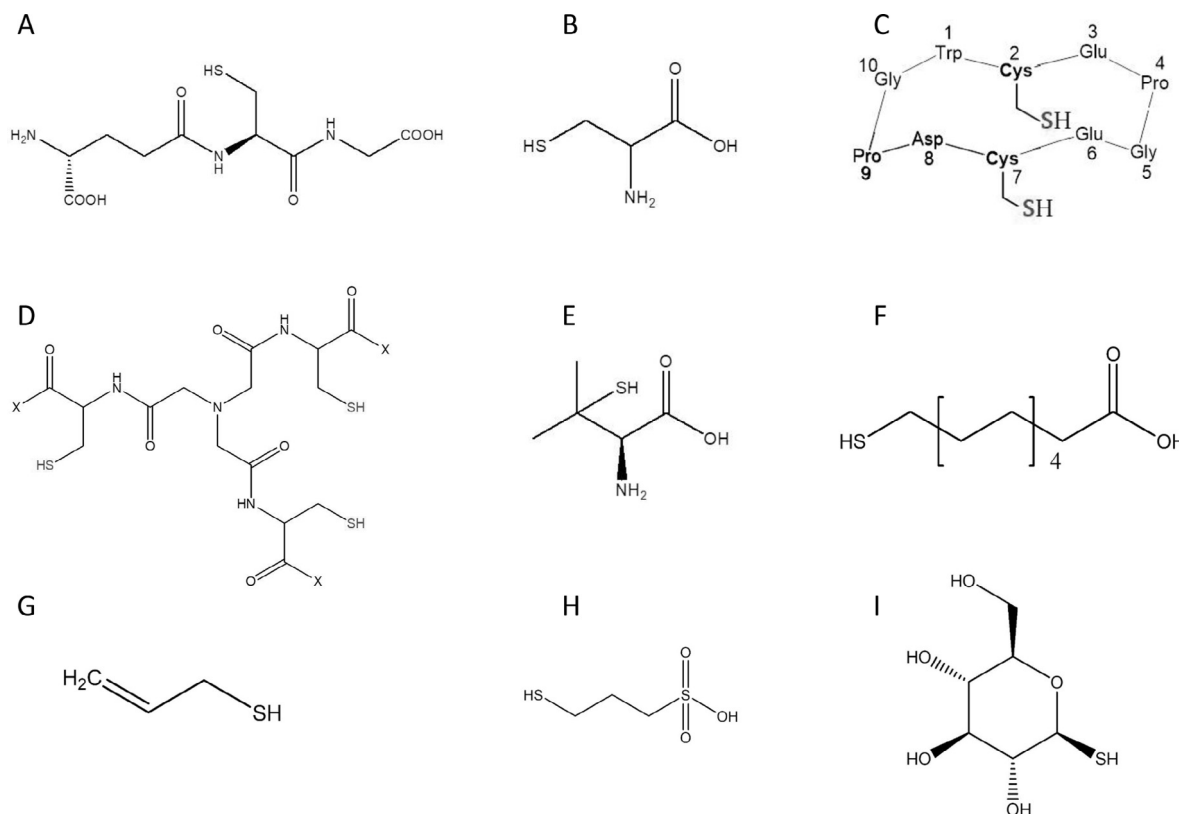


Fig. 2. Scheme of the different molecules used for thiol-mediated AgNP coatings. (A) GSH, (B) Cys, (C) P³, (D) L¹ with X = OEt, (E) Pen, (F) 11-mercaptoundecanoic acid, (G) allylmercaptan, (H) 3-mercapto-1-propanesulfonate (3MPS) and (I) 1-β-thio-D-glucose.

a faster dissolution in the case of citrate-coated AgNPs compared to PVP-coated that can easily be explained by the steric hindrance induced by the polymer, while citrate is in dynamic exchange with the solution providing a higher accessibility of surface Ag(I) for thiol molecules [70]. However, little is known about the impact of multi-thiol molecules and in particular with AgS₃-prone molecules. Surprisingly, the incubation of MT with AgNPs showed a dual phenomenon of dissolution-aggregation mechanisms leading to the formation of large species dense to the electron under transmission electron microscopy (TEM) observations with low or no crystallinity [71]. It is tempting to speculate that this process can either be due to the specific AgS₃ coordination, as observed by X-ray absorption spectroscopy (XAS) [58], or simply due to the high Cys content of this protein. It has also been shown that GSH can form polymers with Ag(I) in AgS₂ and AgS₃ coordination modes [72,73] leading to layers of Ag-GSH. These polymers can have some similarity with the objects observed between MT and AgNPs.

2.2.3. Ag(I) complexation by organothiol molecules in the cellular context

A consensus emerged for GSH and MT to be the two main providers of thiols for Ag(I) complexation upon AgNP exposure in mammalian cells [29,74]. We and others confirmed it by different molecular and cellular biology methods including quantitative PCR showing overexpression of the genes of MT and glutamate cysteine ligase modifier (GCLM, enzyme involved glutathione synthesis) [24,29] and also indirectly by assessing Ag(I) coordination using XAS [29,74]. Interestingly, this kind of AgS_x structures, not well defined and dense to the electrons, can be also observed by TEM in sections of mammalian cells exposed to AgNPs ([24] and Fig. 3).

In the case of hepatocytes, we observed this kind of objects after long-term exposure corresponding to high degree of transformation of the AgNPs, as seen from the modification and dispersion of size of the NPs localized in lysosomal vesicles in Fig. 3. Altogether, it is tempting to imagine that the MT-Ag object observed

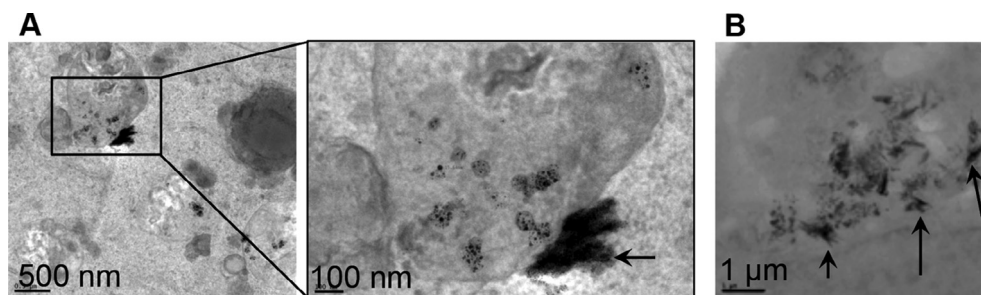


Fig. 3. TEM micrographs of lysosomal vesicles in the hepatoma-derived cells HepG2 exposed for 24 h to (A) 100 μM AgNPs coated with PVP and (B) 50 μM AgNPs coated with citrate. The arrows show transformed AgNPs, i.e. AgS_x structures.

in vitro [71] corresponds to the cellular phenomenon happening upon AgNP dissolution/transformation inside mammalian cells in endo-lysosomal vesicles. It would mean that abundant thiol molecules, firstly GSH and MT, would play an active role in intracellular AgNP fate and would not only be involved in the binding of Ag(I) released from the NPs. Besides, *in vivo*, Cu(I) trafficking is driven by a cascade of thiol molecules with different affinities and GSH has one of the lowest [75]. While it has been shown that Ag(I) exposure in yeast can affect different Cu-proteins [76], it remains unclear whether Ag(I) released from AgNPs can really follow the Cu trafficking pathway that would, first of all, lead to Cu-protein inhibition. It is not a toxicity mechanism that has been described so far. It would therefore be of high interest to be able to follow Ag species trafficking starting from transformed AgNPs in endo-lysosomes and analyze their speciation in the different subcellular localization in order to nail down the role of other thiol and non-thiol molecules in AgNP fate and Ag(I) complexation in mammalian cells.

2.3. Ag-Chloride species

On the opposite to thiols, chloride has the tendency to protect AgNPs *in vitro*, while inducing their agglomeration [49,77]. More precisely, Ag(I) is highly insoluble in the presence of chloride ($K_{sp} = 1.6 \cdot 10^{-10}$ M) that would thus form an AgCl precipitate on the NP surface by interacting with the Ag(I) bound to the NP surface [46]. This precipitate is protecting AgNPs from oxidative dissolution but inducing agglomeration of the NPs thanks to Van der Waals attraction forces [78]. This solubility product value means that we can reach up to 13 μ M of soluble AgCl in water. However, in biological conditions, the chloride concentration is in the mM to more than 100 mM range. Ag(I) speciation has been modeled in function of the chloride concentration (species distribution shown in [47] and Fig. 4) and showed that dissolved Ag(I) species reached a minimum concentration of about 0.6 μ M at 3 mM chloride concentration with a predominance of the AgCl_x species [47]. At lower chloride concentrations in the micro to submillimolar range, free Ag(I) is the predominant species, while it is almost absent at millimolar chloride concentrations and higher. When the concentration of chloride is increased from 3 mM to 1 M, dissolved Ag(I) species concentration increases continuously and further species, AgCl₂⁻ (predominant at chloride concentration higher than 10–20 mM) and AgCl₃²⁻, becomes more and more prominent, while dissolved AgCl concentration is actually constant whatever the chloride concentration is. Extracellular spaces and blood contain about 110 mM chloride leading to quite a high concentration of dissolved Ag(I) species between 5 and 10 μ M with AgCl₂⁻ predominant. Cytosol only contains 4 mM of chloride thus limiting dissolved Ag(I) to low micromolar concentration mainly as AgCl species. This simulation reveals the drastic decrease in Ag(I) bioavailability that should occur upon intracellular uptake of AgNPs and Ag(I) from extracellular space and particularly from the bloodstream. However, this perspective only takes into account chloride, while the real life provides AgNPs and Ag(I) with a wide variety of biomolecules and ions in addition.

2.4. Ag-Protein species: AgNP corona and Ag(I)-protein complexes

Following ingestion, inhalation or systemic administration, AgNPs are in contact with a complex mixture of proteins, peptides and aminoacids present in any biological media, inside and outside cells. These molecules can take care of both AgNPs and the released ions. It has been shown that proteins are wrapping around the NP to form a protein corona [79,80]. For loosely bound organic coatings, proteins are replacing them but for polymers, such as PVP,

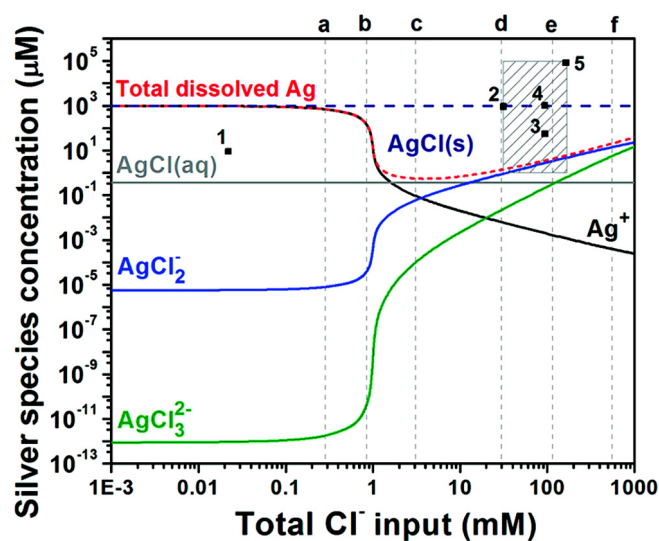


Fig. 4. Ag species concentrations in function of chloride concentration (Adapted from [47]).

discrepancies exist in the literature between proteins binding to the coating or to the Ag core (see later in this section).

2.4.1. *In vitro* characterization of AgNP corona

For the protein corona formation, it is generally described a two-step process where various proteins bind to the NPs, first. The loosely bound molecules are exchanging rapidly with the media and are thus gradually removed from the NP surface and replaced by high affinity proteins that form the hard corona (for review see [81]). Proteins with fast exchange with the media are forming the so-called soft corona. From a kinetic point of view, localized surface plasmon resonance (SPR) and electron microscopy allowed to describe the fast exchange of PVP for albumin in an hour to form a hard corona [82]. However, the amount of protein tightly bound to the AgNP increases during hours and tends to reach a plateau at around 600 μ g of protein/m² between 12 and 24 h of incubation. This process has been studied extensively *in vitro* using pure proteins, such as albumin from various species, or using cell culture media supplemented with serum in order to study the mechanism of formation of the corona and to identify the proteins forming the hard corona. Proteomic analyses managed to reveal some specific proteins that bind to different AgNPs in terms of coating and/or size [83,84]. Interestingly, there is more difference in corona composition depending on the size of the NPs than depending on their coatings [84]. A study using fish plasma also revealed a gender related difference in protein corona composition [83]. Although some specific proteins are enriched in the corona, several abundant proteins of the serum but not enriched in the corona, are anyway always found in high amounts in the corona, such as albumin, lipoproteins and immunoglobulins [83,84]. Besides, circular dichroism revealed that hard corona proteins are usually unfolding upon binding to the NP [79].

2.4.2. AgNP dissolution versus stabilization in biological media

In vitro studies using biological media or its mimic provide an appropriate model for the first minutes of AgNP's life inside organisms such as mammals and are of high interest in the study of AgNP fate before cellular uptake. For example, the use of cell culture media containing fetal serum mimics AgNPs directly administered to the bloodstream which is a typical case for AgNPs contained in medical devices. Gliga and co-workers studied the release of Ag(I) soluble species from AgNPs of different sizes upon

incubation in cell culture media containing serum [85]. They found that the larger the NP, the lowest is the percentage of released Ag(I). However, if we analyzed these data in terms of layer of Ag atoms released from the AgNPs, 4 h and 24 h incubation corresponds to 1 and 2 layers of atoms, respectively, independently of the AgNP size. Indeed, for the 10, 40 and 50 nm AgNPs the first layer corresponds to 11.6%, 2.9% and 2.3% of Ag atoms and the amounts of released ions in 4 h are 10.6%, 3.9% and 1.8%, respectively. The second layer corresponds to 23.8%, 6% and 4.7% for AgNPs of 10, 40 and 50 nm diameter, respectively, and the amounts of released Ag in 24 h are 23.6%, 7% and 4.4%, respectively. Therefore, ion release occurs at the same pace in terms of AgNP layer dissolution and only 2 layers of atoms are removed in 24 h, which means that oxidative dissolution is maybe not happening in cell culture media but only already oxidized surface Ag(I) are released in the media. This hypothesis would require further experiments to be tested.

It was also evidenced that the presence of serum in cell culture media enhanced the colloidal stability of AgNPs dispersed in solution [29]. It is particularly striking to observe the massive agglomeration of 20 nm citrate-coated AgNPs in cell culture media without serum due to the presence of high amount of chloride that favors electrostatic attraction between particles, while the addition of fetal serum leads to the formation of relatively homogenous AgNPs (PDI of 16%) with an hydrodynamic diameter of 160 nm ([29] and unpublished results). This 8-fold increase in hydrodynamic diameter cannot be explained by a simple corona, estimated to be about 3.5 nm thickness [82]. One can make the hypothesis that interactions between proteins and AgNPs lead to the formation of small clusters of AgNPs coated and stabilized by proteins. In the case of PVP-coated AgNPs, the particles are stable in the different conditions tested, water or cell culture media with and without serum. Although, the behavior of AgNPs with different coatings can vary a lot, a protein corona always occurs even in the case of polymers that sterically hinders interaction with the AgNP core [82,86]. However, Treuel et al. explore the differences in corona binding in function of the coating of the NP [87]. Bovine albumin has an affinity of 20 nM for citrate-coated AgNPs but only 500 nM for PVP-coated AgNPs. The authors used Raman and SERS spectroscopy to look into the details of BSA binding and understood this difference. As it can be thought, binding to citrate-coated AgNPs is mediated by high affinity thiols, although the affinity is 3 to 4 orders of magnitude lower compared to the binding of Ag(I) in solution. In the case of PVP-coated AgNPs and contrary to the results described by Miçlaus et al. [82], the polymer is not replaced by albumin and proteins are not directly bound to the metal but interacts *via* Van der Waals and Coulomb attractions and hydrophobic effects to the coated AgNPs. Therefore, it is worth knowing that polymer coatings can limit or inhibit interactions between AgNP surface and thiol ligands depending on the polymer size ([87] and our personal observations). The question of the stability of corona-coated AgNPs is directly connected with the question of Ag(I) ion release because this is linked with the toxicity induced by AgNPs. In addition, to the increase of the colloidal stability, the corona also decreases ion release in a protein concentration manner [88,89]. The mechanism behind is hypothetical. It could be due to the protection of AgNP surface to oxidative dissolution and/or to grapping of surface Ag(I) by high affinity ligands, such as GSH or Cys, or by trapping of released Ag(I) by proteins present in the corona. The latter is easy to imagine in the case of albumin that contains several Cys. Recently, Miçlaus et al. evidenced a more elaborated model to explain AgNP dissolution decrease by the protein corona [82]. In their model, a limited AgNP sulfidation occurs only at the surface in the presence of serum in the media and both soft and hard coronas are determinants for this controlled sulfidation process. Indeed, tightly bound proteins can

trap Ag(I) and in the presence of reduced sulfur Ag₂S may form at the surface of the NP, while excess Ag(I) bind to soft corona proteins that exchange rapidly out of the surface preventing the massive production of Ag₂S. As already shown in other studies, these sulfidized AgNPs are not toxic for mammalian cells. This is due to the passivation of the NP surface by the highly insoluble Ag₂S ($K_{sp} = 6 \cdot 10^{-51}$ M) that completely impedes the release of bioavailable Ag(I) species.

2.4.3. Influence of the corona on AgNP cellular uptake and toxicity

The data concerning the influence of the AgNP corona on cellular uptake and toxicity are scarce but consistent. The protein corona decreases AgNP cellular entry, to a huge extent in some cases [79,90]. Besides, hyperspectral imaging enabled to show that the corona is released upon cellular entry [79,80]. The toxicity is slightly lower with the corona [79] probably because cells end-up with less silver content but the corona cannot protect AgNPs from intracellular dissolution due to its fast intracellular removal. In summary, the corona tends to limit AgNP cellular entry in mammals that decrease only to a low extent the cytotoxicity. This corona is also rapidly released after cellular entry of the NPs and it influences cellular activation and toxicity for unknown reasons. The difficulty to draw solid conclusions concerning AgNP fate and effects in mammalian cells arise from the simplification we want to do with our models and the focus we have in each study on one or very few parameters, while there is complex connections between many variables that we cannot control at the same time. In the next part, we will try to intersect the main parameters we previously described and build an attempt model for AgNP fate *in vivo* that could be used for further studies.

3. Hypothesis for AgNP fate at the level of the organism

As previously described, following AgNP exposure, Ag speciation in biological fluids is complex. However, many studies simply compare AgNP versus Ag(I) effect on 2D cell cultures or animals. The latter does not completely make sense as a variety of Ag(I) species are anyway formed within the organism. Besides, for Ag(I): AgCl_x, Ag-thiol or free Ag(I) can exist in solution that possess different properties and different toxicity levels. Therefore, the use of an Ag salt is not sufficient to cover the full range of Ag(I) species that can exist in biological media. In our team and in the majority of the studies, we usually compare an Ag salt, such as AgNO₃ with pristine AgNPs. The former directly provides a bioavailable form of Ag(I) that can enter cells by metal ion transporters, such as Ctr1. The Ag salt, therefore, has a high and fast cytotoxic potential to have kind of a maximum effect. We also made the choice to add pristine NPs to the cell culture media considering that this is a good mimic of biological fluids in which it will be partly transformed before cellular uptake. Therefore, we are close to direct bloodstream injection of AgNPs in mammals. This method is far from perfect but enables to expose cells to the different Ag species that can exist within the organism, preventing to miss a particularly toxic species. This is critical if we compare Ag with arsenic for which a wide diversity of species are known but only some of them are toxic, while the others are inert for living organisms (for review see [91]). In the case of AgNPs and their by-products, we already know that Ag₂S is inert, AgNP *per se* also seems to have a limited toxicity, while bioavailable Ag(I) is toxic by several means, such as replacement of Cu or other soft metals in metalloproteins or by oxidative stress induction, etc. Therefore, there is now a need to identify pertinent Ag(I) species and study specifically their fate: intracellular entry, trafficking, and impact on cell functions. It would be, for instance, very interesting to study the fate of Ag(I)-GSH complexes. In this case, Ag(I) availability is not clear

but similarly to Cu-trafficking, Ag(I) could be exchanged for thiol-biomolecules with higher affinity ending-up in proteins critical for the cell, such as ceruloplasmin, superoxide dismutase [76] or cytochrome c oxidase.

It is usually considered that AgNP-corona are the only species cells see [79,92]. In that respect, pristine AgNPs are also appropriate for this type of studies. Indeed, as soon as proteins are present in the media, they covered the NPs whatever the coating is and proteins are present in all biological fluids. Whatever the administration mode, AgNP-corona is thus the main species if we ignore released ions. Ag biodistribution in rodents following AgNP exposure has already been reviewed and it is clear that the main target organs are always liver and spleen in any exposure mode ([93,94] and for review see [30]). We will now describe AgNP fate in the main exposure routes: ingestion and parenteral.

3.1. AgNP fate in the gastro-intestinal tract

3.1.1. Simulated gastro-intestinal tract

Different studies analyzed AgNP transformations that should occur in the GIT, using *in vitro* incubation of AgNPs in media mimicking these conditions. Liu et al. determine AgNP dissolution rate at different pHs [55]. Based on the results in acidic pH, close to the stomach conditions (pH 1.5), the authors predicted an accelerated dissolution of the NPs that will not be complete for most of them because of the limited residence time, up to 240 min. More realistic experiments have been done recently with the NM300K AgNPs from the JRC by Bove et al. [95]. In this work, the successive steps happening in the GIT have been performed sequentially in a media very close to the reality, if not perfectly matching, and with proper incubation time. In this study, the transit through the stomach is dramatic for AgNPs, which are dissolved almost completely (95%). This result is higher than the prediction from Liu et al. Following transit through simulated GIT, large aggregates/agglomerates as well as nanosized objects are observed by TEM following incubation in the intestine juice but no detectable AgNP surface plasmon resonance signal has been detected meaning that the intestine media favors the formation of precipitates most likely of AgCl. This is corroborated by another work that showed the formation of AgCl precipitates upon AgNP exposure to HCl [96]. Another study analyzed AgNP or AgNO₃ fate in a similar simulated GIT in presence or absence of proteins [97]. The overall results are similar to Bove et al. but in their conditions the presence of proteins inhibits the massive dissolution of AgNPs in gastric juice that form large clusters containing Ag and Cl. Afterwards, in the intestine juice particles containing only Ag and with the same size as primary NPs are found back. In the case of AgNO₃, NPs containing Ag, Cl and S are found in the intestine juice. Overall, these studies showed that AgCl is the main speciation for Ag in the intestine following AgNPs or Ag salt ingestion. AgCl particles/precipitates are probably in equilibrium with soluble species but it remains difficult to predict which form(s) are absorbed by the intestinal barrier (Fig. 5). Besides, soluble organothiol-Ag(I) or Ag(I)-protein complexes can form from AgCl and can also be translocated towards blood. If this is true, we can go further in this idea and wonder if there is any interest in looking at the impact of pristine AgNPs on cells in a context of AgNP dietary contamination.

3.1.2. *In vivo* experiments

Several studies analyzed the distribution of Ag following oral administration of AgNPs or an Ag salt during several days to rodents [93,94,98,99]. A consensus arises with a main accumulation in liver and spleen but a controversy exists concerning the Ag species that are absorbed, *in vivo*, at the level of the intestinal barrier between AgNPs and/or Ag(I) [93,94]. The comparison between AgNP and Ag salt exposure revealed a similar

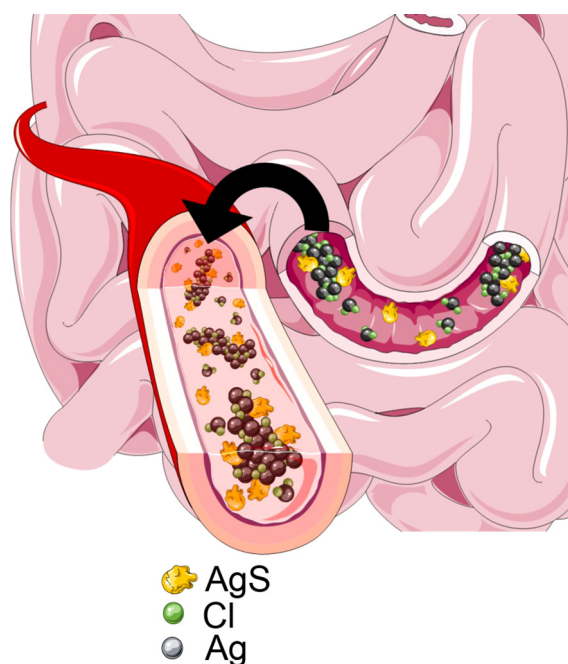


Fig. 5. Schematic representation of the putative Ag species in the intestine that could be transferred to the blood. Illustration made thanks to the Servier Medical Art: Banque d'illustrations médicales. URL www.servier.fr.

biodistribution of Ag but the amount of Ag in the different organs is much lower for rats exposed to AgNPs. This is in agreement with an indicator of a higher fecal excretion following administration of AgNPs [93]. In both studies [93,94], silver uptake in blood and organs was higher with an Ag salt than with AgNP exposure. Van der Zande and co-workers analyzed AgNP uptake data taking into considerations only the fraction of soluble silver present in the AgNP solution administered to the rats. With this analysis, a similar amount of Ag uptake by rats exposed to AgNP or an Ag salt was found. Their hypothesis is thus that upon oral exposure to AgNPs, mainly or even exclusively the ionic fraction of Ag is absorbed. This is very interesting but in complete discrepancy with the work on AgNP dissolution in model GIT from Bove et al. [95]. Indeed, in the study from Van der Zande, rat GIT would not trigger AgNP dissolution to explain their data, which would be unlikely to happen. Loeschner et al. only found a 2 to 3-fold difference in amount of Ag in the different organs as well as in blood and intestine following oral exposure of rats to Ag salt compared to AgNPs [93]. Since their AgNPs contain 11% of Ag(I) species, this is not enough to explain this difference in amount of Ag absorbed by rats with Van der Zande's hypothesis. In Loeschner's study, the authors choose to expose rats to the same dose of Ag in NP or ion forms as opposed to other works [94]. The high difference measured by Van der Zande et al. between AgNP and Ag salt absorption could thus be due to saturation of intestine Ag absorption in the presence of high concentration of Ag upon exposure to AgNPs (10 times higher Ag concentration compared to Ag salt exposure). Therefore, ingested AgNPs would be highly dissolved in the GIT and different forms of Ag(I) species complexed with chloride and/or thiols are crossing the intestinal barrier and are distributed in the body *via* the blood. Absorption of Ag from AgNP oral administration in mammals was estimated to be in the range of 1–5% [99,100]. Besides, following oral administration, the form of Ag present in different organs has been analyzed by TEM-EDX (Energy Dispersive X-ray spectroscopy) and single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) [93,94,98]. SP-ICP-MS enabled the detection of AgNPs of 20–30 nm in diameter in liver, spleen, stomach, lungs and intestine [94].

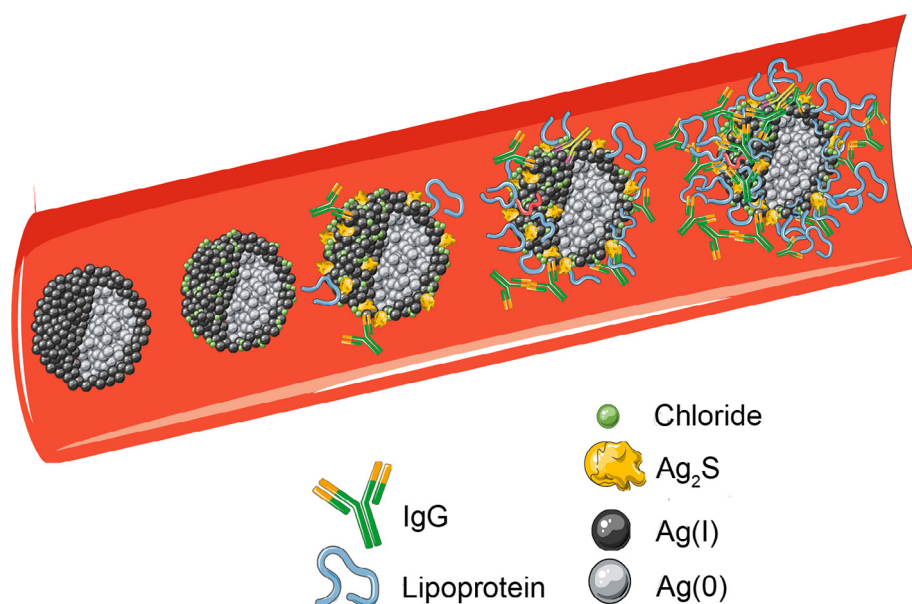


Fig. 6. Schematic representation of AgNP blood transformations following parenteral administration. Illustration made thanks to the Servier Medical Art: Banque d'illustrations médicales. URL www.servier.fr.

Unfortunately, this method could not provide the information on the elemental composition of these nanoparticles but Ag. Using TEM coupled to EDX, it was possible to identify particles in the range 20–30 nm that contain at least Ag and S in the liver and Ag, S and Se in the ileum [93,98]. However, similar particles, in size and amounts, were observed following exposure to AgNPs and Ag salts. Therefore, similarly to the results described with GIT ageing models, non-primary NPs containing silver and sulfur are formed *in vivo* following AgNP dissolution in the GIT. It is yet unclear whether AgS-NPs are formed in the intestine before translocation to the blood and distribution in the whole organism or if soluble Ag(I) species would cross the intestinal barrier and would be uptaken in the different organs where AgS-NPs are formed.

3.2. AgNP fate in blood

Whatever the administration mode, the different Ag species arriving in blood will be exposed to a variety of proteins (albumin, lipoprotein, IgG, etc), small thiol ligands and ions such as chloride (Fig. 6). These species should bind soluble Ag(I). However, in the case of small thiol molecules an equilibrium in favor of the disulfide oxidized form exists. For example, total GSH is present in hundreds of micromolar concentration in plasma but reduced GSH only between 10 and 80 μM [101,102]. However, free reduced thiols are present in several hundred of micromolar in plasma [102].

Many Ag species should co-exist in the blood especially when AgNPs have been ingested and thus highly transformed (see Section 3.1). Equilibrium between species could be modified upon AgNP blood entrance as the composition of medium is very different between intestine and blood. Understanding the equilibrium displacement following compartment translocation is probably a keypoint to determine which species is/are predominant(s) and thus the potential toxicity in the new compartment. Liu et al. analyzed exchange between Ag-GSH and AgCl to model displacements that are likely to occur in blood [55]. *In vitro*, AgCl precipitates are dissolved by GSH to form most likely Ag-GSH complexes that can be either monomeric or multimeric. However, the analysis was only done by dynamic light scattering and conclusions are drawn based on the evolution of the diameter of the main species. Therefore, there is no clear speciation determined and non-predominant species are neglected in this work.

3.2.1. Differences in AgNP fate in blood between ingestion and parenteral exposures

Species arriving in the bloodstream can vary a lot depending on the administration mode and this can modulate Ag species fate in blood and the whole organism. It has been highlighted by Ag biodistribution studies following AgNP orally or intravenously administered a great difference in terms of Ag clearance. A single dose of AgNPs at the same concentration led to about 10 times higher blood concentration if administered intravenously compared to oral exposure, as it is expected [99]. Ag is also rapidly excreted after oral administration, while the level of Ag in blood remains quite constant for 5 days after AgNP injection [99,103] before decreasing gradually over time [103]. It has a great impact on the amount of silver accumulated in organs that is 10 to a thousand times higher, in the case of liver. Ag amount in the different organs tested also remains quite constant for at least 1 month [99,103].

Dziendzikowska et al. also observed NPs in lung, spleen, liver, kidney and brain in TEM sections of rat tissues following intravenous injection of AgNPs [103]. However, they did not perform EDX analysis, which would be required (i) to prove that these are AgNPs and not just osmium (Os) deposits, for instance, and (ii) to identify if these are pristine AgNPs or if it could be AgS-NPs. This difference in silver organism excretion is most probably due to the Ag speciation. As explained in the previous Section 3.1, ingested AgNPs are highly transformed and arrive in the blood in Ag(I) redox state as mixed AgSR, AgCl, and/or Ag-protein species in soluble and/or particle forms. Soluble species are easily excreted out of the body and particle made of Ag(I) are easier to mobilize than Ag(0), the main form in injected AgNPs. Indeed, upon Ag(I) soluble species excretion, chemical equilibrium will drive Ag(I)-particles towards dissolution into Ag(I) soluble species. This kind of process will favor Ag(I) species excretion, while Ag(0)-particles requires an oxidation step before excretion of Ag(I) species. Therefore, Ag speciation not only matters for cellular impact but also for biodistribution and clearance.

3.2.2. AgNP transformations in a context mimicking wound dressings

In order to precisely analyze both AgNP and Ag(I) species and to be able to quantify them, methodological developments have been performed recently to study AgNP fate in the blood in the context of the use of Acticoat™ that are wound dressings for burn patients

and which are made of polyethylene fibers coated with a layer of uncapped AgNPs of 10 nm diameter [104]. Hydrodynamic chromatography coupled to SP-ICP-MS enabled to analyze and compare the fate of Ag(I), 10 nm PVP-coated AgNPs and Acticoat™ after 2 h incubation in solution containing human albumin or in whole human plasma. These analyses were substantiated with X-ray absorption spectroscopy (XAS) in order to determine speciation. In the case of Ag(I), it is mainly bound to thiol in the presence of albumin, while contrary to the study from Liu et al. [55], when Ag(I) is mixed with plasma, it mainly forms AgCl species. PVP-coated AgNPs also seem more robust than in other works, since they mainly remained in the NP form both in the presence of albumin and diluted in plasma. Only 7% of Ag are bound to thiols in the presence of albumin. Acticoat™ is the most relevant part to simulate medical device exposure. After 2 h of incubation in plasma, only 32% of the Ag atoms from the Acticoat™ are still in the Ag(0) state. The main species is AgCl, 59% and Ag-thiol are also present for 10% of the Ag species. These results add an unexpected level of complexity and are surprising compared to other *in vitro* studies that would predict a majority of Ag-thiol due to the affinity and abundance of molecules such as GSH in the blood. Besides, μ XANES analyses were performed to determine speciation at the level of the particle itself. The map showed a non-uniform distribution of Cl at the border of the particle and S is present at the periphery between the NP and the surrounding media. Altogether, this original study proved the possible co-existence of at least three different forms of Ag in plasma but only in the case of exposure to acticoat™ that contains uncoated AgNPs. Besides, these different species are bound to the NP meaning that this dynamic involving AgNP transformation, surface oxidation, equilibrium displacement, ligand exchange, etc, occurs at the surface of the NP. AgNP surface is clearly an interface for exchange of species due to the presence of Ag(I) in aerobic conditions. These surface chemistry processes are therefore the key in the understanding of AgNP fate in biological media and we have to integrate coordination chemistry concepts at a solid/liquid interface. Therefore, AgNP fate in blood is highly complex since various Ag species can be considered and even 2 types of pristine AgNPs can have a completely different behavior in blood as seen in the case of Acticoat™ compared to standard PVP-coated AgNPs. On top of that, medical device can contain different forms of silver that are not all nanoscale.

4. AgNP fate at the cellular scale

As previously described, different forms of bioavailable Ag are trafficking in the blood: (i) AgNPs coated with a corona, (ii) AgCl

or AgSR precipitates; (iii) organothiol-Ag(I) soluble complexes and (iv) soluble Ag(I)-halide complexes mainly chloride most probably with a predominance of AgCl_2^- .

4.1. AgNP cellular uptake mechanisms

Cellular uptake has been widely studied for different types of AgNPs in their pristine form and a consensus emerged for endocytosis-based entry. Indeed, TEM images enabled to capture events of membrane invagination engulfing AgNPs (Fig. 7). Studies have been performed in macrophages, cells expert in phagocytosis [28,105] but also using other cell types, pulmonary [85], ovarian [26] and others as well as in model organisms: *C. elegans* [106] and *P. ulvae* [107]. However, no specific pathway has been identified for AgNP uptake, even for a specific type of AgNP (size, shape, coating). The assessment of the endocytosis pathways used by AgNPs has been asked using various compounds inhibiting the different known pathways: clathrin and caveolin endocytosis, pinocytosis, and phagocytosis [26,85,105–109]. Furthermore, in *C. elegans* a combination of chemicals and strains deleted for specific genes involved in endocytosis were used [106]. None of the inhibitors were able to completely abolish AgNP uptake in mammalian cells or model organisms, even in the case of the strain deleted for the gene responsible for endocytosis initiation in *C. elegans* where redundancy is rare. The inhibition of AgNP entry is in the range between 0 and 60% and only 4 °C incubation, a condition that stops the metabolic activity of the cell, can abolish AgNP uptake [26,85,109]. AgNP uptake is therefore an active process, although a small fraction of the AgNPs can last due to non specific sticking to cell membranes. Apart from this, it is impossible to find a clear consensus for AgNP uptake pathway because the inhibitors used are not always the same and depending on the cell type different mechanisms can be leading. Clathrin, caveolin and actin-dependent processes have all been described but the major effects have been observed for lipid raft-mediated endocytosis and actin-dependent phagocytosis and/or macropinocytosis. Interestingly, Wang et al. take advantage of the particular photophysical properties of AgNPs that have a SPR signal with a maximal wavelength shifting in function of its neighboring environment [105]. This signal was followed by confocal microscopy in order to visualize the aggregation state of AgNPs upon uptake by the J774 cells. Two levels of differentiation co-exist in this cell line, monocytes and macrophages. The use of specific endocytosis inhibitors provided more qualitative information compared to the other studies. In this case, the authors revealed a clathrin-dependent endocytosis in which NPs are not agglomerated and which probably occurs in

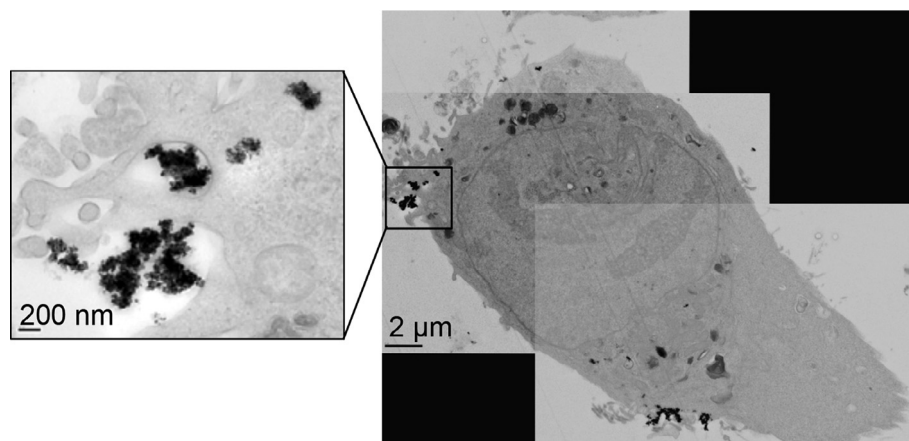


Fig. 7. Visualization of an endocytosis event in the hepatoma-derived cells HepG2 exposed to 50 μM citrate-coated AgNPs.

the monocyte-like cells. A second mechanism, actin-dependent, leading to compact clusters of AgNPs is performed by more mature macrophages. Besides, in these cells AgNP uptake is mediated by scavenger receptors that are maybe one of the key to explain this diversity for AgNP uptake mechanisms. Scavenger receptors are a wide family of receptors involved in various functions, major ones are related to immunity (for review see [110]). These receptors are expressed predominantly by myeloid cells but not only and recognize a variety of ligands, including endogenous and modified host-derived molecules and microbial pathogens. Scavenger receptor intracellular trafficking is complex and still under study but they are internalized by different mechanisms of endocytosis and phagocytosis [110,111]. Scavenger receptors may not be a unique solution to this question of AgNP uptake but, at least, they allow to reconcile this puzzling problematic. It also enables to explain some of the effects observed following AgNP exposure such as inflammation triggering or oxidative stress enhancement. Indeed, scavenger receptors can trigger specific intracellular pathways upon extracellular binding, such as interleukin production or NADPH oxidase activation [110,111]. Shannahan et al. studied the role of scavenger receptors which are known to recognize proteins present in corona, such as lipoproteins or albumin. These receptors could thus mediate the cellular uptake of corona-coated AgNPs and the further activation of the cell. However, they showed that an inhibitor of these receptors has a similar or more effect on the uptake of uncoated AgNPs that is limiting the conclusions of this work. Furthermore, this inhibitor has a minor effect on cell viability but completely abolishes IL-6 activation upon exposure to AgNPs coated or not with a corona. In this study, the main effect demonstrated is the activation of scavenger receptors by any types of AgNPs that triggers IL-6 activation.

4.2. Possible cellular entry mechanisms for the different Ag(I) species

In order to explain the limited effect of all the endocytosis inhibitors, another idea missing in the literature is the possible uptake of Ag(I) species in the form of organothiol complexes or soluble AgCl_x . Indeed, one can consider a slow dissolution of AgNPs over the exposure period releasing low amount of bioavailable Ag(I) in the extracellular media. Based on our previous analysis several forms can be considered. Due to the concentration of chloride of more than 100 mM, free Ag(I) should be negligible, while it would easily enter into cells *via* the Ctr1 protein [112]. Ag(I) can also be bound to amino acids, peptides and proteins mainly through thiol binding. Depending on the cell type different transporters can be expressed in the cell membrane such as peptide transporter that could maybe transport GSH or Cys bound to Ag(I), for instance. Finally, AgCl_x species, predominantly AgCl_2^- , should also be present in solution and/or bound to the NP surface. However, it is hard to predict whether this species can be undertaken by a specific membrane transporter for cellular uptake. Ag exchange could also happen between AgCl_x and high affinity sulfur ligand from ion transporter such as Ctr1 that would drive Ag(I) intracellular uptake [112]. Released Ag(I) was taken into consideration by Gliga and co-workers [85] that determined the amount of released Ag(I) in cell culture media as previously described (see Section 2.3). They recovered the supernatant from cell culture media incubated for 24 h with AgNPs and applied it to BEAS-2B cells [85]. They found no toxicity and suggested that the toxic effects observed after 24 h incubation with AgNPs were not related to extracellular Ag release in cell medium. Nonetheless, they only determined cytotoxicity and did not measure the amount of uptaken Ag, while upon AgNP exposure both endocytized AgNPs and externally released Ag(I) could contribute to the cytotoxicity. Therefore, Ag(I) may not be the predominant species taken up by the cells but it could anyway contribute to the toxicity induced by AgNPs. The

decrease of toxicity induced by N-acetyl cysteine has been attributed to Ag(I) chelation by Guo et al. [113], although this molecule can also scavenge reactive oxygen species (ROS). Moreover, this is not a proof of the contribution of Ag(I) released outside cells to cytotoxicity because this molecule is cell permeant and can thus also chelate intracellular Ag(I) to protect cells. Similarly, De Matteis et al. used dithiopropanol that decreased ROS generation by AgNPs [25] but again this is not conclusive for the impact of externally released Ag(I) since this molecule as both Ag chelator and ROS scavenger capabilities. In order to test this hypothesis we would need to use a strict silver chelator that is cell impermeant.

4.3. Intracellular AgNP fate

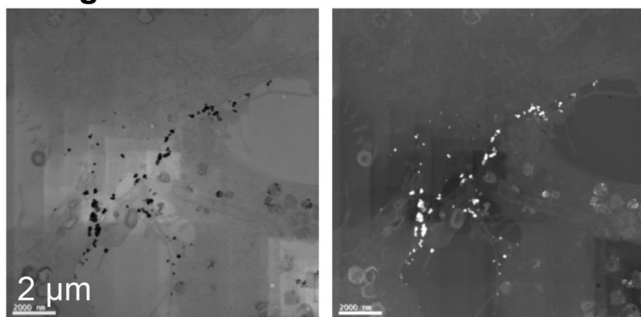
4.3.1. Endosomal AgNP dissolution

As shown previously, following endocytosis, the protein corona is released and AgNPs become “nude” with Ag atoms exposed to the endosomal media. Besides, a whole process of vesicle maturation will start, which includes pH decrease inside the vesicle. As shown *in vitro*, protons are promoting AgNP dissolution with a typical oxidative dissolution mechanism [46]. It has not been described *in cellulo* whether oxygen-active species are produced inside endosomes and/or lysosomes to favor AgNP dissolution but AgNPs are readily dissolved into Ag(I) species within endosomes and lysosomes [29]. Indeed, TEM analysis of cell sections following exposure to AgNPs showed the decrease of AgNP size upon endosome maturation (Fig. 8B and C). In the example presented in the Fig. 8A, the input particles were about 100 nm diameter and after 24 h exposure of HepG2 cells, we observed large lysosomal vesicles containing lots of very small particles with individual size up to 20 nm. TEM analysis also allowed to reveal PVP-coated AgNPs at different stages in the process of cellular transformation in the same cell (Fig. 8). Individual AgNPs stacked at the interface between two cell membranes (Fig. 8A), early endosomes containing large AgNPs packed together on the endosome membrane and very small NPs (Fig. 8B), and late endosomes containing very small AgNPs (Fig. 8C). Different figures like that co-exist within a cell and for an unknown reason these vesicles are driven towards nuclei upon maturation and usually ends-up perinuclear. EDX analysis proved that the dense spots contain Ag. We show in Fig. 8 both dark and bright field images from STEM in order to show the interest of dark field imaging to detect metals. Metals appear very bright under dark field, while bright field does not give such a high contrast between light and heavy elements. These observations have been corroborated by X-ray fluorescence microscopy performed on the ID16B beamline at the ESRF with images taken at resolution between 70 and 200 nm [29]. The comparison of X-ray fluorescence (XRF) imaging after 6 and 24 h of exposure revealed the increase of the size of silver hot spots corresponding to the fusion of endocytic vesicles upon maturation towards lysosomes that contains AgNPs being dissolved. XRF imaging has a limited resolution compared to electron microscopy that highlights the fate in terms of shape and size of individual AgNPs but the main power of XRF is the capability to also visualize soluble Ag(I) species. In this study we were thus able to visualize for the first time the distribution of Ag(I) throughout hepatocytes following AgNP endo-lysosomal dissolution.

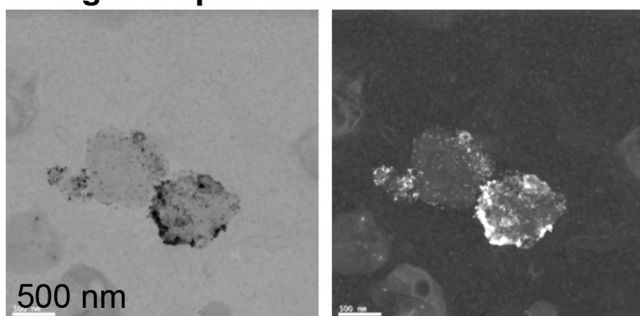
4.3.2. Chloride and sulfur binding to AgNPs in endosomes

Proton increase inside vesicles is not the only determinant for endocytosis completion. A chloride import is also required [114] and it has been measured that chloride concentration increases from 20 to 30 mM in early endosomes up to 50–70 mM in late endosomes, which have pHs of 7 and 5.5, respectively [115]. Oxidative dissolution can thus be favored by the increase in chloride concentration since higher concentration of chloride favors the

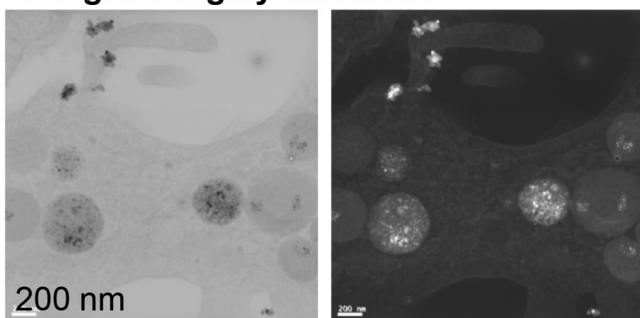
A- AgNPs between cells



B- AgNPs upon dissolution



C- AgNPs highly dissolved



Bright field

Dark field

Fig. 8. PVP-coated AgNPs at different stages in the process of cellular transformation in HepG2 cells exposed for 6 h to 100 μ M AgNPs coated with PVP.

production of soluble AgCl_x species. The equilibrium can thus be displaced towards AgNP dissolution into Ag(I) species that can be transported across endosome membranes and distributed through the cell as shown by XRF microscopy [29]. We make the hypothesis that chloride may participate in AgNP surface modification and further Ag(I) release inside endosomes because we observed the presence of Cl in these particles and, in some cases, Cl was also present for both types of AgNPs (Fig. 9A, C and D). In hepatocytes exposed to, either PVP- or citrate-coated AgNPs, we identified intracellular vesicles containing NPs. STEM coupled with EDX enabled to confirm the presence of Ag in these particles and, in some cases, Cl was also present for both types of AgNPs (Fig. 9A, C and D). Besides, in the case of PVP-coated AgNPs, sulfur was also present close to some NPs, while sulfur signal is very low, even close to background level in the case of citrate AgNPs. We assume that due to their lower colloidal stability in cell culture media, clusters of citrate AgNPs with protein corona is also covered by chloride before cell uptake limiting the amount of thiol molecules that can tightly bind to them. In Fig. 9B, we also show late endosomes with highly dissolved/transformed AgNPs that does not show significant signals for S or Cl close to the NPs. It is not easy to explain why but we can suggest different

hypothesis that would have to be further assessed. It could be due to the highly advanced dissolution process that already depleted these vesicles in free reduced thiol molecules. The surface of these very small AgNPs may also be not covered by Ag(I). Finally, this very small size is drastically decreasing the amount of surface thiol molecules and/or chloride that can be bound to the surface, maybe decreasing S and Cl EDX signal to background levels. Interestingly, we also found PVP-coated AgNPs bound to the cell surface before entry (Fig. 9C). EDX analysis showed the presence of Cl co-localizing with Ag from the NPs and low sulfur signal that could be the signature of the protein corona.

4.3.3. What type of Ag(I) species can be present inside endosomes?

However, a question mark remains in the identification of the type of soluble Ag(I) species located inside endosomes as well as the mechanism/transporter through which they cross the membrane towards cytosol. Indeed, several XAS studies performed on cell pellets showed the presence of two main species inside cells: AgSR_x and AgNPs [26,29,74,116]. The ratio between both depends on the cell type, the type of NPs used and the exposure time. These data mean that the thermodynamic stability of organothiol-Ag(I) complexes drives intracellular released Ag(I) towards thiol binding. mRNA quantification following AgNP exposure showed the high overexpression of MT and to a lower extent of GCLM. Besides, GSH is the most abundant thiol molecule in the cell, present at millimolar concentrations. Therefore, we and others made the hypothesis that GSH in a first instance and then MT following its overexpression are binding Ag(I) intracellularly released in mammalian cells exposed to AgNPs [24,29,116]. This mechanism can become a problem for the cell as soon as intracellular thiol molecules are overloaded since they are involved in the defense against oxidative stress. The intracellular concentration of ROS will thus increase and will generate cellular damages. This is one of the main commonly assumed causes of AgNP cytotoxicity. Besides, thermodynamic equilibrium will drive Ag(I) towards thiol binding sites of higher affinity. Ag(I) could thus follow similar trafficking pathways than Cu(I) that, for instance, moves from copper chaperone, such as Atx1, to Cu-dependent enzyme such as SOD1 [76]. Excess Ag(I) can also replace thiol-bound Zn and perturbs Zn homeostasis that is essential for many cellular functions. Zn is the most abundant metal in the cell and its replacement is actually occurring upon AgNP exposure. This is the mechanism responsible for metallothionein overexpression. Indeed, Ag(I) ions are displacing Zn in resting MT and the released Zn(II) bind the transcription factor MTF1 that will translocate to the nucleus and induce the expression of different genes involved in metal detoxification including MT.

Two groups also managed to detect transient AgO species by XAS [26,116] that could be a necessary intermediate for AgNP dissolution in endosomes. The possibility to detect surface species by XAS is questionable since the signal of surface Ag is very limited compared to Ag(0) atoms in the NP. This is anyway not answering the key question of the identity of soluble species in the endosomes. It is difficult to identify transient and/or non predominant Ag species with XAS experiments performed on cell pellets. Data analysis mainly consists of linear combination fitting of spectra of different standard species, which means that it is meaningless to add a component for low abundance species as well as to put lots of components. This strategy can improve the fit but would not be a proof of their presence *in cellulo*. These limits could be circumvented by the use of μ XAS that should allow to analyze the speciation of an element, *i.e.* Ag, in a specific location in the cell, such as in the endosomes. The problem with dissolved species is their low concentration that lead to noisy spectra and the increase in acquisition time hardly preserve the speciation even under cryo-conditions.

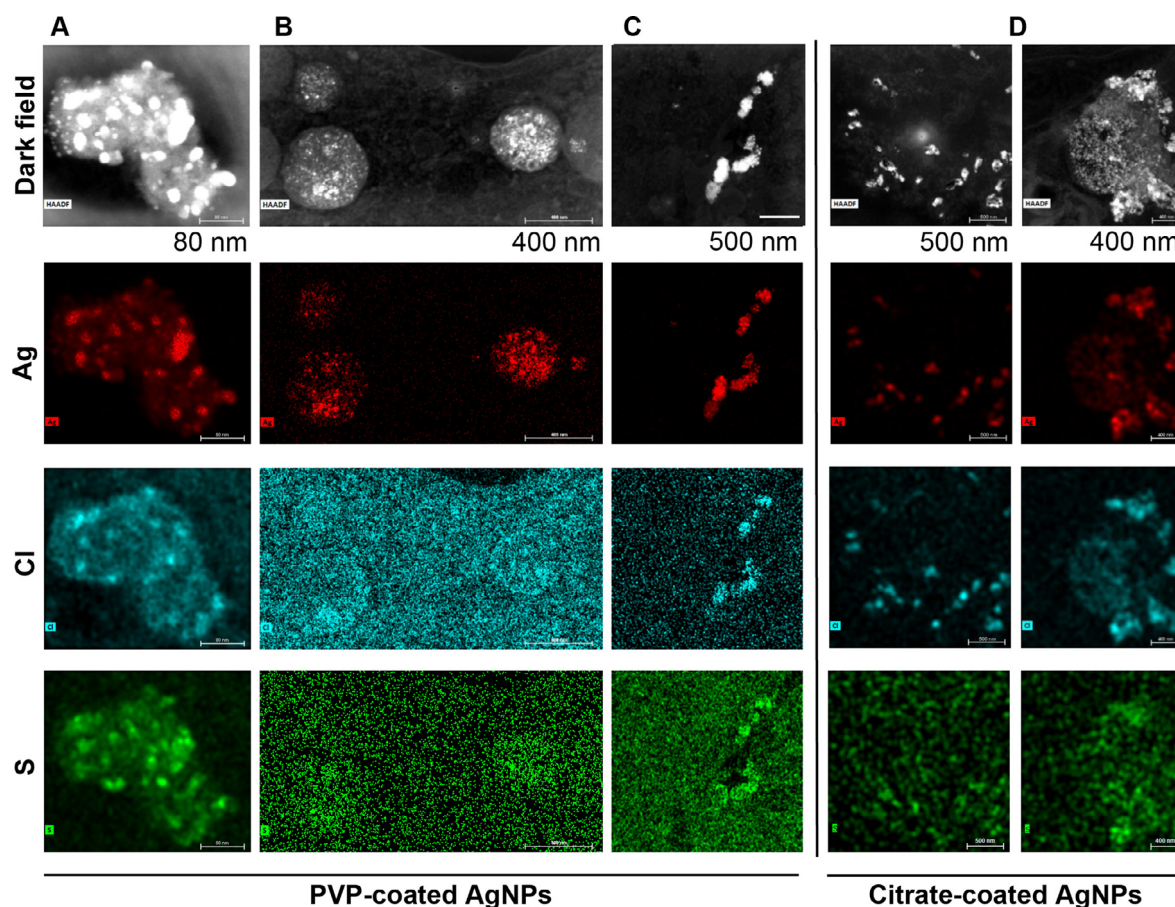


Fig. 9. STEM-EDX of HepG2 cells exposed for 6 h to 100 μ M AgNPs coated with PVP (A–C) or 50 μ M AgNPs coated with citrate (D).

4.3.4. AgNP sulfidation can occur in mammals in specific cell types or biological context

Contrary to this acidification-induced AgNP dissolution, some cell types have the ability to implement a mechanism to sulfidize intracellular AgNP in order to protect, at least an organ. Indeed, sulfidized AgNPs is a form of non-toxic silver. It has been shown that microglial cells that are brain immune cells responsible for protective inflammatory reactions induce the expression of cystathionine γ -lyase (CSE) upon AgNP exposure [117]. CSE is one of the enzymes able to synthesize a source of sulfide in the form of H_2S . The production of H_2S readily sulfidizes AgNPs as demonstrated by electron diffraction. Thus, AgNP exposure did not lead to ROS production in the cell and no cytotoxicity was observed, while cells were exposed to a high concentration of Ag, about 500 μ M. As a comparison, the same concentration of AgNPs was cytotoxic for dopaminergic neurons. Interestingly, the same sulfidation mechanism was observed for silver nanowires in alveolar epithelial cells [118] as well as in the case of bone regeneration from titanium implant coated with AgNPs [119]. In the latter case, related to medical use of AgNPs, silver released from the implant is sulfidized in the newly formed osseous tissue. Silver sulfidation mechanism could therefore be more widespread than expected and there is still a lot to do to identify the cell types and the conditions inducing it.

4.3.5. AgCl crystal is a source of bioavailable Ag(I)

Interestingly, the toxicity of Ag(I) nanoparticles in the form of AgCl-NPs were compared with Ag acetate for different prokaryotes and several mammalian cell lines [120]. Homogenous NPs about

100–150 nm were obtained with a good stability for at least a week in cell culture media. The same toxicity levels were found with the NP and the salt form for the different strains and cell lines assessed, which would mean that AgCl-NP is the state for Ag salt in cell culture media that provides bioavailable Ag(I) with a fast kinetic. These data are indicative of the toxic potential of Ag(I) solubilized from NPs even in conditions inducing AgCl precipitation.

4.3.6. AgNPs and their by-products cellular excretion mechanisms

Overall AgNP transformations before cellular entry and AgNP fate within the cell, even not fully understood, have been thoroughly described but the processes involved in the excretion of AgNP by-products are not known. Wang et al. imaged human monocytes (THP1 cell line) and analyzed Ag speciation during both the uptake and what they called the exocytosis [116]. In this study, different imaging techniques were used and showed that the amount of silver inside cells decreases as soon as AgNP exposure is stopped. In addition, TEM revealed the presence of NPs close to the cell but in sort of vesicular structures that, for the authors, have been secreted by the cell. However, this analysis is based on 2D imaging of cell sections that does not enable to visualize a possible connection of these vesicles with the cell and without EDX confirmation of the elements present in the NP-like structure. Therefore, it is not clear which kind of species are excreted out of the cell following AgNP exposure. It would be very interesting to know whether these species still include a NP structure, or are purely precipitated Ag(I) species or a mixture of both. In addition, the presence of S and/or Cl could have been also assessed. These are really critical points to analyze but the majority of cellular studies

are performed on 2D cell cultures and these are probably not the best systems to analyze excretion. Three dimensional cell culture systems with polarization and functional excretion pathways would be more appropriate. This is most probably the kind of studies that will be developed in the near future. At the level of the organism (mice, rats), it has been shown that Ag is readily excreted from most of the target organs, except brain and testis. We now need to understand how this is performed at the cellular and molecular levels.

4.4. Mitochondrial and nuclear localization of AgNPs

4.4.1. Conventional electron microscopy analysis

As previously described, it is currently accepted that AgNPs enter cells *via* different endocytosis mechanisms. Subsequently Ag(I) species are released upon endosome maturation with pH decrease that favors oxidative dissolution. The most convenient and easily accessible method to analyze AgNP subcellular distribution is TEM. Usually, cells are chemically fixed after AgNP exposure, stained with heavy metal (Os and uranium (U) and/or lead (Pb)) and included into a resin. Sections of the cells included into the resin block are cut before observation on the TEM. Cellular membranes are visualized thanks to Os and organelles can thus be identified easily. In our experiments and in most of the cases, AgNPs are observed in endosomes and lysosomes but some studies showed mitochondrial and nuclear localizations. Yang et al. observed AgNPs inside swollen mitochondria that is a clear sign of cell death [121]. In this situation it is known that mitochondrial membranes become highly permeable (for review see [122–124]) and AgNPs could easily enter into without using an active mechanism. Similarly AshaRani et al. observed AgNPs both in mitochondria but also in the nucleus [125] and Kim et al. also reported AgNPs located in the nucleus [126]. However, in these studies no EDX has been performed to prove the nature of these dense particles. On the other hand, the vast majority of the studies that looked at AgNP cellular distribution did not find AgNPs neither in the mitochondria nor in the nucleus. Butler and co-workers used TEM coupled to EDX to analyze electron-dense particles [127]. In this work, particles containing some Ag were only found in endosomes and lysosomes and the authors claimed that many electron dense spots are generally Os particles generated by the sample preparation protocol that can be anywhere within the cell. This is a first explanation for the singular mitochondrial and nuclear AgNP localization since no EDX has been performed in these studies [125,126]. Another explanation could be the impact of section preparation. TEM sample preparation laboratories are used to prepare this kind of cell sections with a thickness of 80 nm. Our experience shows that very few particles are observed in 80 nm compared to 200 nm thick sections prepared from the same cells. This is not surprising as soon as we work with particles with a diameter larger than 40 nm there is a high probability to cross a particle with the diamond knife during the sectioning. Due to their high density and small size, AgNPs can just be pulled out by the knife and therefore not observed under EM or simply moved to another location leading to misinterpretation. Therefore, we usually use sections of thickness between 150 and 250 nm, although the resolution is lower.

4.4.2. Optical versus electron microscopy

Optical microscopy was also used to perform low resolution co-localization studies between AgNPs and the different subcellular compartments [25,128]. This method is more quantitative because several cells per field can be observed and the cells are entire and not sectioned. With this method, AgNPs were only observed co-localizing with endosomes and lysosomes. Indeed, TEM is hardly quantitative and with cell sections it is even worse as we are only looking at a fraction of the cell. Statistics concerning the number of

events and cells observed are usually not provided in TEM studies. However, micrographs showing 1 particle in 1 cell nucleus are anyway not statistically significant. Finally, if we simply consider the physics of nuclear pores, their permeability in terms of passive diffusion has been assessed with proteins [129] and dextrans [130] providing diameters about 5 and 10 nm, respectively. Therefore, it could be possible that AgNPs up to 10 nm but probably less because of their global charge could reach the nucleus but this does not seem to be an active mechanism in the cell since most of the studies did not observe AgNPs in the nucleus. AgNPs could also be trapped in the nucleus during the mitosis process, but this phenomenon requires their presence in the cytosol while AgNP trafficking in the cell is vesicular. Wang et al. also observed an effect of AgNPs on RNA transcription that is proposed to be due to the direct interaction of AgNPs with the RNA polymerase in the nucleus [131]. Based on pull-down assays, the authors claimed that the inhibition of the polymerase would be due to a direct interaction with AgNPs, which would have to be in the nucleus. However, this is not a clear proof of the presence of AgNPs in the nucleus and considering the very low frequency of this kind of event in the numerous EM studies published, there would not have enough AgNPs in the nucleus to drastically inhibit the RNA polymerase but Ag(I) species could better do it. As a comparison 35 nm AgNPs conjugated with a nuclear localization signal (NLS) are readily and massively transported to the nucleus [132], while non NLS AgNPs are found dispersed in the cell. Therefore, even bigger than the nuclear pore, AgNPs can be pushed towards nucleus by an active mechanism involving importins and in this case AgNPs are not scarce inside. Overall, the impact of AgNP exposure on nuclear functions could merely be explained by Ag(I) species without any contribution of AgNPs translocated into the nucleus. Indeed, it would be similar to prokaryotes in which only Ag(I) enters cells and affects cellular functions including DNA-related ones.

AgNPs in the mitochondria have been less observed and it could only happen in cases of cell death since the inner mitochondrial membrane is very tightly sealed to be able to generate a proper proton gradient that is required for cell respiration [133]. Targeting metal particles to mitochondria has also been tested for nanomedicine purposes but remains extremely challenging and requires conjugating with targeting compounds [134].

4.5. Summary for AgNP fate at the cellular level

From the Section 3, it is clear that the Ag species the cells will be in contact with, will depend on the exposure mode, *i.e.* ingestion, inhalation or parenteral, but the general cellular mechanisms are summarized hereafter and described in Fig. 10. At the cellular level, AgNPs can enter cells *via* various endocytosis mechanisms, while cellular uptake mechanisms for soluble Ag(I) species in the form of organothiol and/or AgCl_x complexes have not been investigated so far. It has only been shown the uptake of Ag(I) *via* Ctr1 in the context of an Ag salt exposure. The uptake of Ag from Ag(I) or mixed Ag(0)/Ag(I) precipitates also remains elusive. Is it a simple question of equilibrium that drives the dissolution of precipitates to soluble organothiol-Ag(I) or AgCl_x species which are uptaken by the cell or are these precipitates endocytized? Further experiments are required to solve this issue, ideally performed in biologically relevant conditions in order to build comprehensive models similar to those described for Pt complexes, for instance [19].

Inside cells, two main species for Ag co-exists: AgNPs made of Ag(0) and organothiol-Ag(I). The ratio between both depends on the exposure concentration and duration, and on the cell type. The main process involves the dissolution of AgNPs into Ag(I) inside endo-lysosomal vesicles. This mechanism is triggered by proton and the concomitant increase in chloride concentration during lysosomal maturation process can also favor the release of

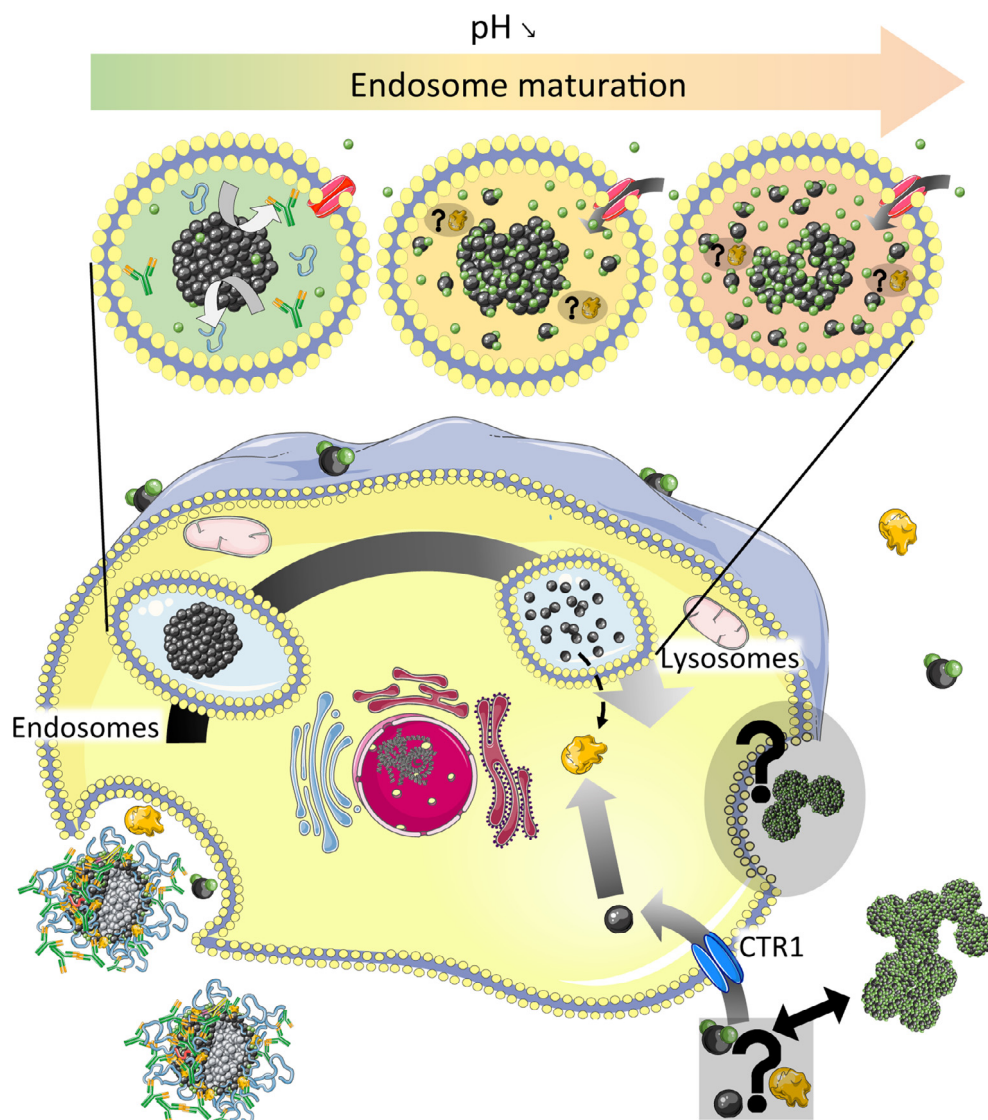


Fig. 10. Summary of the current knowledges about AgNP fate at the cellular level. AgNPs are endocytized, while Ag(I) may, at least, be uptaken by Ctr1. Upon endosome maturation, pH decreases and chloride concentration increases. Both phenomenon favor AgNP dissolution into Ag(I) species. The identity of these Ag(I) species is still unknown. In the cytosol, Ag(I) is mostly complexed by thiol (in yellow), GSH and MT in a first instance and these complexes are distributed throughout the cell.

soluble AgCl_x species. However, it remains to be identified the type of soluble Ag(I) species formed in these vesicles and the mechanism(s) used to exit them for diffusion throughout the cell. Within the cell, organothiol-Ag(I) complexes are predominant and the exchange of Ag(I) between thiol molecules towards binding site of higher affinities should drive Ag(I) into Cu(I) enzymes and thiol-based Zn(II) proteins of essential functions for the cell. This mechanism could therefore disrupt critical cellular processes. Finally, the mechanisms for the excretion of soluble or precipitated Ag(I) species or Ag(0), AgNPs for instance, are largely unknown and requires extensive investigations since they are critical to alleviate possible Ag poisoning in mammals.

5. Future developments for imaging and characterization of AgNP fate in *cellulo*

At the scale of the organism, metal distribution and especially copper has been extensively studied by positron emission tomography, in which speciation is also crucial [135]. As shown previously, higher resolution method have been preferred for the

study of AgNP fate in various organism studies such as EM performed on cell sections, XRF microscopy and XAS. These approaches are actually of interest for the study of various metallic NPs and we recently reviewed pioneer works on the fate of silver and copper and zinc oxide NPs in 2D cell culture systems [30]. Other powerful techniques that could lead to breakthrough in the field of “nanotoxicology” emerged in the last years. They already revolutionized other fields such as cell biology and their use for the study of AgNP fate in biological environment is promising.

5.1. Three dimensional EM-based method

Different instruments perform electron microscopy in three dimensions (3D-EM) instead of the conventional 2D imaging. Classically the sample is fixed chemically or using high pressure freezing to better preserve cellular structures but also elemental content that is crucial for the study of AgNP fate. Fixed cells are then included into a resin that can be trimmed for 3D-EM imaging. The method with the highest resolution in the 3 dimensions is the

Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscope (FIB-SEM, for review see [136]). In FIB-SEM, the surface of the sample is sequentially and iteratively imaged by SEM and abraded by gallium ions. The resolution is nanometric in plane and can go down to 2 nm in z, the resolution of the Ga gun for the abrasion. The alignment of the whole stack of 2D images enables the reconstruction of a 3D volume at a resolution down to 2 nm in the 3 dimensions. The quality of the alignment is one of the critical point in the volume reconstruction process. Very recently, FIB-SEM has been used to reconstruct human macrophages exposed to citrate-coated AgNPs [137]. As a proof of principle, the authors sliced a complete cell and found 3138 ± 722 NPs within a single macrophage cell. Most of the NPs were found in large agglomerates. 53% of all NPs were located in clusters with a size of at least 20 NPs. Only 9% of all AgNPs were found in clusters of one to five particles and 34 single AgNPs were detected. The method also provided the diameter of individual particles that was the same than initial AgNPs. However, this study is far from state of the art FIB-SEM applied to biological objects. First, the resolution in z is 40 nm for a question of acquisition duration most probably that is a clear limitation of FIB-SEM. This technique is anyway not high throughput and can hardly be used as a method to compare AgNP uptake in function of the cell types or of the type of NPs as proposed by the authors of this study. Besides, they admit the loss of intracellular structures due to their sample preparation, which limits the conclusions of this work concerning AgNP subcellular localization.

FIB-SEM could provide a complete 3D reconstruction of AgNP distribution within the cell at a few nanometer resolution. As discussed previously, controversies exist for the possible localization of AgNPs outside vesicles typical of endosomes or lysosomes. FIB-SEM is surpassing conventional EM-preparation artefacts and would thus clearly state about AgNP localization in nucleus, cytosol or mitochondria. From cell section images, it is also possible to see AgNPs in the cytosol, without surrounding membranes, but they can be missed under 2D-EM if the cutting plane is not orthogonal to the lipid bilayer. Under conventional TEM, we solved this issue by acquiring tilt images to find an appropriate angle to be sure of AgNP location as presented in Fig. 11 where the -40° image clearly showed the intravesicular localization of the NP compared to the other angles that are less conclusive. These limitations would be overcome with FIB-SEM. In addition it is possible to couple FIB-SEM with EDX as in conventional EM, which means that elemental composition of the observed NPs could be determined.

5.2. Optical microscopy, towards high resolution imaging of NPs

Confocal microscopy is widely used in cell biology for many purposes such as protein localization or trafficking pathway analyses. Its great force holds in the possibility to perform live cell imaging with good temporal resolution. In the case of nanoparticles,

such as AgNPs, that are not fluorescent but have good light scattering properties, it is possible to perform confocal reflectance microscopy (CRM, for review see [138,139]). Different modes of CRM imaging can be used: dark-field, reflection or differential interference contrast. CRM possesses the advantages to be easy to set-up, does not require tedious and laborious sample preparation and can be performed both on fixed cells or living cells. This method thus enables to follow the dynamic of the particles outside and inside the cells and therefore to track NP uptake, accumulation and subcellular distribution [140]. Besides, it can be coupled with standard confocal fluorescence microscopy that allows the colocalization of NPs with a sub-cellular compartment, for instance, thanks to fluorescent dyes specific of any organelle. Reflection and dark-field CRM already provided promising results with gold [140] and titanium dioxide NPs [141], respectively. However, conventional optical microscopy resolution is limited to 200–250 nm based on the diffraction limitation and this is similar or worse in the case of CRM. Super resolution microscopy broke new grounds in cell biology by reaching about 20 nm spatial resolution that leads to the 2014 Chemistry Nobel Prize [142]. Recent developments have also been made towards super resolution CRM. Structured Illumination Microscopy (SIM) has been developed in a reflectance version, called R-SIM and used to analyze metal oxide NPs distribution within a cell [143]. R-SIM reaches a resolution of 115 nm compared to 354 nm for conventional CRM that enabled to better resolve NP clusters inside endosomes and lysosomes. Another approach based on enhanced dark-field illumination has been used for super resolution microscopy of gold and silver NPs [144]. The authors achieved a resolution of 75 nm but have the challenge to reach 10 nm thanks to the plasmonic coupling effect inherent of these noble metal NPs. As a proof of principle, NP distribution in HEK cells has been obtained with higher resolution in xy compared to z. Interestingly, the authors also managed to resolve three individual particles at a distance close to 50 nm in a specific subcellular volume. In conclusion, while barely used, optical microscopy approaches provide a wide range of perspectives for future studies of AgNP fate in cells. It gives the possibility for higher throughput compared to conventional TEM studies as well as real time experiments that would be invaluable for a better understanding of the processes involved in AgNP cellular uptake, distribution and transformations.

5.3. Methods for size and speciation analysis from complex samples

As previously shown, imaging methods are the key to follow AgNP fate in cells but analytical methods are required to go further in the accurate analysis of the size of the transformed NPs, their composition, their quantification and also for soluble Ag(I) species analysis. XRF is the only imaging approach enabling the visualization of the latter. Therefore, combination of imaging and analytical

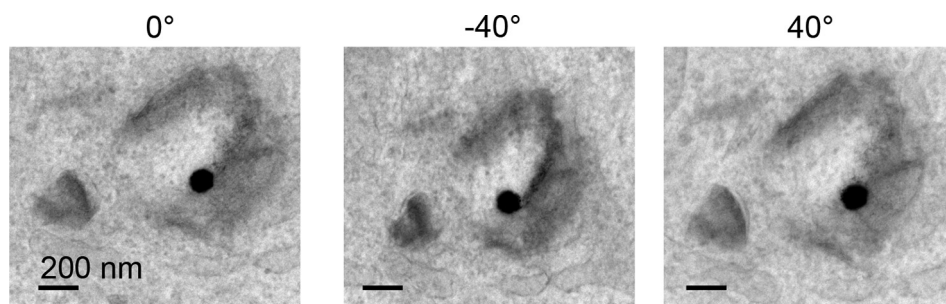


Fig. 11. Tilt series micrographs showing an intracellular vesicle containing a PVP-coated AgNP.

methods will be the key for the proper analysis of AgNP fate in biological media, cells or even organisms. Roman et al. provides a nice example of combination analysis by μ XANES and hydrodynamic chromatography coupled to SP-ICP-MS [104]. Without chromatographic coupling SP-ICP-MS appeared to be an efficient way to analyze the size and the elemental composition of NPs extracted from environmental or biological matrices with a detection limit of NPs larger than 20 nm [94,145]. This method is also great to preserve the state of the sample as intracellular NPs can be analyzed after a single and fast extraction step performed in a gentle buffer containing some detergent. Preceded by a liquid chromatography step, ICP-MS or SP-ICP-MS, enable to achieve extensive analysis of the species stemming from complex matrices. Species of different sizes can be separated and the different elements present can be quantified accurately. In a typical biological samples, Ag(I) species and different forms of AgNPs can thus be separated and analyzed in order to provide more information on AgNP fate, in cells for instance. Liquid chromatography can be, but are not limited to, hydrodynamic chromatography [104,146], asymmetric flow-field flow-fractionation (AF₄) [147] or size exclusion chromatography [148], each method having pros and cons. Different separation techniques used for further metal speciation analysis have also been described in a recent review [19]. The latter has recently been used for the development of Elemental Mass Size Distribution (EMSD), a method enabling the characterization in terms of size and elemental composition of nanoparticles in trace amounts [148]. This proof of concept study showed the capability of the approach to analyze AgNP transformations in fetal bovine serum, for example. However, the authors relate the difficulties to analyze samples at very low concentrations close to environmental conditions. This is probably the main drawback of this kind of methods that will be hardly applicable for environmental purposes but it should not be a problem for cellular fate of AgNPs. Indeed, in this case, cells can be extracted in small volumes in order to keep Ag(I) and AgNP species concentrated enough. The main difficulty resides in the choice of the extraction buffer that has to preserve the state of all Ag species, chloride should therefore be abrogated. This buffer has also to be compatible with the chromatographic method. We faced this problem with the analysis of AgNP transformations upon exposure to proteins, *in vitro*, where different buffer conditions were chosen for AF₄ elution of AgNPs and for Ag(I)-protein complexes [71]. Some works has still to be done for the development of these methods, but, in the future, the combination of imaging and analytical approaches will be crucial for the proper understanding of AgNP fate in cells and living organisms.

6. Conclusion

In this review, we highlighted all the complexity of AgNP fate in a biological context. Indeed, AgNPs are subject to various modifications in the environment as well as in organisms. AgNP transformations in biological media are a matter of surface, redox and photo-chemistry and depend on the surrounding molecules and ions. The complexity of biological fluids triggers the formation of many different Ag species: Ag(0)/Ag(I), soluble/precipitate/NP, complexed with thiol, chloride or proteins. This is therefore a real challenge to analyze surface reactivity and to identify Ag speciation *in cellulo* and their proper understanding requires simplified experimental models. Besides, in an organism, nothing is simple and the predictions of AgNP transformations are tough. Imaging analysis using EM, XRF and μ XANES are providing the more relevant data to understand AgNP fate *in cellulo* or *in vivo* with limited bias but the exposure levels are usually not relevant in current studies. The challenge for the future will be to use better biological models and relevant exposure scenarios. The former improved with cell

culture model mimicking biological epithelium and should further improve with 3D cell culture based on bioprinting, for instance. The knowledge acquired on real exposure levels should drive future more realistic nanotoxicity studies because high concentration can lead to wrong conclusions. As shown with the study from Van der Zande et al., the difference in concentration applied between AgNP and AgNO₃ change the uptake capacity of the intestine and therefore bias the conclusions. If we decrease the exposure concentrations, AgNP transformations will change, such as in the GIT. All the equilibrium between species will change also, producing maybe more Ag-thiol and less AgCl_x. The rate of uptake across the intestinal barrier could increase, the amount of Ag accumulated in the liver could also change. Therefore, the balance between every Ag species can completely change in real exposure conditions and the conclusions drawn in the majority of the studies up to now could be withdrawn just because of the overexposure scenarios used. In addition, mis- and over-interpretation has to be abrogated from nanotoxicology studies. Indeed, there is no reason not to follow the rules applied in chemistry and biology in the “nano” context. Everything is not possible and a better characterization and standardization of the set-up, the NPs, the exposure scenario, the biological system is required to drive nanotoxicology outside of the controversy. The field needs some efforts to provide solid rules for the safe use of NMs.

Acknowledgments

The authors acknowledge the ESRF for providing access to the beamline ID16B-NA.

Fundings

This work was funded by the CEA-Toxicology Transversal Program through the NanoSilverSol grant and by the CEA Transversal Programs Toxicology and Nanoscience through the NanoTox-RX grant. This research is part of the LabEx SERENADE (grant ANR-11-LABX-0064) and the LabEx ARCANE (grant ANR-11-LABX-0003-01). This work is also supported by the CEA DRF-Impulsion grant FIB-Bio and the Université Grenoble Alpes – AGIR grant NanoSilverSafe. The platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) were used, with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01), within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscope facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the fonds FEDER, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the CEA, the University of Grenoble, EMBL, and the GIS-Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBISA).

References

- [1] B. Nowack, H.F. Krug, M. Height, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1177–1183.
- [2] J. Hedberg, S. Skoglund, M.E. Karlsson, S. Wold, I. Odnevall Wallinder, Y. Hedberg, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7314–7322.
- [3] C. Blasco, Y. Picó, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 84–99.
- [4] C. Gonzalez, H. Rosas-Hernandez, M.A. Ramirez-Lee, S. Salazar-Garcia, S.F. Ali, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 493–511.
- [5] B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K. Dawson, I. Lynch, *Materials* 6 (2013) 2295–2350.
- [6] H. Chen, A. Fang, Y. Zhang, S. Yao, *Talanta* 174 (2017) 148–155.
- [7] J.T. Dias, G. Svedberg, M. Nystrand, H. Andersson-Svahn, J. Gantelius, *Sci. Rep.* 7 (2017) 6837.
- [8] M. Sriram, K. Zong, S.R. Vivekchand, J.J. Gooding, *Sensors (Basel)* 15 (2015) 25774–25792.
- [9] V. Vinod Kumar, S.P. Anthony, *Sens. Actuators B* 191 (2014) 31–36.
- [10] A.H. Alshehri, M. Jakubowska, A. Mlozniak, M. Horaczek, D. Rudka, C. Free, J.D. Carey, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 7007–7010.
- [11] T. Sannicola, M. Lagrange, A. Cabos, C. Celle, J.P. Simonato, D. Bellet, *Small* 12 (2016) 6052–6075.
- [12] D.D. Evanoff Jr., G. Chumanov, *Chemphyschem* 6 (2005) 1221–1231.

Bibliographie

- [1] N. W. H. Adams et J. R. Kramer. "Potentiometric Determination of Silver Thiolate Formation Constants Using a Ag₂S Electrode". In : *Aquatic Geochemistry* 5.1 (1999), 1—11. DOI : [10.1023/A:1009699617808](https://doi.org/10.1023/A:1009699617808).
- [2] K. Afshinnia, I. Gibson, R. Merrifield et M. Baalousha. "The concentration-dependent aggregation of Ag NPs induced by cystine". In : *Science of The Total Environment* 557-558 (2016), p. 395–403. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.212>.
- [3] A. Akhavan, A. Sodagar, F. Mojtahedzadeh et K. Sodagar. "Investigating the effect of incorporating nanosilver/nanohydroxyapatite particles on the shear bond strength of orthodontic adhesives". In : *Acta Odontologica Scandinavica* 71.5 (2013), p. 1038–1042. DOI : [10.3109/00016357.2012.741699](https://doi.org/10.3109/00016357.2012.741699).
- [4] V. Alt, M. Wagener, D. Salz, T. Bechert, P. Steinrücke et R. Schnettler. "Plasma Polymer — High-Porosity Silver Composite Coating for Infection Prophylaxis in Intramedullary Nailing". In : *Practice of Intramedullary Locked Nails : New Developments in Techniques and Applications*. Sous la dir. de K.-S. Leung, G. Taglang, R. Schnettler, V. Alt, H. J.T. M. Haarman, H. Seidel et I. Kempf. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 297–303. ISBN : 978-3-540-32345-7. DOI : [10.1007/3-540-32345-7_30](https://doi.org/10.1007/3-540-32345-7_30).
- [5] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Dommann et R. Schnettler. "An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement". In : *Biomaterials* 25.18 (2004), p. 4383–4391. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.078>.
- [6] C Amendola, O Bakr et F Stellacci. "A Study of the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation Method : Effect of Shape, Size, Structure, and Assembly". In : *Plasmonics* 5 (2010), p. 85–97. DOI : [10.1007/s11468-009-9120-4](https://doi.org/10.1007/s11468-009-9120-4).
- [7] M. Andara, A. Agarwal, D. Scholvin, R. A. Gerhardt, A. Doraiswamy, C. Jin, R. J. Narayan, C.-C. Shih, C.-M. Shih, S.-J. Lin et Y.-Y. Su. "Hemocompatibility of diamondlike carbon–metal composite thin films". In : *Diamond and Related Materials* 15.11 (2006), 1941—1948. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2006.05.013>.

- [8] S. Angkaew et P. Limsuwan. "Preparation of silver-titanium dioxide core-shell (Ag@TiO₂) nanoparticles : Effect of Ti-Ag mole ratio". In : *Procedia Engineering* 32 (2012), p. 649–655. DOI : [10.1016/j.proeng.2012.01.1322](https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1322).
- [9] H. Arakawa, J.-F. Neault et H. A. Tajmir-Riahi. "Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by Fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis." In : *Biophysical Journal* 81.3 (2001), p. 1580–1587. DOI : [10.1016/S0006-3495\(01\)75812-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75812-2).
- [10] J. L. Axson, D. I. Stark, A. L. Bondy, S. S. Capracotta, A. D. Maynard, M. A. Philbert, I. L. Bergin et A. P. Ault. "Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid". In : *The Journal of Physical Chemistry C* 119.35 (2015), p. 20632–20641. DOI : [10.1021/acs.jpcc.5b03634](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03634).
- [11] L. A. Ba, M. Doering, T. Burkholz et C. Jacob. "Metal trafficking : from maintaining the metal homeostasis to future drug design". In : *Metallomics* 1.4 (2009), p. 292. DOI : [10.1039/b904533c](https://doi.org/10.1039/b904533c).
- [12] M. E. Badawy, S. Rendahandi, B. Morris, K. Scheckel, M. Suidan et T. Tolaymat. "Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles". In : *Environmental Science & Technology* 45.1 (2011), p. 283–287. DOI : [10.1021/es1034188](https://doi.org/10.1021/es1034188).
- [13] P. Bailon, A. Palleroni, C. A. Schaffer, C. L. Spence, W.-J. Fung, J. E. Porter, G. K. Ehrlich, W. Pan, Z.-X. Xu, M. W. Modi, A. Farid, W. Berthold et M. Graves. "Rational Design of a Potent, Long-Lasting Form of Interferon : A 40 kDa Branched Polyethylene Glycol-Conjugated Interferon α -2a for the Treatment of Hepatitis C". In : *Bioconjugate Chemistry* 12.2 (2001), p. 195–202. DOI : [10.1021/bc000082g](https://doi.org/10.1021/bc000082g).
- [14] N. G. Bastús, F. Merkoçi, J. Piella et V. Puntes. "Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm : Kinetic Control and Catalytic Properties". In : *Chemistry of Materials* 26.9 (2014), p. 2836–2846. ISSN : 0897-4756, 1520-5002. DOI : [10.1021/cm500316k](https://doi.org/10.1021/cm500316k).
- [15] C. Battocchio, C. Meneghini, I. Fratoddi, I. Venditti, M. V. Russo, G. Aquilanti, C. Maurizio, F. Bondino, R. Matassa, M. Rossi, S. Mobilio et G. Polzonetti. "Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols : A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure". In : *The Journal of Physical Chemistry C* 116.36 (13 sept. 2012), p. 19571–19578. DOI : [10.1021/jp305748a](https://doi.org/10.1021/jp305748a).
- [16] S. Bayram, O. K. Zahr et A. S. Blum. "Short ligands offer long-term water stability and plasmon tunability for silver nanoparticles". In : *RSC Adv* 5 (9 2015), p. 6553–6559. DOI : [10.1039/C4RA09667C](https://doi.org/10.1039/C4RA09667C).
- [17] R. Bayston, W. Ashraf et L. Fisher. "Prevention of infection in neurosurgery : role of "antimicrobial" catheters". In : *Journal of Hospital Infection* 65 (2007), p. 39–42. DOI : [10.1016/S0195-6701\(07\)60013-9](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60013-9).

- [18] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland et H. Autrup. "Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?" In : *Toxicology Letters* 208.3 (2012), p. 286–292. DOI : [10.1016/j.toxlet.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002).
- [19] D. Berube, C. Cummings, M. Cacciatore, D. Scheufele et J. Kalin. "Characteristics and classification of nanoparticles : Expert Delphi survey". In : *Nanotoxicology* 5.2 (2011), p. 236–243. DOI : [10.3109/17435390.2010.521633](https://doi.org/10.3109/17435390.2010.521633).
- [20] A. Besinis, S. D. Hadi, H. R. Le, C. Tredwin et R. D. Handy. "Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings". In : *Nanotoxicology* 11.3 (2017), p. 327–338. DOI : [10.1080/17435390.2017.1299890](https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1299890).
- [21] K. Bhol et P. Schechter. "Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis". In : *British Journal of Dermatology* 152.6 (2005), p. 1235–1242. DOI : [10.1111/j.1365-2133.2005.06575.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06575.x).
- [22] J. Y. Bottero et al. "SERENADE : safer and ecodesign research and education applied to nanomaterial development, the new generation of materials safer by design". In : *Environmental Science : Nano* 4.3 (2017), p. 526–538. DOI : [10.1039/C6EN00282J](https://doi.org/10.1039/C6EN00282J).
- [23] H Bouwmeester, S Dekkers, M Noordam, W Hagens, A Bulder, C de Heer, S ten Voorde, S Wijnhoven et A Sips. *Health impact of nanotechnologies in food production*. RIKILT – Institute of Food Safety, 2007.
- [24] P. Bove, M. A. Malvindi, S. S. Kote, R. Bertorelli, M. Summa et S. Sabella. "Dissolution test for risk assessment of nanoparticles : a pilot study". In : *Nanoscale* 9 (19 2017), p. 6315–6326. DOI : [10.1039/C6NR08131B](https://doi.org/10.1039/C6NR08131B).
- [25] G. Bryan et W. Langston. "Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries : a review". In : *Environmental Pollution* 76.2 (1992), 89–131. DOI : [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(92\)90099-V](https://doi.org/10.1016/0269-7491(92)90099-V).
- [26] L.-H. Cai, S. Panyukov et M. Rubinstein. "Mobility of Nonsticky Nanoparticles in Polymer Liquids". In : *Macromolecules* 44.19 (2011), p. 7853–7863. DOI : [10.1021/ma201583q](https://doi.org/10.1021/ma201583q).
- [27] C. Cantuarias-villessuzanne et P. Boucard. *TEtude de l'utilisation du nano-argent, Rapport d'études N°DRC-16-157037-04739B*. INERIS, 2016.
- [28] F. Carlini, L. Ugolini, A. Visaggio, D. Visca, P. Fratoddi, I. Venditti, I. Meneghini, C. Simonelli, L. Marini, C. Olszewski, W. Ramanan, N. Luisetto et I Battocchio. "Synthesis and Structural Characterization of Silver Nanoparticles Stabilized with 3-Mercapto-1-Propansulfonate and 1-Thioglucoose Mixed Thiols for Antibacterial Applications". In : *materilas* 9 (2016), p. 1028. DOI : [10.3390/ma9121028](https://doi.org/10.3390/ma9121028).

- [29] J. E. Castle. "Practical surface analysis by Auger and X-ray photoelectron spectroscopy. D. Briggs and M. P. Seah (Editors). John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1983, 533 pp., £44.50". In : *Surface and Interface Analysis* 6.6 (1984), p. 302–302. DOI : [10.1002/sia.740060611](https://doi.org/10.1002/sia.740060611).
- [30] CEINT NanoInformatics Knowledge Commons. <https://ceint.duke.edu/research/nikc>.
- [31] H. Cha, D. Lee, J. H. Yoon et S. Yoon. "Plasmon coupling between silver nanoparticles : Transition from the classical to the quantum regime". In : *Journal of Colloid and Interface Science* 464 (2016), p. 18 –24. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.009>.
- [32] K. Chaloupka, Y. Malam et A. M. Seifalian. "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications". In : *Trends in Biotechnology* 28.11 (2010), p. 580–588. DOI : [10.1016/j.tibtech.2010.07.006](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006).
- [33] X. Chen et H. Schluesener. "Nanosilver : A nanoparticle in medical application". In : *Review of Scientific Instruments* 79.1 (2008), p. 1–12. DOI : [10.1016/j.toxlet.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004).
- [34] X. Chen et H. Schluesener. "Nanosilver : A nanoparticle in medical application". In : *Toxicology Letters* 176.1 (2008), p. 1–12. DOI : [10.1016/j.toxlet.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004).
- [35] J. Cheng, Y.-J. Gu, S. H. Cheng et W.-T. Wong. "Surface Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery". In : *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9.8 (2013), p. 1362–1369. DOI : [10.1166/jbn.2013.1536](https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1536).
- [36] I. Chopra. "The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents : a useful development or a cause for concern?" In : *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59.4 (2007), p. 587–590. DOI : [10.1093/jac/dkm006](https://doi.org/10.1093/jac/dkm006).
- [37] M. R. Ciriolo, P. Civitareale et G. Rotilio. "Purification and Characterization of Ag,Zn-Superoxide Dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Silver". In : *The Journal of Biological Chemistry* (1994), p. 25783–25787.
- [38] S. Clemens, E. J. Kim, D. Neumann et J. I. Schroeder. "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthases from plants and yeast." In : *The EMBO Journal* 18.12 (1999), p. 3325–3333. DOI : [10.1093/emboj/18.12.3325](https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3325).
- [39] G. F. Clemente, L. C. Rossi et G. P. Santaroni. "Trace element intake and excretion in the Italian population". In : *Journal of Radioanalytical Chemistry* 37.2 (1977), p. 549–558. DOI : [10.1007/BF02519367](https://doi.org/10.1007/BF02519367).
- [40] M. S. Cohen, J. M. Stern, A. J. Vanni, R. S. Kelley, E. Baumgart, D. Field, J. A. Libertino et I. C. Summerhayes. "In Vitro Analysis of a Nanocrystalline Silver-Coated Surgical Mesh". In : *Surgical Infections* 8.3 (2007), p. 397–404. DOI : [10.1089/sur.2006.032](https://doi.org/10.1089/sur.2006.032).

- [41] O. Craciunescu, A.-M. Seciu, V. S. Manoiu, M. Trif, M. Moisei, A. I. Nicu et O. Zarnescu. "Biosynthesis of silver nanoparticles in collagen gel improves their medical use in periodontitis treatment". In : *Particulate Science and Technology* (2018), p. 1–7. DOI : [10.1080/02726351.2018.1455780](https://doi.org/10.1080/02726351.2018.1455780).
- [42] M. Csete, A. Szalai, E. Csapó, L. Tóth, A. Somogyi et I. Dékány. "Collective Plasmonic Resonances on Arrays of Cysteine-Functionalized Silver Nanoparticle Aggregates". In : *The Journal of Physical Chemistry C* 118.31 (2014), p. 17940–17955. DOI : [10.1021/jp503465r](https://doi.org/10.1021/jp503465r).
- [43] B. Cushing, V. Kolesnichenko et C. O'Connor. "Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles". In : *Chemical Reviews* 104 (2004). DOI : [10.1021/cr030027b](https://doi.org/10.1021/cr030027b).
- [44] P. Delangle, C. Gateau et A. Pujol. "Chelating agents of metal ions, their methods of preparation and their applications". Brev. US20100234338A1. 2010.
- [45] V. A. Demin, I. V. Gmoshinsky, V. F. Demin, A. A. Anciferova, Y. P. Buzulukov, S. A. Khotimchenko et V. A. Tutelyan. "Modeling interorgan distribution and bioaccumulation of engineered nanoparticles (using the example of silver nanoparticles)". In : *Nanotechnologies in Russia* 10.3 (2015), 288—296. DOI : [10.1134/S1995078015020081](https://doi.org/10.1134/S1995078015020081).
- [46] Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin et R. F. Minchin. "Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles". In : *Nanotechnology* 20.45 (2009), p. 455101. DOI : [10.1088/0957-4484/20/45/455101](https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/45/455101).
- [47] Directive. RÈGLEMENT (UE) 2017/745 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL relatif aux dispositifs médicaux, modifiant la directive 2001/83/CE, le règlement (CE) no 178/2002 et le règlement (CE) no 1223/2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/385/CEE et 93/42/CEE. 2017.
- [48] G. J. Doherty et H. T. McMahon. "Mechanisms of Endocytosis". In : *Annual Review of Biochemistry* 78.1 (2009), p. 857–902. DOI : [10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540).
- [49] N. Durán, C. P. Silveira, M. Durán et D. S. T. Martinez. "Silver nanoparticle protein corona and toxicity : a mini-review". In : *Journal of Nanobiotechnology* 13.1 (2015). DOI : [10.1186/s12951-015-0114-4](https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4).
- [50] *DynaPro NanoStar User's Guide*. Wyatt Technology, 2009.
- [51] K. Dziendzikowska, J. Gromadzka-Ostrowska, A. Lankoff, M. Oczkowski, A. Krawczyńska, J. Chwastowska, M. Sadowska-Bratek, E. Chajduk, M. Wojewódzka, M. Dušinská et M. Kruszewski. "Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats : Biodistribution of nanosilver in rats". In : *Journal of Applied Toxicology* 32.11 (2012), p. 920–928. DOI : [10.1002/jat.2758](https://doi.org/10.1002/jat.2758).

- [52] J. L. Elechiguerra, J. L. Burt, J. R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H. H. Lara et M. J. Yacaman. "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1". In : *Journal of nanobiotechnology* 3.1 (2005), p. 6–16. DOI : [10.1186/1477-3155-3-6](https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-6).
- [53] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim et J. O. Kim. "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*". In : *Journal of Biomedical Materials Research* 52.4 (2000), p. 662–668. DOI : [10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3).
- [54] *FIJI*. <https://fiji.sc/>.
- [55] V. Frazzini, E. Rockabrand, E. Mocchegiani et S. L. Sensi. "Oxidative stress and brain aging : is zinc the link?" In : *Biogerontology* 7.5 (2006), p. 307–314. DOI : [10.1007/s10522-006-9045-7](https://doi.org/10.1007/s10522-006-9045-7).
- [56] I. Galván Márquez, M. Ghiyasvand, A. Massarsky, M. Babu, B. Samanfar, K. Omid, T. W. Moon, M. L. Smith et A. Golshani. "Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*". In : *PLoS ONE* 13.3 (2018), e0193111. DOI : [10.1371/journal.pone.0193111](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193111).
- [57] R. García-Contreras, L. Argueta-Figueroa, C. Mejía-Rubalcava, R. Jiménez-Martínez, S. Cuevas-Guajardo, P. A. Sánchez-Reyna et H. Mendieta-Zeron. "Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice : Silver nanoparticles in dental practice". In : *International Dental Journal* 61.6 (2011), p. 297–301. DOI : [10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x](https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x).
- [58] H. Geng, G. Poologasundarampillai, N. Todd, A. Devlin-Mullin, K. L. Moore, Z. Golrokhi, J. B. Gilchrist, E. Jones, R. J. Potter, C. Sutcliffe, M. O'Brien, D. W. Hukins, S. Cartmell, C. A. Mitchell et P. D. Lee. "Biotransformation of Silver Released from Nanoparticle Coated Titanium Implants Revealed in Regenerating Bone". In : *ACS Applied Materials and Interfaces* 9.25 (2017), p. 21169–21180. DOI : [10.1021/acscami.7b05150](https://doi.org/10.1021/acscami.7b05150).
- [59] H. Ghanbari, H. Viatge, A. G. Kidane, G. Burriesci, M. Tavakoli et A. M. Seifalian. "Polymeric heart valves : new materials, emerging hopes". In : *Trends in Biotechnology* 27.6 (2009), p. 359–367. DOI : [10.1016/j.tibtech.2009.03.002](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.03.002).
- [60] R. S. Gibson et C. A. Scythes. "Chromium, selenium, and other trace element intakes of a selected sample of Canadian premenopausal women". In : *Biological Trace Element Research* 6.2 (1984), p. 105–116. DOI : [10.1007/BF02916928](https://doi.org/10.1007/BF02916928).
- [61] A. R. Gliga, S. Skoglund, I. Odnevall Wallinder, B. Fadeel et H. L. Karlsson. "Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells : the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release". In : *Particle and Fibre Toxicology* 11.1 (2014), p. 11. DOI : [10.1186/1743-8977-11-11](https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11).

- [62] A. P. Gondikas, A. Morris, B. C. Reinsch, S. M. Marinakos, G. V. Lowry et H. Hsu-Kim. "Cysteine-Induced Modifications of Zero-valent Silver Nanomaterials : Implications for Particle Surface Chemistry, Aggregation, Dissolution, and Silver Speciation". In : *Environmental Science & Technology* 46.13 (3 juil. 2012), p. 7037–7045. ISSN : 0013-936X. DOI : [10.1021/es3001757](https://doi.org/10.1021/es3001757).
- [63] O. Gordon, T. Vig Slenters, P. S. Brunetto, A. E. Villaruz, D. E. Sturdevant, M. Otto, R. Landmann et K. M. Fromm. "Silver Coordination Polymers for Prevention of Implant Infection : Thiol Interaction, Impact on Respiratory Chain Enzymes, and Hydroxyl Radical Induction". In : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54.10 (2010), p. 4208–4218. DOI : [10.1128/AAC.01830-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01830-09).
- [64] A. Gupta, K. Matsui, J.-F. Lo et S. Silver. "Molecular basis for resistance to silver cations in Salmonella". In : *Nature Medicine* 5 (1999), p. 183–188. DOI : [10.1038/5545](https://doi.org/10.1038/5545).
- [65] H. Hada, Y. Yonezawa, A. Yoshida et A. Kurakake. "Photoreduction of silver ion in aqueous and alcoholic solutions". In : *The Journal of Physical Chemistry* 80.25 (1976), p. 2728–2731. DOI : [10.1021/j100566a003](https://doi.org/10.1021/j100566a003).
- [66] C. Haefeli, C. Franklin et K. Hardy. "Plasmid-determined silver resistance in Pseudomonas stutzeri isolated from a silver mine." In : *Journal of Bacteriology* 158.1 (1984), p. 389–392.
- [67] E. Hamidi-Asl, F. Dardenne, S. Pilehvar, R. Blust et K. De Wael. "Unique Properties of Core Shell Ag@Au Nanoparticles for the Aptasensing of Bacterial Cells". In : *Chemosensors* 4.3 (2016), p. 16. ISSN : 2227-9040. DOI : [10.3390/chemosensors4030016](https://doi.org/10.3390/chemosensors4030016).
- [68] E. Hamilton et M. Minski. "Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors". In : *Science of The Total Environment* 1.4 (1973), p. 375–394. DOI : [10.1016/0048-9697\(73\)90025-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(73)90025-9).
- [69] L. Han, H. Wei, B. Tu et D. Zhao. "A facile one-pot synthesis of uniform core-shell silver nanoparticle@mesoporous silica nanospheres". In : *Chemical Communications* 47.30 (2011), p. 8536. ISSN : 1359-7345, 1364-548X.
- [70] J. M. Harris et R. B. Chess. "Effect of pegylation on pharmaceuticals". In : *Nature Reviews Drug Discovery* 2.3 (2003), p. 214–221. DOI : [10.1038/nrd1033](https://doi.org/10.1038/nrd1033).
- [71] B. Hellack, C. Nickel, C. Albrecht, T. A. J. Kuhlbusch, S. Boland, A. Baeza-Squiban, W. Wohlleben et R. P. F. Schins. "Analytical methods to assess the oxidative potential of nanoparticles : a review". In : *Environ. Sci. : Nano* 4 (10 2017), p. 1920–1934. DOI : [10.1039/C7EN00346C](https://doi.org/10.1039/C7EN00346C).
- [72] J. Helmlinger, C. Sengstock, C. Groß-Heitfeld, C. Mayer, T. A. Schildhauer, M. Köller et M. Epple. "Silver nanoparticles with different size and shape : equal cytotoxicity, but different antibacterial effects". In : *RSC Adv.* 6 (22 2016), p. 18490–18501. DOI : [10.1039/C5RA27836H](https://doi.org/10.1039/C5RA27836H).

- [73] R. Hong, G. Han, J. M. Fernández, B.-j. Kim, N. S. Forbes et V. M. Rotello. "Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers". In : *Journal of the American Chemical Society* 128.4 (2006), p. 1078–1079. DOI : [10.1021/ja056726i](https://doi.org/10.1021/ja056726i).
- [74] H. H. Huang, X. P. Ni, G. L. Loy, C. H. Chew, K. L. Tan, F. C. Loh, J. F. Deng et G. Q. Xu. "Photochemical Formation of Silver Nanoparticles in Poly(N-vinylpyrrolidone)". In : *Langmuir* 12.4 (1996), p. 909–912. DOI : [10.1021/la950435d](https://doi.org/10.1021/la950435d).
- [75] J. Huotari et A. Helenius. "Endosome maturation". In : *The EMBO Journal* 30.17 (2011), p. 3481–3500. DOI : [10.1038/emboj.2011.286](https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286).
- [76] J. A. Imlay. "Diagnosing oxidative stress in bacteria : not as easy as you might think". In : *Current opinion in microbiology* 24 (2015), p. 124–131. DOI : [10.1016/j.mib.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.004). JSTOR : {PMC}4380616.
- [77] INSERM. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales>.
- [78] F. Jalilvand. "Sulfur : not a silent element any more". In : *Chem. Soc. Rev.* 35.12 (2006), p. 1256–1268. DOI : [10.1039/B417595F](https://doi.org/10.1039/B417595F).
- [79] X. Jiang, T. Miclăuş, L. Wang, R. Foldbjerg, D. S. Sutherland, H. Autrup, C. Chen et C. Beer. "Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells : implication for cytotoxicity". In : *Nanotoxicology* 9.2 (2015), p. 181–189. DOI : [10.3109/17435390.2014.907457](https://doi.org/10.3109/17435390.2014.907457).
- [80] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim et Y. H. Park. "Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli". In : *Applied and Environmental Microbiology* 74.7 (2008), p. 2171–2178. DOI : [10.1128/AEM.02001-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07).
- [81] H. Kaczmarek, M. Metzler et K. Wgrzynowska-Drzymalska. "Effect of stabilizer type on the physicochemical properties of poly(acrylic acid)/silver nanocomposites for biomedical applications". In : *Polymer Bulletin* 73.10 (2016), p. 2927–2945. ISSN : 0170-0839, 1436-2449. DOI : [10.1007/s00289-016-1617-3](https://doi.org/10.1007/s00289-016-1617-3).
- [82] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D. H. Jeong et M.-H. Cho. "Antimicrobial effects of silver nanoparticles". In : *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine* 3.1 (2007), p. 95–101. DOI : [10.1016/j.nano.2006.12.001](https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001).
- [83] H. J. Klasen. "Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses". In : *Burns* 26.2 (2000), p. 117–130. DOI : [10.1016/S0305-4179\(99\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00108-4).

- [84] T. Klaus, R. Joerger, E. Olsson et C.-G. Granqvist. "Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.24 (1999), p. 13611–13614.
- [85] *LabEx SERENADE*. <http://www.labex-serenade.fr/safer-ecodesign-research-and-education-applied-nanomaterial-development>.
- [86] H. H. Lara, E. N. Garza-Treviño, L. Ixtepan-Turrent et D. K. Singh. "Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds". In : *Journal of nanobiotechnology* 9.1 (2011), p. 30. DOI : [10.1186/1477-3155-9-30](https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30).
- [87] K. Lem, A. Choudhury, A. Lakhani, P. Kuyate, J. Haw, D. S Lee, Z. Iqbal et C. Brumlik. "Use of nanosilver in consumer products". In : *Recent patents on nanotechnology* 6.1 (2012), p. 60–72.
- [88] G. Lespes. "Introduction à L'AF4". In : *Ecole Thématique Française du Fractionnement Flux Force*. 2016.
- [89] C. Levard, E. M. Hotze, B. P. Colman, L. Truong, X. Y. Yang, A. Bone, G. E. Brown, R. L. Tanguay, R. T. Di Giulio, E. S. Bernhardt, J. N. Meyer, M. R. Wiesner et G. V. Lowry. "Sulfidation of Silver Nanoparticles : Natural antidote to their toxicity". In : *Environmental science & technology* 47.23 (2013), p. 13440–13448. DOI : [10.1021/es403527n](https://doi.org/10.1021/es403527n).
- [90] C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry et G. E. Brown. "Environmental Transformations of Silver Nanoparticles : Impact on Stability and Toxicity". In : *Environmental Science and Technology* 46.13 (2012), p. 6900–6914. DOI : [10.1021/es2037405](https://doi.org/10.1021/es2037405).
- [91] W.-R. Li, X.-B. Xie, Q.-S. Shi, H.-Y. Zeng, Y.-S. OU-Yang et Y.-B. Chen. "Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli". In : *Applied Microbiology and Biotechnology* 85.4 (2010), p. 1115–1122. DOI : [10.1007/s00253-009-2159-5](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5).
- [92] W.-R. Li, X.-B. Xie, Q.-S. Shi, S.-S. Duan, Y.-S. Ouyang et Y.-B. Chen. "Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus". In : *BioMetals* 24.1 (2011), p. 135–141. DOI : [10.1007/s10534-010-9381-6](https://doi.org/10.1007/s10534-010-9381-6).
- [93] J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani et R. H. Hurt. "Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces". In : *ACS Nano* 4.11 (2010), p. 6903–6913. DOI : [10.1021/nn102272n](https://doi.org/10.1021/nn102272n).
- [94] J. Liu et R. H. Hurt. "Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids". In : *Environmental Science & Technology* 44.6 (2010), p. 2169–2175. DOI : [10.1021/es9035557](https://doi.org/10.1021/es9035557).
- [95] W Liu, I Worms, N Herlin-Boime, D Truffier-Boutry, I Michaud-Soret, E Mintz, C Vidaud et F Rollin-Genetet. "Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin : impact on metal substitution by Ag(I), corona formation and enzymatic activity". In : *Nanoscale* 9 (2017), p. 6581–6594. DOI : [10.1039/C7NR01075C](https://doi.org/10.1039/C7NR01075C).

- [96] K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H. R. Lam et E. H. Larsen. "Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate". In : *Particle and Fibre Toxicology* 8 (2011), p. 18–18. DOI : [10.1186/1743-8977-8-18](https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18).
- [97] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. K.-H. Tam, J.-F. Chiu et C.-M. Che. "Silver nanoparticles : partial oxidation and antibacterial activities". In : *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12.4 (2007), p. 527–534. DOI : [10.1007/s00775-007-0208-z](https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z).
- [98] K. Loza, J. Diendorf, C. Sengstock, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Köller et M. Epple. "The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media". In : *J. Mater. Chem. B* 2 (12 2014), 1634—1643. DOI : [10.1039/C3TB21569E](https://doi.org/10.1039/C3TB21569E).
- [99] L. Lu, G. Burkey, I. Halaciuga et D. V. Goia. "Core-shell gold/silver nanoparticles : Synthesis and optical properties". In : *Journal of Colloid and Interface Science* 392 (2013), p. 90 –95. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.09.057>.
- [100] J. officiel de L'Union Européenne. *COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial : 2001/696/EU*. 2001.
- [101] S. Lutsenko. "Human copper homeostasis : a network of interconnected pathways". In : *Current Opinion in Chemical Biology* 14.2 (2010), p. 211–217. DOI : [10.1016/j.cbpa.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.003). (Visité le 10/07/2018).
- [102] S. Lutsenko. "Copper trafficking to the secretory pathway". In : *Metallomics* 8.9 (2016), p. 840–852. DOI : [10.1039/C6MT00176A](https://doi.org/10.1039/C6MT00176A).
- [103] C. Marambio-Jones et E. Hoek. "A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment". In : *Journal of Nanoparticle Research* 12.5 (2010), p. 1531–1551. DOI : [10.1007/s11051-010-9900-y](https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y).
- [104] M. Marchioni, T. Gallon, I. Worms, P.-H. Jouneau, C. Lebrun, G. Veronesi, D. Truffier-Boutry, E. Mintz, P. Delangle, A. Deniaud et I. Michaud-Soret. "Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by bio-relevant molecules". In : *Environmental Sciences : Nano* (2018).
- [105] M. Marchioni, P.-H. Jouneau, M. Chevallet, I. Michaud-Soret et A. Deniaud. "Silver nanoparticle fate in mammals : Bridging in vitro and in vivo studies". In : *Coordination Chemistry Reviews* 364 (2018), p. 118–136. DOI : [10.1016/j.ccr.2018.03.008](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.008).
- [106] A. J. Martinolich, G. Park, M. Y. Nakamoto, R. E. Gate et K. E. Wheeler. "Structural and Functional Effects of Cu Metalloprotein-Driven Silver Nanoparticle Dissolution". In : *Environmental Science & Technology* 46.11 (2012), p. 6355–6362. DOI : [10.1021/es300901h](https://doi.org/10.1021/es300901h).

- [107] G. Martínez-Criado, J. Villanova, R. Tucoulou, D. Salomon, J.-P. Suuronen, S. Labouré, C. Guilloud, V. Valls, R. Barrett, E. Gagliardini, Y. Dabin, R. Baker, S. Bohic, C. Cohen et J. Morse. "ID16B : a hard X-ray nanoprobe beamline at the ESRF for nano-analysis". In : *Journal of Synchrotron Radiation* 23.1 (1^{er} jan. 2016), p. 344–352. DOI : [10.1107/S1600577515019839](https://doi.org/10.1107/S1600577515019839).
- [108] L. L. Maurer, X. Yang, A. J. Schindler, R. K. Taggart, C. Jiang, H. Hsu-Kim, D. R. Sherwood et J. N. Meyer. "Intracellular trafficking pathways in silver nanoparticle uptake and toxicity in *Caenorhabditis elegans*". In : *Nanotoxicology* 10.7 (2016), p. 831–835. DOI : [10.3109/17435390.2015.1110759](https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1110759).
- [109] A. D. Maynard, R. J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M. A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S. S. Tinkle, L. Tran, N. J. Walker et D. B. Warheit. "Safe handling of nanotechnology". In : *Nature* 444 (2006), p. 267. DOI : [10.1038/444267a](https://doi.org/10.1038/444267a).
- [110] G. L. Mchugh, R. Moellering, C. Hopkins et M. Swartz. "Salmonella Typhimurium Resistant to Silver nitrate, Chloramphenicol, and Ampicillin : A New Threat in Burn Units?" In : *The Lancet* 305.7901 (1975), p. 235 –240. DOI : [10.1016/S0140-6736\(75\)91138-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)91138-1).
- [111] R. K. Mehra, K. Tran, G. W. Scott, P. Mulchandani et S. S. Saini. "Ag(I)-binding to phytochelatin". In : *Journal of Inorganic Biochemistry* 61.2 (1996), 125–142. DOI : [10.1016/0162-0134\(95\)00046-1](https://doi.org/10.1016/0162-0134(95)00046-1).
- [112] K. Mehrabi, B. Nowack, Y. Arroyo Rojas Dasilva et D. M. Mitrano. "Improvements in Nanoparticle Tracking Analysis To Measure Particle Aggregation and Mass Distribution : A Case Study on Engineered Nanomaterial Stability in Incineration Landfill Leachates". In : *Environmental Science & Technology* 51.10 (2017), p. 5611–5621. DOI : [10.1021/acs.est.7b00597](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00597).
- [113] G. Metin-Gürsoy, L. Taner et G. Akca. "Nanosilver coated orthodontic brackets : in vivo antibacterial properties and ion release". In : *European Journal of Orthodontics* 39.1 (2017), p. 9–16. DOI : [10.1093/ejo/cjv097](https://doi.org/10.1093/ejo/cjv097).
- [114] T. Miclăuş, V. E. Bochenkov, R. Ogaki, K. A. Howard et D. S. Sutherland. "Spatial Mapping and Quantification of Soft and Hard Protein Coronas at Silver Nanocubes". In : *Nano Letters* 14.4 (2014), p. 2086–2093. DOI : [10.1021/nl500277c](https://doi.org/10.1021/nl500277c).
- [115] K. Mijndonckx, N. Leys, J. Mahillon, S. Silver et R. Van Houdt. "Antimicrobial silver : uses, toxicity and potential for resistance". In : *BioMetals* 26.4 (2013), p. 609–621. DOI : [10.1007/s10534-013-9645-z](https://doi.org/10.1007/s10534-013-9645-z).
- [116] R. Miras, I. Morin, O. Jacquin, M. Cuillel, F. Guillain et E. Mintz. "Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1". In : *J. Biol. Inorg. Chem* 2 (2008), p. 195–205. DOI : [10.1007/s00775-007-0310-2](https://doi.org/10.1007/s00775-007-0310-2).

- [117] F. Mirzajani, A. Ghassempour, A. Aliahmadi et M. A. Esmaeili. "Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*". In : *Research in Microbiology* 162.5 (2011), p. 542–549. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009>.
- [118] D. Mitrano. "Nano characterization". In : *IMBG advanced course*. 2017.
- [119] D. M. Mitrano, K. Mehrabi, Y. A. R. Dasilva et B. Nowack. "Mobility of metallic nanoparticles in leachates from landfills containing waste incineration residues". In : *Environmental Science : Nano* 4.2 (2017), p. 480–492. DOI : [10.1039/C6EN00565A](https://doi.org/10.1039/C6EN00565A).
- [120] K. B. Mogensen et K. Kneipp. "Size-Dependent Shifts of Plasmon Resonance in Silver Nanoparticle Films Using Controlled Dissolution : Monitoring the Onset of Surface Screening Effects". In : *The Journal of Physical Chemistry C* 118.48 (2014), p. 28075–28083. DOI : [10.1021/jp505632n](https://doi.org/10.1021/jp505632n).
- [121] B. Molleman et T. Hiemstra. "Time, pH, and size dependency of silver nanoparticle dissolution : the road to equilibrium". In : *Environ. Sci. : Nano* 4 (6 2017), p. 1314–1327. DOI : [10.1039/C6EN00564K](https://doi.org/10.1039/C6EN00564K).
- [122] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez et M. J. Yacaman. "The bactericidal effect of silver nanoparticles". In : *Nanotechnology* 16.10 (2005), p. 2346–2353. DOI : [10.1088/0957-4484/16/10/059](https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059).
- [123] G. Morose. "The 5 principles of "Design for Safer Nanotechnology"". In : *Journal of Cleaner Production* 18.3 (2010), p. 285–289. DOI : [10.1016/j.jclepro.2009.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2009.10.001).
- [124] Mueller et Nowack. "Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment". In : *Environmental Science and Technology* 42.12 (2008), p. 4447–4453. DOI : [10.1021/es7029637](https://doi.org/10.1021/es7029637).
- [125] NANoREG.
- [126] *NanoSight Range*. Malvern, 2014.
- [127] D. Neubauer Kenneth. Mitrano. *An Introduction to Flow Field Flow Fractionation and Coupling to ICP-MS*. PerkinElmer, 2011, p. 4.
- [128] C. Noguez. "Surface Plasmons on Metal Nanoparticles : The Influence of Shape and Physical Environment". In : *The Journal of Physical Chemistry C* 111.10 (2007), p. 3806–3819. DOI : [10.1021/jp066539m](https://doi.org/10.1021/jp066539m).
- [129] F. Paladini, M. Pollini, D. Deponti, A. Di Giancamillo, G. Peretti et A. Sannino. "Effect of silver nanocoatings on catheters for haemodialysis in terms of cell viability, proliferation, morphology and antibacterial activity". In : *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 24.4 (2013), p. 1105–1112. DOI : [10.1007/s10856-013-4870-0](https://doi.org/10.1007/s10856-013-4870-0).

- [130] A. Panáček, L. Kvítek, M. Smékalová, R. Večeřová, M. Kolář, M. Röderová, F. Dyčka, M. Šebela, R. Prucek, O. Tomanec et R. Zbořil. "Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it". In : *Nature Nanotechnology* 13.1 (2018), p. 65–71. DOI : [10.1038/s41565-017-0013-y](https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y).
- [131] E.-J. Park, E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S. H. Lee, J. Yoon, B. C. Lee et K. Park. "Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles". In : *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30.2 (2010), p. 162–168. DOI : [10.1016/j.etap.2010.05.004](https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.05.004).
- [132] K. Park, E.-J. Park, I. K. Chun, K. Choi, S. H. Lee, J. Yoon et B. C. Lee. "Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats". In : *Archives of Pharmacal Research* 34.1 (2011), p. 153–158. DOI : [10.1007/s12272-011-0118-z](https://doi.org/10.1007/s12272-011-0118-z).
- [133] R. G. Pearson. "Hard and Soft Acids and Bases". In : *Journal of the American Chemical Society* 85.22 (1963), p. 3533–3539. DOI : [10.1021/ja00905a001](https://doi.org/10.1021/ja00905a001).
- [134] D. Pencheva, R. Bryaskova et T. Kantardjiev. "Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles". In : *Materials Science and Engineering : C* 32 (2012), p. 2048–2051.
- [135] S. Peng, J. M. McMahon, G. C. Schatz, S. K. Gray et Y. Sun. "Reversing the size-dependence of surface plasmon resonances". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.33 (2010), p. 14530–14534. DOI : [10.1073/pnas.1007524107](https://doi.org/10.1073/pnas.1007524107).
- [136] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Hühn, C. Carrillo-Carrion, D. J. de Aberasturi, V. Merk, S. Barcikowski et W. J. Parak. "Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment : the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles". In : *Journal of the Royal Society Interface* 11.96 (2014), p. 20130931. DOI : [10.1098/rsif.2013.0931](https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0931).
- [137] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger et B. Nowack. "Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world". In : *Journal of Nanoparticle Research* 14.9 (2012). DOI : [10.1007/s11051-012-1109-9](https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9).
- [138] Z. S. Pillai et P. V. Kamat. "What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?" In : *The Journal of Physical Chemistry B* 108.3 (2004), p. 945–951. DOI : [10.1021/jp037018r](https://doi.org/10.1021/jp037018r).
- [139] R. Podila, R. Chen, P. C. Ke, J. M. Brown et A. M. Rao. "Effects of surface functional groups on the formation of nanoparticle-protein corona". In : *Applied Physics Letters* 101.26 (2012), p. 263701. DOI : [10.1063/1.4772509](https://doi.org/10.1063/1.4772509).

- [140] F. Porcaro, L. Carlini, A. Ugolini, D. Visaggio, P. Visca, I. Fratoddi, I. Venditti, C. Meneghini, L. Simonelli, C. Marini, W. Olszewski, N. Ramanan, I. Luisetto et C. Battocchio. "Synthesis and Structural Characterization of Silver Nanoparticles Stabilized with 3-Mercapto-1-Propansulfonate and 1-Thiogluco Mixed Thiols for Antibacterial Applications". In : *Materials* 12 (2016). DOI : [10.3390/ma9121028](https://doi.org/10.3390/ma9121028).
- [141] R. D. Prabha, R. Kandasamy, U. S. Sivaraman, M. A. Nandkumar et P. D. Nair. "Antibacterial nanosilver coated orthodontic bands with potential implications in dentistry". In : *The Indian Journal of Medical Research* 144.4 (2016), p. 580–586. DOI : [10.4103/0971-5916.200895](https://doi.org/10.4103/0971-5916.200895).
- [142] A. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun et P. Delangle. "A Serie of Tripodal Cysteine Derivatives as Water-Solluble Chelators that are Highly Selective fo Copper(I)". In : *Chem. Eur. J.* 17 (2011), p. 4418–4428. DOI : [10.1002/chem.201003613](https://doi.org/10.1002/chem.201003613).
- [143] A. Pujol. "Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre(I) pour les maladies de type Wilson". Université de Grenoble, 2010.
- [144] A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz et P. Delangle. "Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide". In : *Journal of the American Chemical Society* 133.2 (2011), p. 286–296. DOI : [10.1021/ja106206z](https://doi.org/10.1021/ja106206z).
- [145] J. Pult-Prociak et M. Banach. "Silver nanoparticles – a material of the future. ... ?" In : *Open Chemistry* 14.1 (2016). DOI : [10.1515/chem-2016-0005](https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005).
- [146] Pustovalov et Fritzsche. "Nonlinear Dependences of Optical Properties of Spherical Core–Shell Silver–Gold and Gold–Silver Nanoparticles on Their Parameters". In : *Plasmonics* 8.2 (2013), p. 983–993. DOI : [10.1007/s11468-013-9500-7](https://doi.org/10.1007/s11468-013-9500-7).
- [147] M. A. Pérez, R. Moiraghi, E. A. Coronado et V. A. Macagno. "Hydroquinone Synthesis of Silver Nanoparticles : A Simple Model Reaction To Understand the Factors That Determine Their Nucleation and Growth". In : *Crystal Growth & Design* 8.4 (2008), p. 1377–1383. DOI : [10.1021/cg7009644](https://doi.org/10.1021/cg7009644).
- [148] *R-Nano.fr*. <https://www.r-nano.fr/?locale=en>.
- [149] A. Rahaman, A. Manjunath et A. Mookherjee Bhattacharya. "NANOSILVER VERSUS POVIDONE IODINE DRESSING- EFFICACY IN THE MANAGEMENT OF CHRONIC DIABETIC FOOT ULCERS". In : *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences* 6.22 (2017), p. 1799–1803. DOI : [10.14260/Jemds/2017/395](https://doi.org/10.14260/Jemds/2017/395).
- [150] M. Rai, A. Yadav et A. Gade. "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials". In : *Biotechnology Advances* 27.1 (2009), p. 76–83. DOI : [10.1016/j.biotechadv.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002).

- [151] *Rapport INERIS : Argent et nano-argent*. INERIS, 2015.
- [152] M. A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A. N. Sabri, S. Riaz et S. Naseem. "Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes". In : *Nanomaterials* 6.4 (2016), p. 74. DOI : [10.3390/nano6040074](https://doi.org/10.3390/nano6040074).
- [153] A. E. Pradas del Real, H. Castillo-Michel, R. Kaegi, B. Sinnet, V. Magnin, N. Findling, J. Villanova, M. Carrière, C. Santaella, A. Fernández-Martínez, C. Levard et G. Sarret. "Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils". In : *Environmental Science & Technology* 50.4 (2016), p. 1759–1768. DOI : [10.1021/acs.est.5b04550](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04550).
- [154] B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K. A. Dawson et I. Lynch. "Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity : A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications". In : *Materials* 6.6 (2013), p. 2295–2350. DOI : [10.3390/ma6062295](https://doi.org/10.3390/ma6062295).
- [155] M. Roberts, M. Bentley et J. Harris. "Chemistry for peptide and protein PEGylation". In : *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012), p. 116–127. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.025>.
- [156] A. Russel et W. Hugo. "Antimicrobial activity and action of silver". In : *Progress in medicinal chemistry* 31 (1994).
- [157] O. Schäfer et C. SCHLEICHER. "Medical apparatus comprising an antimicrobial surface coating and method for controlling microorganisms on the surface of such an apparatus". Brev. US20170321067A1. 2017.
- [158] J. Seiffert, F. Hussain, C. Wiegman, F. Li, L. Bey, W. Baker, A. Porter, M. P. Ryan, Y. Chang, A. Gow, J. Zhang, J. Zhu, T. D. Tetley et K. F. Chung. "Pulmonary Toxicity of Instilled Silver Nanoparticles : Influence of Size, Coating and Rat Strain". In : *PLoS ONE* 10.3 (2015), e0119726. DOI : [10.1371/journal.pone.0119726](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119726).
- [159] I. Sekler, S. L. Sensi, M. Hershfinkel et W. F. Silverman. "Mechanism and Regulation of Cellular Zinc Transport". In : *Molecular Medicine* (2007), p. 7. DOI : [10.2119/2007-00037.Sekler](https://doi.org/10.2119/2007-00037.Sekler).
- [160] H. Sellers, A. Ulman, Y. Shnidman et J. E. Eilers. "Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces : implications for self-assembled monolayers". In : *Journal of the American Chemical Society* 115.21 (1993), p. 9389–9401.
- [161] J. H. Shannahan, R. Podila, A. A. Aldossari, H. Emerson, B. A. Powell, P. C. Ke, A. M. Rao et J. M. Brown. "Formation of a Protein Corona on Silver Nanoparticles Mediates Cellular Toxicity via Scavenger Receptors". In : *Toxicological Sciences* 143.1 (2015), p. 136–146. DOI : [10.1093/toxsci/kfu217](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu217).

- [162] V. K. Sharma, K. M. Siskova, R. Zboril et J. L. Gardea-Torresdey. "Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions : Fate, stability and toxicity". In : *Advances in Colloid and Interface Science* 204 (2014), p. 15–34. DOI : [10.1016/j.cis.2013.12.002](https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002).
- [163] A. Shkilnyy, M. Soucé, P. Dubois, F. Warmont, M.-L. Saboungi et I. Chourpa. "Poly(ethylene glycol)-stabilized silver nanoparticles for bioanalytical applications of SERS spectroscopy". In : *The Analyst* 134.9 (2009), p. 1868.
- [164] L. Sigg et U. Lindauer. "Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide". In : *Environmental Pollution* 206 (2015), p. 582–587. ISSN : 0269-7491. DOI : [10.1016/j.envpol.2015.08.017](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.017).
- [165] S. Silver, L. T. Phung et G. Silver. "Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds". In : *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33.7 (2006), p. 627–634. DOI : [10.1007/s10295-006-0139-7](https://doi.org/10.1007/s10295-006-0139-7).
- [166] C. Smythe. "the reaction of iodoacetate and of iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations". In : *Journal of biological chemistry* (1936).
- [167] V. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter et J. Susini. "A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra". In : *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy* 62.1 (2007), p. 63–68. DOI : [10.1016/j.sab.2006.12.002](https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.12.002).
- [168] I. Sondi et B. Salopek-Sondi. "Silver nanoparticles as antimicrobial agent : a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria". In : *Journal of Colloid and Interface Science* 275.1 (2004), p. 177–182. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
- [169] K Stamplecoskie et J Scaiano. "Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles". In : *Journal of the American Chemical Society* 132.6 (2010), p. 1825–1827. DOI : [10.1021/ja910010b](https://doi.org/10.1021/ja910010b).
- [170] V. Stone et al. "ITS-NANO - Prioritising nanosafety research to develop a stakeholder driven intelligent testing strategy". In : *Particle and Fibre Toxicology* 1.1 (2014), p. 9. DOI : [10.1186/1743-8977-11-9](https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-9).
- [171] A. Sze, D. Erickson, L. Ren et D. Li. "Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow". In : *Journal of Colloid and Interface Science* 261.2 (2003), p. 402–410. DOI : [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00142-5).

- [172] S.-P. Tai, Y. Wu, D.-B. Shieh, L.-J. Chen, K.-J. Lin, C.-H. Yu, S.-W. Chu, C.-H. Chang, X.-Y. Shi, Y.-C. Wen, K.-H. Lin, T.-M. Liu et C.-K. Sun. "Molecular Imaging of Cancer Cells Using Plasmon-Resonant-Enhanced Third-Harmonic-Generation in Silver Nanoparticles". In : *Advanced Materials* 19.24 (2007), p. 4520–4523. DOI : [10.1002/adma.200602213](https://doi.org/10.1002/adma.200602213).
- [173] *The Silver Institute*. http://www.mineralinfo.fr/sites/default/files/upload/documents/worldsilver2014_silverinstitute.pdf.
- [174] M. Trop, M. Novak, S. Rodl, B. Hellbom, W. Kroell et W. Goessler. "Silver-Coated Dressing Acticoat Caused Raised Liver Enzymes and Argyria-like Symptoms in Burn Patient : " in : *The Journal of Trauma : Injury, Infection, and Critical Care* 60.3 (2006), p. 648–652. DOI : [10.1097/01.ta.0000208126.22089.b6](https://doi.org/10.1097/01.ta.0000208126.22089.b6).
- [175] T. Van Teunenbroek, J. Baker et A. Dijkzeul. "The ProSafe White Paper : Towards a more effective and efficient governance and regulation of nanomaterials". In : (2017).
- [176] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski et M. S. Hull. "Nanotechnology in the real world : Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory". In : *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6 (2015), p. 1769–1780.
- [177] F. M. Veronese et G. Pasut. "PEGylation, successful approach to drug delivery". In : *Drug Discovery Today* 10.21 (2005), p. 1451–1458. DOI : [10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0).
- [178] G. Veronesi, C. Aude-Garcia, I. Kieffer, T. Gallon, P. Delangle, N. Herlin-Boime, T. Rabilloud et M. Carrière. "Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages". In : *Nanoscale* 7.16 (2015), p. 7323–7330. DOI : [10.1039/c5nr00353a](https://doi.org/10.1039/c5nr00353a).
- [179] G. Veronesi, A. Deniaud, T. Gallon, P.-H. Jouneau, J. Villanova, P. Delangle, M. Carrière, I. Kieffer, P. Charbonnier, E. Mintz et I. Michaud-Soret. "Visualization, quantification and coordination of Ag⁺ ions released from silver nanoparticles in hepatocytes". In : *Nanoscale* 8 (38 2016), p. 17012–17021. DOI : [10.1039/C6NR04381J](https://doi.org/10.1039/C6NR04381J).
- [180] G. Veronesi, A. Deniaud, T. Gallon, P.-H. Jouneau, J. Villanova, P. Delangle, M. Carrière, I. Kieffer, P. Charbonnier, E. Mintz et I. Michaud-Soret. "Visualization, quantification and coordination of Ag⁺ ions released from silver nanoparticles in hepatocytes". In : *Nanoscale* 8 (38 2016), p. 17012–17021. DOI : [10.1039/C6NR04381J](https://doi.org/10.1039/C6NR04381J).
- [181] E. Vlachou, E. Chipp, E. Shale, Y. T. Wilson, R. Papini et N. S. Moiemmen. "The safety of nanocrystalline silver dressings on burns : A study of systemic silver absorption". In : *Burns* 33.8 (2007), p. 979–985. DOI : [10.1016/j.burns.2007.07.014](https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.07.014).

- [182] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski et N. von Goetz. "Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products". In : *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012), p. 2242–2250. DOI : [10.1021/es204168d](https://doi.org/10.1021/es204168d).
- [183] R. E. Weisbarth, M. M. Gabriel, M. George, J. Rappon, M. Miller, R. Chalmers et L. Winterton. "Creating Antimicrobial Surfaces and Materials for Contact Lenses and Lens Cases :'' in : *Eye & Contact Lens : Science & Clinical Practice* 33 (2007), p. 426–429. DOI : [10.1097/ICL.0b013e318157f488](https://doi.org/10.1097/ICL.0b013e318157f488).
- [184] WHO 2002 : *silver and Silver compounds*. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad200201.pdf>.
- [185] S. W. Wijnhoven, W. J. Peijnenburg, C. A. Herberths, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, S. Dekkers, W. H. De Jong, M. van Zijverden, A. J. Sips et R. E. Geertsma. "Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment". In : *Nanotoxicology* 3.2 (2009), p. 109–138. DOI : [10.1080/17435390902725914](https://doi.org/10.1080/17435390902725914).
- [186] B. Wiley, Y. Sun, J. Chen, H. Cang, Z.-Y. Li, X. Li et Y. Xia. "Shape-Controlled Synthesis of Silver and Gold Nanostructures". In : *MRS Bulletin* 30.5 (2005), 356–361. DOI : [10.1557/mrs2005.98](https://doi.org/10.1557/mrs2005.98).
- [187] S. Wojtysiak, J. Solla-Gullon, P. Dłuzewski et A. Kudelski. "Synthesis of core-shell silver-platinum nanoparticles, improving shell integrity". In : *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 441 (2014), p. 178–183. DOI : [10.1016/j.colsurfa.2013.09.008](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.09.008).
- [188] *Woodrow Wilson Institute*. <http://www.nanotechproject.org/cpi/>.
- [189] G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton et N. D. Turner. "Glutathione Metabolism and Its Implications for Health". In : *The Journal of Nutrition* 134.3 (2004), p. 489–492. DOI : [10.1093/jn/134.3.489](https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489).
- [190] Z.-m. Xiu, Q.-b. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin et P. J. J. Alvarez. "Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles". In : *Nano Letters* 12.8 (2012), p. 4271–4275. DOI : [10.1021/nl301934w](https://doi.org/10.1021/nl301934w).
- [191] M. van der Zande, R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. B. Peters, P. C. H. Hollman, P. J. M. Hendriksen, H. J. P. Marvin, A. A.C. M. Peijnenburg et H. Bouwmeester. "Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure". In : *ACS Nano* 6.8 (2012), p. 7427–7442. DOI : [10.1021/nn302649p](https://doi.org/10.1021/nn302649p).
- [192] S. Zhang, K. Xu, L. Ge, M. A. Darabi, F. Xie, S. Derakhshanfar, Y. Liu, M. M. Q. Xing et H. Wei. "A novel nano-silver coated and hydrogel-impregnated polyurethane nanofibrous mesh for ventral hernia repair". In : *RSC Advances* 6.93 (2016), p. 90571–90578. DOI : [10.1039/C6RA10014G](https://doi.org/10.1039/C6RA10014G).