

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

TOXICITÉ DES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES CHEZ DIFFÉRENTS MODÈLES
BIOLOGIQUES

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
FRANÇOIS PERREAULT

AOÛT 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Cette thèse est dédiée à la mémoire du Professeur Radovan Popovic (1940-2012).

En tout premier lieu, je tiens à rendre hommage à mon directeur de thèse et ami, le Pr. Radovan Popovic, qui nous a quittés quelques jours après la finalisation de mon doctorat. Depuis le baccalauréat jusqu'à la fin de mes études supérieures, il m'a supporté, encouragé et conseillé avec un dévouement sans borne. Il fut une grande inspiration pour moi et son départ laisse un grand vide, professionnel et émotionnel, dans ma vie. Sans son support et sa confiance, ce travail de recherche n'aurait jamais été réalisé et je lui en serai toujours reconnaissant. Il n'aura pas eu la chance de voir cette thèse, sa dernière en carrière, dans sa forme finale mais j'espère qu'il pourra en être fier.

Merci également à mon co-directeur, Pr. David Dewez, qui a repris le flambeau de ma supervision à la suite du Pr. Popovic. Il m'a initié à la toxicologie alors que j'étais stagiaire de premier cycle et est revenu à l'UQAM pour superviser la fin de mes études. Il fut donc une influence importante dans mes études et je le remercie pour son support.

J'aimerais remercier les professeurs qui ont participé aux différents comités d'évaluation de mon doctorat : Pr. Sami Haddad, Pr. Wanda Smoragiewicz, Pr. Alfred Jaouich, Pr. Mario Fragata, Pr. Canh Le-Tien et Pr. L'Hocine Yahia. Leur apport critique à mon travail m'a beaucoup apporté dans mon cheminement académique.

Je remercie spécialement le Pr. William Gerson Matias pour l'accueil exceptionnel que j'ai reçu dans son laboratoire et son support indispensable lors de mon cheminement académique. Les trois mois que j'ai passés dans son laboratoire ont été une expérience inoubliable. Je remercie aussi mes collègues du LABTOX au Brésil, soit Silvia, Cristina, Ana Leticia, Cristiane, Barbara, Leticia, Jose, Juliana et Juliana.

Je remercie également le Pr. Philippe Juneau et son groupe de recherche. En plus d'avoir eu la chance de collaborer ensemble sur différents projets, la grande camaraderie photosynthétique et les rencontres partagées ont fait de l'équipe de recherche Juneau une partie constante de mes études supérieures. Merci Philippe, Annie, Charles, Gabrielle, Francis et Thibault.

J'ai eu la chance de travailler en collaboration avec différents groupes de recherche et je tiens à remercier chacun de ces groupes qui ont pu m'apporter de nouvelles perspectives de recherche. Je remercie le Pr. Mario Morin (UQAM) et la Dr. Nicoleta Bogdan, le Pr. Jérôme Claverie (UQAM) ainsi que ses étudiants Jean-Christophe et Wei-Hong, le Pr. Claude Fortin (INRS-ÉTÉ) et le Pr. Edmond Ekué Creppy (Université de Bordeaux 2).

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire qui ont partagé toutes ces années avec moi. Tout d'abord, Abdallah, mon camarade de recherche avec qui j'ai pu échanger tant de bonnes idées, Laura, pour sa gentillesse et sa grande connaissance de la culture des algues qui m'a assurément évité bien des problèmes, Olivier, pour son expérience qui m'a plus d'une fois aidé à régler mes problèmes de nature biochimique (et de swing), Louka, pour la bonne compagnie et les chants d'accompagnement, Cyril, pour le divertissement halieutique et une bonne amitié, Luc, pas toujours présent mais jamais oublié, c'était toujours un plaisir de discuter avec toi, Mahshid, pour son enthousiasme et sa volonté de travail. Merci également à tous les stagiaires (Catherine, Sébastien, Anne, Nabila, Szilvia, Marcelo et Julien) pour leur part respective dans mon cheminement académique.

Je remercie finalement ma femme Sabrina, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, et mes parents, pour leur support et leur confiance sans faille.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est constituée de cinq articles scientifiques et un rapport de conférence issus de mes travaux de doctorat. Ma contribution est majeure dans chacun de ces articles, où j'ai été le principal contributeur au travail expérimental et à la rédaction du manuscrit. Pour ces raisons, je figure comme premier auteur sur chacune de ces publications. La contribution des auteurs est détaillée au début de chaque chapitre. Selon les règles de présentation d'une thèse par article, ces travaux sont présentés en six chapitres distincts.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES	xviii
RÉSUMÉ.....	xxi
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I	
DÉVELOPPEMENT DES NANOTECHNOLOGIES ET RISQUES ASSOCIÉS AUX NANOMATÉRIAUX.....	2
1.1 Propriétés des nanomatériaux.....	2
1.2 Applications des nanomatériaux	5
1.3 Risque toxicologique des nanomatériaux.....	8
1.4. Nanotoxicologie : l'émergence d'une discipline.....	11
1.4.1 Interactions des nanomatériaux avec les organismes : rôle de la taille.....	12
1.4.2 Rôle de la chimie de surface dans la toxicité des nanomatériaux	15
1.4.3 Rôle de la solubilité dans la toxicité des nanomatériaux	16
1.4.4 Importance de la caractérisation en nanotoxicologie	19
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE : TOXICITÉ DES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES CHEZ DIFFÉRENTS MODÈLES BIOLOGIQUES	21
2.1. Évaluation du risque toxicologique des nanomatériaux.....	21
2.2 État des connaissances sur la toxicité des nanoparticules d'oxyde cuivrique et d'or.....	23
2.3 Indicateurs de toxicité en nanotoxicologie.....	25
2.3.1 Modèles biologiques pour l'étude de la toxicité des nanomatériaux	25
2.3.2 Bioindicateurs de viabilité cellulaire.....	26
2.3.3 Bioindicateurs photosynthétiques	28
2.3.4 Bioindicateurs liés au stress oxydatif.....	34
2.3.5 Bioindicateurs de génotoxicité.....	35

CHAPITRE III	
LES PROBLÉMATIQUES SPÉCIFIQUES DU PROJET DE RECHERCHE	37
CHAPITRE IV	
EVALUATION OF COPPER OXIDE NANOPARTICLE TOXICITY USING CHLOROPHYLL <i>a</i> FLUORESCENCE IMAGING IN <i>LEMNA GIBBA</i>	41
4.1 Résumé	44
4.2 Abstract	45
4.3 Introduction	46
4.4 Materials and methods	48
4.4.1 Biological material	48
4.4.2 CuO NPs preparation and characterization	48
4.4.3 Pollutant treatments	49
4.4.4 Chl <i>a</i> fluorescence measurements	50
4.4.5 Data analysis and statistics	51
4.5 Results and discussion	51
4.6 Acknowledgments	54
4.7 References	54
CHAPITRE V	
NANOPARTICULATE AND IONIC COPPER HAVE SIMILAR EFFECTS ON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY: A CHLOROPHYLL FLUORESCENCE STUDY	66
5.1 Résumé	67
5.2 Abstract	68
5.3 Introduction	69
5.4 Results and discussion	70
5.5 Conclusion	72
5.6 Acknowledgements	72
CHAPITRE VI	
POLYMER COATING OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES INCREASES NANOPARTICLES UPTAKE AND TOXICITY IN THE GREEN ALGA <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	77
6.1 Résumé	78
6.2 Abstract	79
6.3 Introduction	80

6.4 Materials and methods	81
6.4.1 Algal cultures	81
6.4.2 NP synthesis.....	82
6.4.3 NP treatment	82
6.4.4 Characterisation of the NP suspensions in the culture media	83
6.4.5 Intracellular formation of ROS	83
6.4.6 Chl <i>a</i> fluorescence measurements.....	84
6.4.7 Light microscopy	84
6.4.8 TEM analysis of intracellular CuO NPs.....	85
6.4.9 Intracellular copper concentration.....	85
6.4.10 Data analysis and statistics.....	86
6.5 Results	86
6.5.1 Characterisation of the NP suspensions in the media	86
6.5.2 NPs toxicity in <i>C. reinhardtii</i>	87
6.5.3 Interaction of NPs with algal cells	88
6.6 Discussion	89
6.7 Acknowledgements	91
6.8 References	92
CHAPITRE VII	
MECHANISMS OF BARE AND POLYMER-COATED COPPER OXIDE	
NANOPARTICLE TOXICITY IN <i>LEMNA GIBBA</i> : A COMPARISON WITH	
IONIC COPPER.....	
7.1 Résumé	102
7.2 Abstract	104
7.3 Introduction	105
7.4 Materials and methods	106
7.4.1 Biological material.....	106
7.4.2 NP synthesis.....	107
7.4.3 NP treatment	107
7.4.4 Characterisation of the NP suspensions in the culture media	108
7.4.5 Esterase enzymatic activity	108
7.4.6 ROS formation	109

7.4.7 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurements	109	
7.4.8 Growth rate and copper uptake	110	
7.4.9 Data analysis and statistics.....	111	
7.5 Results	111	
7.5.1 Characterisation of the NP suspensions in the media	111	
7.5.2 Toxicity to <i>L. gibba</i>	112	
7.5.3 Copper uptake	113	
7.6 Discussion	114	
7.7 Conclusion.....	116	
7.8 Acknowledgements	117	
7.9 References	117	
CHAPITRE VIII		
TOXICITY OF PAMAM-COATED GOLD NANOPARTICLES IN DIFFERENT UNICELLULAR MODELS.....		128
8.1 Résumé	129	
8.2 Abstract	130	
8.3 Introduction	131	
8.4 Materials and methods	132	
8.4.1 Cell cultures	132	
8.4.2 NPs synthesis	133	
8.4.3 NP characterization in the media	134	
8.4.4 Toxicity evaluation	134	
8.4.5 Data analysis and statistics.....	135	
8.5 Results	136	
8.5.1 Characterization of AuG0 NPs in the different culture media	136	
8.5.2 Toxicity of AuG0 NPs in different unicellular models.....	137	
8.5.3 Effect of the medium on AuG0 NPs toxicity.....	137	
8.6 Discussion	138	
8.7 Conclusions	140	
8.8 Acknowledgements.....	141	
8.9 References	141	

CHAPITRE IX	
GENOTOXIC EFFECTS OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES IN NEURO-2A CELL CULTURES	152
9.1 Résumé	153
9.2 Abstract	154
9.3 Introduction	155
9.4 Materials and methods	156
9.4.1 Cell culture	156
9.4.2 Preparation of the NP suspension	156
9.4.3 NP treatments	157
9.4.4 Mitochondrial activity assay	158
9.4.5 Lipid peroxidation	158
9.4.6 DNA extraction and genotoxicity assay	159
9.4.7 DNA fragmentation assay in agarose gel electrophoresis	159
9.4.8 DNA methylation	160
9.4.9 Micronucleus assay	160
9.4.10 Data analysis and statistics	161
9.5 Results	161
9.5.1 CuO NP agglomeration in the media	161
9.5.2 MTT assay	161
9.5.3 Lipid peroxidation	162
9.5.4 DNA fragmentation	162
9.5.5 DNA methylation	162
9.5.6 Micronucleus formation	163
9.6 Discussion	163
9.7 Conclusions	165
9.8 Acknowledgements	165
9.9 References	166
CHAPITRE X	
CONCLUSION	178
10.1 Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne en nanotoxicologie	178
10.2 Effet de la modification de surface sur la toxicité des nanoparticules	180

10.3 Effet des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques	181
10.4 Conclusion générale	184
BIBLIOGRAPHIE	187

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 A. Différents types de nanomatériaux selon leur origine (modifié d'après Stern et Mcneil, 2008); B. Photo de microscopie électronique à transmission de nanotubes de carbone issus d'une centrale de gaz naturel. C. Photo de microscopie électronique à transmission de nanotubes de carbone produits par voie catalytique (Murr et Garza, 2009).....	3
1.2 A. Changement des propriétés optiques de suspensions de NPs d'or de différentes tailles (modifié d'après Philip, 2008); B. Changement de l'émission de fluorescence de suspensions de NPs de Cd-Se-CdS de différentes tailles (modifié d'après Roduner, 2006 ; photo de H. Weller, University of Hamburg).	4
1.3 Relation entre le diamètre des NPs et le ratio surface / volume (en bleu) et le pourcentage d'atomes à la surface (en rouge) (modifié d'après Witschger et Fabries, 2005).	5
1.4 Recensement des produits contenant des nanomatériaux pour différentes catégories d'utilisation, selon l'inventaire du « <i>Project on Emerging Nanotechnologies du Woodrow Wilson Center for International Scholars</i> ». En inséré : augmentation du nombre de produits listés par année, depuis 2005 (Project on Emerging Nanotechnologies, 2011).....	7
1.5 Prédiction de l'augmentation de la production américaine de TiO ₂ sous forme nano (noir) et non-nano (gris) (modifié d'après Robichaud <i>et al.</i> , 2009).....	8
1.6 Transport des nanomatériaux dans l'environnement. Les voies d'entrées des nanomatériaux dans les écosystèmes sont indiquées en noir. Les processus affectant le devenir des nanomatériaux dans les écosystèmes sont indiqués en bleu (d'après les schémas de Nowack et Bucheli, 2007; Philip, 2008; Batley et McLaughlin, 2010).	11
1.7 Différents mécanisme de pénétration des nanomatériaux dans la cellule (modifié d'après Krug et Wick, 2011).	13
1.8 Schéma des différents types de complexes que peuvent faire les métaux en solution. L'ion libre (A) est en équilibre dynamique avec les hydroxo-complexes (B), les complexes inorganiques (C), les complexes organiques (D) et les complexes métaux-substances humiques (E) (Campbell et Couillard, 2004).	17
1.9 Modèle d'interactions des NPs de cuivre dans la cellule. À gauche, les NPs sont solubilisées en ions dans un effet « Cheval de Troie » ; à droite les NPs ne sont pas solubilisées (modifié de Studer <i>et al.</i> , 2010).	19

2.1	Les différentes étapes de la gestion du risque d'une substance (modifié de Krug et Wick, 2011).....	21
2.2	Représentation schématisée (haut) et photo de microscopie électronique des NPs de CuO nues ou encapsulées dans un polymère ainsi que des NPs d'or stabilisées par des groupements PAMAM. La barre noire des images de microscopie électronique représente une échelle de 50 nm.	23
2.3	Approches méthodologiques pour évaluer la viabilité cellulaire. Les tests du bleu de trypan et de la lactate déshydrogénase (LDH) évaluent l'intégrité membranaire par la pénétration du bleu de trypan dans la cellule ou la sortie du LDH hors de la cellule. Le test du MTT mesure la conversion du MTT en formazan. Le test de la fluorescéine diacétate (FDA) mesure l'hydrolysatation du FDA en fluorescéine (fluorescente) par les estérases et la sortie du marqueur polaire fluorescent hors de la cellule.....	27
2.4	Transport d'électrons (en rouge) et de protons (en bleu) dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I (PSII, PSI), le cytochrome b_6f (Cyt b_6f) et le complexe H^+ -ATP synthétase (CF_0 et CF_1). Les transporteurs d'électrons mobiles sont les plastoquinones (PQ) et les plastocyanines (PC) (modifié de Malkin et Niyogi, 2000).....	28
2.5	Voies de dissipation de l'énergie lumineuse par le photosystème II (d'après Baker, 2008).....	30
2.6	Cinétique rapide de fluorescence induite par un éclair saturant. Les transitions O, J, I et P sont indiquées à 50 μs , 2 ms, 30 ms et au tF_M , soit le temps donnant l'émission maximale de fluorescence. L'état d'oxydo-réduction de Q_A et Q_B est indiqué pour chaque transition. En inséré: fluorescence chlorophyllienne normalisée selon $V = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$ montrant la linéarité du début de la courbe de fluorescence (modifié de Strasser <i>et al.</i> , 2004).....	31
2.7	Cinétique de fluorescence chlorophyllienne modulée. F_0 et F'_0 indiquent la fluorescence de base (centres réactionnels oxydés) aux états adaptés à l'obscurité et à la lumière, respectivement. F_V et F'_V représentent la fluorescence variable aux états adaptés à l'obscurité et à la lumière, respectivement. F_M et F'_M indiquent la fluorescence maximale (centres réactionnels réduits) aux états adaptés à l'obscurité et à la lumière, respectivement. L'ouverture et la fermeture des différentes lumières sont indiquées par les flèches (modifié de Schreiber <i>et al.</i> , 1986).....	33
2.8	Différents effets génotoxiques et les approches méthodologiques pour leur évaluation (modifié d'après Fenech <i>et al.</i> , 1999; Mortelmans et Zeiger, 2000; Mikhailenko <i>et al.</i> , 2005).	37
4.1	The change of active photosynthetic surface in <i>L. gibba</i> whole plants exposed 48h to different concentrations of CuO NPs, ionic copper ($CuSO_4$) and polyacrylic	

- acid (PAA). The active photosynthetic surface was evaluated by imaging of the F_0 fluorescence yield for entire plant distributed in the microplate. Treatments' concentrations in the different rows (A, B, C, D) are distributed in the microplate according to table 1. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value of F_0 fluorescence yield. 60
- 4.2 Change in the Chl a fluorescence kinetics of *L. gibba* leaves exposed 48 hours to 0.4 g l^{-1} of CuO NPs, its ionic copper fraction alone (13.16 mg l^{-1} Cu added as CuSO_4) and its organic fraction alone (0.27 g l^{-1} PAA). For treatments details, see materials and methods. 61
- 4.3 Change of maximal PSII quantum yield (Φ_{MII}), operational PSII quantum yield (Φ'_{MII}), photochemical (qP) and non-photochemical fluorescence quenching coefficient (qN) and the non-photochemical quenching parameter (NPQ). Different concentrations are indicated by the different symbols on the figure. The error bars indicate the standard deviations calculated on an average of 6 replicates. 62
- 4.4 The change of the maximal PSII quantum yield (Φ_{MII}) in *L. gibba* whole plants by exposed to different concentrations of CuO NPs, determined by Chl a fluorescence imaging PAM method. CuO NPs' concentrations are indicated on the left side of the figure and exposition time on top of the figure. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. The change of color on the leaf area in the figure indicates the change of the Φ_{MII} value on this specific leaf area. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value Φ_{MII} 63
- 4.5 The change of the operational PSII quantum yield (Φ'_{MII}) in *L. gibba* whole plants by exposed to different concentrations of CuO NPs, determined by Chl a fluorescence imaging PAM method. CuO NPs' concentrations are indicated on the left side of the figure and exposition time on top of the figure. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. The change of color on the leaf area in the figure indicates the change of the Φ'_{MII} value on this specific leaf area. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value Φ'_{MII} 64
- 4.6 The change of the non-photochemical quenching of fluorescence (qN) in *L. gibba* whole plants exposed to different concentrations of CuO NPs, determined by Chl a fluorescence imaging PAM method. CuO NPs' concentrations are indicated on the left side of the figure and exposition time on top of the figure. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. The change of color on the leaf area in the figure indicates the change of the qN value on this specific leaf area. Color

scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value of qN.	65
5.1 A. Rapid rise of Chl fluorescence in <i>L. gibba</i> leaves after 48h of treatment. Curve a: Control. Curve b: 0.7 g l ⁻¹ CuO NPs. Curve c: 1 g l ⁻¹ CuO NPs. Curve d: 2.1 g l ⁻¹ CuO NPs Curve e: 4.5 g l ⁻¹ CuO NPs. Curve f: 0.004 g l ⁻¹ Cu. Curve g: 0.008 g l ⁻¹ Cu. Curve h: 0.016 g l ⁻¹ Cu; B. Radar plot of photosynthetic-based fluorescence parameters named as JIP-test. Grey line: Control. Black line: 21 g l ⁻¹ CuO NPs. Dashed black line: 0.008 g l ⁻¹ Cu. For details on the JIP-test parameters, see Strasser <i>et al.</i> (2004).	74
5.2 PAM fluorescence kinetic in <i>L. gibba</i> leaves after 48h of treatment for control, 2.1 g l ⁻¹ CuO NPs or 0.008 g l ⁻¹ Cu treatment. Chl fluorescence was measured as in Perreault <i>et al.</i> (2010).	75
5.3 The change of photosynthetic parameters evaluated from the PAM fluorescence kinetic in <i>L. gibba</i> leaves after 48h of treatment for soluble Cu (left) or CuO NPs (right).	76
6.1 Bare and polymer coated (CS-CuO) NPs size distribution in HSM media, for a [CuO] of 0.04 g l ⁻¹	96
6.2 Formation of ROS (—) and change in PSII performance index (PI, - - -) in <i>C. reinhardtii</i> cells exposed 6 h to bare CuO NPs (●) and polymer-coated CS-CuO NPs (□). NPs effect is compared on the basis of mass concentration (A) and total surface area (B).	97
6.3 Agglomeration of <i>C. reinhardtii</i> cell culture for control or after 6 h of treatment to 0.04 g l ⁻¹ of bare CuO NPs or polymer-coated CuO NPs.	98
6.4 TEM images of <i>C. reinhardtii</i> cells for control and after 6 h of treatment to 0.04 g l ⁻¹ of bare CuO NPs or polymer-coated CuO NPs. Cellular structures are identified as the pyrenoid (Pyr), the chloroplast (C), starch granules (S) and CuO NPs agglomerates (NP). Insert (right picture): enlarged view of a NP agglomerates.	99
6.5 Energy-dispersive X-ray spectroscopy of metallic agglomerates found in the cytoplasm of CuO NPs-treated <i>C. reinhardtii</i> cells.	100
6.6 Intracellular total copper concentration in <i>C. reinhardtii</i> cells for control and after 6 h of treatment to 0.04 g l ⁻¹ of bare CuO NPs or polymer-coated CuO NPs. Letters (a,b,c,d) indicate results statistically different from each other.	101
7.1 A. Morphological changes of <i>L. gibba</i> plants induced by bare CuO NPs, polymer coated CS-CuO NPs and soluble copper (CuSO ₄) after 48h of treatments. Numbers indicate measured amounts of total copper in the media. B. Visualization of the maximum PSII quantum yield (Φ _{MII}) in <i>L. gibba</i> plants	

exposed 48h to CuO NPs, CS-CuO NPs and CuSO ₄ using chlorophyll fluorescence imaging. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value of Φ_{MII}	122
7.2 Change in growth rate (white bars), operational quantum yield of PSII as Φ'_{MII} (grey bars), PSII performance index as P.I. (dotted bars) and esterase enzymatic activity (slashed bars) for <i>L. gibba</i> plants exposed 24 and 48h to CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO ₄). The horizontal dashed line indicates the control value (100%). Treatments are compared on the basis of total copper concentration in the media of exposure.....	123
7.3 Change in ROS formation, indicated by the DCF fluorescence emission, in <i>L. gibba</i> plants exposed 24h (white bars) and 48h (grey bars) to CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO ₄). The horizontal dashed line indicates the control value (100%). Treatments are compared on the basis of total copper concentration in the media of exposure.....	124
7.4 Total copper content in <i>L. gibba</i> plants (dry weight) exposed 24h (white bars) and 48h (grey bars) to CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO ₄). Treatments are compared on the basis of total copper concentration in the media of exposure.	125
7.5 Relationship between copper content in the plant and the change of growth rate, operational quantum yield of PSII (Φ'_{MII}), PSII performance index (P.I.), esterase enzymatic activity and the formation of reactive oxygen species (ROS) in <i>L. gibba</i> plants exposed 48h to CuO NPs (dots), CS-CuO NPs (squares) and copper sulfate (CuSO ₄) (triangles).	126
8.1 Synthesis of gold NP with G0 PAMAM adsorbed on its surface. For details see section 8.4.2.....	145
8.2 TEM microscopy images of AuG0 NPs suspensions (1 mg ml ⁻¹) prepared in the different treatment media used for N2A and Vero cells, <i>C. reinhardtii</i> and <i>V. fischeri</i> . For more details on the culture media, see section 8.4.1.....	146
8.3 FTIR spectra of the AuG0 NPs suspension (20 mg ml ⁻¹) in the different culture media used for N2A and Vero cells, <i>C. reinhardtii</i> and <i>V. fischeri</i> . The arrows indicate the amide I and II peaks found in the three spectra. For more details on the culture media, see section 8.4.1.....	147
8.4 Absorption spectra of the AuG0 NPs suspension (0.1 mg ml ⁻¹) in the different culture media used for N2A and Vero cells, <i>C. reinhardtii</i> and <i>V. fischeri</i> . For more details on the culture media, see section 8.4.1.	148
8.5 Change of cell viability indicators in N2A and Vero cells exposed 24 h, <i>C. reinhardtii</i> cells exposed for 30 min and 24 h, and in <i>V. fischeri</i> exposed for 30 min to AuG0 NPs. Data are presented as mean \pm standard deviation. Stars	

indicate results significantly different between the 30 min and 24 h tests (for $p < 0.05$).....	149
8.6 A. UV-VIS absorption spectra of AuG0 NPs prepared in the <i>C. reinhardtii</i> media with 10% RPMI. B. Effect of AuG0 NPs prepared in RPMI (10% final RPMI concentration in treatment) for <i>C. reinhardtii</i> . Data are presented as mean \pm standard deviation. Dashed line indicates the effect of AuG0 NPs in the <i>C. reinhardtii</i> media only, to facilitate comparison. Stars indicate significantly different toxicity of AuG0 NP in <i>C. reinhardtii</i> medium compared to 10% RPMI medium (for $p < 0.05$).	150
9.1 A. SEM microscopy picture of CuO NPs in water. B. TEM microscopy picture of CuO NPs in the culture media.	170
9.2 Size distribution of BSA-coated CuO NPs in the culture media. Bold line indicates the size distribution of NPs. The dashed line indicates the cumulative total fraction of particles.....	171
9.3 Change of N2A cell viability after 24h of exposure to CuO NPs. Cell viability was determined using the mitochondrial MTT assay (n=3). Insert : Change in MTT reduction induced by CuO NPs alone.....	172
9.4 MDA concentrations in N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l ⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide was used as a positive control (n=3).	173
9.5 DNA fragmentation in N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l ⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide was used as a positive control. A. Agarose gel electrophoresis of Neuro-2A DNA extracts; B. Image analysis of DNA band intensity (n=3 gels).	174
9.6 Change in the ratio m5dC/(dC+m5dC) in DNA extracts of N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l ⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide was used as a positive control (n=3).	175
9.7 Examples of control (A) and micronucleated cells (B,C,D) for N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l ⁻¹ CuO NPs.	176
9.8 Micronucleus count in N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l ⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide (1 mg l ⁻¹) was used as a positive control (n=3).....	177

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Concentrations de certains nanomatériaux dans les sols et les eaux de surface selon différents modèles. Les concentrations indiquées représentent les prédictions de scénarios avec faibles ou fortes émissions dans les différentes régions du monde..	10
1.2 Distribution des NPs d'or stabilisées par le citrate chez des rats 24 h après une injection par voie intraveineuse.	14
2.1 Paramètres photosynthétiques déterminés à partir de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne (Strasser <i>et al.</i> , 1995; 2004).....	32
2.2 Paramètres photosynthétiques obtenus à partir de la cinétique de fluorescence modulée.	33
2.3 Sources, effets, configuration électronique et demie-vie des principales espèces réactives de l'oxygène (d'après D'autréaux et Toledano, 2007; Karuppanapandian <i>et al.</i> , 2011).....	34
4.1 Disposition of the different treatments on the microplate. Concentrations of 0.00 indicate control samples.	59
7.1 Characterisation of CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate in the culture media used for treatments and EC ₅₀ value determined using the decrease of growth rate after 48 h of treatments.	127
8.1 NOEC, EC ₁₀ and EC ₅₀ values of AuG0 NPs obtained using different bioassays. AuG0 NP effects were measured on N2A and Vero cells using the MTT assay, on <i>C. reinhardtii</i> with the FDA assay and on <i>V. fischeri</i> with the Microtox ISO-11348-3 assay. Letters in superscript indicate significantly different results ($p < 0.05$).	151

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AuG0 NPs	Nanoparticules d'or stabilisées par des groupements de type poly(amidoamine) de génération 0
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
Chl	Chlorophylle
CS-CuO NPs	Nanoparticules de type « <i>Core-Shell</i> », avec un cœur inorganique de CuO et une capsule de polymère organique
CuO NPs	Nanoparticule d'oxyde de cuivre
dC	Cytosine déoxyribonucléoside
DCF	2',7'-dichlorofluorescéine
DNA	« <i>Desoxiribonucleic acid</i> »
EC ₁₀	Concentration efficace induisant 10% de l'effet maximal
EC ₅₀	Concentration efficace médiane, induisant 50% de l'effet maximal
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
F _O	Fluorescence de base émise par les antennes chlorophylliennes lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont oxydés
F _M	Fluorescence maximale induite par un éclair saturant, lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont réduits.
F _S	Fluorescence variable mesurée sous illumination actinique continue à l'état d'équilibre du transport d'électrons photosynthétique
F' _O	Fluorescence émise par les antennes chlorophylliennes à l'état d'équilibre du transport d'électrons photosynthétique lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont oxydés

F' _M	Fluorescence maximale à l'état d'équilibre du transport d'électrons, lorsque les centres réactionnels du photosystème II sont réduits.
FDA	Fluorescéine diacétate
FTIR	« <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> »
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate
HSM	Milieu de culture « <i>High Salt Medium</i> »
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique par torche de plasma
JIP-test	Ensemble de paramètres photosynthétiques basés sur la théorie du flux d'énergie dans les membranes photosynthétiques
LDH	lactate déshydrogenase
MDA	Malondialdéhyde, un sous-produit de la peroxidation des lipides
MTT	3-(4,5-diméthylethiazole-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide
M ⁵ dC	5-méthyle déoxycytosine
NADP ⁺	Nicotidamine adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée
NADPH	Nicotidamine adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NNI	« <i>National Nanotechnology Initiative</i> »
NPQ	Atténuation non-photochimique de fluorescence chlorophyllienne
NPs	Nanoparticules
N2A	Lignée cellulaire Neuro-2A de neuroblastomes de souris
PAA	Acide polyacrylique
PAM	Fluorescence chlorophyllienne mesurée par la méthode « <i>Pulse-Amplitude-Modulated</i> »
PAMAM	dendrimère de type poly(amidoamine)
PBS	Tampon « <i>Phosphate buffered saline</i> »
PC	Plastocyanine

PI	Indice de performance du photosystème II
PSII	Photosystème II
PQ	Plastoquinone
Q _A	Quinone A
qN	Atténuation non-photochimique de fluorescence chlorophyllienne
qP	Atténuation photochimique de fluorescence chlorophyllienne
RPMI-1640	Milieu de culture pour les cellules animales <i>in vitro</i>
ROS	« <i>Reactive oxygen species</i> »
TBA	Acide thiobarbiturique
TEM	« <i>Transmission electron microscopy</i> »
UV-VIS	Spectroscopie d'absorption ultraviolet et visible.
Vero	Lignée cellulaire Vero d'épithélium de rein de singe
Φ'_{MII}	Rendement quantique maximal du Photosystème II lorsque l'appareil photosynthétique est adapté à l'obscurité
Φ'_{MII}	Rendement quantique opérationnel du Photosystème II à l'état d'équilibre adapté à la lumière
Φ_{NO}	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée du photosystème II.

RÉSUMÉ

L'utilisation des nanoparticules (NPs) métalliques en nanotechnologie entraîne un risque de contamination de l'environnement qui est difficile à évaluer en raison du manque de connaissance toxicologique sur les NPs. La compréhension des mécanismes de toxicité des NPs peut favoriser leur utilisation sécuritaire. Dans cette optique, l'objectif principal de cette thèse est de mieux comprendre la toxicité des NPs métalliques.

Le premier objectif visait à évaluer les effets des NPs de CuO sur la photosynthèse à l'aide de bioindicateurs basés sur la fluorescence chlorophyllienne. Les NPs de CuO encapsulées dans un polymère, modèle des NPs pouvant être libérées des peintures antisalissures, induisent une inhibition de la photosynthèse du macrophyte aquatique *Lemna gibba*. L'imagerie de fluorescence chlorophyllienne est montrée comme une approche utile pour évaluer la toxicité des NPs. De plus, en utilisant deux approches complémentaires de fluorescence chlorophyllienne, le cuivre ionique et les NPs de CuO ont montré des effets similaires sur l'activité photosynthétique. La solubilisation des NPs de CuO est donc proposée comme principal mécanisme d'action des NPs de CuO sur la photosynthèse.

Le deuxième objectif consistait à déterminer comment l'encapsulation dans un polymère modifie la toxicité des NPs. La toxicité de NPs de CuO nues ou encapsulées a été évaluée chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. L'encapsulation augmente la toxicité des NPs encapsulées en augmentant leur pénétration dans la cellule, ce qui indique que la toxicité des NPs de CuO est associée à des interactions intracellulaires. Les mécanismes cellulaires d'action des NPs ont été étudiés chez *L. gibba* en évaluant la toxicité en relation avec l'accumulation de cuivre dans l'organisme. Cette relation indique que les NPs de CuO nues et encapsulées n'ont pas le même mode d'action au niveau cellulaire. La modification des propriétés de surface des NPs par l'encapsulation modifie le mécanisme d'action cellulaire en augmentant la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les NPs métalliques peuvent donc avoir des mécanismes d'action différents selon leurs propriétés physico-chimiques.

Le dernier objectif était de caractériser la toxicité des NPs métalliques chez différents modèles biologiques. Pour les NPs d'or stabilisées par un dendrimère poly(amidoamine) (PAMAM), la toxicité était liée au changement des propriétés physico-chimiques des NPs dans le milieu. Ces NPs étaient toxiques pour l'algue *C. reinhardtii* et la bactérie *Vibrio fischeri* alors que les cellules animales Neuro-2A et Vero n'étaient pas affectées. La différence de sensibilité était liée à l'altération des propriétés des NPs dans le milieu, soulignant ainsi le besoin de caractériser les NPs dans le milieu utilisé pour évaluer la toxicité. Pour les NPs de CuO, la toxicité a été étudiée en conditions *in vitro* chez la lignée cellulaire Neuro-2A. Les NPs de CuO ont montré des effets cytotoxiques et génotoxiques sur ces cellules. La formation de micronoyaux était l'indicateur de toxicité le plus sensible, ce qui montre que la génotoxicité est un aspect important de la toxicité des NPs de CuO.

Cette thèse permet de conclure que l'évaluation du risque toxicologique des NPs métalliques doit être réalisée en considération du changement de leurs propriétés physico-chimiques selon le milieu utilisé et les modifications apportés aux NPs. La compréhension des liens entre les propriétés des NPs et leur toxicité peut permettre une utilisation plus sécuritaire des nanomatériaux dans les applications issues de la nanotechnologie.

Mots clés : nanotoxicologie, génotoxicité, photosynthèse, fluorescence chlorophyllienne.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis la révolution industrielle, l'empreinte de l'homme sur son environnement devient de plus en plus importante. Les activités humaines sont en constante évolution et les procédés industriels changent avec chaque nouvelle avancée technologique. Depuis le début du nouveau millénaire, le domaine d'innovation qui progresse le plus rapidement est sans aucun doute la nanotechnologie.

Avec les changements technologiques, la nature des contaminants émis par les activités humaines change également. Les recherches en toxicologie environnementale doivent suivre l'émergence de ces nouveaux contaminants afin de prévenir leurs impacts sur la santé humaine et l'environnement. Les nanomatériaux sont la plus récente addition à la diversité des contaminants environnementaux provenant des activités humaines (Delay et Frimmel, 2012) cependant la compréhension de leurs effets sur les organismes est encore à ses débuts.

En raison de leur taille nanométrique, les nanomatériaux possèdent des propriétés physico-chimiques différentes des mêmes matériaux de plus grande taille. Ces propriétés uniques sont utilisées dans tous les domaines d'applications. Actuellement, les nanotechnologies sont en pleine expansion et de nouveaux produits contenant des nanomatériaux sont constamment mis sur le marché. Le développement des nanotechnologies augmente le risque d'exposition aux contaminants de taille nanométrique. Le risque toxicologique de ces composés est cependant difficile à évaluer car plusieurs aspects des mécanismes de toxicité des nanomatériaux ne sont pas encore bien compris.

Les nanoparticules (NPs) métalliques sont très répandues à cause de la simplicité de leurs méthodes de synthèse et de la diversité de leurs applications. La toxicité des NPs métalliques a été montrée chez plusieurs organismes, cependant plusieurs questions fondamentales demeurent quant à leurs effets sur les systèmes biologiques. Leur taille à l'échelle nanométrique leur procure des propriétés uniques qui peuvent entraîner des effets toxiques nouveaux et différents qui ne sont pas encore élucidés. Pour permettre un développement responsable et sécuritaire des nanotechnologies utilisant des NPs métalliques, une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité des NPs métalliques au niveau cellulaire est donc requise.

CHAPITRE I

DÉVELOPPEMENT DES NANOTECHNOLOGIES ET RISQUES ASSOCIÉS AUX NANOMATÉRIAUX

1.1 Propriétés des nanomatériaux

Les nanomatériaux sont une classe très large de matériaux regroupant des composés de nature organique, inorganique ou composite, dont au moins une dimension est à l'échelle nanométrique (10^{-9} m). Le terme nanoparticule désigne quant à lui une particule dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique (International Organization for Standardization, 2008). Les nanomatériaux se retrouvent en abondance dans l'environnement et peuvent être d'origine naturelle ou anthropique (Figure 1.1A). La principale source de nanomatériaux dans l'environnement est la combustion dans les forêts, les volcans, les voitures et les usines (Nowack et Bucheli, 2007; Lanone et Boczkowski, 2010 ; Myung et Park, 2012). Les nanomatériaux issus de la combustion sont principalement constitués de composés de carbone (noir de carbone, fullerène, nanotubes de carbone) (Murr et Garza, 2009).

La deuxième catégorie de nanomatériaux anthropiques est les nanomatériaux manufacturés, soit des matériaux produits intentionnellement pour avoir une taille à l'échelle nanométrique en vue d'obtenir des propriétés nouvelles. Ces nanomatériaux peuvent être produits par synthèse chimique (approche ascendante ou « *bottom-up* ») ou en brisant mécaniquement des matériaux de plus grande taille (approche descendante ou « *top-bottom* »). Les nanomatériaux manufacturés diffèrent des nanomatériaux naturels par l'homogénéité de leurs caractéristiques, leur plus grande stabilité et la présence de groupements chimiques spécifiques à leur surface pour favoriser des applications particulières. La Figure 1.1 démontre la différence observée à l'échelle nanométrique d'un échantillon de nanotubes de carbone produits par combustion dans une centrale de gaz naturel (Figure 1.1B) et des nanotubes de carbone produits par voie de synthèse en laboratoire (Figure 1.1C).

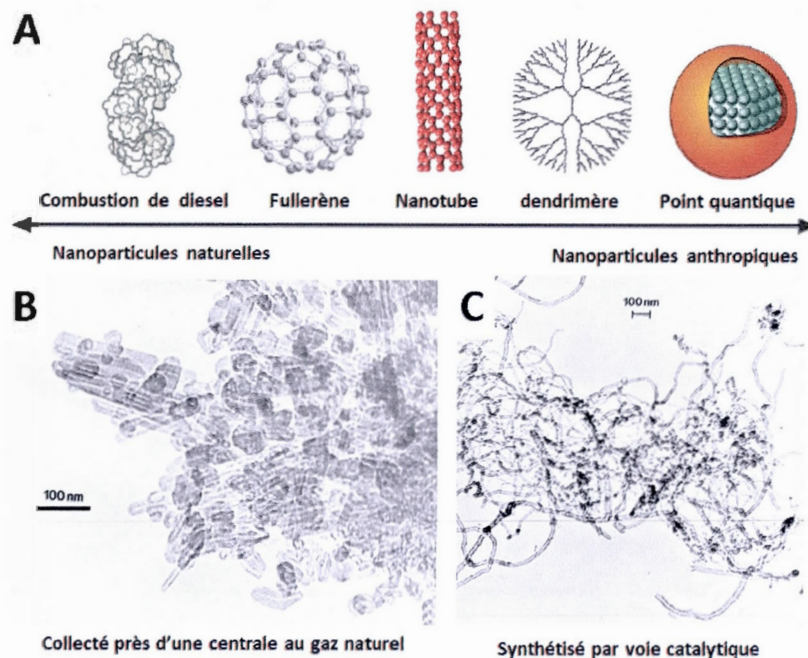


Figure 1.1 A. Différents types de nanomatériaux selon leur origine (modifié d'après Stern et Mcneil, 2008) ; B. Photo de microscopie électronique à transmission de nanotubes de carbone issus d'une centrale de gaz naturel. C. Photo de microscopie électronique à transmission de nanotubes de carbone produits par voie catalytique (Murr et Garza, 2009).

À l'échelle macroscopique, les propriétés des matériaux sont principalement définies par les propriétés de ses constituants puisque la surface et le volume sont considérés comme un continuum; les phénomènes de surface sont négligeables à cette échelle (Witschger et Fabries, 2005). Toutefois, avec la diminution de la taille à l'échelle nanométrique, de nouvelles propriétés apparaissent et les nanomatériaux peuvent agir de façon très différente du même composé de taille supérieure. Par exemple, un métal inerte, comme l'or, peut devenir réactif à l'échelle nanométrique (Brown *et al.*, 2008). Le cuivre, qui est un métal conducteur et peu magnétique, devient semiconducteur (Anandan et Yang, 2007) ou magnétique (Rehman *et al.*, 2011) sous forme de NPs. Le changement des propriétés optiques des NPs d'or ou des points quantiques de Cd-Se-CdS en fonction de la taille est montré à la figure 1.2.

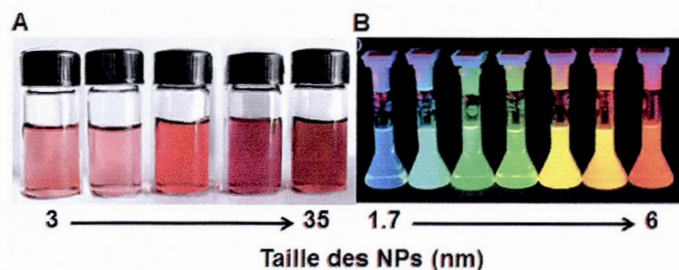


Figure 1.2 A. Changement des propriétés optiques de suspensions de NPs d'or de différentes tailles (modifié d'après Philip, 2008); B. Changement de l'émission de fluorescence de suspensions de NPs de Cd-Se-CdS de différentes tailles (modifié d'après Roduner, 2006 ; photo de H. Weller, University of Hamburg).

Plusieurs facteurs sont responsables de l'apparition de ces propriétés uniques à l'échelle nanométrique: le grand pourcentage d'atomes à la surface par rapport au volume, l'augmentation du nombre d'atomes à faible niveau de coordination à la surface, la dominance des forces électromagnétiques pour des particules de très faible masse et les effets de confinements quantiques (Roduner, 2006). Ces phénomènes prennent de plus en plus d'importance alors que la taille d'un matériau diminue en deçà de 100 nm. La figure 1.3 illustre la relation entre la taille d'une particule, le rapport entre sa surface et son volume, ainsi que le pourcentage d'atomes se retrouvant à la surface de la particule. Avec l'augmentation du rapport surface : volume et principalement du pourcentage d'atomes présents à la surface comparativement au volume, les phénomènes de surface deviennent plus importants et l'activité de surface devient de plus en plus significative dans la détermination des propriétés physico-chimiques des matériaux à l'échelle nanométrique (Witschger et Fabries, 2005).

Au-delà de la taille, les propriétés des nanomatériaux sont le résultat d'un ensemble de facteurs liés à la nature du composé, sa morphologie, sa cristallinité, la composition de sa surface et le degré d'agglomération des particules (Grassian, 2008). La nature des éléments formant le nanomatériau (métal, carbone, polymère) est évidemment le premier facteur qui contrôle la nature de ses propriétés. Toutefois, la modification de la surface d'un nanomatériau peut complètement altérer ses propriétés puisque la nature des éléments responsables des nombreux phénomènes de surfaces à l'échelle nanométrique est modifiée.

Par exemple, l'émission de photoluminescence des NPs de ZnO est modifiée par l'encapsulation des NPs dans un polymère (Zhang *et al.*, 2012). La forme des nanomatériaux est également un facteur très important puisque les atomes retrouvés aux pointes ou sur les coins des particules de forme non-sphérique possèdent un plus faible nombre de coordination que ses atomes de surfaces (Sau *et al.*, 2010). Les NPs de taille irrégulière, comme des nanocubes ou des nano-fleurs, peuvent ainsi posséder des propriétés différentes comparativement aux NPs sphériques (Kharisov, 2008 ; Sau *et al.*, 2010). Le développement des méthodes de synthèse permet un meilleur contrôle de la taille, de la morphologie et de la pureté des nanomatériaux, ce qui permet ainsi de mieux contrôler leurs propriétés.

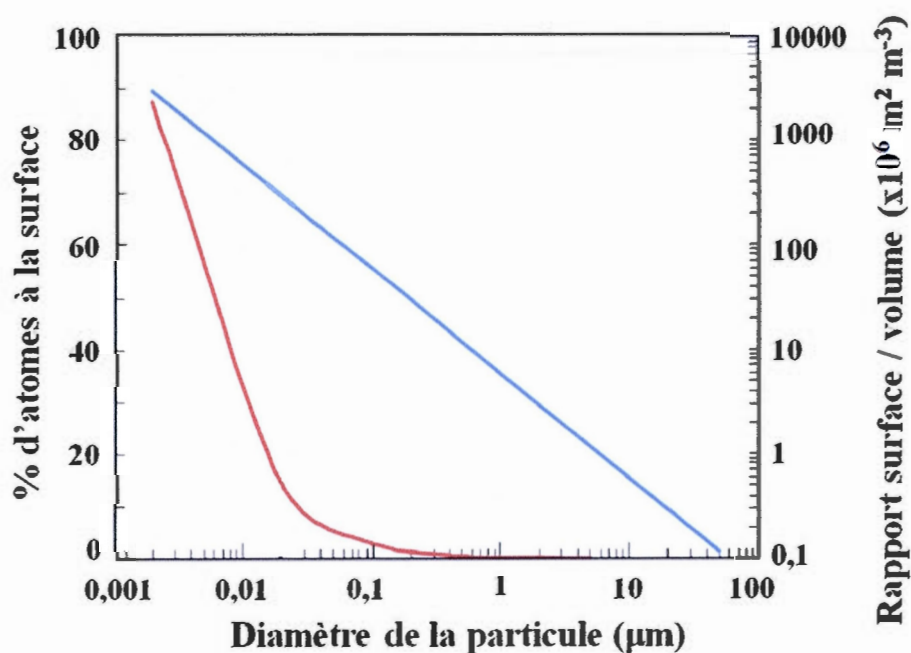


Figure 1.3 Relation entre le diamètre des NPs et le ratio surface / volume (en bleu) et le pourcentage d'atomes à la surface (en rouge) (modifié d'après Witschger et Fabries, 2005).

1.2 Applications des nanomatériaux

L'aspiration de manipuler la matière à l'échelle nanométrique pour créer des matériaux aux propriétés nouvelles n'est pas récente; le prix Nobel de physique Richard Feynman, lors d'une conférence à la « *California Institute of Technology* » en 1959, avançait l'idée en ces mots : « *lorsque nous aurons quelques contrôles sur l'arrangement des atomes à*

une petite échelle, nous découvrirons que la matière possède des propriétés énormément plus étendues et qu'avec nous pourrons réaliser beaucoup plus de choses » (Feynman, 1959). Toutefois, la réelle explosion des nanotechnologies dans les produits d'usage courant a débuté en 2000 avec la création aux États-Unis de la « *National Nanotechnology Initiative* » (NNI), un programme avec un budget initial de 300 millions de dollars visant à stimuler le développement des nanosciences et de ses applications. Le NNI a depuis investi un total de 16.5 milliards. Le NNI a vu ses équivalents se former partout à travers le monde, par exemple en Europe avec le programme « Nanotechnologies, Matériaux et Procédés », au Canada avec la création du « *National Institute of Nanotechnology* » par le Conseil National de Recherche du Canada, ou au Québec avec NanoQuébec. Les nanotechnologies sont actuellement considérées comme la nouvelle révolution industrielle et affectent toutes les sphères de la société (Roco, 2001).

L'intégration des nanomatériaux dans les produits commerciaux est en constante croissance. Selon l'inventaire du « *Woodrow Wilson International Center for Scholars* », on retrouve à chaque an environ 250 nouveaux produits comprenant des nanomatériaux dans leur composition (Figure 1.4, inséré). L'utilisation des nanomatériaux est particulièrement forte dans le domaine des produits de santé et de bien-être, ce qui inclut les produits d'hygiène personnelle, les vêtements et les cosmétiques (Figure 1.4).

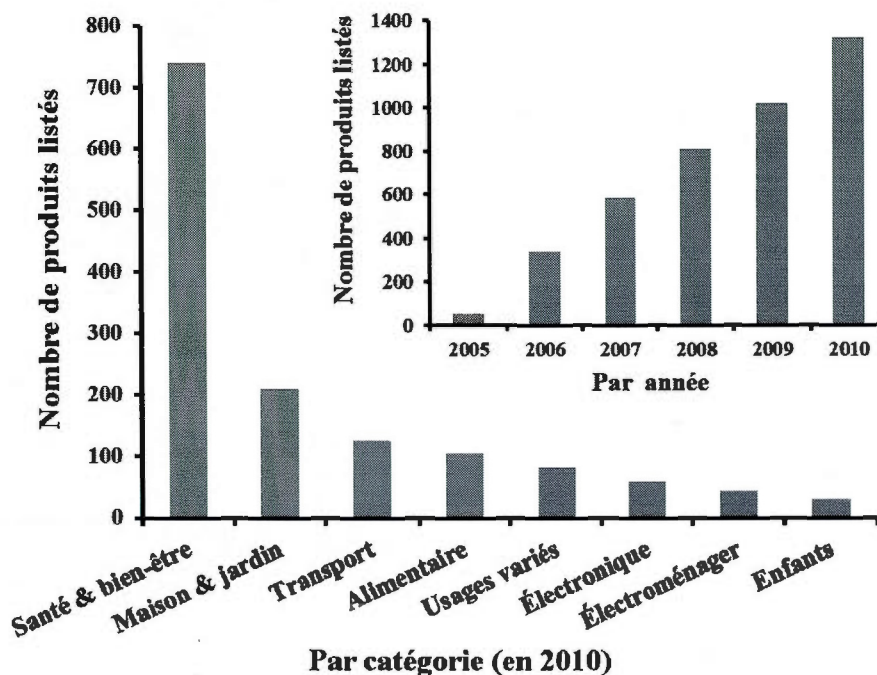


Figure 1.4 Recensement des produits contenant des nanomatériaux pour différentes catégories d'utilisation, selon l'inventaire du « *Project on Emerging Nanotechnologies du Woodrow Wilson Center for International Scholars* ». En inséré : augmentation du nombre de produits listés par année, depuis 2005 (Project on Emerging Nanotechnologies, 2011).

Différents types de nanomatériaux sont utilisés dans le marché actuel. Les nanomatériaux les plus couramment utilisés sont les NPs métalliques (argent, oxydes métalliques, or, points quantiques) et les nanomatériaux à base de carbone (nanotubes de carbone et fullerène) (Aitken *et al.*, 2006 ; Meyer *et al.*, 2009). La production de ces nanomatériaux est en hausse constante ; pour le TiO_2 seulement, la production américaine actuelle est estimée à 40 000 tonnes métriques et devrait augmenter aux environs de 2,5 millions de tonnes métriques en 2025, avec le changement de la production du TiO_2 macrométrique vers le TiO_2 nanométrique (Figure 1.5).

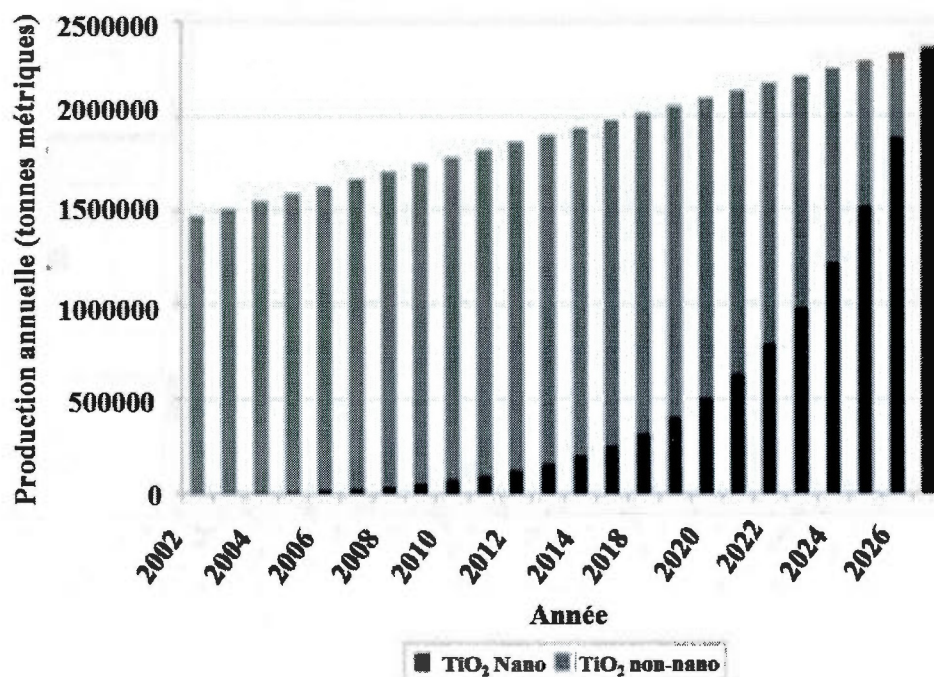


Figure 1.5 Prédiction de l'augmentation de la production américaine de TiO₂ sous forme nano (noir) et non-nano (gris) (modifié d'après Robichaud *et al.*, 2009).

1.3 Risque toxicologique des nanomatériaux

Le développement des nanotechnologies fut initialement lancé sans une analyse complète des risques que peuvent représenter les nanomatériaux sur la santé humaine et l'environnement. Cette absence d'évaluation des risques était initialement fondée sur les connaissances toxicologiques des matériaux de taille macroscopique de même nature. Par exemple, la « *Food and Drug Administration* » a déclaré en 1999 que l'utilisation dans les crèmes solaires des « *miconized TiO₂* » (particules de TiO₂ de taille réduite et contrôlée formant une crème non-opaque) ne nécessitait pas une nouvelle évaluation toxicologique car les poudres de TiO₂, utilisées depuis des décennies dans les crèmes solaires, sont bien connues pour ne pas être toxique (Food and Drug Administration, 1999). Toutefois, la communauté scientifique (Colvin, 2003) et les organismes environnementaux (Arnall, 2003; ETC Group, 2003) ont rapidement réclamé un moratoire sur l'utilisation des nanotechnologies sur la base des risques toxicologiques encore inconnus qui pourraient être associés aux propriétés uniques des nanomatériaux. L'évaluation des risques des

nanomatériaux sur la santé humaine et sur l'environnement devient de plus en plus importante avec le développement du domaine des nanotechnologies et l'augmentation du nombre de produits comportant des nanomatériaux dans leur composition.

L'émission de nanomatériaux manufacturés dans l'environnement, lors de la production ou par la dégradation de produits contenant des nanomatériaux, est un fait reconnu (Gottschalk et Nowack, 2011). Kaegi *et al.* (2008) ont mesuré des concentrations de $8 \mu\text{g l}^{-1}$ de particules de TiO_2 de tailles entre 20 et 300 nm dans les eaux de surface urbaines, provenant en partie de la dégradation des peintures des façades environnantes. Les textiles antimicrobiens contenant des NPs d'argents peuvent libérer jusqu'à 45% de leur contenu total en argent, sous forme d'ions métalliques, de NPs et de macroparticules d'argent, lors du lavage ou de l'exposition à la sueur (Geranio *et al.*, 2009 ; Kulthong *et al.*, 2010). En manufacture, les modèles estiment qu'environ 2% de la production est émise non-intentionnellement dans l'environnement lors de la production (Gottschalk *et al.*, 2010). Cependant, il est encore difficile d'évaluer le niveau de contamination par les nanomatériaux dans l'environnement à cause de la complexité des méthodes d'analyse à l'échelle nanométrique, la difficulté de séparer les NPs anthropogéniques des colloïdes naturellement présents dans les écosystèmes et la grande diversité des nanomatériaux existants (Lead and Wilkinson, 2007 ; Simonet et Valcarcel, 2009). Les modèles d'émissions de nanomatériaux dans l'environnement fournissent une estimation du niveau de contamination de certains nanomatériaux dans l'environnement (Tableau 1.1), toutefois des mesures quantitatives précises sont encore nécessaire pour bien estimer l'impact du développement des nanotechnologies sur la contamination de l'environnement par les nanomatériaux.

Tableau 1.1 Concentrations de certains nanomatériaux dans les sols et les eaux de surface selon différents modèles. Les concentrations indiquées représentent les prédictions de scénarios avec faibles ou fortes émissions dans les différentes régions du monde.

Nanomatériau	Concentrations, sols ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentrations, eaux de surface ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Référence
Argent	1.45	0.01	Boxall <i>et al.</i> , 2007
Argent	0.02-0.1	0.03-0.08	Mueller et Nowack, 2008
Argent	8.3-22.7	0.116-0.764	Gottschalk <i>et al.</i> , 2009
Argent	0.02-0.43	0.01-0.03	da Silva <i>et al.</i> , 2011
Or	20.4	0.14	Boxall <i>et al.</i> , 2007
TiO ₂	0.4-4.8	0.7-16	Mueller et Nowack, 2008
TiO ₂	0.28-1.28	0.002-0.021	Gottschalk <i>et al.</i> , 2009
TiO ₂	0.4-1030	0.7-24.5	da Silva <i>et al.</i> , 2011
Nanotubes de carbone	0.01-0.02	0.0005	Mueller et Nowack, 2008
Nanotubes de carbone	0.56-1.92	0.0006-0.004	Gottschalk <i>et al.</i> , 2009

En raison de leur réactivité, les nanomatériaux sont susceptibles de réagir rapidement avec la matrice environnementale. En conséquence, les nanomatériaux sont généralement peu mobiles dans l'environnement puisqu'ils sont rapidement agglomérés avec les composants du milieu. L'interaction entre les nanomatériaux et la matrice environnementale est cependant influencée par les différents facteurs pouvant modifier la réactivité et la stabilité des nanomatériaux. Par exemple, les NPs de ZnO ou de TiO₂ encapsulées dans un polymère sont beaucoup plus mobiles dans les sols en raison de leur plus grande stabilité (Petosa *et al.*, 2012). La liaison de matière organique naturellement présente dans le milieu (acides humiques et fulviques) peut également permettre une plus grande stabilité dans l'environnement. Ben-Moshe *et al.* (2010) ont montré une plus grande stabilité des NPs de TiO₂ dans une colonne de billes de verre en présence d'acide humiques, alors que la présence d'acides humiques et fulviques réduit l'agglomération et la précipitation des NPs de fullerène, Fe₂O₃ et de ZnS en solution (Chen et Elimelech, 2008; Baalousha, 2009; Deonarine *et al.*, 2011). L'agglomération et la déposition des nanomatériaux sont influencées par le pH et la force ionique du milieu ainsi que par les propriétés spécifiques de chaque nanomatériau, ce qui rend complexe la prédiction de leur comportement dans l'environnement (Nowack *et al.*, 2012). Les modifications que peuvent subir les nanomatériaux dans le milieu, en altérant leurs propriétés physico-chimiques, peuvent donc influencer leurs interactions avec les

organismes biologiques. La figure 1.6 résume les différentes voies d'entrées des nanomatériaux dans l'environnement ainsi que leur devenir dans les écosystèmes.

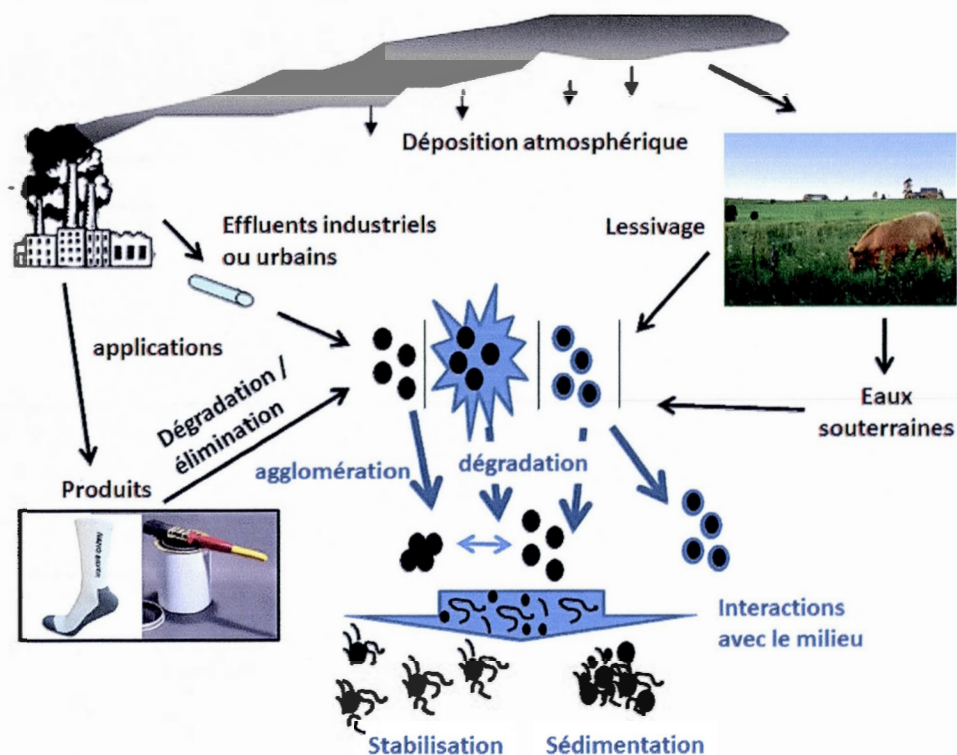


Figure 1.6 Transport des nanomatériaux dans l'environnement. Les voies d'entrées des nanomatériaux dans les écosystèmes sont indiquées en noir. Les processus affectant le devenir des nanomatériaux dans les écosystèmes sont indiqués en bleu (d'après les schémas de Nowack et Bucheli, 2007; Philip, 2008; Batley et McLaughlin, 2010).

1.4. Nanotoxicologie : l'émergence d'une discipline

Les premières indications que les particules de taille nanométrique peuvent induire des effets toxiques différents des particules de plus grande taille se trouvent dans le domaine de la toxicologie pulmonaire (Oberdorster *et al.*, 2007). Dès 1990, on avait identifié que les effets biologiques des particules inhalées sont différents selon leur taille et que les plus petites particules, appelées particules ultra-fines, sont plus toxiques que les particules de taille plus élevée pour la même dose massique (Ferin *et al.*, 1990; Oberdorster *et al.*, 1990). Quelques années plus tard, il a été démontré que la toxicité des particules ultra-fines était beaucoup

mieux corrélée avec l'aire de surface des particules qu'avec la masse (Oberdorster *et al.*, 1992). Ce changement de concept dans la dosimétrie des particules est fondamental dans l'émergence de la nanotoxicologie et les toxicologues ont depuis porté beaucoup d'attention aux différentes propriétés physico-chimiques affectant la toxicité des particules. Bien que la diversité des nanomatériaux soit très grande, plusieurs facteurs sont régulièrement identifiés comme majeur dans la toxicité des nanomatériaux: la taille, l'aire de surface, la forme, la solubilité, la stabilité colloïdale, la réactivité et la chimie de surface. Tout ces facteurs influencent comment les nanomatériaux vont interagir avec les systèmes biologiques.

1.4.1 Interactions des nanomatériaux avec les organismes : rôle de la taille

La taille influence l'interaction avec les systèmes biologiques au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme (pour les organismes pluricellulaires). Au niveau cellulaire, la petite taille des nanomatériaux favorise leur pénétration dans la cellule. Les mécanismes qui gouvernent la pénétration des nanomatériaux sont cependant complexes et encore plusieurs éléments restent à élucider. Il est bien établi que les nanomatériaux de plus petite taille ont une plus grande capacité de pénétrer les cellules (Nabeshi *et al.* 2010 ; Sakai *et al.*, 2011), toutefois cette relation n'est pas parfaitement linéaire. Certaines tailles critiques semblent posséder une plus grande capacité à pénétrer les cellules que des tailles inférieures ou supérieures. Chez des cultures cellulaires de fibroblastes, la taille optimale pour la pénétration des NPs d'or et des nanotubes de carbone est de 25 nm, selon le modèle de pénétration cellulaire établi par Jin *et al.* (2009). Lorsque la pénétration de NPs d'or de diamètre entre 10 et 100 nm est comparée pour des cultures de cellules HeLa, les NPs de 50 nm de diamètre présentent une plus grande affinité de pénétration que celles de 10, 30, 70 ou 100 nm (Chithrani *et al.* 2006). La capacité des NPs de certaines tailles à pénétrer plus facilement les cellules peut être liée à différents mécanismes d'entrée dans la cellule en fonction de la taille. Certains nanomatériaux sont pris en charge activement par la cellule, par voie d'endocytose, phagocytose ou pinocytose, alors que d'autres peuvent pénétrer de façon passive par diffusion au travers de la membrane (Krug et Wick, 2011). La figure 1.7 illustre comment peuvent varier les différents mécanismes de prise en charge cellulaire en fonction de la taille.

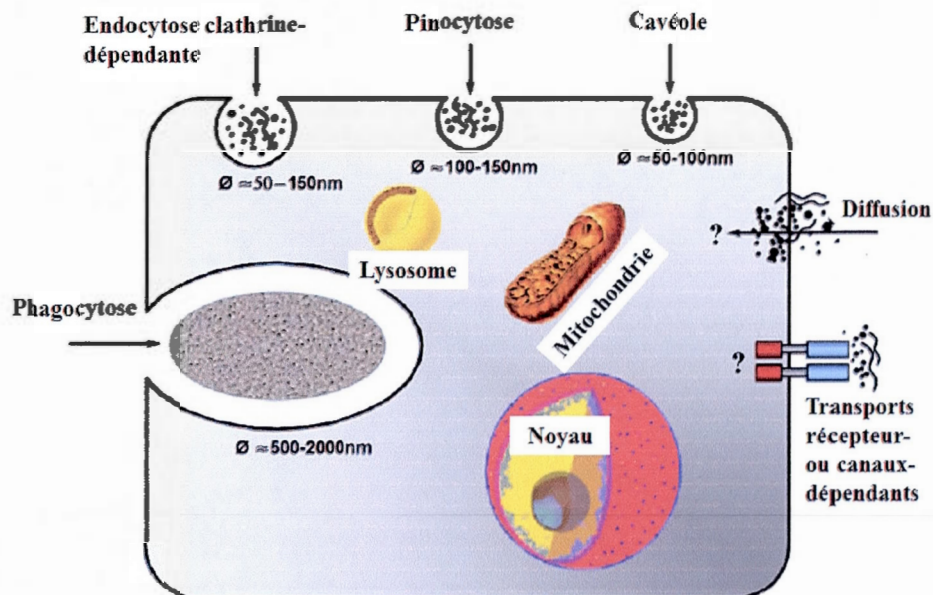


Figure 1.7 Différents mécanisme de pénétration des nanomatériaux dans la cellule (modifié d'après Krug et Wick, 2011).

La taille des nanomatériaux a également une grande influence sur la distribution des nanomatériaux à l'intérieur de l'organisme, affectant ainsi la nature des effets toxiques induits sur l'organisme. Les premiers résultats sur ce sujet proviennent une fois de plus de la science de la toxicologie respiratoire. Lorsque des poussières de particules sont inhalées, les particules de diamètre entre 10 et 100 nm pénètrent plus profondément dans le système respiratoire pour se rendre jusqu'aux bronches et aux alvéoles comparativement aux particules de taille supérieure à 100 nm, qui sont principalement déposées au niveau du nez, pharynx et du larynx (Schiller *et al.*, 1986 ; Swift *et al.*, 1992, 1994). Au niveau nanométrique, la taille influence également le transport dans les tissus de l'organisme. Les NPs d'or de petite taille (15 nm) peuvent pénétrer plus profondément dans la peau et dans l'intestin que les particules de taille supérieure à 100 nm (Sonavane *et al.*, 2008). Les NPs d'or de 20 nm, mais pas celles de 100 nm, peuvent passer du sang jusqu'à la rétine lorsque injectées par voie intraveineuse à des rats (Kim *et al.*, 2009). La grande capacité des NPs de petite taille de traverser les membranes biologiques peut également leur permettre de traverser le placenta des mammifères pour atteindre le fœtus. Le passage des nanomatériaux de la mère au fœtus a été observé chez des souris pour des NPs de silice de 70 nm et des NPs

de TiO₂ de 35 nm (Keelan, 2011). Le passage des NPs de silice de 50, 80 et 240 nm au travers d'un placenta a également été démontré en condition *ex vivo* (Wick *et al.*, 2010). Le tableau 1.2 montre comment la taille des NPs d'or affecte la distribution dans différents organes chez des rats ; certains tissus, comme le cœur, les poumons et le cerveau, accumulent une plus grande fraction de NPs de petite taille, alors que le foie accumule une plus grande portion de NPs de plus grande taille.

Tableau 1.2 Distribution des NPs d'or stabilisées par le citrate chez des rats 24 h après une injection par voie intraveineuse.

Organe	Concentration selon la taille des NPs d'or (% de la dose totale)								
	1.4	5	18	80	200	10	50	100	250
Sang	0.11	0.024	0.016	0.0016	0.00086	36	31	45	16
Foie	5.1	10.0	10.0	11.0	12.0	46	21	44	31
Rate	2.3	2.7	1.6	1.9	3.6	2.2	1.3	1.4	1.2
Reins	1.9	0.037	0.013	0.016	0.0025	1.0	0.2	0.1	0.1
Poumons	0.2	0.035	0.038	0.027	0.037	0.3	2.3	0.15	0.035
Coeur	0.18	0.0069	0.0094	0.0034	0.0056	0.2	0.1	0.009	0.035
Cerveau	0.0064	0.0001	0.0000 3	0.0003	0.00002	0.2	-	-	-
Réf.	Hirn <i>et al.</i> , 2011					De Jong <i>et al.</i> , 2008			

La relation entre la taille et la toxicité d'un nanomatériau est liée à deux facteurs : l'augmentation de l'aire de surface et le changement des interactions entre les nanomatériaux et les constituants cellulaires. L'augmentation de l'aire de surface et du nombre d'atomes à la surface à l'échelle nanométrique sont étroitement liés à l'effet toxique des nanomatériaux car plusieurs des interactions des nanomatériaux à l'échelle cellulaire sont des phénomènes de surface, comme l'adsorption de protéines à la surface des nanomatériaux (Tenzer *et al.*, 2011) ou la formation de radicaux libres par la photocatalyse ou par des réactions d'oxydo-réduction des atomes de surface (Nel *et al.*, 2006). En raison de l'importance des phénomènes de surface dans la toxicité, l'aire de surface est souvent mieux corrélée avec la toxicité que la concentration massique des nanomatériaux (Van Hoecke *et al.*, 2008; Grass *et al.*, 2010). Les changements de taille à l'échelle nanométrique influencent également la nature des interactions que peuvent avoir les nanomatériaux avec les macromolécules biologiques comme l'acide désoxyribonucléique (ADN) (~ 2.5 nm de largeur), les ribosomes (~ 25 nm)

et les protéines (10-100 nm). Par exemple, les NPs d'or de 1.4 nm sont plus toxiques que les NPs de taille inférieure ou supérieure (Pan *et al.*, 2007). Cette toxicité accrue est attribuée à la capacité des NPs d'or de 1.4 nm de se lier fortement à l'intérieur de la double hélice de l'ADN (Schmid, 2008). La nature des protéines se liant à la surface des NPs change également en fonction de la taille des NPs (Lundqvist *et al.*, 2008 ; Tenzer *et al.*, 2011).

1.4.2 Rôle de la chimie de surface dans la toxicité des nanomatériaux

Puisque plusieurs des effets toxiques des nanomatériaux au niveau cellulaire sont dépendants des effets de surface, la nature des groupements chimiques retrouvés à la surface des nanomatériaux aura donc un rôle prépondérant dans les effets toxiques induits par les nanomatériaux. La modification de la chimie de surface peut influencer la toxicité par plusieurs moyens. La charge de surface des nanomatériaux est liée à la toxicité des nanomatériaux, avec les nanomatériaux cationiques généralement plus toxiques que les nanomatériaux anioniques en raison de la charge négative des membranes cellulaires (Goodman *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2010; El Badawy *et al.*, 2011). Pour des nanomatériaux comportant plusieurs groupements fonctionnels à la surface, comme les dendrimères de type poly(amidoamine) (PAMAM), le nombre de groupements fonctionnels à la surface détermine leur capacité à réagir avec les cellules et donc leur toxicité (Naha *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2010). L'hydrophobicité/hydrophilicité de la surface affecte également les interactions entre les nanomatériaux et les systèmes biologiques à plusieurs niveaux, de leur capacité à traverser les membranes lipidiques à leur liaison avec les protéines. Les nanomatériaux hydrophobes sont généralement plus toxiques que les nanomatériaux hydrophiles à cause de leur plus grande capacité à pénétrer les membranes cellulaires (Johnston *et al.*, 2010 ; Makarucha *et al.*, 2011). L'encapsulation des nanomatériaux dans un polymère peut, selon la nature du polymère, réduire ou augmenter la toxicité des nanomatériaux. Par exemple, l'encapsulation des nanomatériaux dans le polyéthylène glycol, un polymère hydrophile biocompatible, est souvent utilisée pour réduire la toxicité des nanomatériaux (Chang *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Sperling et Parak, 2010). L'encapsulation de NPs de ZnO dans un polymère d'acide polyacrylique (PAA) a permis de faire varier la toxicité en modifiant la charge de surface des NPs (Zhang *et al.*,

2012). La modification des propriétés de surface des nanomatériaux permet de moduler leurs interactions biologiques pour favoriser certaines applications ou réduire les risques toxicologiques associés à leur utilisation.

1.4.3 Rôle de la solubilité dans la toxicité des nanomatériaux

Les métaux sont des éléments généralement toxiques pour les organismes, bien que certains soient également des micronutriments essentiels à de faibles concentrations. Leur toxicité est associée à plusieurs maladies importantes chez l'homme comme le diabète, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, l'asthme et le développement de nombreux cancers (Brewer, 2010 ; Jomova et Valko, 2011). Au niveau cellulaire, les effets des ions métalliques sont principalement causés par la formation de radicaux libres par les ions métalliques, via les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (D'autréaux et Toledano, 2007), qui mène à l'oxydation des protéines, lipides et ADN (Uriu-Adams et Keen, 2005). La liaison des ions métalliques aux protéines, principalement aux groupements thiol, imidazole et carboxylate, peut également participer dans la toxicité des métaux (Xiao et Wedd, 2010). Par exemple, la liaison des ions Cu^{2+} aux groupements thiols des enzymes cytochrome P450 monooxygénase ou au glutathion *S*-transférase inhibe l'activité de ces enzymes (Letelier *et al.*, 2005).

La toxicité des métaux dépend de plusieurs facteurs liés à leurs propriétés chimiques et à la composition du milieu. Les propriétés chimiques des ions métalliques, comme leur constante d'hydrolyse (K_{OH}) (Tatara *et al.*, 1997), leur indice de covalence (Tatara *et al.*, 1998), leur valence (Lepadatu *et al.*, 2009) ou leur électrophilie (Yamamoto *et al.*, 1998) influence leur toxicité en milieu biologique. Dans le milieu, la spéciation des ions métalliques en différents complexes a une forte influence sur leur toxicité en raison de la biodisponibilité des différents complexes formés par les métaux en solution. Les différents types de complexes que peuvent former les métaux en solution sont présentés à la figure 1.8. L'ion métallique libre est reconnu comme étant la forme la plus biodisponible et l'effet toxique d'un métal en solution est lié à la concentration du métal sous cette forme (modèle du ligand biotique) (Campbell et Couillard, 2004). La biodisponibilité de l'ion libre dépend de plusieurs facteurs comme le pH, les concentrations en ions pouvant compétitionner pour les sites de

liaisons du métal et la présence de ligands pouvant complexer le métal (Worms *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2009 ; Lavoie *et al.*, 2012). Ainsi, la même concentration de métal peut induire des effets très différents dans des milieux dont la composition chimique est différente.

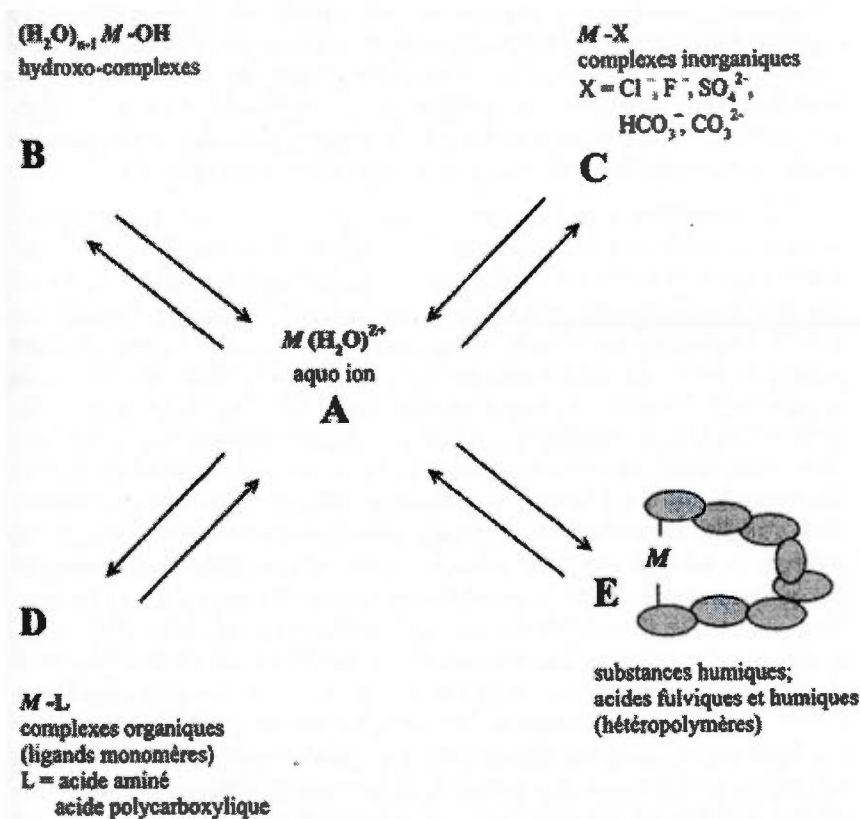


Figure 1.8 Schéma des différents types de complexes que peuvent faire les métaux en solution. L'ion libre (A) est en équilibre dynamique avec les hydroxo-complexes (B), les complexes inorganiques (C), les complexes organiques (D) et les complexes métaux-substances humiques (E) (Campbell et Couillard, 2004).

La solubilisation des nanomatériaux composés de métaux toxiques en ions libres peut donc induire une toxicité par la présence de ces ions dans le milieu. L'importance de cet effet a été identifiée chez les algues pour les NPs d'argent et de ZnO (Franklin *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008), chez les bactéries et les invertébrés pour les NPs de CuO et d'argent (Heinlaan *et al.*, 2008; Ivask *et al.*, 2010 ; Mortimer *et al.*, 2010). Toutefois, d'autres études ont mené à des résultats contradictoires, où la présence d'ions solubles ne pouvait pas

expliquer la toxicité des NPs métalliques, autant chez les algues, pour les NPs de CdTe/CdS et de NiO (Domingos *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2011), chez les cellules animales pour les NPs de CuO, NiO et ZnO (Karlsson *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2012), et chez les bactéries pour les NPs de CuO, NiO et ZnO (Baek et An, 2011).

La solubilisation des NPs métalliques est très variable en fonction du type de NPs et du milieu. Navarro *et al.* (2008) a mesuré environ 1% de solubilisation pour des NPs d'argent dans un milieu d'eau douce et Gong *et al.* (2011) ont trouvé 0.14% de solubilisation des NPs de NiO en eau salée. Pour les NPs de ZnO, CuO et NiO, une solubilisation entre 2 et 10% a été trouvée, en fonction de la concentration totale en NPs dans un milieu de culture bactérien (Baek et An, 2011). La solubilisation peut aller jusqu'à 25% de la masse totale des NPs, tel que trouvé par Aruoja *et al.* (2009) pour des NPs de CuO et ZnO. La solubilité des NPs varie en fonction de leur nature; certains éléments, comme le titane ou l'or, sont très peu solubles sous forme de particules dans un milieu biologique alors que des particules de Cd ou de Zn sont plus solubles en conditions biologiques (Pujalté *et al.*, 2011). La taille des particules influence la solubilité des NPs et les macroparticules sont souvent moins solubles que leur contrepartie nanométrique (Aruoja *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012).

En plus de la solubilisation dans le milieu externe, les NPs peuvent relâcher des ions après la prise en charge par la cellule, directement dans le milieu intracellulaire. Cet effet est appelé « Cheval de Troie » et a été avancé comme un mécanisme majeur pour la toxicité de certaines NPs au niveau cellulaire. En comparant la toxicité des NPs de CuO nues ou stabilisées par un recouvrement de carbone chez deux lignées cellulaires animales *in vitro*, Studer *et al.* (2010) ont conclu que la plus forte toxicité des NPs de CuO nues était causée par sa plus grande solubilité dans le milieu intracellulaire, plus acide que le milieu externe. L'étude des changements de l'expression du génome entier a révélée que des cellules épithéliales de poumon réagissent de façon similaire aux NPs de CuO qu'au cuivre ionique en solution, en condition *in vitro* (Hanagata *et al.*, 2011). L'effet « Cheval de Troie » est illustré à la figure 1.8 pour des NPs solubles dans le milieu intracellulaire et des NPs insolubles dans le milieu intracellulaire, qui sont séquestrées dans la vacuole sans libérer d'ions. La toxicité induite est alors majoritairement dépendante des effets de surface.

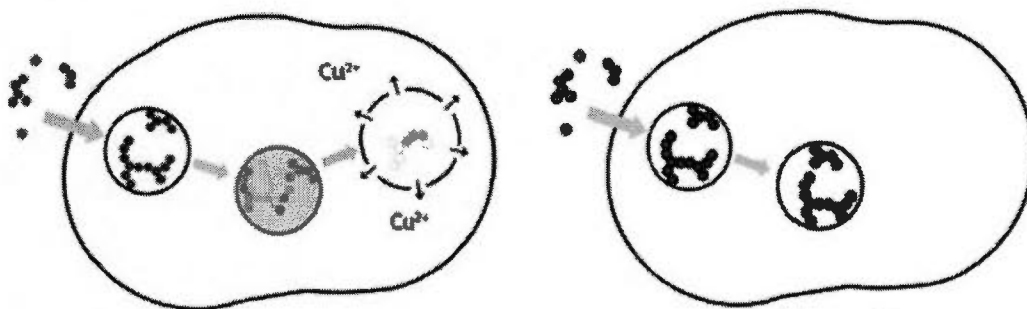


Figure 1.9 Modèle d'interactions des NPs de cuivre dans la cellule. À gauche, les NP sont solubilisées en ions dans un effet « Cheval de Troie » ; à droite les NPs ne sont pas solubilisées (modifié de Studer *et al.*, 2010).

1.4.4 Importance de la caractérisation en nanotoxicologie

Une faible variation de la taille ou des propriétés de surface des nanomatériaux peut considérablement changer leur toxicité. Pour cette raison, une bonne caractérisation des propriétés physico-chimiques des nanomatériaux est essentielle dans toute étude toxicologique des nanomatériaux. L'importance de la caractérisation a été soulignée par plusieurs auteurs, qui ont suggéré plusieurs paramètres à évaluer pour une caractérisation adéquate (Warheit, 2008; Klaine, 2009; Boverhof et David, 2010; Bouwmeester *et al.*, 2011).

Les paramètres les plus fréquemment mentionnés sont :

- La taille (taille des particules, taille des agglomérats)
- La composition (pureté)
- La surface (charge, groupement chimique, aire de surface)
- Forme
- Stabilité (stabilité colloïdale, solubilité)
- Structure cristalline

La caractérisation complète des nanomatériaux nécessite plusieurs approches méthodologiques (da Silva *et al.*, 2011; Suarez *et al.*, 2011; Wilkinson, sous presse). La microscopie électronique (à transmission ou à balayage) est utilisée pour visualiser les nanomatériaux, ce qui permet de déterminer leur taille et leur morphologie. La taille des nanomatériaux en suspension peut être déterminée par diffusion dynamique de la lumière,

une approche basée sur le mouvement brownien des particules en solutions. Par la même technique, en appliquant un courant électrique dans la solution, le mouvement électrophorétique des particules permet de déterminer leur charge de surface (potentiel zeta). La composition élémentaire peut être déterminée par spectroscopie des rayons X, par absorption atomique, ou par spectrométrie de masse. L'analyse de la chimie de surface des nanomatériaux se fait selon différentes approches selon la nature des groupements fonctionnels attachés à la surface : spectroscopie UV-visible (UV-VIS), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), spectrométrie de masse. La thermogravimétrie est utilisée pour évaluer les fractions organique et inorganique des nanomatériaux.

Une caractérisation complète des nanomatériaux peut rapidement devenir complexe et coûteuse en raison du nombre d'approches méthodologiques requis. Les études toxicologiques qui réalisent une caractérisation complète des nanomatériaux étudiés sont rares. La mesure de la taille des nanomatériaux est toutefois considéré comme essentielle pour toute étude en nanotoxicologie (Dhawan *et al.*, 2009).

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE : TOXICITÉ DES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES
CHEZ DIFFÉRENTS MODÈLES BIOLOGIQUES

2.1. Évaluation du risque toxicologique des nanomatériaux

L'évaluation du risque toxicologique d'une substance intègre la mesure du risque d'exposition des organismes et ses effets toxiques sur l'organisme. En se basant sur ces deux connaissances, il est possible de gérer les risques d'un composé par la prévention du risque, la réduction du risque et la communication du risque posé par ce composé. Les différentes étapes de la gestion du risque toxicologique sont présentées à la figure 2.1.

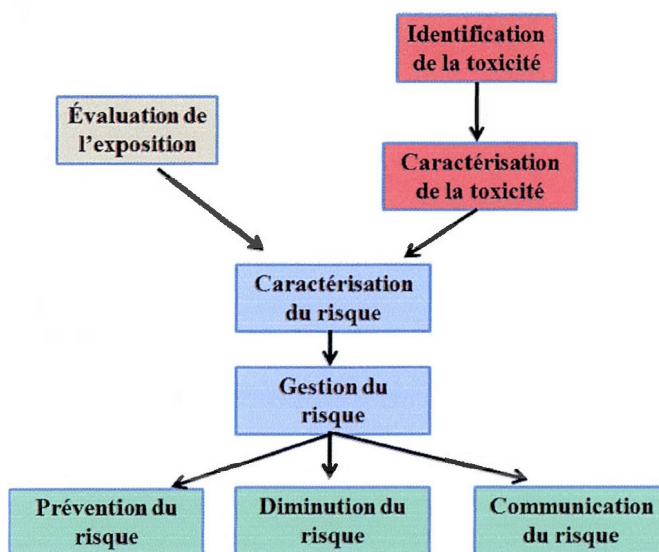


Figure 2.1 Les différentes étapes de la gestion du risque d'une substance (modifié de Krug et Wick, 2011).

Un des objectifs de la nanotoxicologie est de favoriser un développement sécuritaire des nanotechnologies en identifiant les facteurs importants pour la toxicité des nanomatériaux. Une bonne compréhension des mécanismes de toxicité des nanomatériaux peut permettre de sélectionner des nanomatériaux moins à risques pour le développement de

nouveaux produits. Le projet de recherche de cette thèse cible la partie rouge de la figure 2.1, soit l'identification et la caractérisation de la toxicité des NPs métalliques. Pour ce projet, deux NPs modèles ont été sélectionnées, les NPs de CuO et d'or, respectivement constituées d'un métal toxique (Cu) et d'un métal bioinerte (Au).

Les NPs de CuO sont utilisées principalement pour leurs propriétés biocides dans les textiles, les peintures et les plastiques (Ren *et al.*, 2009; Dastjerdi and Montazer, 2010; Delgado *et al.*, 2011). Elles sont également utilisées dans le développement d'antibiotiques pour le domaine médical en raison de la plus faible probabilité de développement de résistance chez les bactéries (Muhling *et al.*, 2009; Allaker, 2010; Huh et Kwon, 2011). Malgré ses nombreuses applications, ce type de NPs est reconnu comme étant très toxique comparativement aux autres NPs d'oxydes métalliques ou de carbone (Karlsson *et al.*, 2008; Baek et An, 2011; Wang *et al.*, 2011). Considérant leur fort potentiel toxique, les différents effets des NPs de CuO au niveau cellulaire doivent être bien compris et caractérisés.

Pour les NPs d'or, on les retrouve dans des applications très variées dans plusieurs domaines comme l'électronique, les pigments et les technologies biomédicales (Jennings et Strouse, 2007; Panyala *et al.*, 2009). Leur caractère bioinerte, leur grande stabilité colloïdale et le grand nombre de modifications de surfaces possibles en font un candidat majeur pour le développement de composés pharmaceutiques ou pour des applications médicales, comme l'imagerie ou la thérapie photothermale (Panyala *et al.*, 2009). La liaison de dendrimère de type PAMAM à la surface des NPs leur confère une bonne stabilité en milieu biologique, une grande réactivité et peut permettre une multitude d'applications biologiques (Biricova et Laznickova, 2009; Bogdan, 2009). Les nanocomposites or-PAMAM sont également connus pour être moins toxiques que le PAMAM seul (Nair *et al.*, 2009), toutefois la toxicité des nanomatériaux peut être très variable selon les propriétés cellulaires du modèle biologique étudié (Chen *et al.*, 2010). Ce type de nanocomposite peut donc présenter un risque plus important pour d'autres organismes une fois dans l'environnement. Sa toxicité doit donc être mieux évaluée chez différents modèles biologiques.

Les différentes formes de NPs utilisées dans ce projet sont présentées à la figure 2.2, sous forme schématisée et visualisées par microscopie électronique.

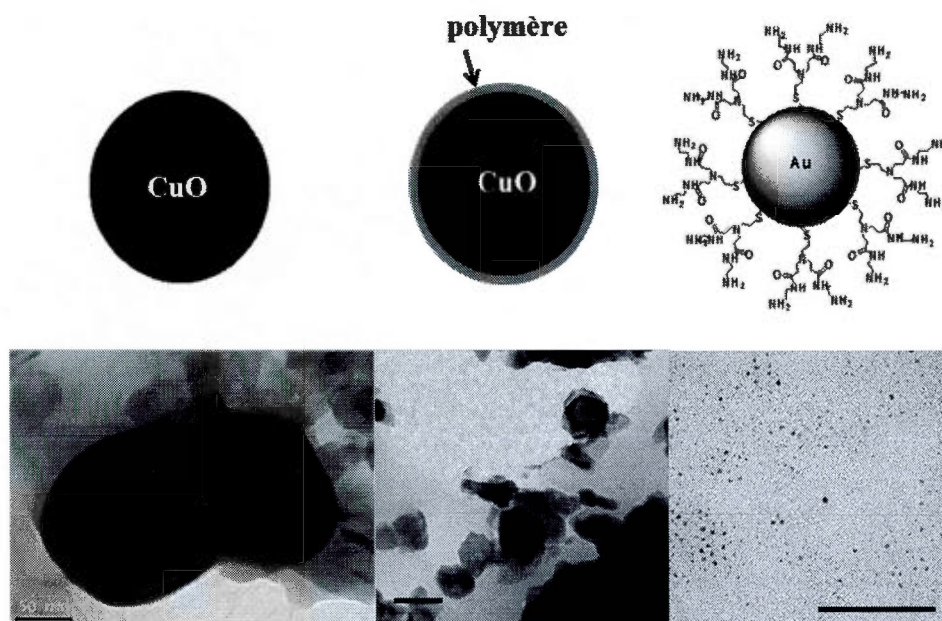


Figure 2.2 Représentation schématisée (haut) et photo de microscopie électronique des NPs de CuO nues ou encapsulées dans un polymère ainsi que des NPs d'or stabilisées par des groupements PAMAM. La barre noire des images de microscopie électronique représente une échelle de 50 nm.

2.2 État des connaissances sur la toxicité des nanoparticules d'oxyde cuivrique et d'or

Les NPs métalliques sont la catégorie de nanomatériaux la plus répandue dans les différentes applications de la nanotechnologie. Les NPs métalliques sont connues pour induire des effets toxiques chez plusieurs types d'organismes (Schrand *et al.*, 2010; Li et Chen, 2011) cependant plusieurs aspects de leur mécanisme de toxicité au niveau cellulaire ne sont pas encore bien compris. Entre autres, les rôles de la taille, de la modification de la surface et de la solubilisation dans la modulation des interactions entre les NPs et les cellules ne sont pas encore bien compris.

Le potentiel toxique des NPs de CuO est utilisé pour donner des propriétés biocides ou antibiotiques à de nombreux types de matériaux comme les textiles, les peintures et les plastiques (Ren *et al.*, 2009; Dastjerdi and Montazer, 2010; Delgado *et al.*, 2011; Muhling *et al.*, 2009; Allaker, 2010; Huh et Kwon, 2011). L'action des NPs de CuO au niveau

biologique n'est pas complètement élucidée car plusieurs facteurs sont impliqués dans la toxicité des NPs de CuO. Les principaux mécanismes d'action cellulaire sont l'induction du stress oxydatif, l'adsorption des NPs sur la cellule, limitant ainsi les échanges avec le milieu, et la libération d'ions Cu^{2+} toxiques. La contribution respective de ces différents mécanismes est toutefois difficile à séparer. Le mécanisme généralement considéré comme le plus important pour les NPs de CuO est la solubilisation des NPs en Cu^{2+} dans le milieu ou dans la cellule (effet « Cheval de Troie »), toutefois les résultats sont contradictoires sur ce sujet. Baek et An (2011) ont déterminé que la concentration en ions dans le milieu contribuait de façon négligable à la toxicité chez trois différentes souches de bactéries, alors que Karlsson *et al.* (2008) sont arrivés à la même conclusion en conditions *in vitro* en utilisant des cellules pulmonaires humaines. En condition *in vivo*, la réponse inflammatoire des poumons de rats était différente après une exposition aux NPs de CuO qu'après une exposition aux ions Cu^{2+} (Cho *et al.*, 2012). À l'inverse, la solubilisation en Cu^{2+} était responsable de l'ensemble de la réponse toxique chez les bactéries *Escherichia coli* et *Vibrio fischeri* et l'invertébré aquatique *Thamnocephalus platyurus*. Ces résultats contradictoires peuvent être causés par la spécificité des différents indicateurs de toxicité utilisés envers le cuivre ionique ou sous forme nanoparticulaire, ou être le résultat des altérations des propriétés physico-chimiques des NPs dans les différents milieux.

La toxicité des NPs d'or est généralement faible (Connor *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2008; Ponti *et al.*, 2009), ce qui permet de nombreuses applications dans le domaine biomédical ou pour le développement de composés pharmaceutiques (Panyala *et al.*, 2009). Les NPs de faibles tailles (1-2 nm) ou les NPs dont la surface est modifiée par différents groupements chimiques peuvent cependant entraîner une toxicité, généralement caractérisée par un stress oxydatif, des dommages au matériel génétique et mener à la mort cellulaire (Pan *et al.*, 2007, 2009; Alkilany *et al.*, 2009). La liaison de dendrimère de type PAMAM à la surface des NPs, qui est utilisée pour de nombreuses applications biologiques (Biricova et Laznickova, 2009; Bogdan, 2009) peut modifier la toxicité des nanoparticules d'or en raison de la grande réactivité des dendrimères. Au niveau cellulaire, les PAMAM sont connus pour induire une perturbation des membranes cellulaires, entraînant ainsi un stress oxydatif ou la mort cellulaire (Leroueil *et al.*, 2007; Petit *et al.*, 2012). En utilisant des lignées de cellules endothéliales en conditions *in vitro*, Nair *et al.* (2009) ont montré que le nanocomposite or-

PAMAM était moins toxique que le PAMAM seul, ce qui peut permettre différentes applications dans le domaine biomédical. Toutefois, la toxicité des nanomatériaux peut être très variable selon les propriétés cellulaires du modèle biologique étudié (Chen *et al.*, 2010). Ce type de nanocomposite peut donc présenter un risque plus important pour d'autres organismes une fois dans l'environnement. Sa toxicité doit donc être mieux évaluée chez différents modèles biologiques.

2.3 Indicateurs de toxicité en nanotoxicologie

Un bioindicateur est un changement au niveau moléculaire, biochimique, physiologique ou comportemental qui indique un état biologique spécifique. Les bioindicateurs de toxicité sont basés sur la réponse d'un organisme à un contaminant et sont des indicateurs de la présence et des effets des contaminants dans l'organisme (McCarty et Munkittrick, 1996). Deux types de bioindicateurs de toxicité sont utilisés pour l'évaluation de la toxicité des contaminants: les bioindicateurs intégrateurs de toxicité et les bioindicateurs spécifiques de toxicité. Les bioindicateurs intégrateurs de toxicité mesurent l'effet général d'un polluant sur la santé et le développement d'un organisme. Ces indicateurs sont la croissance, la division cellulaire, la production de biomasse et la reproduction. La modification de ces paramètres peut être causée par des effets sur une multitude de réactions biochimiques ou physiologiques et pour cette raison intègre la réponse toxique de l'ensemble de l'organisme. Les bioindicateurs spécifiques de toxicité évaluent l'activité d'un phénomène cellulaire précis, comme l'activité d'une enzyme, l'expression d'un gène ou l'augmentation d'un métabolite (Brain et Cedergreen, 2008). L'effet d'un contaminant sur ces bioindicateurs spécifiques de toxicité peut être directement ou indirectement lié à son mode d'action sur la cellule. Ce sont donc souvent des indicateurs plus rapides et sensibles que les biomarqueurs intégrateurs de toxicité.

2.3.1 Modèles biologiques pour l'étude de la toxicité des nanomatériaux

Les organismes photosynthétiques sont à la base de la chaîne trophique des écosystèmes par leur capacité à convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique

transférable aux niveaux trophiques supérieurs. La contamination des écosystèmes par des contaminants entraînant des effets toxiques pour les organismes photosynthétiques aura donc une répercussion sur l'ensemble de l'écosystème. Dans l'évaluation du risque écotoxicologique des contaminants, les organismes photosynthétiques sont donc des organismes de choix pour leur importance dans le fonctionnement de l'écosystème. Les modèles photosynthétiques utilisés pour les bioessais de toxicité sont choisis pour la simplicité des méthodes de culture et la sensibilité en réponse aux contaminants. Chez les microalgues, l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* est le modèle algal le plus utilisé pour la recherche en physiologie, en biologie moléculaire et en biochimie (Harris, 2001). C'est également un modèle sensible aux effets de nombreux contaminants et est couramment utilisé en toxicologie (Hanikenne, 2003). Pour les plantes supérieures, le macrophyte aquatique *Lemna gibba* est également utilisé comme modèle de référence en écotoxicologie (Greenberg *et al.*, 1992; Brain et Solomon, 2007). Ces modèles ont déjà montré une sensibilité pour la toxicité des nanomatériaux (Wang *et al.*, 2008; Perreault *et al.*, 2010 ; Petit *et al.*, 2010).

Pour les modèles animaux, l'évaluation de la toxicité des nanomatériaux doit être réalisée à la fois *in vitro* et *in vivo* pour obtenir une compréhension globale du devenir et des effets des nanomatériaux dans l'organisme. Les modèles *in vivo*, comme les souris, les rats et les poissons, permettent de déterminer les voies d'entrées dans l'organisme, la biodistribution des nanomatériaux dans les différents organes et les mécanismes d'excrétion des nanomatériaux hors de l'organisme. Pour l'étude des mécanismes de toxicité, les modèles cellulaires *in vitro* sont cependant favorisés car ils permettent d'isoler et d'identifier plus précisément les mécanismes d'actions des nanomatériaux sur le système cellulaire (Arora *et al.*, 2012). Ils ont également l'avantage d'être plus rapides et moins coûteux que les tests sur les animaux, ce qui permet d'évaluer le risque d'un plus grand nombre de nanomatériaux. Le choix des modèles *in vitro* en nanotoxicologie doit cependant se faire sur la base de résultats *in vivo*, tel que la biodistribution, pour permettre une évaluation réaliste des risques sur l'organisme (Stone *et al.*, 2009).

2.3.2 Bioindicateurs de viabilité cellulaire

La mort cellulaire est l'ultime conséquence des effets toxiques d'un contaminant. La distinction entre une cellule viable et une cellule morte peut cependant être établie par différents paramètres cellulaires. L'intégrité membranaire est un bon indicateur de la viabilité cellulaire et peut être facilement déterminée par la pénétration dans la cellule d'un composé normalement incapable de traverser les membranes, comme le bleu de Trypan qui colore uniquement les cellules non-viables, ou par la libération d'un composé normalement incapable de sortir de la cellule, comme le test de la lactate déshydrogénase qui quantifie la quantité d'enzyme libérée dans le milieu extracellulaire après la mort de la cellule. L'activité de certaines enzymes ayant un rôle important dans le métabolisme cellulaire est également utilisée comme indicateur de viabilité cellulaire, comme la réduction du [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) en formazan par la réductase mitochondriale ou l'hydrolyse du fluorescéine diacétate (FDA) par les estérases cellulaires. Ces indicateurs ont montré une bonne sensibilité aux effets des nanomatériaux (Lanone *et al.*, 2009; Petit *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011). La figure 2.3 schématise les principales approches méthodologiques pour évaluer la viabilité cellulaire.

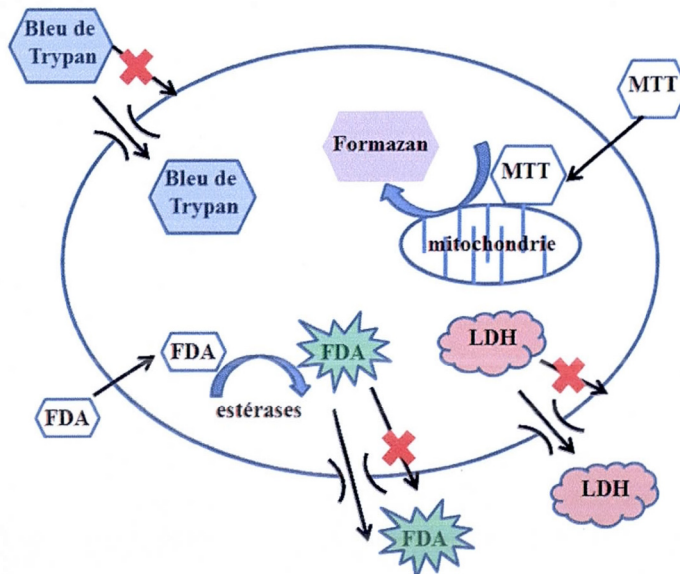


Figure 2.3 Approches méthodologiques pour évaluer la viabilité cellulaire. Les tests du bleu de trypan et de la lactate déshydrogénase (LDH) évaluent l'intégrité membranaire par la pénétration du bleu de trypan dans la cellule ou la sortie du LDH hors de la cellule. Le test du MTT mesure la conversion du MTT en formazan. Le test de la fluorescéine diacétate (FDA) mesure l'hydrolysatation du FDA en fluorescéine (fluorescente) par les estérases et la sortie du marqueur polaire fluorescent hors de la cellule.

2.3.3 Bioindicateurs photosynthétiques

La photosynthèse est au centre du métabolisme des organismes photosynthétiques. À l'intérieur du chloroplaste, l'organite où se déroulent toutes les étapes de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, la lumière est absorbée par les pigments des antennes chlorophylliennes des photosystèmes II (PSII) et I (PSI) pour former un transport d'électrons à partir de l'eau, donneur primaire d'électrons, jusqu'au nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), accepteur final d'électrons, en passant par le PSII, le cytochrome b_6f et le PSI. Le transport d'électrons est couplé avec un transport transmembranaire de protons pour former un gradient électrochimique qui servira à la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) via la pompe H^+ -ATP synthétase (Avenson *et al.*, 2005; Merchant et Sawaya, 2005). Ces réactions constituent la phase lumineuse, ou photochimique, de la photosynthèse. Ces étapes sont résumées à la figure 2.4. La deuxième phase, appelée obscure ou biochimique, regroupe l'ensemble des réactions biochimiques liées au Cycle de Calvin-Benson, où l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la transformation du CO_2 en glucides ($C_6H_{12}O_6$) (Blankenship, 2002). L'équation générale de la photosynthèse peut se résumer par : $6 CO_2 + 12 H_2O + \text{Énergie lumineuse} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 + 6 H_2O$.

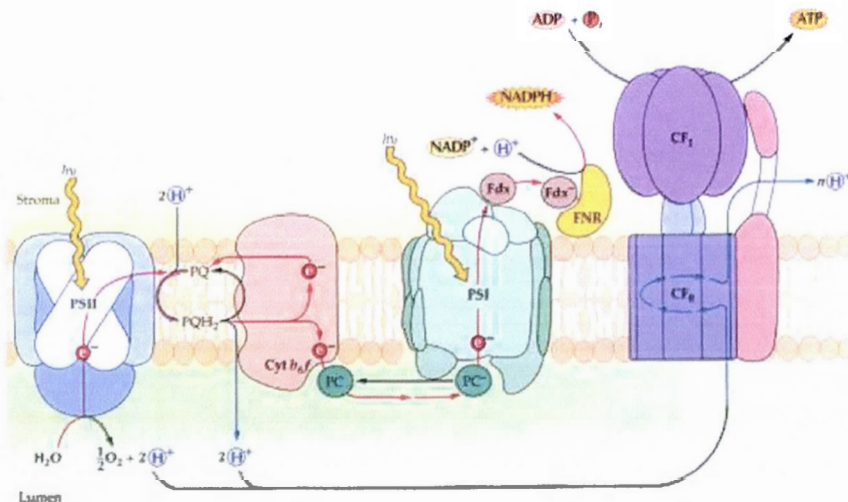


Figure 2.4 Transport d'électrons (en rouge) et de protons (en bleu) dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I (PSII, PSI), le cytochrome b_6f (Cyt b_6f) et le complexe H^+ -ATP synthétase (CF_0 et CF_1). Les transporteurs d'électrons mobiles sont les plastoquinones (PQ) et les plastocyanines (PC) (modifié de Malkin et Niyogi, 2000).

Les processus photosynthétiques sont très sensibles aux stress environnementaux tel que la température, la salinité, les fortes intensités lumineuses et les effets des contaminants (Takahashi et Murata, 2008). La mesure de l'activité photosynthétique peut donc servir comme indicateur de toxicité des contaminants environnementaux (Popovic *et al.*, 2003). Le PSII est généralement considéré comme le site le plus sensible pour les effets des contaminants et plusieurs biomarqueurs de toxicité sont basés sur son activité (Giardi *et al.*, 2001). Les NPs d'argent et de CuO, les nanotubes de carbone, les points quantiques et diverses NPs métalliques ont montrées un effet sur l'activité du PSII (Blaise *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Saison *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010).

Une approche rapide, sensible et non-intrusive pour évaluer l'activité photosynthétique est la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. Lorsque l'énergie lumineuse est absorbée par les pigments des antennes chlorophylliennes des PSII et PSI, elle peut être dissipée par l'une des différentes voies de dissipation : transport d'électrons photosynthétique, fluorescence et chaleur. Ces trois voies compétitionnent entre elles et l'énergie qui n'est pas utilisée pour initier le transport d'électrons photosynthétique est alors réémise sous forme de fluorescence et de chaleur (Figure 2.5). L'émission de fluorescence chlorophyllienne variable origine principalement des antennes chlorophylliennes du PSII (Baker, 2008). La mesure de la fluorescence chlorophyllienne variable peut donc servir comme indicateur de l'activité photosynthétique.

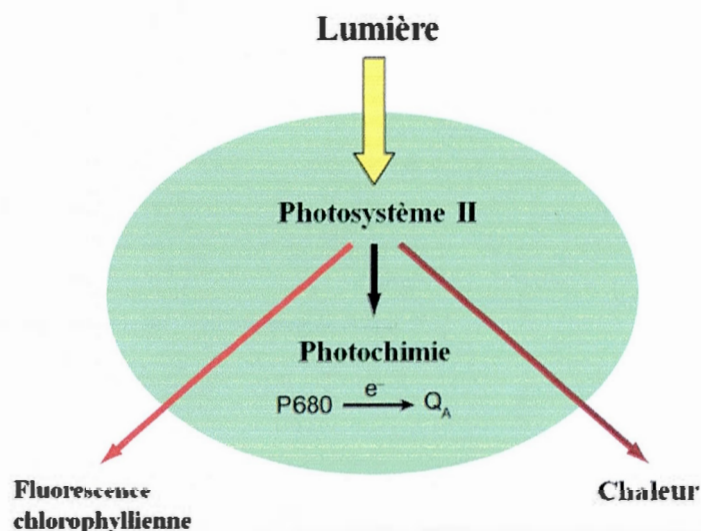


Figure 2.5 Voies de dissipation de l'énergie lumineuse par le photosystème II (d'après Baker, 2008).

Deux principales approches méthodologiques permettent d'évaluer respectivement les réactions photochimiques primaires du PSII et la dissipation d'énergie du PSII à l'état d'équilibre. La cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne est induite par un éclair saturant après une adaptation de l'échantillon à l'obscurité. La cinétique rapide est caractérisée par quatre transitions appelées O, J, I et P, qui représentent les différents états d'oxydo-réduction du centre réactionnel du PSII, passant de l'état complètement oxydé ($Q_A Q_B$) jusqu'à l'état complètement réduit ($Q_A^- Q_B^{2-}$) (Figure 2.6). Cette approche de la fluorescence chlorophyllienne renseigne donc sur les différentes étapes de la réduction du PSII. Différents paramètres basés sur la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne permettent d'évaluer différents aspects structurels et fonctionnels du PSII. Ces paramètres sont résumés au tableau 2.1.

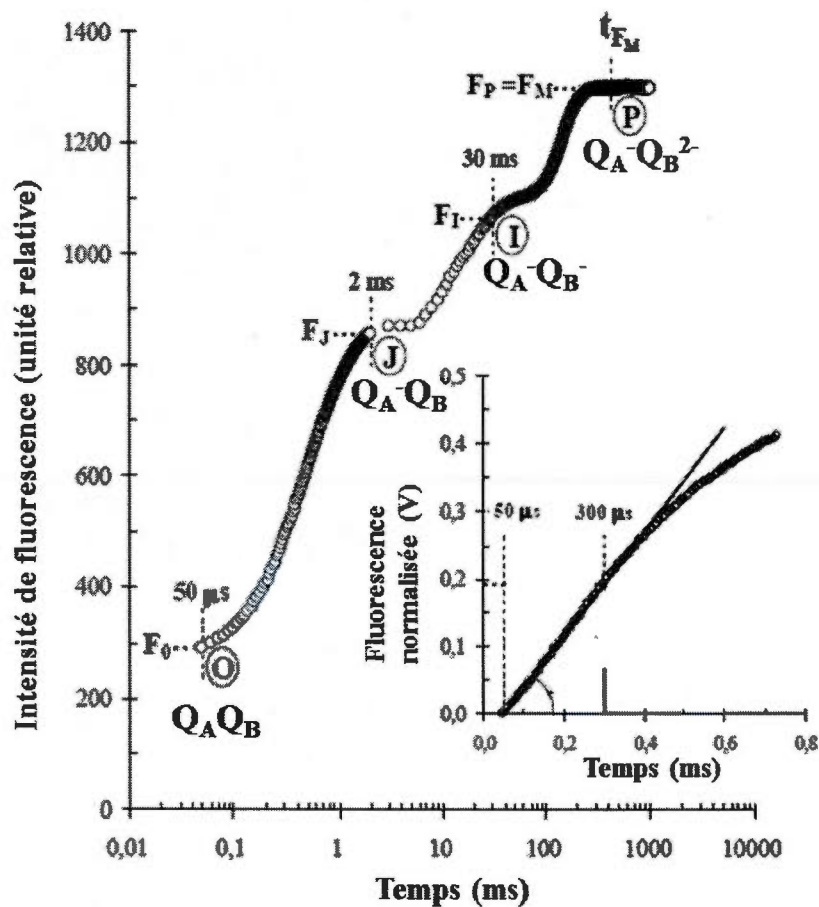


Figure 2.6 Cinétique rapide de fluorescence induite par un éclair saturant. Les transitions O, J, I et P sont indiquées à $50 \mu s$, $2 ms$, $30 ms$ et au t_{F_M} , soit le temps donnant l'émission maximale de fluorescence. L'état d'oxydo-réduction de Q_A et Q_B est indiqué pour chaque transition. En inséré : fluorescence chlorophyllienne normalisée selon $V = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$ montrant la linéarité du début de la courbe de fluorescence (modifié de Strasser *et al.*, 2004).

Tableau 2.1 Paramètres photosynthétiques déterminés à partir de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne (Strasser *et al.*, 1995; 2004)

Paramètre	Définition	Équation
V_J	Fluorescence relative au niveau J, indicateur de la réduction de Q_A	$\frac{F_{2ms} - F_{50\mu s}}{F_M - F_{50\mu s}}$
M_O	Taux de fermeture des centres réactionnels	$4 \times \frac{F_{300\mu s} - F_{50\mu s}}{F_M - F_{50\mu s}}$
TR_0 / ABS	Probabilité de transfert de l'excitation des antennes vers le centre réactionnel	$\frac{F_M - F_{50\mu s}}{F_M}$
ET_0 / TR_0	Probabilité de transport d'électrons	$1 - V_J$
TR_0 / RC	Probabilité maximale de réduction de Q_A par centre réactionnel actif du PSII	$\frac{M_0}{V_J}$
ABS / RC	Taille effective des antennes chlorophylliennes par centre réactionnel actif	$\frac{TR_0}{\frac{RC}{\frac{TR_0}{ABS}}}$
ET_0 / RC	Transport d'électrons au-delà de Q_A par centre réactionnel actif du PSII	$\frac{TR_0}{RC} \times \frac{ET_0}{TR_0}$
DI_0 / RC	Dissipation d'énergie par voies non-photochimique par centre réactionnel du PSII	$\frac{ABS}{RC} - \frac{TR_0}{RC}$
P.I.(abs)	Indice de performance du PSII	$\left(1 - \frac{F_{50\mu s} - F_M}{\frac{M_0}{V_J}}\right) \times \frac{F_M - F_0}{F_0} \times \frac{1 - V_J}{V_J}$

La cinétique modulée de fluorescence chlorophyllienne, mesurée par la méthode du « *Pulse-Amplitude Modulated* » (PAM) permet d'évaluer la dissipation d'énergie sous les différentes voies (photochimie, fluorescence et chaleur) lorsque le PSII est en équilibre avec tout les autres processus énergétiques cellulaires (Schreiber *et al.*, 1986). À l'état d'équilibre, l'activité du PSII est donc influencée par le transport d'électrons du PSI, la fixation du CO_2 dans le cycle de Calvin et la respiration dans la mitochondrie (Baker, 2008). La fluorescence modulée utilise différentes sources d'illuminations (modulée, actinique et saturante) pour mesurer l'émission de fluorescence du PSII sous différents états d'oxydo-réduction. La cinétique de fluorescence modulée est présentée à la figure 2.7. Différents paramètres photosynthétiques sont obtenus par l'analyse de l'émission de fluorescence chlorophyllienne. Ces paramètres sont résumés au tableau 2.2.

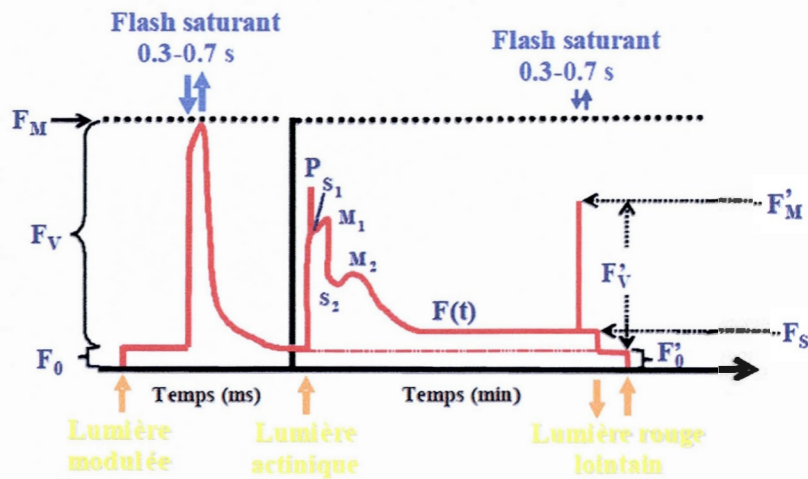


Figure 2.7 Cinétique de fluorescence chlorophyllienne modulée. F_0 et F'_0 indiquent la fluorescence de base (centres réactionnels oxydés) aux états adaptés à l'obscurité et à la lumière, respectivement. F_V et F'_V représentent la fluorescence variable aux états adaptés à l'obscurité et à la lumière, respectivement. F_M et F'_M indiquent la fluorescence maximale (centres réactionnels réduits) aux états adaptés à l'obscurité et à la lumière, respectivement. L'ouverture et la fermeture des différentes lumières sont indiquées par les flèches (modifié de Schreiber *et al.*, 1986).

Tableau 2.2 Paramètres photosynthétiques obtenus à partir de la cinétique de fluorescence modulée.

Paramètre	Définition	Équation	Référence
Φ_{MII}	rendement quantique maximal du PSII	$\frac{F_M - F_0}{F_M}$	Kitajima et Butler, 1975
Φ'_{MII}	rendement quantique opérationnel du PSII	$\frac{F'_M - F_S}{F'_M}$	Genty <i>et al.</i> , 1989
Φ_{NO}	Rendement de dissipation d'énergie par voie non-photochimique non-réglée	$\frac{1}{\frac{F_M - F'_M}{F'_M} + 1 + (qP \times \frac{F'_V}{F_S}) \times (\frac{F_M}{F_0} - 1)}$	Kramer <i>et al.</i> , 2004
Φ_{NPQ}	Rendement de dissipation d'énergie par voie non-photochimique réglée	$1 - \Phi'_{MII} - \Phi_{NO}$	Kramer <i>et al.</i> , 2004
qP	quenching photochimique	$\frac{F'_M - F_S}{F_M - F'_0}$	Schreiber <i>et al.</i> , 1986
qN	quenching non-photochimique	$\frac{F_V - (F_0 - F'_M)}{F_V}$	Van Kooten et Snel, 1990
NPQ	quenching non-photochimique	$\frac{F_M - F'_M}{F'_M}$	Bilger et Bjorkman, 1990

2.3.4 Bioindicateurs liés au stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des dérivés de l'oxygène ayant une durée de vie très courte en raison de leur grande réactivité. Les ERO peuvent mener à un stress oxydatif lorsque leur formation excède les capacités de défense de la cellule. Ils peuvent réagir avec différents composés cellulaires (lipides, protéines, pigments, ADN) et induirent des dommages importants à la cellule (D'Autréaux et Toledano, 2007). Les ERO les plus fréquents sont le radical hydroxyl, l'anion superoxyde, l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène (Tableau 2.3). Dans la cellule, les ERO sont principalement formés au niveau des chaînes de transport d'électrons, dans le chloroplaste et les mitochondries (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Dans ces processus, lorsque le transport d'électrons est limité par un stress ou un contaminant, les électrons peuvent passer à l'oxygène pour former des ERO. Les ERO peuvent également être formés par les métaux et les nanomatériaux via les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (D'Autréaux et Toledano, 2007). La forme la plus stable et la moins dommageable est le peroxyde d'hydrogène (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Les sources et les effets des ERO sont résumés dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 Sources, effets, configuration électronique et demie-vie des principales espèces réactives de l'oxygène (d'après D'Autréaux et Toledano, 2007; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

Espèce	Configuration électronique	Demie-vie	Principales sources cellulaires	Effets
peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	H:O-O:H	1 ms	chloroplaste; mitochondrie; réticulum endoplasmique, membrane plasmique	oxydation des résidus Cys des protéines, formation de ·OH
oxygène singulet (¹ O ₂)	O-O:	1 μs	chloroplaste	oxydation des lipides, protéines et ADN
radical superoxyde ([·] O ₂ ⁻)	·O-O:	1 μs	photooxydation ; chloroplaste ; mitochondrie ; membrane plasmique	réaction avec les groupements Fe-S des protéines
radical hydroxyl ([·] OH)	H:O·	1 ns	Réaction d'Haber-Weiss et de Fenton, décomposition de l'ozone	oxydation des protéines, lipides, ADN et autres macromolécules

Le système cellulaire possède plusieurs mécanismes pour réduire le stress oxydatif. Pour réduire la formation d'ERO, les chloroplastes et les mitochondries possèdent différents mécanismes de régulation impliquant des voies alternatives de transport d'électrons ou de dissipation d'énergie. Au niveau du chloroplaste, le transport cyclique d'électrons autour du PSI, la chlororespiration, le cycle des xanthophylles et les transitions d'états des antennes chlorophylliennes permettent de réguler l'activité photosynthétique afin de réduire la formation d'ERO (Niyogi, 2000; Cardol *et al.*, 2011). Au niveau des mitochondries, la déshydrogenase NAD(P)H-dépendante, l'oxydase alternative et les canaux sodiques sensibles à l'ATP permettent la régulation du transport d'électrons respiratoire pour éviter la formation excessive d'ERO en cas de stress (Blokhina et Fagerstedt, 2010). Les cellules possèdent également plusieurs enzymes dont la fonction est de séquestrer les ERO sous une forme moins réactives, limitant ainsi le stress oxydatif. Les enzymes les plus importantes, semblables chez tous les organismes, sont la catalase (EC 1.11.1.6), la glutathion S-transférase (EC 2.5.1.18), la superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1), l'ascorbate peroxydase (EC 1.11.1.11) et la glutathion réductase (EC 1.6.4.2). Plusieurs composés non-enzymatiques participent aussi à la défense cellulaire contre les ERO : l'acide ascorbique, les tocophérols, le glutathion, les composés phénoliques et les caroténoïdes (Karuppanapandian *et al.*, 2011)

L'oxydation des composantes cellulaires par les ERO peut également être utilisée pour évaluer le stress oxydatif induit par les nanomatériaux. Par exemple, les sous-produits de la peroxydation des lipides, des protéines et de l'ADN, respectivement le malondialdéhyde (MDA), les carbonyles et le 8-oxo-7,8-dihydroguanine, sont des bioindicateurs des effets des ERO sur le système cellulaire (Collins, 2005).

2.3.5 Bioindicateurs de génotoxicité

Étant du même ordre de grandeur que les molécules d'ADN, les nanomatériaux peuvent interagir directement avec l'ADN pour induire des dommages (Pan *et al.*, 2007, 2009 ; Alkilany *et al.*, 2009). La toxicité causée par l'interaction directe des nanomatériaux avec l'ADN est appelé génotoxicité primaire (Arora *et al.*, 2012). La génotoxicité secondaire est induite par les effets des ERO formés lors de l'interaction des nanomatériaux avec le

système cellulaire ou directement par l'action catalytique des nanomatériaux (Shukla *et al.*, 2011). Les sous-produits de l'oxydation cellulaire, comme le MDA, peuvent également entraîner une génotoxicité par leur action mutagénique (Marnett, 1999). Le risque de génotoxicité et de cancérogénèse par les nanomatériaux est donc grand et plusieurs auteurs ont souligné l'importance des tests de génotoxicité dans l'évaluation des effets toxiques des nanomatériaux (Singh *et al.*, 2009; Donner *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2012). La génotoxicité est définie comme tout effet d'un composé qui induit une altération structurelle ou fonctionnelle du génome. La génotoxicité inclut donc les dommages au niveau de l'ADN, les mutations, les altérations chromosomiques et les effets épigénétiques. Les effets génotoxiques peuvent mener à des altérations au niveau de l'expression des gènes, à la mort cellulaire ou à la formation de cancer.

Les dommages au niveau de l'ADN induisent des cassures qui peuvent être visualisées par électrophorèse de l'ADN cellulaire. Deux approches permettent de déterminer le niveau de fragmentation de l'ADN ; l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN total et le test de comète. Le test de comète visualise la cassure de l'ADN à l'échelle cellulaire (une cellule à la fois) et offre une grande sensibilité dans l'évaluation de la génotoxicité des contaminants (Karlsson *et al.*, 2010). L'électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée en utilisant l'ADN totale d'une culture cellulaire et permet de distinguer les cassures de l'ADN résultant des cellules nécrotiques et des cellules apoptotiques (Ioannou et Chen, 1996). Au niveau chromosomique, des cassures dans le génome lors de la division cellulaire peuvent également former des agrégats de chromosomes et de chromatine indicateurs des effets génotoxiques des contaminants (Kirsch-Volders *et al.*, 2011). Ces effets sont le résultat d'une altération de l'intégrité structurelle de l'ADN et sont de bons indicateurs des effets génotoxiques des nanomatériaux (Singh *et al.*, 2009). Les effets mutagéniques des contaminants induisent des modifications aléatoires des séquences de nucléotides dans l'ADN, pouvant mener ou non à une modification de l'expression des gènes. Les mutations s'évaluent au niveau du gène et leur apparition est aléatoire; l'évaluation spécifique des effets mutagéniques des contaminants est donc complexe et laborieuse. Certains tests généraux de mutagénicité ont cependant été développés pour évaluer le potentiel des contaminants à induire des mutations. Par exemple, le test de Ames utilise des souches de *Salmonella typhimurium* dont la capacité à synthétiser l'histidine, un acide aminé essentiel, a été inhibée par mutation dans les gènes nécessaire à sa

synthèse. Ces souches ont donc besoin d'un apport externe d'histidine pour survivre. L'action mutagène d'une substance sur le site de mutation inhibant la synthèse de l'histidine peut permettre de restaurer la capacité de ces souches de *S. typhimurium* à synthétiser l'histidine. Ainsi, la croissance des colonies de souches mutantes de *S. typhimurium* dans un milieu sans histidine permet de démontrer l'action mutagène d'une substance (Mortelmans et Zeiger, 2000). Les différents effets génotoxiques et les approches méthodologiques pour leur évaluation sont résumés à la figure 2.7.

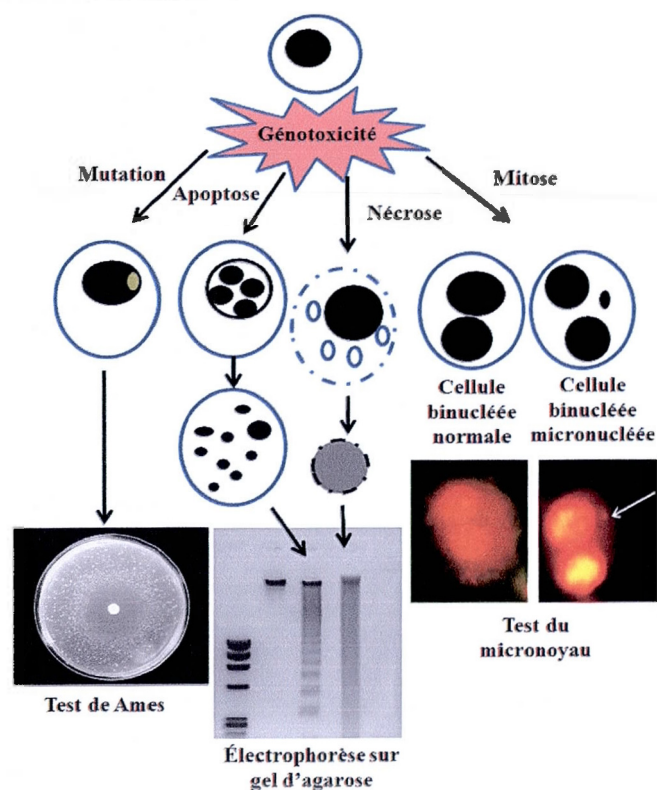


Figure 2.8 Différents effets génotoxiques et les approches méthodologiques pour leur évaluation (modifié d'après Fenech *et al.*, 1999; Mortelmans et Zeiger, 2000 ; Mikhailenko *et al.*, 2005).

Les effets épigénétiques englobent tout effet causant une altération dans l'expression des gènes sans causer de modification dans la séquence des nucléotides. Le contrôle épigénétique de l'expression des gènes passe par plusieurs mécanismes comme le repliement de la chromatine, la modification des queues d'histones et la méthylation biologique de l'ADN (Murrell *et al.*, 2005). Les changements épigénétiques peuvent être associés au

développement de maladies et à la cancérogénèse, par l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes supresseurs de tumeurs (Zukiel *et al.*, 2004). Les changements épigénétiques peuvent être induits par différents types de stress biotiques et abiotiques (Grativol *et al.*, 2012). Pour cette raison, l'altération du taux de méthylation de l'ADN (hypo ou hyperméthylation) est proposée comme un bioindicateur global de l'accumulation du stress en écotoxicologie (Head *et al.*, 2012). Différents types de polluants, comme les métaux, les perturbateurs endocriniens et les phycotoxines ont montré un effet sur le niveau de méthylation de l'ADN (Matias et Creppy, 1998 ; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Greco *et al.*, 2012).

CHAPITRE III

LES PROBLÉMATIQUES SPÉCIFIQUES DU PROJET DE RECHERCHE

Avec le développement récent de la nanotechnologie et l'utilisation des NPs métalliques dans une multitude d'applications diverses, le risque d'exposition des organismes aux NPs métalliques augmente rapidement. L'évaluation des risques toxicologiques des NPs métalliques sur la santé humaine et l'environnement est cependant difficile à cause du manque de connaissances sur les effets des NPs métalliques au niveau cellulaire (Dhawan *et al.*, 2009). Les différents effets que peuvent induire les NPs métalliques sur les organismes ne sont pas encore bien caractérisés. Les mécanismes associés aux effets des NPs métalliques sur les systèmes cellulaires en relation avec leurs différentes propriétés physico-chimiques sont encore incompris. De plus, les différences de sensibilité observées entre différents types de systèmes biologiques sont peu documentées, malgré certaines études qui ont montré que l'interaction des nanomatériaux avec les cellules est dépendante des propriétés cellulaires. (Chen *et al.*, 2010, Perreault *et al.*, 2012). Afin de pouvoir gérer efficacement les risques associés à l'utilisation des NPs métalliques, une meilleure compréhension des effets des NPs métalliques sur les organismes est donc nécessaire. Dans ce cadre, l'objectif à long terme de ce travail de recherche était d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité des nanomatériaux afin de favoriser une utilisation plus sécuritaire des nanomatériaux dans les produits issus de la nanotechnologie.

Le premier objectif de cette thèse consiste à évaluer les effets des NPs de CuO sur les organismes photosynthétiques en utilisant des bioindicateurs de toxicité basés sur la fluorescence chlorophyllienne, une approche sensible et non-intrusive pour étudier l'activité photosynthétique. Dans cette partie, le macrophyte aquatique *Lemna gibba* a été utilisé pour évaluer les effets des NPs de CuO, encapsulées et non-encapsulées, sur l'activité photosynthétique à l'aide de différentes approches de fluorescence chlorophyllienne. Les hypothèses de travail de cet objectif étaient: **1. Les NPs de CuO peuvent induire une inhibition de l'activité photosynthétique;** **2. La fluorescence chlorophyllienne peut permettre l'étude des**

mécanismes d'action des NPs de CuO sur l'appareil photosynthétique. Ces hypothèses ont été abordées en deux chapitres distincts.

Les effets des NPs de CuO sur le macrophyte aquatique *L. gibba* ont été évalués au chapitre IV. Dans ce chapitre, les NPs de CuO ont été utilisées sous une forme encapsulées dans un polymère afin de représenter le type de NPs de CuO pouvant être relâché dans les écosystèmes aquatiques suite à une application dans les peintures antisalissures des bateaux. Les effets des NPs de CuO ont été évalués en utilisant différents paramètres photosynthétiques basés sur la fluorescence chlorophyllienne car cette approche est connue pour fournir des indicateurs sensibles de toxicité pour une vaste gamme de contaminants environnementaux. Ce chapitre a pour objectif de mieux comprendre les effets des NPs de CuO sur les processus photosynthétiques de *L. gibba* et d'évaluer la pertinence de la mesure de fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation de la toxicité des NPs de CuO chez les organismes photosynthétiques.

L'importance de la solubilisation des NPs de CuO en ions Cu^{2+} pour la toxicité des NPs de CuO sur l'appareil photosynthétique de *L. gibba* a été évaluée au chapitre V. La réponse toxique de *L. gibba* exposé au cuivre sous forme ionique a été comparée à celle obtenue par une exposition aux NPs de CuO en utilisant deux approches complémentaires de fluorescence chlorophyllienne. L'objectif de ce chapitre était de déterminer si les effets des NPs de CuO sur l'activité photosynthétique de *L. gibba* sont causés par la solubilisation des NPs en ions Cu^{2+} ou par les phénomènes de surface dépendants des NPs de CuO.

Le deuxième objectif principal de ce travail de recherche consiste à déterminer comment la modification des propriétés de surface des NPs de CuO peut altérer leur toxicité. La modification des NPs par l'addition d'un revêtement organique ou inorganique à la surface des NPs est une stratégie fréquemment utilisée pour stabiliser les suspensions colloïdales et favoriser certaines propriétés en vue d'applications précises. La toxicité des NPs est dépendante de leurs propriétés physico-chimiques uniques et la modification des propriétés de surface peut avoir un effet important sur l'effet des NPs au niveau biologique. Dans cet objectif, les effets des NPs de CuO nues ou encapsulées dans un polymère organique ont été comparés afin de déterminer comment l'encapsulation des NPs de CuO modifie leur toxicité. L'hypothèse de travail de cet objectif était : 1. *L'encapsulation des NPs*

de CuO dans un polymère affecte la toxicité induite chez les organismes photosynthétiques; **2.** Le changement des propriétés physico-chimiques des NPs par l'encapsulation dans un polymère modifie également le mécanisme de toxicité des NPs de CuO. Ces hypothèses ont été abordées en deux chapitres distincts.

L'effet de la modification des propriétés de surface, par l'encapsulation des NPs dans un polymère organique, sur la toxicité des NPs de CuO a été étudié au chapitre VI. Dans ce chapitre, les effets des NPs de CuO nues ou encapsulées ont été comparés chez l'algue verte *C. reinhardtii*. L'effet de l'encapsulation sur les propriétés physico-chimiques des NPs en suspension a été déterminé afin d'évaluer la relation entre le changement des propriétés physico-chimiques des NPs et leur toxicité. L'effet des NPs sur l'activité du PSII et la formation d'ERO, l'agglomération cellulaire et l'accumulation intracellulaire de NPs ont été évalués afin de déterminer comment les deux types de NPs interagissent avec les cellules algales. L'objectif de ce chapitre est d'identifier les facteurs, physico-chimiques et biologiques, qui influencent la différence de toxicité observée entre les NPs de CuO nues et encapsulées dans un polymère.

Les mécanismes de toxicité des NPs de CuO nues et encapsulées ont été évalués au chapitre VII afin de déterminer si l'encapsulation modifie la nature des interactions entre les NPs et l'organisme. Les effets des NPs de CuO nues et encapsulées ont été comparés aux effets du cuivre ionique à l'aide de différents indicateurs de toxicité basés sur l'activité photosynthétique, le stress oxydatif et l'activité enzymatique. Ces effets ont été comparés en fonction de l'accumulation du cuivre dans l'organisme. Les objectifs de ce chapitre sont de distinguer les effets des NPs de CuO dépendants des phénomènes de surface des effets de la solubilisation des NPs en cuivre ionique. Cette étude vise également à déterminer si l'encapsulation des NPs de CuO modifie le mécanisme de toxicité des NPs de CuO au niveau cellulaire.

Le troisième objectif principal de cette thèse consiste en l'étude de la toxicité des NPs métalliques chez différents modèles biologiques. Dans cette partie, différents types de cellules ont été exposés à deux types de NPs, les NPs de CuO et les NPs d'or. Les hypothèses de travail de cet objectif étaient: **1.** Les NPs de CuO et d'or peuvent induire une toxicité chez les différents modèles cellulaires étudiés ; **2.** Le niveau de toxicité des NPs peut être différent

selon les propriétés spécifiques de chaque modèle cellulaire. Ces hypothèses ont été abordées en deux chapitres distincts.

Les effets des NPs d'or ont été évalués chez différents modèles biologiques au chapitre VIII. La toxicité des NPs d'or stabilisées par des groupements PAMAM, le dendrimère le plus couramment utilisé en nanotechnologie, a été évaluée chez deux lignées cellulaires animales, une algue verte unicellulaire d'eau douce et une bactérie marine en utilisant des indicateurs de cytotoxicité spécifique à chaque modèle. La toxicité des NPs or-PAMAM a été évaluée en relation avec l'altération des propriétés physico-chimiques des NPs dans chacun des milieux de culture. Ce chapitre a pour objectif de mieux comprendre les différences de sensibilité entre différents modèles biologiques.

Les effets des NPs de CuO sur les cellules animales ont été évalués au chapitre IX. Puisque les NPs de CuO peuvent être accumulées dans différents organes, dont le cerveau, chez les animaux exposés aux NPs (Tableau 1.2), la lignée cellulaire de neuroblastome de souris, Neuro-2A, a été utilisée comme modèle pour l'étude de la toxicité des NPs de CuO. Les effets des NPs de CuO ont été évalués en utilisant différents indicateurs de cytotoxicité, de génotoxicité, de stress oxydatif et d'altérations épigénétiques. Ce chapitre a pour objectif de mieux comprendre les effets des NPs de CuO sur les cellules animales. Un accent a été mis sur les indicateurs de toxicité permettant l'évaluation du risque de cancérogénèse induit par les contaminants, comme l'un des effets les plus importants pour la santé humaine.

CHAPITRE IV

EVALUATION OF COPPER OXIDE NANOPARTICLE TOXICITY USING CHLOROPHYLL *a* FLUORESCENCE IMAGING IN *LEMNA GIBBA*

François Perreault¹, Abdallah Oukarroum¹, Laura Pirastru¹, Louka Sirois¹, William Gerson Matias² and Radovan Popovic^{1*}

¹Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

²Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC – Brasil.

* Corresponding author

Publié dans *Journal of Botany*, vol. 2010, p. 1-9, Article ID 763142, 2010.

Contribution dans ce chapitre : J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats. J'ai écrit la première version du manuscrit et participé à la rédaction finale. A. Oukarroum et L. Pirastru ont participé à l'élaboration des idées de recherche et L. Sirois a participé aux mesures expérimentales. W.G. Matias et R. Popovic ont participé à la rédaction de la version finale du manuscrit.

4.1 Résumé

Les nanoparticules d'oxyde de cuivre (CuO NPs), qui sont utilisées dans les peintures antisalissures, peuvent être relâchées dans l'environnement et induire une toxicité chez les organismes aquatiques. Dans cette étude, l'imagerie de fluorescence chlorophyllienne a été utilisée pour évaluer la toxicité des CuO NPs chez *Lemna gibba*. Cette approche a permis d'évaluer les effets des CuO NPs sur la photosynthèse de plantes entières. Une exposition de 48h à des concentrations de 0.1 à 0.4 g l⁻¹ CuO NPs induit chez *L. gibba* une forte inhibition de l'activité photosynthétique, ce qui entraîne une diminution de la croissance des plantes. Par imagerie de fluorescence chlorophyllienne, différents paramètres photosynthétiques ont été évalués simultanément à l'aide de microplaques. L'imagerie du niveau de fluorescence F_O montre la diminution de la surface foliaire photosynthétiquement active de plantes entières de *L. gibba* exposées aux CuO NPs. L'imagerie de fluorescence chlorophyllienne montre également que l'exposition de *L. gibba* aux CuO NPs réduit le rendement photochimique maximal du PSII, le rendement photochimique opérationnel du PSII et l'extinction photochimique de fluorescence, associée au transport d'électrons photosynthétique. L'extinction non-photochimique de fluorescence, un indicateur de la dissipation d'énergie non photosynthétique, est augmentée par l'effet des CuO NPs. L'imagerie de fluorescence chlorophyllienne mesurée en microplaque est donc une approche à haut débit qui permet de mesurer simultanément de nombreuses plantes. Cette étude peut apporter une approche méthodologique fiable pour évaluer le risque de toxicité des NPs dans les écosystèmes aquatiques.

4.2 Abstract

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs), used in antifouling paints of boats, are released in the environment and can induce toxicity to aquatic organisms. In this report, we used chlorophyll *a* fluorescence imaging to evaluate CuO NPs toxicity in *Lemna gibba*. This approach allowed the evaluation of the effect of CuO NPs on photosynthesis of whole *L. gibba* plants. Exposure to 0.1 to 0.4 g l⁻¹ CuO NPs during 48h induced a strong inhibition of photosynthetic processes, resulting in a decrease of plant growth. By using fluorescence imaging, different photosynthetic parameters were evaluated simultaneously in microplate conditions. Imaging of F₀ fluorescence yield showed the decrease of leaf photosynthetic active surface for whole plants exposed to CuO NPs. This method showed that CuO NPs inhibited photosystem II maximal quantum yield, photosystem II operational quantum yields and photochemical quenching of fluorescence associated with electron transport. Non-photochemical fluorescence quenching, as an indicator of energy dissipation not used in photosynthesis, was shown to be increased by the effect of CuO NPs. Such approach in microplate conditions provides synchronous high repetition measurements for numerous plants. This study may give a reliable methodological approach to evaluate toxicity risk of NPs in aquatic ecosystems.

Keywords :

Chlorophyll *a* fluorescence imaging, *Lemna gibba*, copper oxide nanoparticles, ecotoxicology, nanotoxicology.

4.3 Introduction

Development of nanotechnologies in the recent decades has led to the widespread use of nanomaterials in all kinds of common industrial and medical applications (Aitken *et al.*, 2006). The use of nanomaterials may represent important toxicological risks because of the difficulty to evaluate the possible toxic effects of such pollutants. The mechanism by which nanomaterials may alter biological systems is dependent on nanomaterial's size, shape, composition and surface properties (Dhawan *et al.*, 2009). Due to the fast growth of the nanotechnology domain, aquatic ecosystems may be contaminated by nano-sized pollutants such as metallic nanoparticles (NPs), which are one of the main types used at large scale for industrial applications (Brar *et al.*, 2009). Toxicological properties of metallic NPs are difficult to evaluate because their toxicity is dependent on both the nanoparticulate form and the toxic metal ions which can be released by the NPs (Franklin *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). In addition, it has been found that the organic compounds used in NPs' synthesis can induce by themselves toxic effects (Kovochich *et al.*, 2009). For these reasons, it has been emphasized that NPs' toxicity is complex and many toxicological aspects still remain to be further investigated (Scheringer, 2008).

The use of NPs such as copper oxide (CuO) NPs in antifouling paints of boats represents an important source of NPs contamination of aquatic ecosystems. These paints consist of a polymeric film made mostly of acrylic and styrenic monomers covering CuO NPs (Almeida *et al.*, 2007). This kind of paint may release copper species in the environment (Singh and Turner, 2009). Decomposition of these paints may release copper under soluble ionic forms or as NPs, both of which can be toxic to aquatic life (Sharma and Agrawal, 2005; Saison *et al.*, 2010). Aquatic photosynthetic organisms represent the main source of biomass in the aquatic trophic chain and these organisms are very sensitive to the effects of copper species. It has been reported that copper may induce strong inhibition of photosynthetic electron transport processes and oxidative stress at the cellular level (Dewez *et al.*, 2005; Knauert and Knauer, 2008). We reported recently that CuO NPs, having a core of CuO NPs and a shell composed of a mixture of polystyrene and polyacrylic acid (PAA), were very toxic to unicellular algae, causing inhibition of PSII electron transport capacity in

Chlamydomonas reinhardtii cultures (Saison *et al.*, 2010). However, the toxicity of CuO NPs was not evaluated in other photosynthetic organisms such as higher aquatic plants.

For the evaluation of pollutant's toxicity, the measure of chlorophyll (Chl) *a* fluorescence was found to be a sensitive methodological approach (Juneau and Popovic, 1999; Ralph *et al.*, 2007). Chl *a* fluorescence induced by the absorption of light by light-harvesting complexes represents part of the dissipated light energy not used for Photosystem II (PSII) photochemistry and electron transport activity (for a review, see Govindjee, 1995). It is well known that when photosynthetic events related to biochemical or physiological processes are inhibited, the yield and kinetic of Chl *a* fluorescence are significantly changed (Baker, 2008). Therefore, Chl *a* fluorescence can serve as a reliable, non-invasive indicator of photosynthetic processes in plants. The pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorimetric approach can provide useful information concerning photosynthetic electron transport and energy dissipation processes associated with PSII and PSI activity. Using the PAM approach, the yield of variable Chl *a* fluorescence, as a measure of the PSII-PSI electron transport, was frequently used to determine the toxic effects of metals and herbicides (Juneau *et al.*, 2007; Baumann *et al.*, 2009; Perreault *et al.*, 2009). Parameters linked to PSII electron transport capacity (Φ_{MII} , Φ'_{MII}), photochemical energy dissipation (qP) and non-photochemical quenching of fluorescence (qN, NPQ) are sensitive indicators of toxicity in plants and algae (Juneau and Popovic, 1999; Perreault *et al.*, 2010). Recently, the development of Chl *a* fluorescence imaging systems allowed for rapid and simultaneous measurements of a large number of samples. This approach was used for fast screening of plants mutants (Badger *et al.*, 2009) and to evaluate the effects of different pathogens in higher plants (Scholes and Rolfe, 2009). Using microplate bioassays, Chl *a* fluorescence imaging was used for the evaluation of herbicides toxicity in algae and higher plants (Küster *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2008). However, it is not known how CuO NPs may induce toxic effects on PSII electron transport and energy dissipation processes in higher plants.

In this report, we investigated the use of Chl *a* fluorescence imaging for rapid evaluation of CuO NPs' toxicity in the aquatic higher plant *Lemna gibba* in microplate conditions. In order to differentiate the effect of CuO NPs, we also investigated the possible toxic effects of dissolved ionic copper and polyacrylic acid, used for NPs' coating. Additionally, Chl *a* fluorescence kinetic was analysed using the PAM fluorimetric approach

to provide sensitive parameters useful to determine the toxic effect of CuO NPs on photosynthetic processes. Chl *a* fluorescence imaging was used to determine the change of such photosynthetic parameters in whole *L. gibba* plants exposed to CuO NPs' effect. This approach was evaluated concerning its application in ecotoxicological risk assessment.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Biological material

L. gibba was obtained from Canadian Phycological Culture Centre (formerly UTCC #310). Plants were grown in an inorganic culture medium as described by Frankart et al (2002), in a growing chamber (CONVIRON, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada), with a 16h/8h light/dark photoperiod. Illumination was of $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania GRO-LUX F40/GS/WS, Drummondville, Canada). Temperature was kept at 24°C.

4.4.2 CuO NPs preparation and characterization

Detailed synthesis of CuO NPs can be found in Daigle and Claverie (2008). Briefly, 4 g of CuO, provided by MTI Corporation (Richmond, CA, USA) and 110 mg of PAA were prepared by RAFT polymerization mediated with trithiobenzyl carbonate in 20 ml of nanopure water. The samples were placed in 50 ml beakers in an ice bath. The mixture was stirred with a magnetic bar and sonicated for 3 min with a sonicator (VibraCell 400W) equipped with a microtip. Under these conditions an off-white dispersion of CuO in water was obtained. In a 250 ml round-bottom flask, 4.0 ml of styrene, 51.5 mg of sodium dodecyl sulfate and 20.1 ml of the CuO dispersion were slowly stirred and degassed for 30 min by sparging with argon. The mixture was heated at 80°C. Three droplets of NaOH (30%) and 20.2 ml of nanopure water were added continuously over 4 h ($5 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$) to a of solution containing 40 mg of 4,4'-azobis-4-cyanovaleric acid. NaOH was used to facilitate the dissolution of the initiator (carboxylic acid). The mixture was then kept at 80°C for 1 h in order to bring the reaction to completion. The reaction medium was analyzed by gravimetry (14.8% solids), thermogravimetric analysis (weight composition: 67% core, 33% shell) and

transmission electronic microscopy (TEM). TEM micrographs were obtained with a Tecnai 12 Biotwin microscope equipped with a W source (80 and 120 kV) and a 13 Mpixel Morada camera. The samples were obtained by depositing a dilute sample on a gold grid coated with a formvar film. No contrast agent was used. Using this approach, particle diameter, measured by TEM, was 81 nm (standard deviation 16 nm), and shell thickness was 14 nm (for detailed data, see Daigle and Claverie (2008) and Saison *et al* (2010)).

4.4.3 Pollutant treatments

For experiments, only plants of *L. gibba* developed at the stage of three fronds (during exponential growth) were used to increase the reproducibility of the test. In addition, no plants with a Φ_{MII} value lower than 0.7 were considered to ensure that the physiological state of the plants was constant (see section 4.4.4). Plants were placed in a 24-well microplate, one plant per well, in 2 ml of culture media. To avoid evaporation of the media, microplate was closed with a lid. On the microplate, plants were exposed in duplicates to 0.1, 0.2 and 0.4 g l⁻¹ of CuO NPs. For all concentrations of CuO NPs, a second treatment was done using only the dissolved ionic copper fraction present in the NPs treatments. To determine the total dissolved copper content of the NPs' treatments, NPs were removed from the treatment media by centrifugation and analyzed by atomic absorption spectroscopy using a Varian SpectrAA 220 FS spectrometer. Measurements of dissolved copper were done before and after the 48h of treatments and no differences in the dissolved copper content was found between the beginning and the end of the treatment ($p=0.33$). These results indicate that NPs' coating effectively prevented the degradation of CuO NPs into ionic copper in the media. From this approach, determined dissolved copper content was: 3.29 ± 0.13 , 6.60 ± 0.33 and 13.16 ± 0.63 mg l⁻¹, for 0.1, 0.2 and 0.4 g l⁻¹ CuO NPs', respectively. Dissolved ionic copper was added as CuSO₄ to the treatment media. On the plate, a third treatment was composed of the organic polymer fraction of the CuO NPs that was used for NPs' coating. Polymer was added to the treatment media according to the 67%-33% ratio of organic shell / inorganic core composition of the CuO NPs found in Daigle and Claverie (2008). According to this ratio, polymer treatments were of 0.067, 0.134 and 0.268 g l⁻¹ for the 0.1, 0.2 and 0.4 g l⁻¹ CuO NPs concentrations respectively. The disposition of the treatments on the experimental microplate is presented in table 4.1.

4.4.4 Chl *a* fluorescence measurements

Chl *a* fluorescence kinetics were measured simultaneously in all samples at time 0, 24 and 48h of treatments using the MAXI-Imaging PAM fluorometer system (Walz, Germany). For these measurements, the microplate was placed in the dark for 30 min to obtain equilibrium of PSII oxido-reduction state. Chl *a* fluorescence kinetic was measured according to Schreiber *et al* (1986) and Rohacek and Bartak (1999). The fluorescence F_0 , which represent basal fluorescence yield from Chl of light-harvesting complexes, was evaluated by using a modulated blue light with a low intensity ($1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to avoid the reduction of PSII primary electron acceptor, Q_A . The maximal fluorescence yield, F_M , was induced by a short, saturating pulse of red light ($5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s duration), causing maximal reduction of PSII. The value of F_S was determined at the steady state of variable fluorescence obtained when algal samples were exposed (10 min) to continuous red actinic light ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The maximal fluorescence yield, F'_M , was determined by application of a saturating red light ($5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s duration) at steady state of fluorescence when plants were exposed to continuous actinic light. The F'_0 fluorescence yield, indicating the fluorescence yield when PSII reaction center were in open state at steady-state conditions, as $F'_0 = \frac{F_0}{\frac{F_v}{F_M} + \frac{F_0}{F'_M}}$ according to Oxborough and Baker (1997). The maximal PSII quantum yield, indicating efficiency of light energy transfer to primary acceptor Q_A , was determined as the ratio $\Phi_{MII} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$ (Kitajima and Butler, 1975). According to Genty *et al* (1989), the operational quantum yield was determined as the ratio $\Phi'_{MII} = \frac{F'_M - F_S}{F'_M}$, and the photochemical quenching value was evaluated as $qP = \frac{F'_M - F_S}{F_M - F'_0}$ representing the photochemical energy conversion at PSII reaction centers when the primary acceptor Q_A has been oxidized (Schreiber *et al.*, 1986). The fluorescence quenching which was not related to photochemistry of PSII was measured as the ratio $qN = \frac{F_v - (F'_0 - F'_M)}{F_v}$ according to van Kooten and Snel (1990). According to Bilger and Bjorkman (1990), the non-photochemical quenching parameter was determined as the NPQ = $\frac{F_M - F'_M}{F'_M}$.

4.4.5 Data analysis and statistics

All treatments were done in duplicates on the microplate, and the experiment was repeated three times. Means and standard deviations were calculated for each treatment. Significant differences between control and exposed plants were determined by analysis of variance (ANOVA) and Tukey Honestly Significant Differences (HSD) test where p value less than 0.05 was considered to be significant.

4.5 Results and discussion

The effect of CuO NPs should be considered as a complex since NPs can go through a degradation process which can release other toxic products. Therefore, such secondary products of NPs' degradation should also be investigated in addition to the investigated NP form to better determine the effect closely associated with the interactions of NPs with cellular system. It has been shown that CuO NPs may release copper ions (Cu^{2+}) (Blinova *et al.*, 2009) which may induce itself toxic effects. It is known for copper ions to inhibit photosynthetic processes in *Lemna minor* (Frankart *et al.*, 2002). On the other hand, PAA has been indicated to induce toxic effects on algae and aquatic macrophytes (Sverdrup *et al.*, 2001). However, in another recent report, the polymer used for coating was shown to have no effect on the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* (Saison *et al.*, 2010). Therefore, by considering those effects, we investigated simultaneously the interactions of CuO NPs, copper ions (added as CuSO_4) and polymer with photosynthetic physiological state of *L. gibba*. To determine the change of the active photosynthetic surface of whole plants, we used Chl *a* fluorescence imaging to evaluate the relative value of Chl content based on the evaluation of F_0 fluorescence value. *L. gibba* plants, exposed separately to treatments in a microplate for 48h, showed different effects between treatments. Here, imaging of F_0 fluorescence (indicator of Chl content) showed that CuO NPs induced strong inhibition of plant growth. Some inhibition by copper ions was also found, while no evident effect of the polymer was observed (Figure 4.1). In *L. gibba* exposed to those treatments, we investigated the change of the functional photosynthetic state by using the PAM methodological approach. The change of Chl *a* fluorescence induction kinetics induced by 10 min actinic illumination showed high coherence with indications obtained by F_0 fluorescence imaging. Indeed,

maximal PSII fluorescence yield (Φ_{MII} , in dark adapted fronds) and maximum fluorescence yield of PSII at steady-state of fluorescence (light-adapted at steady-state, Φ'_{MII}) were diminished by the effect of CuO NPs and, to a smaller extent, by copper ions (Figure 4.2). Those effects imposed the interest to evaluate the alteration of PSII functions caused by such treatments. Here, the change of PSII functional parameters during 48h of treatments indicated the modification of PSII energy transfer associated with electron transport and energy dissipation pathways (Figure 4.3). After 48h of treatment, maximal quantum yield of PSII (Φ_{MII}) appeared to be strongly inhibited by CuO NPs ($41 \pm 15\%$ of control sample, $p < 0.05$). Similar effect was also seen for operational quantum yield (Φ'_{MII} value of $16 \pm 12\%$ of control sample for 48h 0.4 g l^{-1} treated plants, $p < 0.05$), while copper ions had some inhibitory effect which was relatively small ($66 \pm 17\%$ of control sample, $p < 0.05$) compared to the effect of CuO NPs. Some effect of ionic copper can be expected since this metal was previously shown to induce inhibition of the PSII water-splitting system in isolated PSII particles (Arellano *et al.*, 1995). Cu^{2+} was also found to increase the sensitivity of leaves to photoinhibition by light and oxidative stress due to its competition with iron as an essential element (Patsikka *et al.*, 2002). Oxidative stress was also found to have a major role in Cu^{2+} toxicity in photosynthetic organisms (Knauer and Knauer, 2008). For CuO NPs, a strong production of reactive oxygen species was observed in algal cells exposed under light conditions to CuO NPs concentrations of 0.02 g l^{-1} (Saison *et al.*, 2010). However, the role of Cu^{2+} ions in CuO NPs toxicity is still a matter of debate. In some studies, it has been suggested that CuO NPs toxicity was due to the dissolved ionic copper fraction (Aruoja *et al.*, 2009; Blinova *et al.*, 2009) while in other reports it has been indicated that ionic copper alone does not explain the toxicity of CuO NPs (Chen *et al.*, 2008; Kasemets *et al.*, 2009). Our results concerning the change of Φ_{MII} and Φ'_{MII} in *L. gibba* indicate that CuO NPs' toxicity was mainly caused by the CuO NPs. For such change of PSII quantum yields, we may expect also important change within PSII photochemistry and electron transport associated with energy dissipation through regulated and non-regulated non-photochemical pathways. Indeed PSII photochemical quenching (qP) values were strongly decreased by CuO NPs' effect. Such inhibitory effect altered energy dissipation processes via PSII. It appeared that CuO NPs' effect increased the energy dissipation not linked to PSII electron transport, as indicated by the change of qN value (regulated non-photochemical energy dissipation) after 48h of

treatment. Similar conclusion was found for CuO NPs' effect on the non-photochemical quenching parameter based on the Stern-Volmer equation, NPQ (Figure 4.3).

The use of fluorescence measurements as an indicator of photosynthetic electron transport in whole plants may be associated with some problems since higher plants show a great heterogeneity in their leaves due to the plant physiological development or the position of the leaves (Kitajima *et al.*, 2002). In many cases, for whole plants, it is hard to obtain reproducible results and to get some integral indicator concerning photosynthetic processes. We believe that recent fluorescence imaging methods may give some advantages concerning reproducibility and determination of integral value related to the whole plant. Here, we presented the advantages to use fluorescence imaging methods in the study of pollutant's toxic effects on whole plants. Since microplate provides optimal conditions to expose *L. gibba* plants simultaneously to different treatments, Chl *a* fluorescence imaging provide the possibility to perform multiple synchronous fluorescence measurements of numerous treatments. Furthermore, fluorescence imaging allows the measurement of different photosynthetic parameters concerning the integral state of plants. Such approach to measure the inhibitory effect of CuO NPs on Φ_{MII} is presented in figure 4.4. In this figure, for visual presentation, different colors were used to determine the value of photosynthetic parameters distributed on the whole plant. The change of color on the same plant indicated the heterogeneity of leaves' physiological state but this heterogeneity did not prevent to evaluate the integral value on the whole plant body. Here, we were able for whole plants to show the decreased value of Φ_{MII} when plants were exposed 48h to CuO NPs. We have to mention that fronds of *L. gibba* showed a different level of inhibition, with some being drastically affected (orange colored) and other at a lesser extent (blue colored) after 48h of exposure to 0.4 g l^{-1} CuO NPs. However, total average value of the whole plants was diminished (see figure 4.3). Similar conclusions was found for Φ'_{MII} (Figure 4.5). Such results were coherent with the change of parameters obtained from PAM fluorescence kinetics. On figure 4.6, a strong increase of non-photochemical energy dissipation can be seen for the whole plant after 48h of exposure to the highest concentration of CuO NPs. Moreover, the same presentation permitted to indicate a strong decrease of growth for such plants. We believe that no other methods will be able to give such evaluation for numerous samples at the same time. The versatility of this approach and its capacity to provide numerous simultaneous measurements

on whole plants indicate that Chl *a* fluorescence imaging may be a valuable approach in CuO NPs' ecotoxicological risk assessment. However, in natural aquatic ecosystems, the degree of contamination by NPs is still hard to evaluate due to the difficulty of quantifying this type of pollutant (Simonet and Valcarcel, 2009) so we do not know yet the concentrations of nanoparticulate copper that may be encountered in the environment. Using high concentrations on CuO NPs, *L. gibba* photosynthetic electron transport was found to be a reliable biomarker for copper NPs' risk assessment but the sensitivity of this approach remains to be investigated in naturally occurring conditions.

We can conclude that Chl *a* fluorescence imaging represents a useful tool to evaluate CuO NPs effect on photosynthesis in whole plants. These results showed that in microplate conditions, by using treatments and measuring protocol of *L. gibba* photosynthesis, Chl *a* fluorescence imaging permitted fast and reliable evaluation of CuO NPs toxicity for numerous samples. High repetition measurements may provide rapid evaluation of the risk of toxicity of pollutants in aquatic ecosystems. Such method will allow for further advance research in environmental toxicological studies and bioassays.

4.6 Acknowledgments

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada) grants awarded to R. Popovic. F. Perreault was supported by a NSERC PhD fellowship. The authors would like to thank Pr. Jérôme Claverie for providing the CuO NPs and polymer solutions.

4.7 References

- Aitken, R.J., M.Q. Chaudhry, A.B.A. Boxall and M. Hull. 2006. "Manufacture and use of nano-materials: current status in the UK and global trends". *Occup. Med.*, vol. 56, p. 300-306.
- Almeida, E., T. Diamantino and O. de Sousa. 2007. "Marine paints: the particular case of antifouling paints". *Prog. Org. Coat.*, vol. 59, p. 2-20.
- Arellano, J.B., J.J. Lazaro, J. Lopez-Gorge and M. Baron. 1995. "The donor side of Photosystem II as the copper-inhibitory binding site". *Photosynth. Res.*, vol. 45, p. 127-134.

- Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets and A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Sci. Total Environ.*, vol. 407, p. 1461-1468.
- Badger, M.R., H. Fallahi, S. Kaines and S. Takahashi. 2009. "Chlorophyll fluorescence screening of *Arabidopsis thaliana* for CO₂ sensitive photorespiration and photoinhibition mutants". *Funct. Plant Biol.*, vol. 36, p. 867-873.
- Baker, N.R. 2008. "Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*". *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 59, p. 89-113.
- Baumann, H.A., L. Morrison and D.B. Stengel. 2008. "Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 72, p. 1063-1075.
- Bilger, W. and O. Bjorkman. 1990. "Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*". *Photosynth. Res.*, vol. 25, p. 173-185.
- Blinova, I., A. Ivask, M. Heinlaan, M. Mortimer and A. Kahru. 2010. "Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water". *Environ. Pollut.*, vol. 158, p. 41-47.
- Brar, K.S., M. Verma, R.D. Tyagi and R.Y. Surampalli. 2010. "Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge –Evidence and impacts". *Waste Manage.*, vol. 30, p. 504-520.
- Chen, J., J. Zhu, H.-H. Cho, K. Cui, F. Li, X. Zhou, J.T. Rogers, S.T.C. Wong and X. Huang. 2008. "Differential cytotoxicity of metal oxide nanoparticles". *J. Exp. Nanosci.*, vol. 3, p. 321-328.
- Daigle, J.-C. and J.P. Claverie. 2008. "A simple method for forming hybrid core shell nanoparticles suspended in water". *J. Nanomater.*, vol. 2008, p. 1-8, article ID 609184.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet and R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 74, p. 150-159.
- Dhawan, A., V. Sharma and D. Parmar. 2009. "Nanomaterials : a challenge for toxicologists". *Nanotoxicology*, vol. 3, p. 1-9.
- Frankart, C., P. Eullafroy and G. Vernet. 2002. "Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations" *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 53, p. 439-445.

- Franklin, N.M., N.J. Roger, S.C. Apte, G.E. Batley, G.E. Gadd and P.S. Casey. 2007. "Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 8484-8490.
- Genty, B., J.M. Briantais and N.R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Govindjee. 1995. "Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence". *Aust. J. Plant Physiol.*, vol. 22, p. 131-160.
- Juneau, P. and R. Popovic. 1999. "Evidence for the Rapid Phytotoxicity and Environmental Stress Evaluation Using the PAM Fluorometric Method: Importance and Future Application". *Ecotoxicology*, vol. 8, p. 449-455.
- Juneau, P., B. Qiu and C.P. Deblois. 2007. "Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review". *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 89, p. 609-625.
- Kasemets, K., A. Ivask, H.-C. Dubourguier and A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Toxicol. in vitro*, vol. 23, p. 1116-1122.
- Kitajima, M. and W.L. Butler. 1975. "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 376, p. 105-115.
- Kitajima, K., S.S. Mulkey, M. Samaniego and S.J. Wright. 2002. "Decline of photosynthetic capacity with leaf age and position in two tropical pioneer tree species". *Am. J. Bot.*, vol. 89, p. 1925-1932.
- Knauert, S. and K. Knauer. 2008. "The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae". *J. Phycol.*, vol. 44, p. 311-319.
- Kovochich, M., B. Espinasse, M. Auffan, E.M. Hotze, L. Wessel, T. Xia, A.E. Nel and M.R. Wiesner. 2009. "Comparative toxicity of C60 aggregates toward mammalian cells: Role of tetrahydrofuran (THF) decomposition". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 6378-6384.
- Kuster, A., K. Pohl and R. Altenburger R. 2007. "A Fluorescence-Based Bioassay for Aquatic Macrophytes and its Suitability for Effect Analysis of Non-Photosystem II Inhibitors". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 14, p. 377-383.

- Muller, R., U. Schreiber, B.I. Escher, P. Quayle, S.M.B Nash and J.F. Mueller. 2008. "Rapid exposure assessment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll *a* fluorescence imaging assay". *Sci. Total Environ.*, vol. 401, p. 51-59.
- Navarro, E., F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra. 2008. "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 8959-8964.
- Oxborough, K. and N.R. Baker. 1997. "Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and nonphotochemical components-calculation of qP and F'_v/F'_M without measuring F'_o ". *Photosynth. Res.*, vol. 54, p. 135-142.
- Patsikka, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E.-M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. "Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition *in vivo* by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiol.*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Perreault, F., N. Ait Ali, C. Saison, R. Popovic and P. Juneau. 2009. "Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*". *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 96, p. 24-29.
- Perreault, F., D. Dewez, C. Fortin, P. Juneau, A. Diallo and R. Popovic. 2010. "Effect of aluminium on cellular division and photosynthetic electron transport in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas acidophila*". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, p. 887-892.
- Ralph, P.J., R.A. Smith, C.M.O. Macinnis-Ng and C.R. Seery. 2008. "Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review". *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 89, p. 589-607.
- Rohacek, K. and M. Bartak. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynthetica*, vol. 37, p. 339-363.
- Saison, C., F. Perreault, J.-C. Daigle, C. Fortin, J. Claverie, M. Morin and R. Popovic. 2010. "Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, p. 109-114.
- Scheringer, M. 2008. "Nanoecotoxicology: Environmental risks of nanomaterials". *Nature Nanotechn.*, vol. 3, p. 322-323.
- Scholes, J.D. and S.A. Rolfe. 2009. "Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective". *Funct. Plant Biol.*, vol. 36, p. 880-892.

- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Schreiber, U., P. Quayle, S. Schmidt, B.I. Escher and J.F. Mueller. 2007. "Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, p. 2554-2563.
- Simonet, B.M. and M. Valcarcel. 2009. "Monitoring nanoparticles in the environment". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, p. 17-21.
- Singh, N. and A. Turner. 2009. "Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles". *Environ. Pollut.*, vol. 157, p. 371-376.
- Sharma, R.K. and M. Agrawal. 2005. "Biological effects of heavy metals: An overview". *J. Environ. Biol.*, vol. 26, p. 301-313.
- Sverdrup, L.E., T. Kallqvist, A.E. Kelley, C.S. Furst and S.B. Hagen. 2001. "Comparative toxicity of acrylic acid to marine and freshwater microalgae and the significance for environmental effect assessments" *Chemosphere*, vol. 45, p. 653-658.
- Van Kooten, O. and J.F.H. Snel. 1990. "The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology". *Photosynth. Res.*, vol. 25, p. 147-150.

Table 4.1 Disposition of the different treatments on the microplate. Concentrations of 0.00 indicate control samples.

Treatments	Polymer coated CuO NPs		Ionic copper (CuSO ₄)		PAA-polystyrene polymer	
	CuO NPs 0.00 g l ⁻¹	CuO NPs 0.00 g l ⁻¹	CuSO ₄ 0.00 mg l ⁻¹	CuSO ₄ 0.00 mg l ⁻¹	Polymer 0.00 g l ⁻¹	Polymer 0.00 g l ⁻¹
A	CuO NPs 0.00 g l ⁻¹	CuO NPs 0.00 g l ⁻¹	CuSO ₄ 0.00 mg l ⁻¹	CuSO ₄ 0.00 mg l ⁻¹	Polymer 0.00 g l ⁻¹	Polymer 0.00 g l ⁻¹
B	CuO NPs 0.10 g l ⁻¹	CuO NPs 0.10 g l ⁻¹	CuSO ₄ 3.29 mg l ⁻¹	CuSO ₄ 3.29 mg l ⁻¹	Polymer 0.07 g l ⁻¹	Polymer 0.07 g l ⁻¹
C	CuO NPs 0.20 g l ⁻¹	CuO NPs 0.20 g l ⁻¹	CuSO ₄ 6.60 mg l ⁻¹	CuSO ₄ 6.60 mg l ⁻¹	Polymer 0.13 g l ⁻¹	Polymer 0.13 g l ⁻¹
D	CuO NPs 0.40 g l ⁻¹	CuO NPs 0.40 g l ⁻¹	CuSO ₄ 13.16 mg l ⁻¹	CuSO ₄ 13.16 mg l ⁻¹	Polymer 0.27 g l ⁻¹	Polymer 0.27 g l ⁻¹

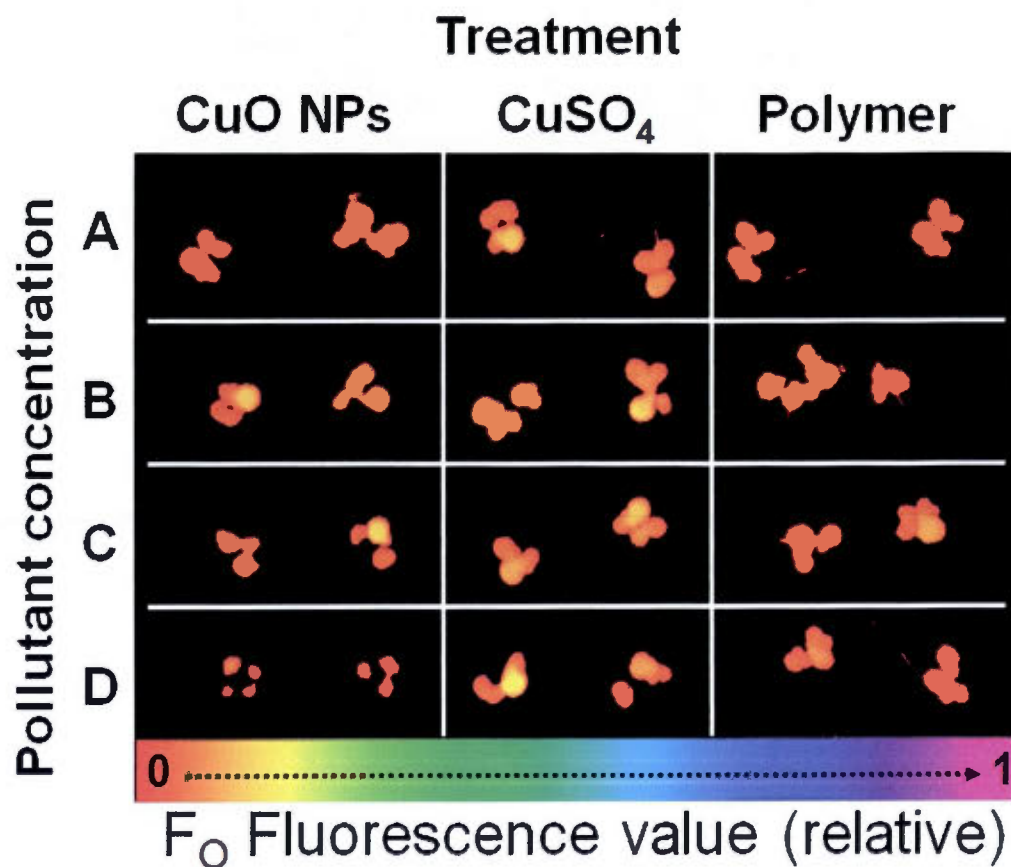


Figure 4.1 The change of active photosynthetic surface in *L. gibba* whole plants exposed 48h to different concentrations of CuO NPs, ionic copper (CuSO₄) and polyacrylic acid – polystyrene polymer. The active photosynthetic surface was evaluated by imaging of the F₀ fluorescence yield for entire plant distributed in the microplate. Treatments' concentrations in the different rows (A, B, C, D) are distributed in the microplate according to table 1. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value of F₀ fluorescence yield.

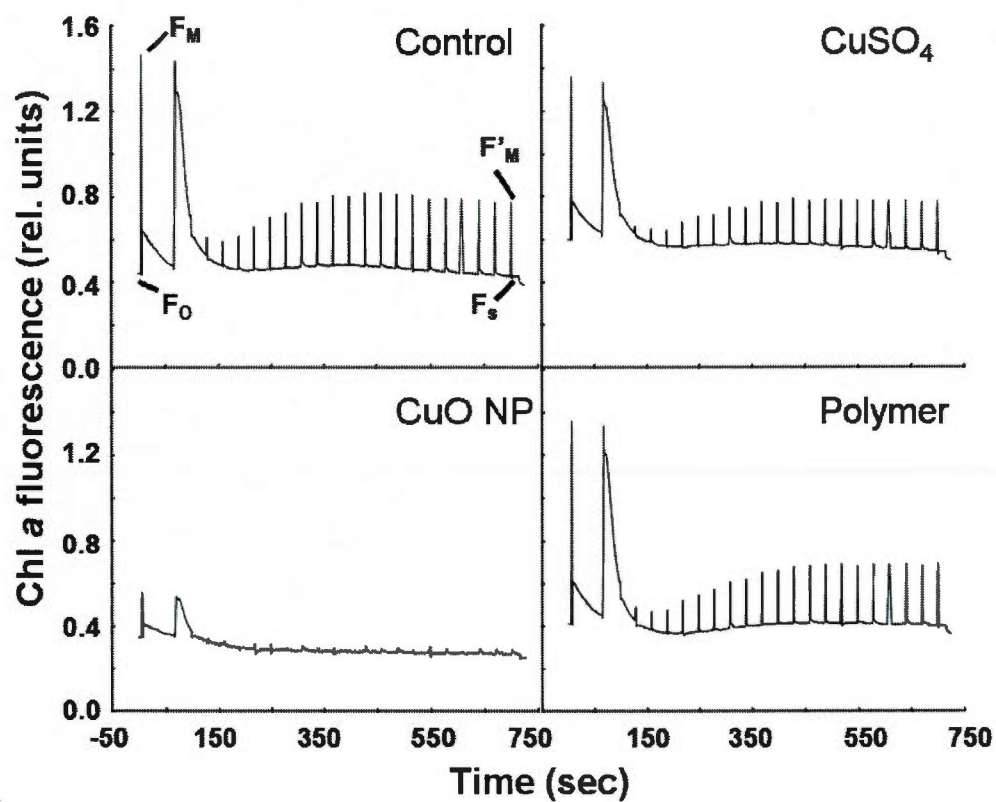


Figure 4.2 Change in the Chl *a* fluorescence kinetics of *L. gibba* leaves exposed 48 hours to 0.4 g l⁻¹ of CuO NPs, its ionic copper fraction alone (13.16 mg l⁻¹ Cu added as CuSO₄) and its organic fraction alone (0.27 g l⁻¹ polymer). For treatments details, see materials and methods.

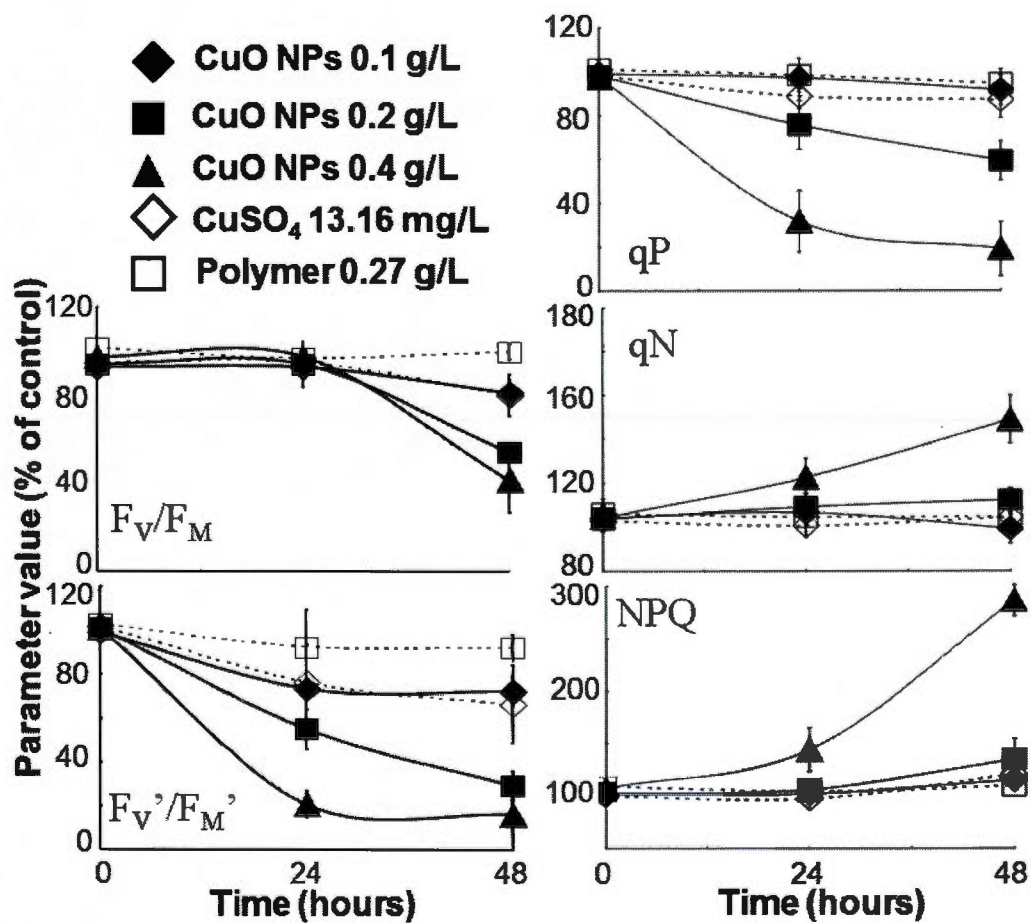


Figure 4.3 Change of maximal PSII quantum yield (Φ_{MII}), operational PSII quantum yield (Φ'_{MII}), photochemical (qP) and non-photochemical fluorescence quenching coefficient (qN) and the non-photochemical quenching parameter (NPQ). Different concentrations are indicated by the different symbols on the figure. The error bars indicate the standard deviations calculated on an average of 6 replicates.

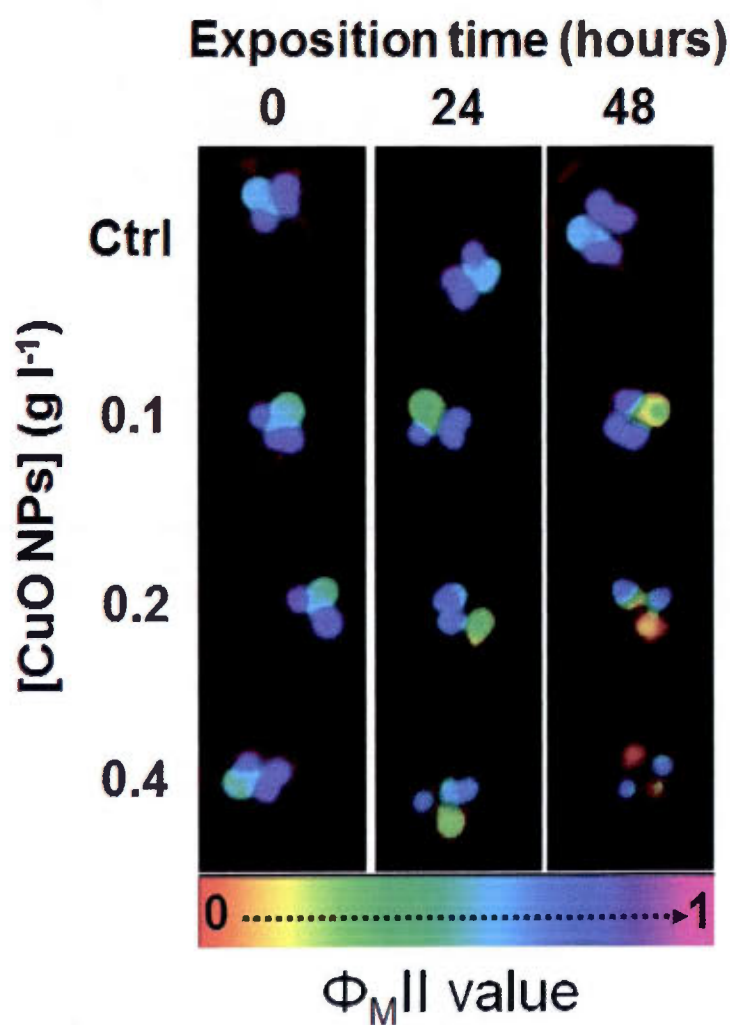


Figure 4.4 The change of the maximal PSII quantum yield (Φ_{MII}) in *L. gibba* whole plants by exposed to different concentrations of CuO NPs, determined by Chl *a* fluorescence imaging PAM method. CuO NPs' concentrations are indicated on the left side of the figure and exposition time on top of the figure. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. The change of color on the leaf area in the figure indicates the change of the Φ_{MII} value on this specific leaf area. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value Φ_{MII} .

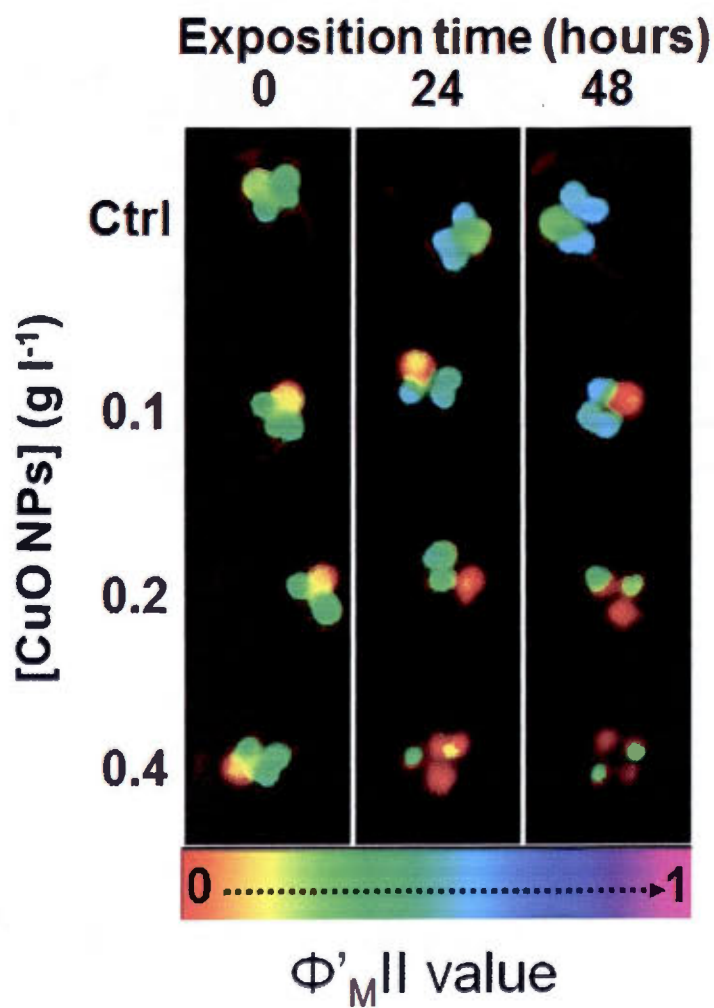


Figure 4.5 The change of the operational PSII quantum yield (Φ'_{MII}) in *L. gibba* whole plants by exposed to different concentrations of CuO NPs, determined by Chl *a* fluorescence imaging PAM method. CuO NPs' concentrations are indicated on the left side of the figure and exposition time on top of the figure. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. The change of color on the leaf area in the figure indicates the change of the Φ'_{MII} value on this specific leaf area. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value Φ'_{MII} .

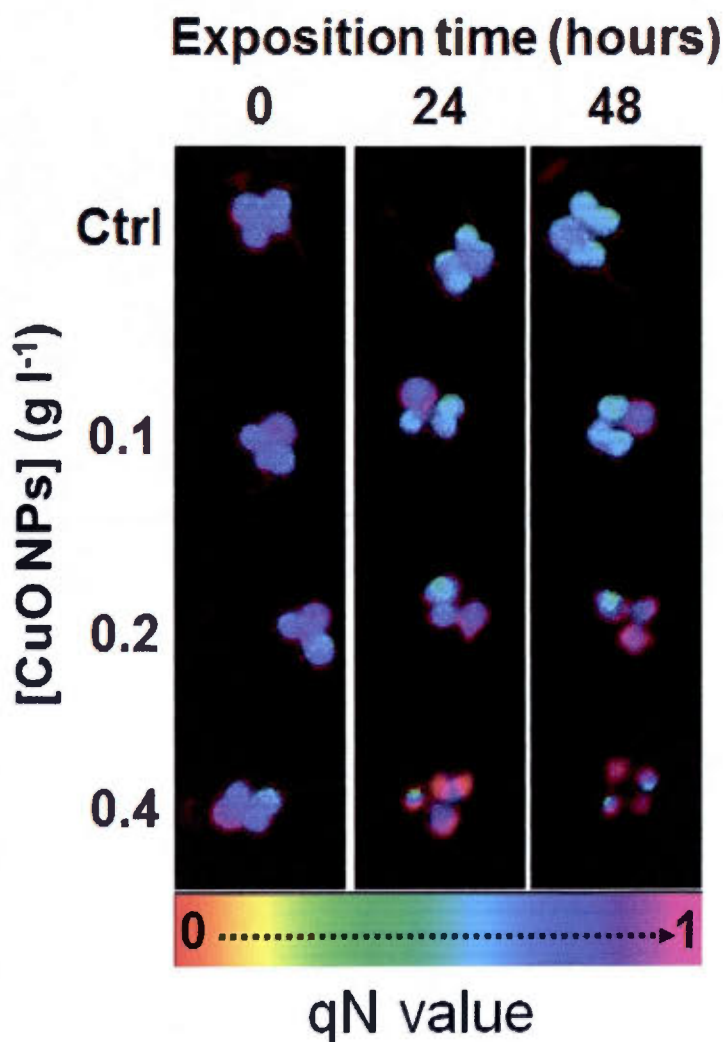


Figure 4.6 The change of the non-photochemical quenching of fluorescence (qN) in *L. gibba* whole plants exposed to different concentrations of CuO NPs, determined by Chl *a* fluorescence imaging PAM method. CuO NPs' concentrations are indicated on the left side of the figure and exposition time on top of the figure. The change of leaf area and leaf Chl distribution is indicated on the figure by the change of the size and shape of the fluorescence emission. The change of color on the leaf area in the figure indicates the change of the qN value on this specific leaf area. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value of qN.

CHAPITRE V

NANOPARTICULATE AND IONIC COPPER HAVE SIMILAR EFFECTS ON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY: A CHLOROPHYLL FLUORESCENCE STUDY

François Perreault¹, Abdallah Oukarroum¹, Radovan Popovic¹, David Dewez^{1*}

¹Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

*Corresponding author.

Proceedings of the 3rd International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications, article ID 164.

Contribution dans ce chapitre : J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats. J'ai écrit la première version du manuscrit et participé à la rédaction finale. A. Oukarroum a participé à l'analyse des résultats. R. Popovic et D. Dewez ont participé à la rédaction de la version finale du manuscrit.

5.1 Résumé

La toxicité des nanoparticules (NPs) métalliques peut être causée par les propriétés uniques des matériaux de taille nanométrique ou par la solubilisation des particules en ions métalliques toxiques. La différence entre les effets des ions métalliques et des NPs doit être clarifiée pour permettre l'identification des risques toxicologiques spécifiques aux nanomatériaux. Dans cette étude, la toxicité du cuivre ionique et des NPs de CuO sur les processus photosynthétiques de *Lemna gibba* a été étudiée à l'aide de deux méthodes de fluorescence chlorophyllienne: la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne, comme un indicateur spécifique de la photochimie primaire du Photosystème II (PSII), et la fluorescence « pulse-amplitude-modulated », comme indicateur intégrateur de l'ensemble de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique en équilibre avec les processus énergétiques cellulaires. Le cuivre ionique et les NPs de CuO induisent tout deux une diminution de la photochimie du PSII, indiquée par la cinétique rapide de fluorescence. À l'état d'équilibre du transport d'électrons photosynthétique, le cuivre ionique et les NPs de CuO induisent également une diminution du transport d'électrons de l'ensemble de la chaîne photosynthétique et augmentent la dissipation d'énergie non-régulée sous forme de chaleur. Pour le même effet sur la capacité maximale du PSII, les changements des processus de dissipation d'énergie étaient similaires pour les plantes exposées au cuivre ionique comparativement aux plantes exposées aux NPs de CuO. Ces résultats supportent l'hypothèse que la toxicité des NPs de CuO est due à la solubilisation des particules en ions métalliques toxiques.

5.2 Abstract

Toxicity of metal nanoparticles (NPs) can be the result of unique properties of nano-sized material or its solubilisation into toxic metal ions. The difference between the effects of ionic metals and NPs must be clarified to identify the toxicological risks specific to nanomaterials. In this report, toxicity of ionic Cu and nano-sized copper (CuO NPs) was investigated on photosynthetic processes of *Lemna gibba* using two different chlorophyll fluorescence methods: the rapid rise of chlorophyll fluorescence, as a specific indicator of photosystem II (PSII) photochemistry, and the pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorescence as an integrative indicator of the whole chain of photosynthetic electron transport and related cellular energy status. Both ionic Cu and CuO NPs induced a decrease of PSII photochemistry, indicated by the rapid rise of fluorescence. At the equilibrium state of electron transport, ionic Cu and CuO NPs also induced a decrease of the whole chain of electron transport and an increase of both regulated and non-regulated thermal energy dissipation. The alteration of energy dissipation processes induced by ionic and nanoparticulate copper was similar when compared to the same effect of maximal PSII capacity. These findings support the hypothesis that the toxicity of CuO NPs is due their solubilisation into toxic Cu ions.

Keywords:

nanotoxicology; *Lemna gibba*; chlorophyll fluorescence; copper oxide nanoparticles

5.3 Introduction

With the rise of nanotechnologies, metal nanoparticles (NPs) may represent a risk for aquatic organisms (Almeida *et al.*, 2007). There are several contradictory findings concerning metal NPs toxicity at the cellular level. Some findings indicated that NPs solubilisation accounts for all the induced toxicity (Franklin *et al.*, 2007), while others suggested that the soluble fraction alone is not sufficient to explain all the toxicity (Kasemets *et al.*, 2009). Toxic effects specific to NPs were previously related to their capacity to generate reactive oxygen species (Bandara *et al.*, 2005), light shading (Schwab *et al.*, 2011) or the reduction of cellular exchange by NPs binding to the cell (Lin *et al.*, 2009). Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are employed as antimicrobial materials due to their high biocide potential (Ren *et al.*, 2009), and may accumulate in aquatic environment. Aquatic plants were previously found to be sensitive to CuO NPs, which induced a decrease of photosynthetic activity and reduced biomass production (Perreault *et al.*, 2010). Ionic Cu also showed to be toxic to photochemical acts of photosynthesis (Kucera *et al.*, 2008). Therefore, specific CuO NPs effects in comparison to ionic Cu need to be cleared.

Photosynthetic-based fluorescence parameters are widely used as reliable indicators of toxicity in photosynthetic organisms. Photosynthesis encompass all chloroplastic reactions leading to carbohydrates synthesis, from light absorption by the chlorophyll (Chl) complexes of photosystem II and I (PSII, PSI), induction of a thylakoidal electron transport (ET) from water to nicotinamide adenine dinucleotide (NADP⁺) via PSII and PSI, formation of a transthylakoidal proton gradient permitting adenosine triphosphate (ATP) synthesis, to CO₂ fixation in the Calvin cycle. At the light-adapted equilibrium state of photosynthesis, ET is regulated by ATP and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) consumption which occur beyond the chloroplastic events. Therefore, photosynthetic ET can be affected by many cellular biochemical processes such as CO₂ uptake and fixation in the Calvin cycle, carbohydrates export in the plant and consumption via mitochondrial respiration (Baker, 2008). For this reason, steady-state photosynthetic ET represents an integrative indicator of cellular energy balance.

The objective of this study was to compare toxicity effects of ionic Cu and CuO NPs on photosynthetic processes and determine specific effects of CuO NPs due to their nano-

sized nature. Two different Chl fluorescence methods were used: The rapid rise of Chl fluorescence, as a specific indicator of PSII photochemistry, and the pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorescence as an integrative indicator of the whole chain of photosynthetic ET and related biochemical processes indicating the whole cellular energetic status. The aquatic macrophyte *Lemna gibba* was used as a model organism due to its small size and high surface absorption capacity of aquatic contaminants.

5.4 Results and discussion

L. gibba plants were exposed in the same conditions as previously described (Perreault *et al.*, 2010) to CuO NPs (0.38 to 4.5 g l⁻¹ total Cu) or Cu (0.004 to 0.068 g l⁻¹ total Cu). Total Cu in the media was determined by atomic absorption spectroscopy. After 48h of treatment, photosynthetic activity was investigated by the measure of Chl fluorescence emission originating from absorbed light energy not used by PSII photochemical reactions nor dissipated as heat; Chl fluorescence is therefore closely related to structural or functional changes of the photosynthetic apparatus (Baker, 2008). The rapid rise of Chl fluorescence reflects the primary electron transport processes of PSII and is characterized, when measured in dark adapted leaves, by 3 transitions steps named J, I, and P, related to the accumulation of PSII electron acceptors in the state of Q_A⁻Q_B, Q_AQ_B⁻ and Q_AQ_B²⁻, respectively (Strasser *et al.*, 2004). In *L. gibba* exposed 48h to ionic Cu or CuO NPs, the fluorescence yield of the rapid rise was lowered, indicating a reduced PSII electron transport capacity (Fig. 5.1A). Ionic Cu was toxic at much lower concentrations than CuO NPs (Fig. 5.1A).

When the effect of ionic Cu at 0.008 g l⁻¹ is compared to 2.1 g l⁻¹ CuO NPs (Fig. 5.1A, curves d and g), the decrease of PSII capacity was found to be similar, as shown by similar level of fluorescence yield at P step. Further insights on the effect of the two forms of copper on PSII was obtained using JIP-test parameters, photosynthetic-based parameters derived from the OJIP fluorescence curves, which describes the different energy fluxes within PSII (Strasser *et al.*, 2004). Using a radar plot, the change of JIP-test parameters was found to be similar for both 0.008 g l⁻¹ ionic Cu and 2.1 g l⁻¹ CuO NPs, since all investigated parameters were altered in the same pattern for both forms of copper (Fig. 5.1B). These

results suggest that ionic Cu and CuO NPs have similar effects on PSII primary photochemical processes.

PAM fluorescence provides different photosynthetic-based parameters indicating photochemical (whole chain of ET) and non-photochemical (thermal) energy dissipation processes of PSII (Baker, 2008). Both dark-adapted and light-adapted equilibrium state of photosynthesis can be probed by PAM fluorescence which is sensitive to events beyond photochemical reactions (Baker, 2008). When *L. gibba* plants were exposed to either ionic Cu or CuO NPs for 48h, the yield of Chl fluorescence was altered (Fig. 5.2). Both parameters 'maximal quantum yield of PSII photochemistry', $\Phi_{MII} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$, and 'operational quantum yield of photochemistry', $\Phi'_{MII} = \frac{F'_M - F_s}{F'_M}$, were decreased by copper effect. For 2.1 g l⁻¹ CuO NPs, Φ_{MII} and Φ'_{MII} was decreased to 92 and 76 % of control, respectively, while for 0.008 g l⁻¹ Cu the decrease was of 89 and 78 % of control (data not shown).

When ET reactions are altered, the excess of absorbed energy will be dissipated via different non-photochemical pathways. At the equilibrium state, energy dissipation is divided between photochemical energy dissipation (described by Φ'_{MII}), regulated non-photochemical pathways that are activated to protect PSII against photodamage (described by the 'non-photochemical quenching' qN and the yield of regulated non-photochemical energy dissipation Φ'_{NPQ}) and non-regulated non-photochemical pathways, related to damaged PSII reaction centers (described by the yield of non-regulated non-photochemical energy dissipation Φ'_{NO}). For a complete description of these parameters, see Kramer et al (2004). The change in the energy dissipation processes within PSII may provide information on the mechanisms associated with the alteration of PSII ET reactions. When the effect of Cu and CuO NPs are compared, it appears that they tends to affect PSII energy dissipation processes in a similar way, characterized by a decrease of photochemical energy dissipation (qP and Φ'_{MII}), and an increase in both regulated (Φ'_{NPQ}) and non-regulated energy dissipation (Φ'_{NO}) (Fig. 5.3).

Moreover, for the same effect on the maximal PSII quantum yield Φ_{MII} (Fig. 5.3, dashed line), both Cu (at 0.008 g l⁻¹) and CuO NPs (at 2.1 g l⁻¹) showed a similar pattern of effect on the different energy dissipation pathways. At these concentrations, no significant difference was found between Cu-treated plants and CuO NPs treated plants for any of the

non-photochemical energy dissipation parameters used (determined by a Student's t-test, $p > 0.05$). These results indicate that non-photochemical energy dissipation were altered in a similar way by Cu and CuO NPs treatments for the same effect on PSII maximal capacity for photochemistry.

5.5 Conclusion

By using Chl fluorescence methods, we showed in this toxicological investigation that both forms of copper have similar mode of toxic action on photosynthetic processes of *L. gibba* plant, as indicated by the change of photosynthetic-based fluorescence parameters. Therefore, our findings support the hypothesis that toxicity effects of CuO NPs is due to the solubilisation of toxic ionic Cu.

5.6 Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Nanoparticles characterization was realized at the NanoQAM research center.

5.7 References

- Almeida, E., T.C. Diamantino and O. de Sousa O. 2007. "Marine paints: the particular case of antifouling paints". *Prog. Org. Coat.*, vol. 59, p. 2-20.
- Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets and A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Sci. Total Environ.*, vol. 407, p. 1461-1468.
- Baker, N.R. 2008. "Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*". *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 59, p. 89-113.
- Bandara, J., I. Guasaquillo, P. Bowen, L. Soare, W.F. Jardim and J. Kiwi. 2005. "Photocatalytic storing of O₂ as H₂O₂ mediated by high surface area CuO. Evidence for reductive-oxidative interfacial mechanism". *Langmuir*, vol. 21, p. 8554-8559.

- Kasemets, K., A. Ivask, H.-C. Dubourguier and A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Toxicol. in Vitro*, vol. 23, p. 1116-1122.
- Kramer, D.M., G. Johnson, O. Kiirats and G.E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes". *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Kucera, T., H. Horakova and A. Sonska. 2008. "Toxic metal ions in photoautotrophic organisms". *Photosynthetica*, vol. 46, p. 481-489.
- Lin, S., P. Bhattacharya, N.C. Rajapakse, D.E. Brune and P.C. Ke. 2009. "Effects of Quantum Dots Adsorption on Algal Photosynthesis". *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, p. 10962-10966.
- Perreault F., A. Oukarroum, L. Pirastru, L. Sirois, W.G. Matias and R. Popovic R. 2010. "Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll *a* Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*". *J. Botany*, vol. 2010, p. 1-9, article ID 763142.
- Ren, G., D. Hu, E.W.C. Cheng, M.A. Vargas-Reus, P. Reip and R.P. Allaker. 2009. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". *Int. J. Antimicrob. Ag.*, vol. 33, p. 587-590.
- Schwab, F., T.D. Bucheli, L.P. Lukhele, A. Magrez, B. Nowack, L. Sigg and K. Knauer. 2011. "Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration?" *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 6136-6144.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient". Dans *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.

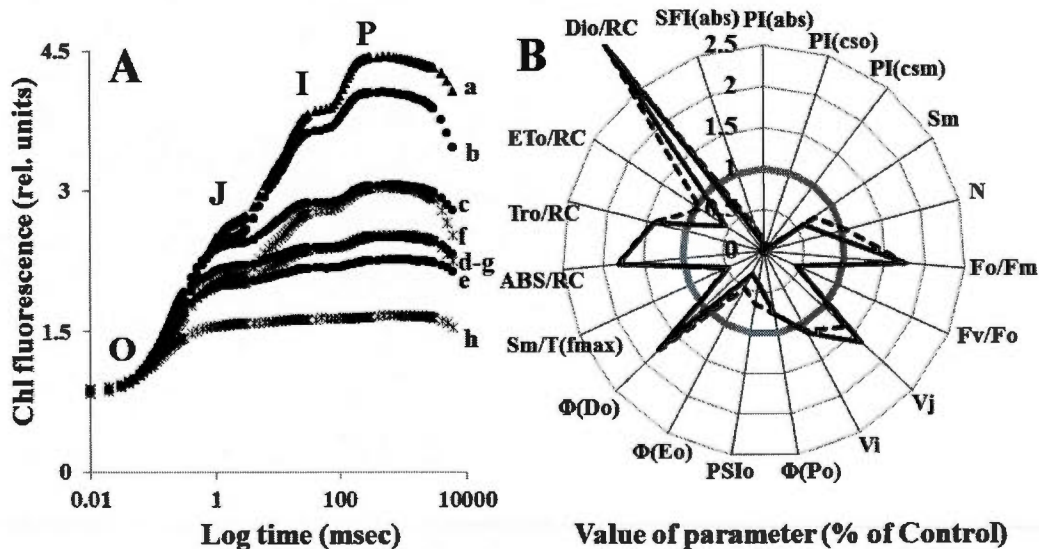


Figure 5.1 A. Rapid rise of Chl fluorescence in *L. gibba* leaves after 48h of treatment. Curve a: Control. Curve b: 0.7 g l⁻¹ CuO NPs. Curve c: 1 g l⁻¹ CuO NPs. Curve d: 2.1 g l⁻¹ CuO NPs. Curve e: 4.5 g l⁻¹ CuO NPs. Curve f: 0.004 g l⁻¹ Cu. Curve g: 0.008 g l⁻¹ Cu. Curve h: 0.016 g l⁻¹ Cu; B. Radar plot of photosynthetic-based fluorescence parameters named as JIP-test. Grey line: Control. Black line: 21 g l⁻¹ CuO NPs. Dashed black line: 0.008 g l⁻¹ Cu. For details on the JIP-test parameters, see Strasser *et al.* (2004).

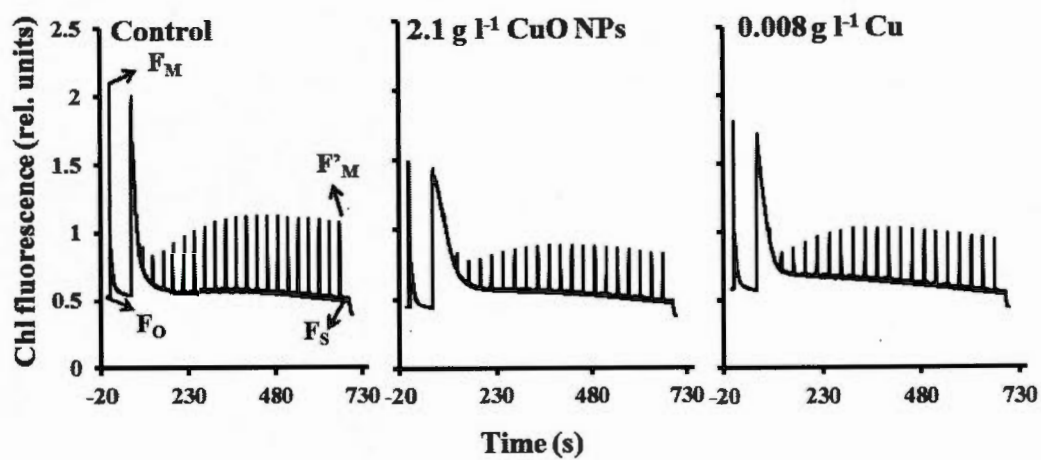


Figure 5.2 PAM fluorescence kinetic in *L. gibba* leaves after 48h of treatment for control, 2.1 g l⁻¹ CuO NPs or 0.008 g l⁻¹ Cu treatment. Chl fluorescence was measured as in Perreault *et al.* (2010).

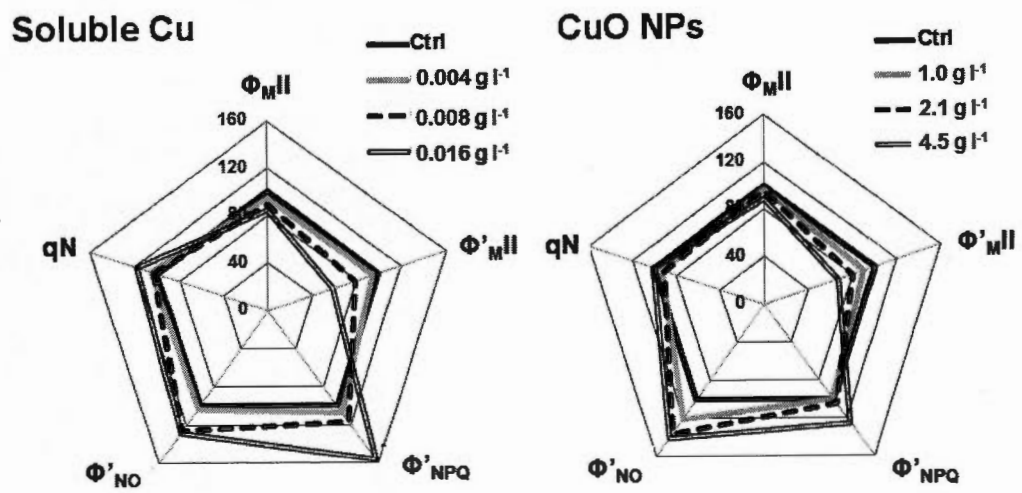


Figure 5.3: The change of photosynthetic parameters evaluated from the PAM fluorescence kinetic in *L. gibba* leaves after 48h of treatment for soluble Cu (left) or CuO NPs (right).

CHAPITRE VI

POLYMER COATING OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES INCREASES NANOPARTICLES UPTAKE AND TOXICITY IN THE GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

François Perreault¹, Abdallah Oukarroum¹, Silvia Pedroso Melegari^{1,2}, William Gerson
Matias² and Radovan Popovic^{1*}

¹ Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

² Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC – Brasil.

* Corresponding author

Publié dans *Chemosphere*, vol. 87, p. 1388-1394, 2012.

Dans ce chapitre, je suis le principal contributeur aux idées de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats. J'ai écrit la première version du manuscrit et participé à la rédaction finale. A. Oukarroum et S.P. Melegari ont participé aux mesures expérimentales. W.G. Matias et R. Popovic ont participé à la rédaction de la version finale du manuscrit.

6.1 Résumé

Les nanoparticules (NPs) de CuO sont fréquemment encapsulées dans des polymères pour être intégrées dans les peintures ou les textiles pour leur propriétés antimicrobiennes. Leur utilisation dans les peintures antisalissures peut mener à la contamination des écosystèmes aquatiques. Cependant, le risque toxicologique des NPs dans l'environnement est difficile à évaluer due au manque de connaissance sur les mécanismes d'interactions des NPs avec les systèmes biologiques. Dans cette étude, l'effet de l'encapsulation des NPs de CuO dans un polymère sur la toxicité des NPs de CuO chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été évalué en utilisant des NPs de CuO nues ou encapsulées dans un polymère organique, préparées à partir de la même nanopoudre initiale. Les deux suspensions de NPs de CuO étaient toxiques pour *C. reinhardtii* après 6 h de traitement à des concentrations de 0.005 à 0.04 g l⁻¹. Les NPs de CuO nues et encapsulées induisent une diminution de l'activité du Photosystème II et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Nos résultats montrent que les NPs de CuO encapsulées dans un polymère sont plus toxiques que les NPs de CuO nues. La plus grande toxicité des NPs de CuO encapsulées est principalement due à la plus grande pénétration des NPs de CuO encapsulées dans les cellules comparativement aux NPs de CuO nues. Ces résultats indiquent que la toxicité des NPs de CuO encapsulées chez les cellules algales est causée par des interactions intracellulaires entre les NPs et la cellule.

6.2 Abstract

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are frequently used in a polymer-coated form, to be included in paints or fabrics for antimicrobial properties. Their application in antifouling paints may lead to the contamination of aquatic ecosystems. However, the toxicological risk of NPs in the environment is hard to evaluate due to a lack of knowledge on the mechanisms of NP interaction with biological systems. In this study, we investigated the effect of polymer coating on CuO NP toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by comparing bare and polymer-coated CuO NPs prepared from the same CuO nanopowder. Both CuO NP suspensions were toxic to *C. reinhardtii* after 6 h treatment to concentrations of 0.005 to 0.04 g L⁻¹. Bare and polymer-coated CuO NPs induced a decrease of Photosystem II activity and the formation of reactive oxygen species. Polymer-coated CuO NP was found to be more toxic than the uncoated CuO NP. The higher toxicity of CS-CuO NP was mainly associated with the increased capacity of polymer-coated CuO NP to penetrate the cell compared to bare CuO NPs. These results indicate that the high toxicity of polymer-coated CuO NPs in algal cells results of intracellular interactions between NPs and the cellular system.

Keywords :

Copper oxide nanoparticle; *Chlamydomonas reinhardtii*; nanotoxicology; reactive oxygen species; photosynthesis.

Abbreviations:

CS-CuO = "Core-Shell" polymer-coated copper oxide nanoparticles; H₂DCFDA = 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; HSM : High Salt Medium; ICP-AES = Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; NPs = nanoparticles; PI= Performance index of Photosystem II; PSII = Photosystem II; ROS = Reactive Oxygen Species; TEM = Transmission electron microscopy.

6.3 Introduction

Nanotechnology has been a major field of innovation in the recent decade and nanomaterials are quickly becoming part of numerous products of industrial, medical and personal uses (Schmid and Riediker, 2008; Peralta-Videa *et al.*, 2011). The widespread use of nanomaterials may lead to the contamination of aquatic ecosystems by nano-sized contaminants (Klaine *et al.*, 2008). However, the ecotoxicological risks of nanomaterials are hard to evaluate because the mechanisms of toxicity of nano-sized materials are still not understood (Dhawan *et al.*, 2009). Toxicological research has identified several key physicochemical characteristics of nanomaterials that can be related to toxicity. These include size, shape, composition, agglomeration and solubility, especially for nanomaterials composed of toxic metals (Griffith *et al.*, 2008; Johnston *et al.*, 2010). For example, toxicity of nano-sized ZnO to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* was found to be solely due to particles solubilisation into toxic Zn^{2+} ions (Franklin *et al.*, 2007). In addition, surface properties, such as total surface area, surface charge, surface reactivity and functionalisation were also identified as major factors in the toxicity of nanomaterials (Verma and Stellacci, 2010; Zhu *et al.*, 2010). These properties are dependent to nanomaterials' surface composition, which is often modified to favour specific applications (Sperling and Parak, 2010). The change of surface properties of nanomaterials can be expected to have an important role on how they interact with biological systems.

Copper oxide NPs (CuO NPs) are frequently used for their antimicrobial and biocidal properties (Cioffi *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2009). In the aquatic environment, this type of NP may represent an important source of contamination due to its application in antifouling paints used on boats and immersed structures. These paints consist of a polymeric film made mostly of acrylic and styrenic monomers covering CuO NPs (Almeida *et al.*, 2007). Antifouling paints were found to be very efficient in preventing the attachment of algae, shellfish and other organisms to the hull of boats (Yebra *et al.*, 2004). However, decomposition of CuO NP-based paints results in the release of their components in the aquatic environment (reviewed in Turner, 2010). Recently, it was shown that polymer-coated, core-shell (CS) CuO NPs are toxic to aquatic photosynthetic organism (Perreault *et al.*, 2010; Saison *et al.*, 2010). In these studies, using microalgae and aquatic macrophytes, toxicity of

CS-CuO NPs was found to be caused by the nanoparticulate fraction. Consequently, release of polymer-coated CuO NPs into the aquatic environment may have severe consequences on photosynthetic organisms, the first step of the aquatic trophic chain.

In our previous report, we showed that CS-CuO NPs were more toxic to algal cells than bare, uncoated CuO NPs. This effect was interpreted as the result of agglomeration and precipitation of bare CuO NPs in the media, decreasing their capacity to interact with algal cells (Saison *et al.*, 2010). However, polymer coating may alter toxicity in many different ways. For the same NP size, different polymer coatings were found to have different effects on root growth of *Lolium multiflorum* (Cheng *et al.*, 2011). Polymer-coated CdSe nanocrystals were also found to have an increased toxicity due to higher NP precipitation on the cell surface (Kirchner *et al.*, 2005). Consequently, to understand the mechanisms of toxicity of CS-CuO NPs in algal cells, it is necessary to investigate the effect of polymer coating on the interaction between NPs and algal cells.

In this report, we investigated the effect of polymer coating of CuO NPs on its toxicity to the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Bare and polymer-coated CuO NPs were characterized to evaluate the effect of polymer coating on different properties relevant for NP toxicity. The two NP suspensions were then investigated to determine how the presence of polymer coating alters the interaction of NPs with algal cells, their intracellular uptake and the resulting toxicity in algae.

6.4 Materials and methods

6.4.1 Algal cultures

C. reinhardtii (CC-400, cell wall deficient strain) was obtained from the Chlamydomonas Center (Duke University, USA) and cultivated in 1 l batch culture in high salt medium (HSM) as previously described (Saison *et al.*, 2010). Samples in the exponential state of growth having a cell density of 1×10^6 cells ml⁻¹ were used for treatments. Culture cell densities were determined with a Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc., USA).

6.4.2 NP synthesis

CuO nanopowder was obtained from MTI Corporation (USA) and used for the preparation of both bare CuO and polymer-coated CuO NP suspensions. Raw nanopowder has a particle diameter of 30-40 nm and purity of over 99%, according to the manufacturer. Bare CuO NP stock suspension was prepared in HSM and sonicated before use during 3 min with a sonicator equipped with a microtip (VibraCell 400 W, Sonics & Materials Inc, USA). Polymer-coated (poly(styrene-co-butyl acrylate)) CS-CuO NP suspension was prepared by the protocol previously described (Daigle and Claverie, 2008). Thermogravimetric analysis of CS-CuO NPs indicated a weight composition of 67% core (CuO) and 33% shell (polymer). Transmission electronic microscopy (TEM) of CS-CuO NPs showed a shell thickness of 14 nm for an average particle size of 81 nm. For detailed characterisation data, see Daigle and Claverie (2008).

6.4.3 NP treatment

Algae were used for treatments when in the exponential phase, to provide higher reproducibility. In addition, cultures having an initial $\frac{F_M - F_{50\mu s}}{F_M}$ value lower than 0.6 were not considered to ensure a constant physiological state of the algal cultures (see section 6.4.6 for more details). Algal cells were exposed to bare and CS-CuO NPs based on the same amount of CuO. Algae were exposed 6 h to 0.0004, 0.004, 0.01, 0.02 and 0.04 g l⁻¹ of CuO NPs in a volume of 50 mL in HSM media. Illumination and temperature conditions were the same as used for algal culture but it should be noted that NP treatments had a higher turbidity due to NP density, which reduced the light intensity passing through the culture by 40% at 0.4 g l⁻¹, as measured with a LI-250 light meter (LI-COR inc., USA). Such light attenuation had no effect on the measurement of the toxicity indicators used in this study due to the short exposure time used (6 h). Toxicity results were evaluated on the basis of mass concentrations (g l⁻¹) and total surface area (cm² l⁻¹).

For treatment of algal cells to the soluble Cu fraction, CuO and CS-CuO NP suspensions were prepared in the same way as for treatments and, after 6 h, the nanoparticulate fraction was removed by centrifugation (Daigle and Claverie, 2008;

Manusadzianas *et al.*, 2012). NP suspensions were centrifuged (12,000 g, 30 min) and the supernatant was collected and used for algal exposure.

6.4.4 Characterisation of the NP suspensions in the culture media

Characterisation of the NP suspensions was done in the HSM media for a [CuO] of 0.04 g l⁻¹ (see discussion). Particle distribution was determined by dynamic light scattering with a ZetaPlus particle sizer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Zeta potential of NPs in the HSM media was determined by the electrophoretic mobility method with the ZetaPlus system. Soluble Cu fraction was determined by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) analysis of the HSM media where the particle fraction was removed by centrifugation. The supernatant was collected, acidified and further filtered (0.22 µm) before ICP-AES to remove any remaining particulate matter (*e.g.* polymer residue found in the CS-CuO NPs' supernatant). Photocatalytic capacity was measured by the photodegradation of methylene blue. NP suspensions in HSM (0.04 g l⁻¹) with methylene blue (10 mg l⁻¹) were exposed to the same conditions described for algal culture and degradation of methylene blue was determined after 6 h by measuring the absorbance at 665 nm (Song and Zhang, 2010).

6.4.5 Intracellular formation of ROS

The intracellular ROS level was determined using the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Invitrogen Molecular Probe, USA). H₂DCFDA stock solution (10 mM) was prepared in ethanol in the dark. H₂DCFDA is a non-polar compound and diffuses into algal cells where it is transformed by intracellular esterase and H₂O₂ into the polar, fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein which has a maximum emission between 517–527 nm. After 6 h treatment, 1 ml samples of algal cultures were exposed 15 min to 0.2 mM H₂DCFDA in the dark. Intracellular ROS level was determined by measuring the fluorescence emission at 530 nm with a flow cytometer (FacScan; Becton Dickinson Instruments, USA). Cytometry results were analysed using the WinMDI 2.8 software. Algal cells were separated from noncellular particles by using a relationship

between particle size and red fluorescence level, originating from chlorophyll (Chl) fluorescence reemission. A positive control sample using methylviologen was done to verify the assay (data not shown).

6.4.6 Chl *a* fluorescence measurements

Photosystem II (PSII) electron transport was evaluated by measuring the Chl *a* fluorescence rise. After 6 h treatment, total Chl content (*a* + *b*) was determined spectrophotometrically, according to Wellburn (1994). Before fluorescence measurements, samples were dark adapted for 30 min. Under a weak green light, an aliquot (5 mg of Chl) was placed on a 13 mm glass fiber filter (Millipore, USA) using low pressure filtration to obtain a humidified uniform layer of algal cells. Rapid, polyphasic rise of Chl *a* fluorescence was measured with a Plant Efficiency Analyser fluorimeter (Handy-PEA, Hansatech Ltd, UK) using a 6 s saturating flash (3,500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The fluorescence intensity at 50 μs was considered as the O value ($F_{50\mu\text{s}}$), fluorescence intensities for J and I transients were determined at 2 ($F_{2\text{ms}}$) and 30 ms ($F_{30\text{ms}}$), respectively, and maximum fluorescence yield P was considered as the maximal value of fluorescence intensity (F_M) under saturating illumination (Strasser *et al.*, 2004).

PSII performance index was calculated as $\text{P.I.} = \frac{\text{RC}}{\text{ABS}} \times \frac{F_M - F_{50\mu\text{s}}}{F_{50\mu\text{s}}} \times \frac{1 - V_J}{V_J}$. In this equation, RC/ABS is an indicator of the number of active PSII reaction centers per Chl unit and is calculated as $\frac{\text{RC}}{\text{ABS}} = \left[\frac{F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}}{4} \times (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}}) \right] \times \frac{F_M - F_{50\mu\text{s}}}{F_M}$. V_J is the relative value of fluorescence at J transient, indicating the accumulation of reduced PSII primary electron acceptor, Q_A , and is determined as the ratio $V_J = \frac{F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}}{F_M - F_{50\mu\text{s}}}$ (Strasser *et al.*, 2004).

6.4.7 Light microscopy

To determine morphological changes in the algal culture, a drop of algal culture was placed on a glass microscope slide and observed using a Nikon Eclipse TS100 microscope.

Pictures were taken with a Pixelink camera at 40 X magnification. Brightness and contrast in the pictures were modified with the Image J software (NIH Image, USA) for better clarity.

6.4.8 TEM analysis of intracellular CuO NPs

After 6 h treatment, 50 ml of control and NPs-treated cultures ($[\text{CuO}] = 0.04 \text{ g l}^{-1}$) were centrifuged and the supernatant discarded. Without disturbing the pellet, cells were washed with 500 μl of washing buffer (0.1 M cacodylate, 0.1% CaCl_2 , pH 7.2) for 10 s. The washing buffer was removed and 500 μl of fixation buffer (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Wash buffer) was added. Cells were fixed overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. After glutaraldehyde fixation, the pellet was washed three times 10 min with the washing buffer, and stained with osmium tetroxide (1% OsO_4 , 1.5% KFeCN in water) during 2 h at 4 $^{\circ}\text{C}$. Then, the pellet was washed with nanopure water (3 x 10 min), dehydrated with increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 80, 90 and 100% acetone, 3 x 10 min each). Dehydrated samples were infiltrated with epon at room temperature with increasing concentrations of epon in acetone: 1:1 (overnight), 2:1 (4 h), 3:1 (overnight). Then, the pellet was placed in pure epon, left 4 h under vacuum and then heated 48 h at 58 $^{\circ}\text{C}$. Hardened pellets were cut into 0.6 μm thick slices and placed on a gold grid for TEM analysis. No secondary fixation was used to obtain a better visualisation of NPs inside the cell. Samples were visualised with a FEI Tecnai 12 120 kV microscope and pictures taken with a Gatan 792 Bioscan 1 k x 1 k Wide Angle Multiscan CCD camera. The elemental nature of the metallic agglomeration found inside the cell was determined by energy-dispersive X-ray spectroscopy of the same epon-fixed samples using a Philips CM200 200 kV TEM equipped with a EDAX Genesis EDS system.

6.4.9 Intracellular copper concentration

Algae were separated from NPs using a modified density equilibrium method (Eroglu and Melis, 2008). Sucrose solutions (20, 40, 60, 80, 100 and 120%) were prepared in the HSM media used for algal culture. Sucrose gradient was done in a Beckman centrifugation tube inclined at a 30 $^{\circ}$ angle. Beginning with the highest sucrose concentration, 3 ml of each sucrose solution were slowly placed in the tube, resulting in 6 layers of different density.

After 6 h treatment, 50 ml of control and NP-treated cultures ($[\text{CuO}] = 0.04 \text{ g l}^{-1}$) was centrifuged and the pellet slowly placed on top of the sucrose gradient. The tubes were centrifuged at 1,000 rpm during 20 min in a swinging-bucket 5810R centrifuge (Eppendorf, Canada), resulting in a clear separation between algal cells and CuO NPs (which formed a pellet at the bottom of the tube). The algal layer was recuperated with a glass Pasteur pipette and filtered on a $0.45 \mu\text{M}$ filter previously dried and weighted. To remove Cu weakly bound to the cell surface or the filter, $3 \times 10 \text{ ml}$ of 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid in HSM medium was slowly passed through the filter. Filters were dried at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h, weighted to calculate algal dry weight and then placed in acid-washed glass tubes in which 4 ml HNO_3 and 500 μL H_2O_2 was added. The samples digested 48 h at room temperature before being diluted to 20% HNO_3 in nanopure water for ICP-AES quantification of Cu. Cu concentrations were normalised to dry weight.

6.4.10 Data analysis and statistics

All experiments were done in four replicates. Means and standard deviations were estimated for each treatment. Significant differences between treatments were determined using a random permutation test. All statistical analysis were done with the R software (v2.13.0, R Core group, 2011) and p values less than 0.05 were considered as significant.

6.5 Results

6.5.1 Characterisation of the NP suspensions in the media

The effect of polymer coating on size distribution, solubility, charge and photocatalytic capacity of the NP suspensions was investigated in the HSM media used for treatments. Size distribution was determined by dynamic light scattering of the NP suspension at the highest CuO concentration tested (0.04 g l^{-1}). Both NP suspensions were prepared from the same nanopowder, which had an average size of 30-40 nm (data not shown). However, when bare CuO NPs were suspended in HSM media, we found a particle size distribution centered around 148 nm, indicating the formation of agglomerates (Fig. 6.1).

When NPs were coated with polymer, particle size was found to be centered around 65.4 nm, with most of the NPs below 100 nm. Therefore, CS-CuO NPs were more stable in the HSM media than bare CuO NPs, resulting in a smaller particle size.

Polymer coating of CuO NPs was also found to alter NP solubility. After removal of the particulate fraction by centrifugation, soluble Cu concentration was found to be 70% higher in the bare CuO NP media ($1.55 \pm 0.08 \text{ mg l}^{-1}$) than in the CS-CuO NP media ($0.9 \pm 0.04 \text{ mg l}^{-1}$), for a total CuO concentration of 0.04 g l^{-1} ($p < 0.05$). This soluble Cu fraction constituted a small percentage (2.8% for CS-CuO NPs and 4.8% for bare CuO NPs) of the total Cu content of the treatment.

Photocatalytic capacity, measured by the light-stimulated degradation of methylene blue by CuO NPs, was found to be low for both NP. After a 6 h treatment to 0.04 g l^{-1} , under the same conditions used for treatments, methylene blue photodegradation was of 10.7 ± 4.1 and $9.4 \pm 4.1\%$ of control sample, for bare and CS-CuO NPs, respectively. Photocatalytic degradation of methylene blue was not significantly different between bare CuO and CS-CuO NPs ($p > 0.05$). Similarly, surface charge, measured as the zeta potential by the electrophoretic mobility method, was not altered by the presence of the polymer coating on the CuO NPs. In the HSM media, for a $[\text{CuO}]$ of 0.04 g l^{-1} , zeta potential was found to be -51.1 ± 5.1 and $-58.9 \pm 3.1 \text{ mV}$, for the bare and CS-CuO NP suspensions, respectively ($p > 0.05$).

6.5.2 NPs toxicity in *C. reinhardtii*

Toxicity of bare and CS-CuO NPs was investigated using two indicators of toxicity: ROS formation and inhibition of PSII activity. These indicators were previously shown to be sensitive to NPs effects in algae (Wang *et al.*, 2008; Petit *et al.*, in press). Toxicity of bare and CS-CuO NPs was compared on the basis of the same CuO concentration. After 6 h treatment, CS-CuO NPs were found to induce the formation of ROS in *C. reinhardtii* cells. ROS formation was significant at a concentration of only 0.004 g l^{-1} CS-CuO NPs ($p < 0.05$) and reached as high as $392 \pm 12\%$ of control for 0.04 g l^{-1} (Fig. 6.2A). Concomitantly, PSII electron transport, evaluated by the PI, was decreased by CuO NP treatments. After 6 h treatment to 0.04 g l^{-1} of CS-CuO NPs, PI was decreased to $13 \pm 12\%$ compared to control (p

< 0.05) (Fig. 6.2A). Such decrease indicates that CS-CuO NP reduced PSII capacity to convert light into photosynthetic electron transport. However, when *C. reinhardtii* was exposed to the same mass concentrations of bare CuO NPs, toxicity was found to be lower using both ROS formation and PSII electron transport. After 6 h treatment to 0.04 g l⁻¹ of bare CuO NPs, ROS formation was increased to 160 ± 15% compared to control, while PI was decreased to 78 ± 20% compared to control (Fig. 6.2A). Bare and polymer-coated CS-CuO NPs were also compared on the basis of total surface area, which was previously found to be a more useful parameter for the comparison of nanomaterials' toxicity (Oberdörster *et al.*, 2005). When evaluated on a total NP surface area per l, CS-CuO NPs still induced higher toxicity than bare CuO NPs for the same surface area (Fig. 6.2B).

6.5.3 Interaction of NPs with algal cells

The interaction of CuO NPs with algal cells was investigated by visual changes in the cell culture morphology using light microscopy. When algae were exposed to either bare CuO or CS-CuO NPs, large agglomerates composed of algal cells and CuO NPs could be observed (Fig. 6.3). Agglomeration was found to be more important in the cell culture exposed to CS-CuO NPs, which had more agglomerates of a larger size than the cell culture exposed to bare CuO NPs (Fig. 6.3).

Penetration of CuO NPs inside algal cells was determined by TEM microscopy of epon-embedded cells after 6 h treatment. TEM micrographs revealed the ultrastructure of the cell, with the large single chloroplast occupying most the cell volume (Fig. 6.4). In NP-treated cells, large metallic agglomerates can be observed. The agglomerates were several hundreds of nm in size and localized only in the cytoplasm of the cell. It should be noted that the absence of a secondary fixation did not allowed for the identification of specific cytosolic organelle; however the metallic agglomerates appear to be enclosed in a membrane structures that can be hypothetized to be the vacuoles (Fig. 6.4, insert). To confirm that these agglomerates were CuO NPs, energy dispersive X-ray spectroscopy was used. The main elements composing the agglomerates were found to be Cu and O, confirming the CuO NP accumulation inside the cell (Fig. 6.5). The presence of X-ray peaks representing C, P, Cl and Ca can be attributed to biological components of the cell or the epon resin used for sample

embedding (Cl), and the Au peaks to the gold grid holding the sample. These results confirm that both types of CuO NPs were able to cross the biological membranes and accumulate in the cell.

Accumulation of CuO NPs inside the cell was analysed quantitatively by the measure of total Cu content in algal cells. When *C. reinhardtii* was exposed to either bare or CS-CuO NPs, an important uptake of Cu was found. Cu uptake in the presence of NPs was significantly more important than when algae were exposed to only the soluble Cu fraction of both NPs solution, which further confirms that CuO penetrated the cells in a particulate form (Fig. 6.6). When total intracellular Cu content is compared between cultures exposed to bare and CS-CuO NPs, it appears evident that uptake is more important for CS-CuO NPs than for bare CuO NPs. Total Cu content in CS-CuO NP-treated cells was 6.5 times higher than in bare CuO NP-treated cells.

6.6 Discussion

Several mechanisms are thought to participate in the toxic interactions of metal NPs with cellular systems. Solubilisation of NPs into free metal ions is usually considered as one of the most common mechanisms of toxicity for several types of NP (Franklin *et al.*, 2007; Aruoja *et al.*, 2009). However, some effects can also be attributed to specific properties of nano-sized particles, such as the capacity of NPs to cross biological membrane (Miao *et al.*, 2011) or to adsorb on the cell surface (Zeyons *et al.*, 2009). Agglomeration of algal culture appears to be a common effect of NP-alga interactions, as it was observed for CuO (this study), NiO, CeO₂ and gold-glycodendrimers NPs (Gong *et al.*, 2011, Rodea-Palomares *et al.*, 2011; Perreault *et al.*, 2012). Some nanomaterials are also able to generate ROS via photocatalytic processes (Hund-Rinke and Simon, 2006). Toxicological evaluation of metal NP toxicity must consider all these factors to determine the mechanism of NP interactions with cellular systems.

In our study, exposure of *C. reinhardtii* to CS-CuO NPs resulted in a stronger formation of ROS and greater inhibition of PSII activity than when algae were exposed to bare CuO NPs. Exposure of algae to CS-CuO NPs also resulted in a more agglomerated state of cells and higher intracellular uptake of NPs. The specific mechanism of CuO NPs toxicity

is still a matter of investigation, although previous studies suggested a primary role of oxidative stress for the toxicity of different NPs (Xia *et al.*, 2006; Saison *et al.*, 2010). In addition, oxidative stress induced by quantum dots and TiO₂ NPs in *C. reinhardtii* was not found to be associated with PSII photoinhibition processes (Wang *et al.*, 2008). In our study, the higher induction of ROS compared to PSII inhibition, as well as the absence of NP in the chloroplast, support these conclusions, indicating that ROS formation may be the primary mechanism for CS-CuO NPs in algae.

In our study, release of Cu ions from CuO NPs was found for both coated and bare NPs, although CS-CuO NPs solubilisation was lower. Soluble Cu fraction represented between 2 and 5% of total Cu content of the treatments. Solubilisation of CuO NPs is dependent on the media and may range from no detectable release to 25% of total Cu (Aruoja *et al.*, 2009; Buffet *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011). In our conditions, CuO NPs solubilisation can therefore be considered as low. On the other hand, cellular uptake of CuO NPs was high, particularly for CS-CuO NPs. Higher uptake of CS-CuO NPs by algal cells can be associated with their higher toxicity, since Cu release and photocatalytic activity were not significantly higher for CS-CuO NPs compared to bare CuO NPs. This may indicate that, in algae, CuO NP toxicity is due to intracellular interactions of NPs. Such effects may take place either via direct interaction of NPs with cellular components or via indirect effects due to intracellular solubilisation, also called Trojan Horse effect (Studer *et al.*, 2010). This conclusion is in agreement with other findings indicating that intracellular uptake is an important part of silver NPs toxicity in algae (Miao *et al.*, 2011). Similar conclusions were also found in the duckweed *Landoltia punctata*, where higher uptake rate of CuO NPs was the major cause for the higher toxicity of CuO NPs compared to bulk CuO particles (Shi *et al.*, 2011). In our study, the higher uptake of polymer-coated CS-CuO NPs may be explained by the smaller size of CS-CuO NPs compared to the larger bare CuO NPs agglomerates. Higher cellular uptake of smaller particles or agglomerates was also observed *in vitro* using the human lung epithelial cell line A549 (Andersson *et al.*, 2011). However, it is also possible that some interactions between the polymer coating and the cell surface may facilitate the penetration of CS-CuO NPs inside algal cells.

In conclusion, we found that the main effect of the polymer coating on CuO NP suspension was to decrease NPs agglomeration, resulting in a lower particle size. We showed

that CS-CuO NPs were more toxic to *C. reinhardtii* than bare CuO NPs at the same mass concentration or total surface area unit. The higher toxicity of CS-CuO NPs was shown to be mainly caused by an higher uptake of CS-CuO NPs, which accumulated as large agglomerates inside membrane structures in the cytosol. The results of this study indicate that, in algae, CuO NPs toxicity may be caused by intracellular interactions between NPs and the cellular system.

6.7 Acknowledgements

This work was supported by research grants awarded to R. Popovic by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, Canada). F. Perreault is supported by a NSERC Ph.D fellowship. S.P. Melegari was supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brasil) post-doctoral fellowship. The authors thank Pr. Jérôme Claverie (UQAM) for providing the CS-CuO NPs.

6.8 References

- Almeida, E., T.C. Diamantino and O. de Sousa. 2007. "Marine paints: the particular case of antifouling paints". *Prog. Org. Coat.*, vol. 59, p. 2-20.
- Andersson, P.O., C. Lejon, B. Ekstrand-Hammarström, C. Akfur, L. Ahlinder, A. Bucht and L. Österlund. 2011. "Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO₂ nanoparticles in living lung epithelial cells". *Small*, vol. 7, p. 714-723.
- Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets and A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Sci. Total Environ.*, vol. 407, p. 1461-1468.
- Buffet, P.-E., O.F. Tankoua, J.-F. Pan, D. Berhanu, C. Herrenknecht, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, J.-B. Bérard, C. Risso, M. Guibbolini, M. Roméo, P. Reip, E. Valsami-Jones and C. Mouneyrac. 2011. "Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles". *Chemosphere*, vol. 84, p. 166-174.
- Cheng, Y., L. Yin, S. Lin, M. Wiesner, E. Bernhardt and J. Liu. 2011. "Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight". *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, p. 4425-4432.
- Cioffi, N., L. Torsi, N. Ditaranto, G. Tantillo, L. Ghibelli, L. Sabbatini, T. Bleve-Zacheo, M. D'Alessio, P.G. Zambonin and E. Traversa. 2005. "Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties". *Chem. Mater.*, vol. 17, p. 5255-5262.
- Daigle, J.-C. and J.P. Claverie. 2008. "A simple method for forming hybrid core shell nanoparticles suspended in water". *J. Nanomater.*, vol. 2008, p. 1-8, article ID 609184.
- Dhawan, A., V. Sharma and D. Parmar. 2009. "Nanomaterials: a challenge for toxicologists". *Nanotoxicology*, vol. 3, p. 1-9.
- Eroglu, E. and A. Melis. 2008. "Density equilibrium method for the quantitative and rapid in situ determination of lipid, hydrocarbon, or biopolymer content in microorganisms". *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, p. 1406-1415.
- Franklin, N.M., N.J. Rogers, S.C. Apte, G.E. Batley, G.E. Gadd, P.S. Casey. 2007. "Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 8484-8490.
- Gong, N., K. Shao, W. Feng, Z. Lin, C. Liang and Y. Sun. 2011. "Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*". *Chemosphere*, vol. 83, p. 510-516.

- Griffitt, R.J., J. Luo, J. Gao, J.-C. Bonzongo and D.S. Barber. 2008. "Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, p. 1972-1978.
- Hund-Rinke, K. And M. Simon. 2006. "Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 13, p. 225-232.
- Johnston, H.J., G.R. Hutchison, F.M. Christensen, K. Aschberger and V. Stone. 2010. "The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity". *Toxicol. Sci.*, vol. 114, p. 162-182.
- Kirchner, C., T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A.M. Javier, H.E. Gaub, S. Stolze, N. Fertig and W.J. Parak. 2005. "Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles". *Nano Lett.*, vol. 5, p. 331-338.
- Klaine, S.J., P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, T.F. Fernandes, R.D. Handy, D.Y. Lyon, S. Mahendra, M.J. McLaughlin and J.R. Lead. 2008. "Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, p. 1825-1851.
- Manusadzianas, L., C. Caillet, L. Fachetti, B. Gylte, R. Grigutyte, S. Jurkoniene, R. Karionas, K. Sadauskas, F. Thomas, R. Vitkus and J.-F. Férard. 2012. "Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 108-114.
- Miao, A.-J., Z. Luo, C.-S. Chen, W.-C. Chin, P.H. Santschi and A. Quigg. 2011. "Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle Toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*". *PLoS ONE*, vol. 5, p. 1-8, article ID e15196.
- Oberdörster, G., E. Oberdörster and J. Oberdörster. 2005. "Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles". *Environ. Health Persp.*, vol. 113, p. 823-839.
- Peralta-Videa, J.R., L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong and J.L. Gardea-Torresdey. 2011. "Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010". *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, p. 1-15.
- Perreault, F., A. Oukarroum, L. Pirastru, L. Sirois, W.G. Matias and R. Popovic. 2010. "Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll *a* fluorescence imaging in *Lemna gibba*". *J. Botany*, vol. 2010, p. 1-9, article ID 763142.
- Perreault, F., N. Bogdan, M. Morin, J. Claverie and R. Popovic. 2012. "Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 109-120.

- Petit, A.-N., T. Debenest, P. Eullaffroy and F. Gagné. In press. "Effects of a cationic PAMAM dendrimer on photosynthesis and ROS production of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Nanotoxicology*, in press, DOI: 10.3109/17435390.2011.579628
- Ren, G., D. Hu, E.W.C. Cheng, M.A. Vargas-Reus, P. Reip and R.P. Allaker. 2009. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". *Int. J. Antimicrob. Ag.*, vol. 33, p. 587-590.
- Rodea-Palomares, I., K. Boltes, F. Fernandez-Pinas, F. Leganes, E. Garcia-Calvo, J. Santiago, R. Rosal. 2011. "Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO₂ nanoparticles using two aquatic microorganisms". *Toxicol. Sci.*, vol. 119, p. 135-145.
- Saison, C., F. Perreault, J.-C. Daigle, C. Fortin, J. Claverie, M. Morin and R. Popovic. 2010. "Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, p. 109-114.
- Schmid, K. and M. Riediker. 2008. "Use of nanoparticles in Swiss industry: A targeted survey". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 2253-2260.
- Shi, J., A.D. Abid, I.M. Kennedy, K.R. Hristova and W.K. Silk. 2011. "To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution". *Environ. Pollut.*, vol. 159, p. 1277-1282.
- Song, L. and S. Zhang. 2010. "Preparation and visible light photocatalytic activity of Bi₂O₃/CaO photocatalysts". *Reac. Kinet. Mech. Cat.*, vol. 99, p. 235-241.
- Sperling, R.A. and W.J. Parak. 2010. "Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles". *Philos. T. R. Soc. A*, vol. 368, p. 1333-1383.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". Dans *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Studer, A.M., L.K. Limbach, L. Van Duc, F. Krumeich, E.K. Athanassiou, L.C. Gerber, H. Moch and W.J. Stark. 2010. "Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles". *Toxicol Lett.*, vol. 197, p.169-74.
- Turner, A., 2010. "Marine pollution from antifouling paint particles". *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 60, p. 159-171.

- Verma, A. and F. Stellacci. 2010. "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions". *Small*, vol. 6, p. 12-21.
- Wang, J., X. Zhang, Y. Chen, M. Sommerfeld and Q. Hu. 2008. "Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Chemosphere*, vol. 73, p. 1121-1128.
- Wellburn, A.R. 1994. "The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution." *J. Plant Physiol.*, vol. 144, p. 307-313.
- Xia, T., M. Kovochich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sioutas, J.I. Yeh, M.R. Wiesner and A.E. Nel. 2006. "Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm". *Nano Lett.*, vol. 6, p. 1794-1807.
- Yebra, D.M., S. Kiil and K. Dam-Johansen. 2004. "Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings". *Prog. Org. Coat.*, vol. 50, p. 75-104.
- Zeyons, O, A. Thill, F. Chauvat, N. Menguy, C. Cassier-Chauvat, C. Oréar, J. Daraspe, M. Auffan, J. Rose and O. Spalla. 2009. "Direct and indirect CeO₂ nanoparticles toxicity for *Escherichia coli* and *Synechocystis*". *Nanotoxicology*, vol. 3, p. 284-295.
- Zhu, Z.-J., R. Carboni, M.J. Quercio, Jr., B. Yan, O.R. Miranda, D.L. Anderton, K.F. Arcaro, V.M. Rotello and R.W. Vachet. 2010. "Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish". *Small*, vol. 6, p. 2261-2265.

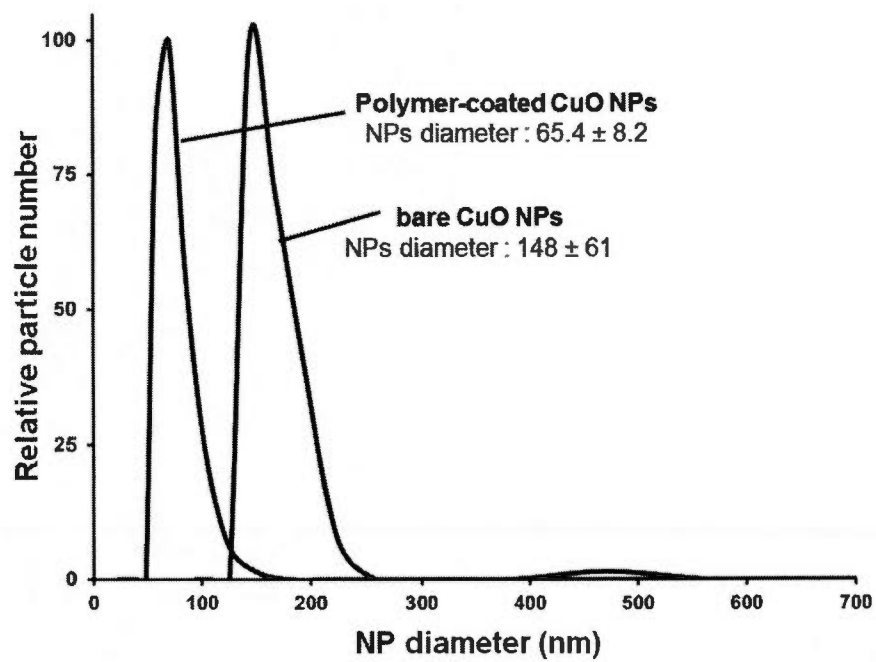


Figure 6.1 Bare and polymer coated (CS-CuO) NPs size distribution in HSM media, for a [CuO] of 0.04 g l⁻¹.

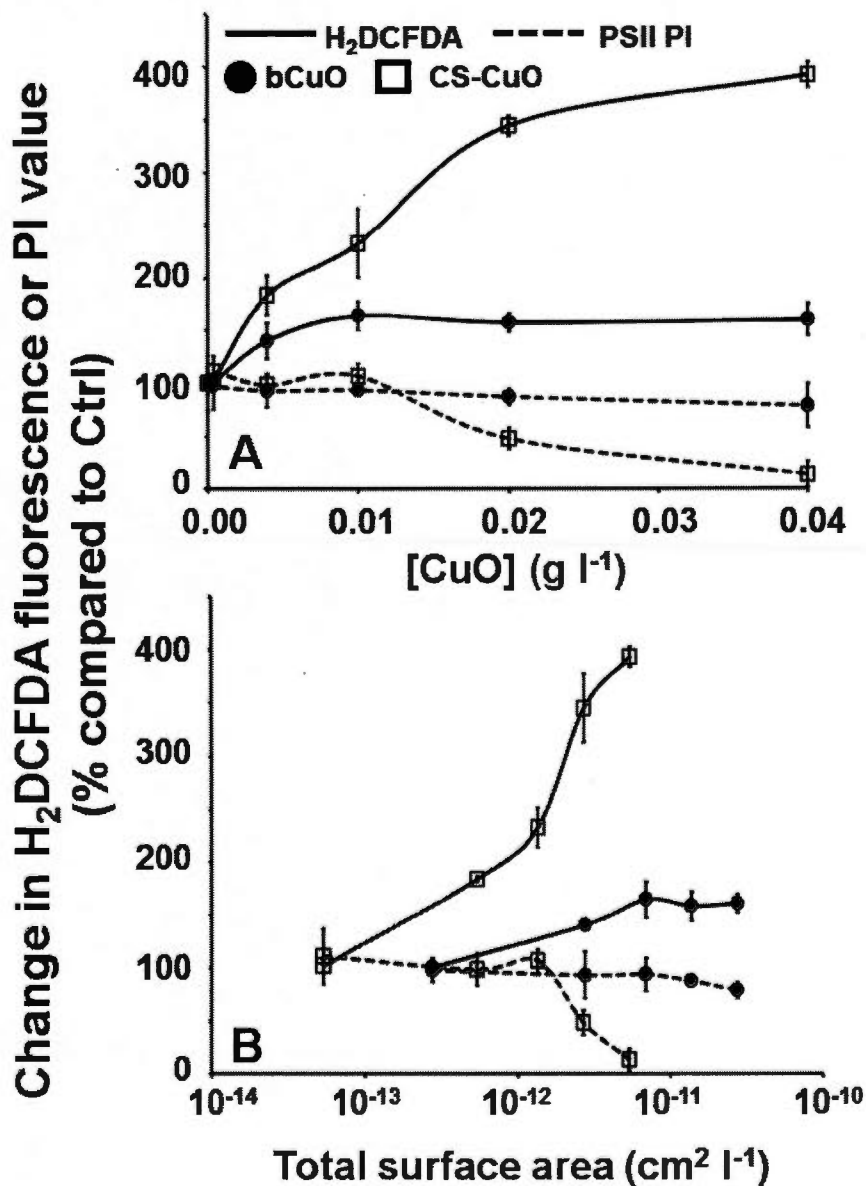


Figure 6.2 Formation of ROS (—) and change in PSII performance index (PI, - - -) in *C. reinhardtii* cells exposed 6 h to bare CuO NPs (●) and polymer-coated CS-CuO NPs (□). NPs effect is compared on the basis of mass concentration (A) and total surface area (B).

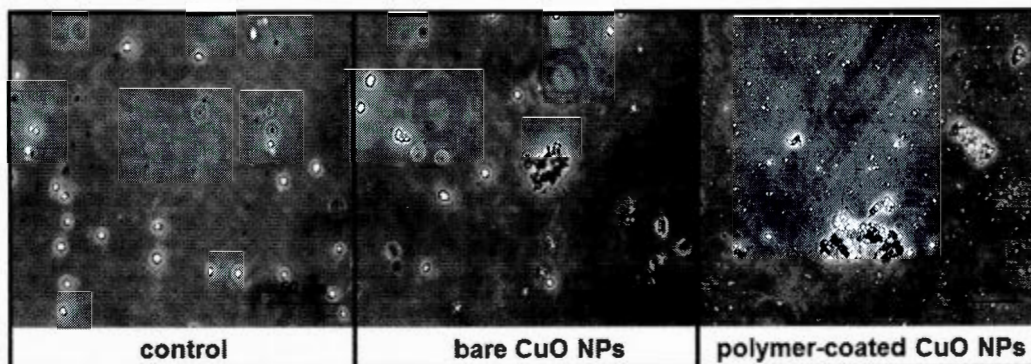


Figure 6.3 Agglomeration of *C. reinhardtii* cell culture for control or after 6 h of treatment to 0.04 g l^{-1} of bare CuO NPs or polymer-coated CuO NPs.

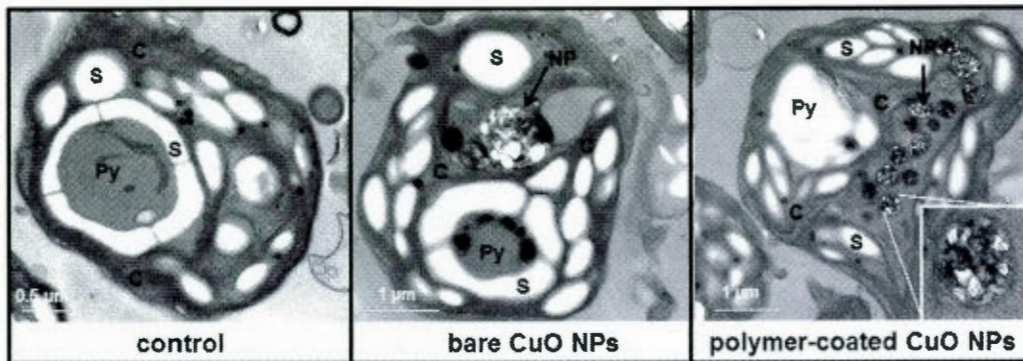


Figure 6.4 TEM images of *C. reinhardtii* cells for control and after 6 h of treatment to 0.04 g l^{-1} of bare CuO NPs or polymer-coated CuO NPs. Cellular structures are identified as the pyrenoid (Pyr), the chloroplast (C), starch granules (S) and CuO NPs agglomerates (NP). Insert (right picture): enlarged view of a NP agglomerates.

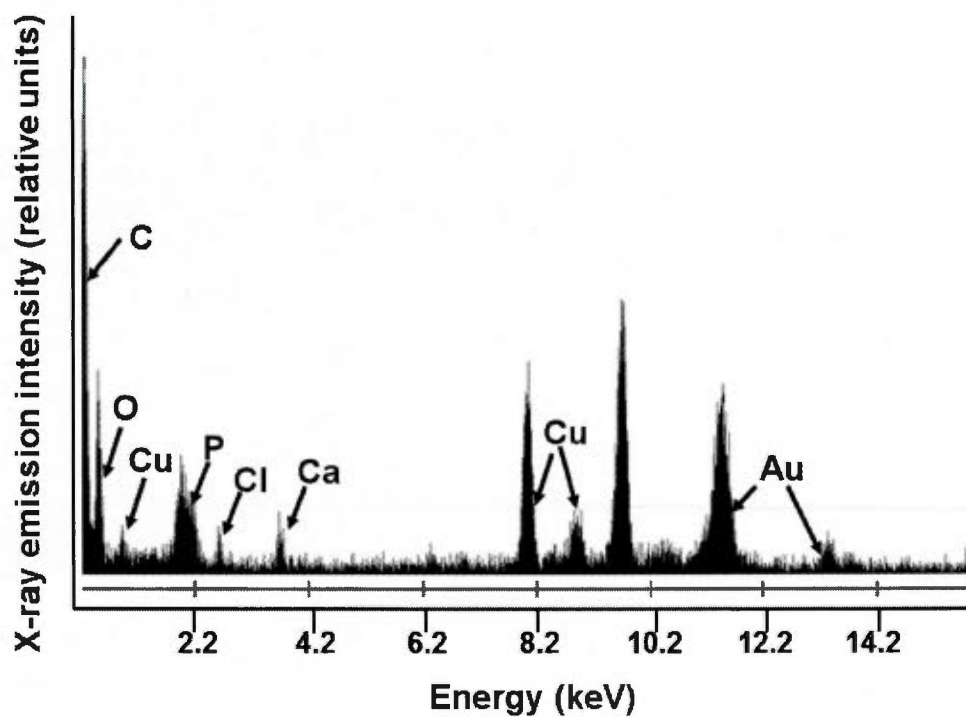


Figure 6.5 Energy-dispersive X-ray spectroscopy of metallic agglomerates found in the cytoplasm of CuO NPs-treated *C. reinhardtii* cells.

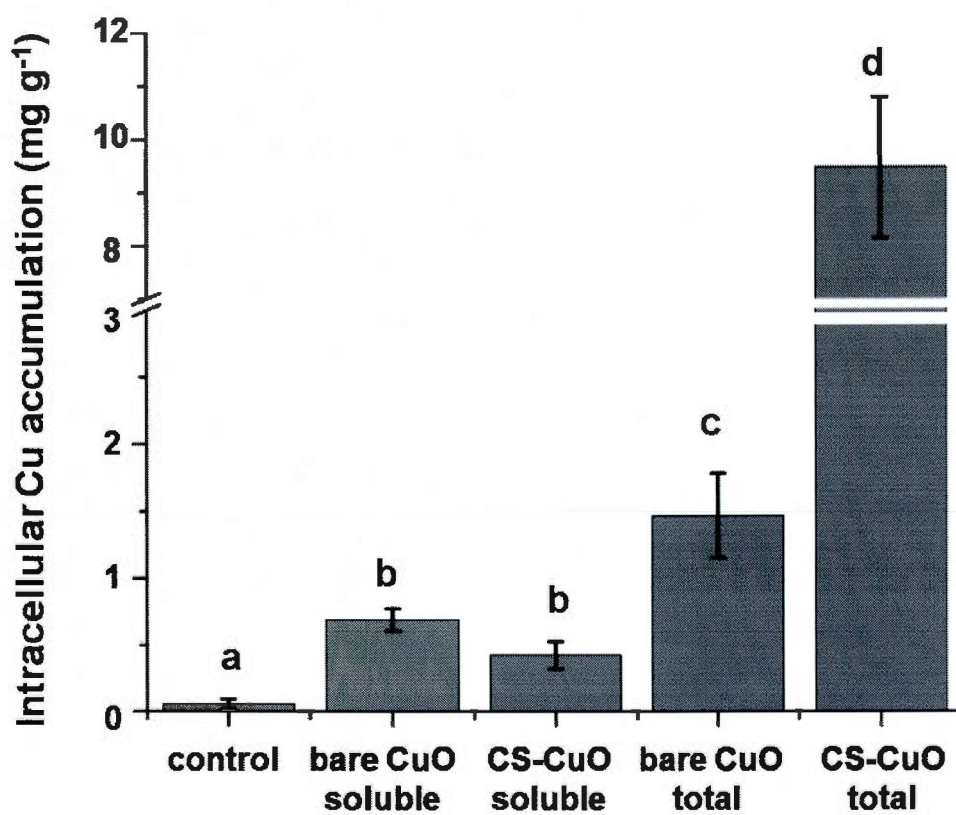


Figure 6.6 Intracellular total copper concentration in *C. reinhardtii* cells for control and after 6 h of treatment to 0.04 g l⁻¹ of bare CuO NPs or polymer-coated CuO NPs. Letters (a,b,c,d) indicate results statistically different from each other.

CHAPITRE VII

MECHANISMS OF BARE AND POLYMER-COATED COPPER OXIDE NANOPARTICLE TOXICITY IN *LEMNA GIBBA*: A COMPARISON WITH IONIC COPPER

François Perreault¹, Radovan Popovic¹ and David Dewez¹

¹Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

* Corresponding author: Université du Québec à Montréal, Case postal 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3P8. Tel.: +1 514 987 3000x3278; fax: +1 514 987 4054. E-mail address: dewez.david@uqam.ca

En préparation, sera soumis à *Journal of Hazardous Materials*

Dans ce chapitre, je suis le principal contributeur aux idées de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats. J'ai écrit la première version du manuscrit et participé à la rédaction finale. R. Popovic et D. Dewez ont participé à la rédaction de la version finale du manuscrit.

7.1 Résumé

Les nanoparticules (NPs) de CuO sont utilisées comme biocide pour être intégrées dans les peintures, les textiles et les plastiques. Leur utilisation peut cependant mener à une contamination des écosystèmes par les NPs de CuO. Les risques toxicologiques des NPs de CuO ne sont pas encore complètement élucidés. La solubilisation des NPs en ions métalliques toxiques est proposée comme le principal mécanisme impliqué dans la réponse toxique aux NPs de CuO, cependant des effets des phénomènes de surface des NPs peuvent aussi participer dans la toxicité des NPs de CuO. Dans cette étude, les effets des NPs de CuO ont été étudiés chez le macrophyte *Lemna gibba* et comparés aux effets du cuivre ionique. L'effet de la modification de la surface des NPs sur leur mécanisme d'action cellulaire a été évalué en utilisant des NPs de CuO encapsulées dans un polymère. La toxicité des NPs de CuO nues ou encapsulées a été évaluée en relation avec l'accumulation de cuivre dans l'organisme et avec l'inhibition du taux de croissance en utilisant différents indicateurs de toxicité basés sur l'activité photosynthétique, l'activité des enzymes estérases et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Nos résultats indiquent que la toxicité des NPs de CuO était principalement causée par la solubilisation des particules en ions toxiques, tandis que l'encapsulation des NPs de CuO dans un polymère augmente la prise en charge des NPs par l'organisme et favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène. La modification de la surface des NPs peut donc modifier les mécanismes d'action des NPs sur la cellule. Pour un développement sécuritaire des nanotechnologies, les nanomatériaux modifiés doivent donc être bien évalués pour déterminer si la modification des nanomatériaux a modifié la nature de leur effet toxique sur l'organisme.

7.2 Abstract

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are applied as biocide agent in many commercial products such as paints, textiles and plastics. Their extensive use may lead to the contamination of freshwater ecosystems and their toxicological risk need to be determined. The solubilisation of CuO NPs into toxic metal ions is proposed as the main component of CuO NPs toxicity, but surface effect from the NP can also be involved in the toxic response. In this report, the effect of CuO NPs was investigated in the aquatic macrophyte *Lemna gibba* and compared with the effect of soluble copper. The effect of surface modification was evaluated by using polymer-coated CuO NPs. Toxicity of both bare and polymer-coated CuO NPs was investigated in relation to copper uptake and growth inhibition using different toxicity indicators based on photosynthetic activity, esterase enzyme activity and reactive oxygen species formation. Our results indicated that toxicity of CuO NPs was mainly induced by the solubilisation of particles into toxic metal ions, while polymer coating of CuO NPs increased NP uptake into cells stimulating reactive oxygen species formation. These results indicated that surface modification affected interactions of NPs with the cellular system. Therefore, modified nanomaterials should be carefully evaluated since surface modification can alter the nature of their toxicological interactions.

Keywords :

Copper oxide nanoparticle, *Lemna gibba*, nanotoxicology, reactive oxygen species, photosynthesis, ionic copper

Abbreviations :

Φ'_{MII} = Photosystem II operational quantum yield; CS-CuO NPs = "Core-Shell" polymer-coated copper oxide nanoparticles; DCF = 2',7'-dichlorofluorescein; FDA = fluorescein diacetate; H₂DCFDA = 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; NPs : nanoparticles; PI = Performance index of Photosystem II; PSII = Photosystem II; ROS = Reactive Oxygen Species.

7.3 Introduction

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are being developed as biocide additives in paints, plastics and textiles (Ren *et al.*, 2009; Dastjerdi and Montazer, 2010). They are also investigated for the development of antibiotics in the biomedical field due to the low probability of resistance development by microorganisms (Muhling *et al.*, 2009; Huh and Kwon, 2011). CuO NPs have been identified to be very toxic nanomaterial (Karlsson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011), however the toxicological risks associated with their use in commercial products are difficult to estimate due to our limited knowledge on their mechanisms of interaction within biological systems. With the rapid rise of nanotechnology in every field of applications and the increasing risk of ecosystem contamination by nano-sized compounds (Klaine *et al.*, 2008; Nowack *et al.*, 2012), there is an urgent need for a better comprehension of CuO NPs toxicity. Such knowledge may favorise a safe development of nanotechnology based on CuO or other types of metal NPs.

Metal nanoparticles (NPs) may lead to deleterious effects by the release of toxic metal ions from NPs, either in the media or in the cell. The contribution of particles solubilisation in metal NPs toxicity is hard to determine and previous studies have lead to several contradictory findings. Using growth rate as a toxicity biomarker, the effect of ZnO and CuO NPs in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* was found to be solely due to particle solubilisation (Franklin *et al.*, 2007; Aruoja *et al.*, 2009). Based on photosynthetic toxicity biomarkers, similar conclusions were found for Ag and CuO NPs in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Navarro *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2009). On the other hand, several studies have indicated that solubilisation of metal NPs into free ions cannot entirely explain their toxicity (Baek and An, 2011; Gong *et al.*, 2011).

NPs have a very high surface to volume ratio which increase the reactivity of NPs compared to larger particles of the same compound. High surface reactivity may lead to toxic effects from the particle itself, such as catalytic and photocatalytic activity to form reactive oxygen species (ROS) or the adsorption of macromolecules to the particle surface (Stark, 2011). Recently, using a whole transcriptome screening approach, it was found that *C. reinhardtii* cellular response to quantum dots (CdTe/CdS NPs) exposure is different than its

cellular response to Cd^{2+} exposure (Domingos *et al.*, 2011). Similar conclusions were found for the inflammatory response of lung cells exposed to ZnO and CuO NPs under both *in vitro* and *in vivo* conditions (Cho *et al.*, 2012). The NP-specific mechanisms involved in the different toxicity of metal NPs compared to their soluble ions are mostly unknown, although the induction of oxidative stress (Xia *et al.*, 2006; Fáhmy and Cormier, 2009), membrane damages (Wang *et al.*, 2011a, 2011b) and decreased cellular exchange with the media due to particle binding to cell membranes (Lin *et al.*, 2009; Perreault *et al.*, 2012a) have been suggested as possible mechanisms of direct NPs interactions with cells.

Due to the role of surface-specific effects in NPs interaction with biological systems, the modification of NPs surface may lead to important modification of its toxicity (Verma and Stellacci, 2010). For example, polymer coating of silver NPs was found to change their toxicity in the ryegrass *Lolium multiflorum* (Cheng *et al.*, 2011), while CuO NPs toxicity was reduced by coating the NPs with gelatin in the MC3T3-E1 mouse osteoblast-like cells (Abe *et al.*, 2012). Recently, we showed that core-shell CuO NPs (CS-CuO NPs), consisting of an inorganic CuO core and an organic polystyrene-polyacrylic acid polymer shell, were more toxic to green alga *C. reinhardtii* than bare CuO NPs (Saison *et al.*, 2010). The higher toxicity of CS-CuO NPs compared to bare CuO NPs was found to be associated with their higher capacity to penetrate inside the cell, underlining the role of intracellular interactions in CuO NPs toxicity (Perreault *et al.*, 2012b). However, the mechanisms of CuO NPs toxicity at the cellular level are not fully elucidated. The accumulation of intracellular NPs can result in higher particles solubilization in the cell (Studer *et al.*, 2010), but direct interactions of NPs within the cellular system may also be involved in the toxicity of CuO NPs.

In this report, the effect of CuO NPs on the aquatic macrophyte *Lemna gibba* was investigated in comparison with ionic copper to determine toxicity differences between nanoparticulate and ionic copper. Polymer-coated CS-CuO NPs were also used to investigate how surface modification may affect toxic interactions of CuO NPs at the cellular level.

7.4 Materials and methods

7.4.1 Biological material

The aquatic plant *Lemna gibba* was obtained from the Canadian Phycological Culture Centre (formerly UTCC #310). Plants were grown in an inorganic culture medium (Frankart *et al.*, 2002) inside a CONVIRON growing chamber (Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada), with a 16h/8h light/dark photoperiod. Illumination was of $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by cool white fluorescent lamps (Sylvania GRO-LUX F40/GS/WS, Drummondville, Canada). Temperature was kept at 24°C.

7.4.2 NP synthesis

Copper sulfate salt ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) while CuO nanopowder was obtained from MTI Corporation (MTI corporation, Richmond, CA, USA). CuO nanopowder was used for the preparation of both bare CuO NPs and polymer-coated CuO NPs. CuO NPs had an average particle diameter of 30-40 nm according to the manufacturers, with purity over 99%. Particle suspensions were prepared in culture media and sonicated before use during 3 min using a sonicator equipped with a microtip (VibraCell 400W, Sonics & Materials Inc, USA). Polymer-coated (poly(styrene-co-butyl acrylate)) CS-CuO NP suspension was prepared according to the protocol described previously by Daigle and Claverie (2008). Thermogravimetric analysis of the CS structure indicated a weight composition of 67% core (CuO) and 33% shell (polymer). Transmission electronic microscopy (TEM) of CS-CuO NPs showed a shell thickness of 14 nm for an average particle size of 81 nm. For detailed characterisation data, see Daigle and Claverie, (2008).

7.4.3 NP treatment

For experiments, only plants of *L. gibba* developed at the stage of three fronds (during exponential growth) were used to increase the reproducibility of the test. In addition, no plants with a Φ_{MII} value lower than 0.7 were considered to ensure that the physiological state of the plants was constant (see section 7.4.7). *L. gibba* plants were exposed during 72 h to bare CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO_4) in microplates as described previously (Perreault *et al.*, 2010). From NP stock, a wide range of concentrations were

selected for each Cu form to obtain a complete growth rate inhibition relationship, sufficient to determine an EC50 value according to guidelines of Sebaugh (2010). For the determination of total Cu concentration in each treatment, 1 ml of treated media was evaporated and then digested overnight in 1 ml of HNO₃ at 120°C. For the experiments, the total Cu content in treated media was: 0.68 ± 0.06 , 1.04 ± 0.12 , 2.08 ± 0.34 and 4.51 ± 0.95 g l⁻¹ for CuO NPs; 0.25 ± 0.02 , 0.42 ± 0.04 , 0.72 ± 0.06 and 1.24 ± 0.12 g l⁻¹ for CS-CuO NPs, and 0.004 ± 0.00004 , 0.008 ± 0.00007 , 0.016 ± 0.00007 and 0.032 ± 0.0002 g l⁻¹ for copper sulfate. For clarity, these concentrations were rounded in figures and in the text.

7.4.4 Characterisation of the NP suspensions in the culture media

Characterisation of the NP suspensions was done in the culture media for a [Cu] of 1.0 g L⁻¹ (see discussion). Particle distribution was determined by dynamic light scattering with a ZetaPlus particle sizer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Zeta potential of particles in the culture media was determined by the electrophoretic mobility method using the ZetaPlus system.

Soluble Cu fraction was determined by atomic absorption spectroscopy analysis of the culture media where the particle fraction was removed by centrifugation, as mentioned by Daigle and Claverie (2008) and Manusadzianas *et al.* (2012). Particle suspensions were centrifuged at 12,000 g for 30 min, the supernatant was collected and samples were further filtered (0.22 µm) before analysis to remove any remaining particulate matter (*e.g.* polymer residue found in the CS-CuO NPs' supernatant).

7.4.5 Esterase enzymatic activity

The activity of the esterase enzymes was evaluated in whole plant using the fluorescein diacetate (FDA) fluorescent probe (Invitrogen Molecular Probe, USA) (Mayer *et al.*, 1997). FDA is a non-polar compound and diffuses passively inside the cell, where it is hydrolyzed by the esterase enzymes into the fluorescent compound fluorescein. FDA stock solution was dissolved in methanol to a final stock solution of 10 mM. The esterase enzymatic activity was evaluated in the same microplate where treatment was performed by

adding 5 μl of FDA solution in each well. Plates were incubated 30 min in the dark and FDA fluorescence emission was measured at 530 nm with a SpectraMax M2 microplate fluorometer (Molecular Devices Inc, CA, USA), using an excitation wavelength of 485 nm. FDA fluorescence emission was expressed in function of the biomass content (dry weight).

7.4.6 ROS formation

The fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) (Invitrogen Molecular Probe, USA) was used as a probe for ROS formation in *L. gibba* plants. H_2DCFDA stock solution (10 mM) was prepared in ethanol in the dark. H_2DCFDA is a non-polar compound and diffuses into algal cells where it is transformed by intracellular esterase and H_2O_2 into the polar, fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). ROS formation was evaluated in the same microplate where treatment was performed by adding 5 μl of H_2DCFDA in each well. Plates were incubated 30 min in the dark and fluorescence emission was measured at 530 nm with a SpectraMax M2 microplate fluorometer (Molecular Devices Inc, CA, USA), using an excitation wavelength of 485 nm. FDA fluorescence emission was normalized to the amount of viable cells, indicated by the esterase activity (FDA emission), as described by Oukarroum *et al.* (2012). A positive control sample using methylviologen was done to verify the assay (data not shown).

7.4.7 Chlorophyll *a* fluorescence measurements

Pulse-Amplitude Modulated (PAM) fluorescence was measured simultaneously in all samples after 24h and 48h for each treatment by using a MAXI-Imaging PAM fluorometer (Walz, Germany). Microplates were placed in the dark for 30 min to oxidize the PSII reaction centers and then Chl *a* fluorescence emission was measured as described by Rohacek and Bartak (1999). Basal fluorescence yield F_0 , originating from Chl antenna complexes of PSII when reaction centers were oxidized, was obtained by using a modulated light with a low intensity ($1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Maximal fluorescence yield F_M was obtained by using a strong saturating light pulse ($5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s duration) which induced a maximal reduction of PSII reaction centers. Steady-state fluorescence emission, F_S was determined at the

equilibrium state of electron transport, when plants were exposed 10 min to continuous actinic light ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The maximal fluorescence yield, F'_M was determined by application of a saturating light pulse ($5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s duration) at the steady state of fluorescence when plants were exposed to continuous actinic light. The maximal PSII quantum yield Φ_{MII} , indicating in dark-adapted state the efficiency of light energy transfer from PSII reaction center to the primary acceptor Q_A , was determined as $\Phi_{MII} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$ (Kitajima and Butler, 1975). The operational quantum yield of PSII Φ'_{MII} , indicating the efficiency of light energy transfer from PSII reaction center to Q_A at the equilibrium state of photosynthetic electron transport chain with all cellular energetic processes (CO_2 fixation), was determined as $\Phi'_{MII} = \frac{F'_M - F_s}{F'_M}$ (Genty *et al.*, 1989).

Primary PSII electron transport processes were evaluated by the measure of the rapid rise of Chl *a* fluorescence according to Strasser *et al.* (2004). Before fluorescence measurements, plants were dark adapted for 30 min. Plants were placed individually in a leaf-clip (Hansatech Ltd, UK) and the rapid rise of Chl *a* fluorescence was measured with a Plant Efficiency Analyser fluorometer (Handy-PEA, Hansatech Ltd, UK) using a 6 s saturating flash ($3500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The fluorescence intensity at $50\mu\text{s}$ was considered to be the O value, noted as $F_{50\mu\text{s}}$, and the variable fluorescence intensities for J and I transients were determined at 2 ($F_{2\text{ms}}$) and 30 ms ($F_{30\text{ms}}$), respectively. The maximum fluorescence yield at P step reached the maximal value of fluorescence intensity (F_M) under saturating illumination. From the rapid rise of Chl *a* fluorescence, the performance index of PSII was calculated according to Strasser *et al.* (2004) as $\text{P.I.} = \frac{\text{RC}}{\text{ABS}} \times \frac{F_M - F_{50\mu\text{s}}}{F_{50\mu\text{s}}} \times \frac{1 - V_J}{V_J}$. In this equation, the number of active PSII reaction centers per Chl unit is calculated as $\frac{\text{RC}}{\text{ABS}} = \left[\frac{F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}}{4} \times (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}}) \right] \times \frac{F_M - F_{50\mu\text{s}}}{F_M}$. V_J is the relative value of variable Chl fluorescence at J transient, indicating the accumulation of reduced PSII primary electron acceptor, Q_A and is determined as the ratio $V_J = \frac{F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}}{F_M - F_{50\mu\text{s}}}$.

7.4.8 Growth rate and copper uptake

After 24 and 48h of treatment, 6 *L. gibba* plants were collected and placed in a dry acid-washed glass tube that was weighted before use. Plants were placed in an oven and dried

at 105°C during 24 h. The tubes were weighted again and the dry tube weight was subtracted to determine the dry plant biomass. Growth rate was calculated as

$$\text{growth rate} = \frac{\ln(\text{dry weight})_b - \ln(\text{dry weight})_a}{\text{time}_b - \text{time}_a}$$

After dry weight measurement, 2 ml of nitric acid and 0.25 ml of hydrogen peroxide were added to the dry plant material and samples were heated at 120°C overnight for digestion. The samples were diluted to 10% nitric acid using nanopure water and total copper content was determined by atomic absorption spectroscopy. Copper concentrations were expressed as mg of copper per mg of dry plant biomass.

7.4.9 Data analysis and statistics

The experiments were done in four replicates for all treatments. Means and standard deviations were estimated for each treatment. Significant differences were determined by using an analysis of variance followed by a Tukey highly significant difference test. Comparison between two treatments was done by using a Student's *t*-test. All statistical analysis were done with the R software (v2.13.0, R Core group, 2011) and *p* values less than 0.05 was considered to be significant.

7.5 Results

7.5.1 Characterisation of the NP suspensions in the media

CuO NPs and CS-CuO NPs properties were characterized in the culture media used for treatment. The two types of NPs originate from the same nanopowder, which has an average NP size of 30-40 nm (according to the manufacturer). In the culture media, bare CuO NPs were found to form agglomerates, and an average hydrodynamic particle diameter of 232 ± 22 nm was found in suspension. On the other hand, polymer coating of CuO NPs increased their colloidal stability in solution and an average hydrodynamic particle of 86 ± 9 nm was found (Table 7.1). The charge at NP surface was not significantly altered by the polymer coating and a zeta potential value of -40 mV was found for both bare and CS-CuO NPs in the media (Table 7.1). In addition, polymer coating of CuO NPs reduced their solubility in the

media. When CuO NPs were suspended in the media, an average of 6.0% of the total copper content in solution represented the copper soluble fraction after 48h of treatment, while only 3.49% of total copper content was present in the soluble fraction when CS-CuO NPs suspension was removed (Table 7.1).

7.5.2 Toxicity to *L. gibba*

When *L. gibba* plants were exposed to both nanoparticulate copper (CuO and CS-CuO NPs) and copper sulfate (CuSO_4) for 48h, morphological changes were observed dependent to the total copper concentration in the media. Copper effect was noticed by the decrease of plants, a reduction of the leaf size and a detachment of the fronds from the main plant (Figure 7.1A). As the concentration of copper increased, a bleaching effect of leaves was observed. Such effect was important for *L. gibba* plants exposed to 0.032 g l^{-1} of CuSO_4 . The decrease in the leaf chlorophyll content was related to the decrease of the leaf photosynthetic surface, which was visualized using chlorophyll fluorescence imaging. The surface showing PSII photochemical activity (indicated by the PSII maximal quantum yield, Φ_{MII}) was lower in copper-treated plants compared to control, and the value of Φ_{MII} was also reduced by copper treatments, indicating a decreased capacity of PSII to convert light energy into photosynthetic electron transport (Figure 7.1B).

By using the change of different indicators of toxicity, we compared the effect of CuO NPs and CS-CuO NPs with copper sulfate (CuSO_4). Growth rate, measured by the change of dry biomass weight, was used as a general and integrative indicator of cellular toxicity, while PSII performance index (P.I.), PSII operational quantum yield (Φ'_{MII}), esterase enzymes activity and ROS formation were used as specific indicators of copper toxic effect. Growth rate of *L. gibba* plants was found to be affected by all forms of copper (Figure 7.2, white bars). Decrease of growth rate after 24h of exposure was significant only for CS-CuO NPs treatments at 0.7 and 1.2 g l^{-1} and for copper sulfate at 0.032 g l^{-1} ($p < 0.05$) while growth rate was increased by CuO NPs treatments. However, the decrease of growth rate was noticed for all treatments after 48h of exposure. Under this condition, EC50 was determined using the growth rate inhibition curve and values were significantly different ($p < 0.05$) when compared between CuO NPs, CS-CuO NPs and CuSO_4 . Particularly, CuO NPs were

significantly less toxic than CS-CuO NPs ($p < 0.05$) and EC50 value was five times higher for CuO NPs compared to CS-CuO NPs (Table 7.1). Also, copper sulfate was found to be the most toxic form of copper, with EC50 of $0.017 \pm 0.05 \text{ g l}^{-1}$ (Table 7.1).

The change of photosynthetic activity, esterases enzymatic activity and ROS formation were compared to the change of plant growth rate to evaluate the most sensitive indicators related to CuO NPs cellular toxic effect. With the exception of esterase activity (Figure 7.2, striped bars), all specific indicators were more sensitive than growth rate inhibition after 24h of treatment. For photosynthetic indicators, the performance index of PSII at dark adapted state, indicated by the change of P.I. value (Figure 7.2, dotted bars), was found to be more sensitive than the operational quantum yield of PSII electron transport at light adapted state (Φ'_{MII} , Figure 7.2, gray bars). After 24h of treatment, a significant decrease of P.I. value was already found at the lowest concentration tested for the three forms of copper (Figure 7.2). Moreover, ROS formation, indicated by the DCF fluorescence emission, was the most sensitive indicator of toxicity for every copper treatments used. After only 24h of treatment, ROS formation changed by 1374, 2344 and 556 % compared with the control value for the lowest concentration of CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate, respectively (Figure 7.3). Especially, ROS formation was maximal for CS-CuO NPs after 48h of treatment to 0.7 g l^{-1} of total Cu (2260 % of control value, Figure 7.2). The order of sensitivity for the specific toxicity indicators was found to be for CuO NPs: ROS formation > P.I. > growth rate > Φ'_{MII} > esterase activity; for CS-CuO NPs: ROS formation > P.I. > growth rate > esterase activity > Φ'_{MII} ; and for copper sulfate: ROS formation > P.I. > Φ'_{MII} > growth rate > esterase activity.

7.5.3 Copper uptake

To determine the relationship between copper uptake and toxicity, the total copper concentration in the plant was evaluated for all treatments. CS-CuO NPs were found to accumulate more inside the plant than the bare CuO NPs. Indeed, when *L. gibba* plants were treated 48h to the same total copper concentration (0.7 g l^{-1}), 0.003 mg of copper per mg of dry biomass was found in plants exposed to CuO NP, while copper concentration was of 0.013 mg per mg of dry biomass in plants exposed to CS-CuO NPs ($p < 0.05$) (Figure 7.4). We

found that copper sulfate was the most bioavailable form of metal. When exposed to total copper concentration of 0.032 g l^{-1} , the accumulation of copper reached 0.03 and 0.05 mg per mg of dry biomass, after 24h and 48h of treatment, respectively (Figure 7.3).

The toxicity of CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate was dependent to the accumulated copper content in plants. Toxic effects was dependent on the accumulated copper content in the plant. After 48h of treatment, the relationship between copper content and toxicity was different for all evaluated toxicity indicators (Figure 7.5). The effect of CuO NPs and copper sulfate on the change of growth rate, P.I. photosynthetic parameter, ROS formation and esterases activity appeared to be similar at high copper content (Figure 7.5). A stimulation of growth rate and P.I. was observed at low CuO NPs concentration which was not found in copper sulfate treatments. However, the relationship between copper accumulation and Φ'_{MII} decrease appeared to be different and the effect on Φ'_{MII} was lower for the same copper content in plants exposed to CuO NPs than for plants exposed to copper sulfate.

For CS-CuO NPs, the relationship between copper accumulation and the change of specific toxicity indicators was significantly different for ROS formation and esterases activity. For those toxicity indicators, the effect of CS-CuO NPs was higher for the same amount of accumulated copper than it was in plants treated to CuO NPs or copper sulfate (Figure 7.5). Growth rate was also lower for the same amount of accumulated copper in plants exposed to CS-CuO NPs when compared with plants exposed to copper sulfate, however the change in growth rate was similar between CS-CuO NPs and CuO NPs for the same accumulated copper concentration. For the change of photosynthetic activity (P.I. and Φ'_{MII} parameters), the effect of CS-CuO NPs and copper sulfate were also similar (Figure 7.5).

7.6 Discussion

CuO NPs toxic effect on plant cellular systems was shown by the alteration of several metabolic pathways as indicated by the change of specific physiological indicators. For CuO NPs treatments, both surface effect of NPs and solubilized free copper ions can be expected to participate in the toxic response of cells. Furthermore, surface modification can alter CuO

NPs toxicity by modifying the nature of the surface effect involved in NPs' interaction with the plant system. In this study, we compared the toxicity of CuO NPs and copper sulfate to identify the cellular responses specific to copper nanoparticulate. CS-CuO NPs were also investigated to determine how surface modification by polymer coating may alter the mechanisms of CuO NPs toxicity. Our results indicated that both CuO NPs and copper sulfate treatments were found to cause the decrease of growth rate, photosynthetic activity, esterase enzyme activity and the induction of ROS formation in *L. gibba* plants. These effects on plant cellular system are in agreement with previous reports concerning the effect of ionic copper (Franklin *et al.*, 2001; Dewez *et al.*, 2005) and CuO NPs (Wang *et al.*, 2011b; Perreault *et al.*, 2012b) on photosynthetic organisms. When CuO NPs and copper sulfate effects are compared on the basis of total bioaccumulated copper, the effect of CuO NPs appeared to involve both effects from the release of soluble copper ions and from surface effect of NPs. Indeed, CuO NPs' inhibitory effect on growth rate, PSII photochemical efficiency (P.I.) and the formation of ROS was similar to the effect of copper sulfate, which may indicate that CuO NPs toxicity are related to the release of copper ions from nanoparticles. On the other hand, concerning the change of PSII photochemical efficiency (Φ'_{MII}) where photosynthetic electron transport is regulated by the whole energetic balance of the cell (Baker, 2008), CuO NPs effect was found to be different than copper sulfate effect. Therefore, we may notice NP-specific toxic effects for CuO NPs in photosynthetic organisms when NPs agglomerate into particles higher than 100 nm.

Polymer coating of CuO NPs significantly altered the interaction of NPs with *L. gibba* plants. CS-CuO NPs were found to be uptake at an higher rate than CuO NPs since four times more copper were found in plants exposed to CS-CuO NPs compared to CuO NPs under the same total copper exposure in the media. These results confirm those found in microalgae, where the higher toxicity of CS-CuO NPs was attributed to the high capacity to be accumulated in algal cells (Perreault *et al.*, 2012b). However, higher uptake of NPs may not be the only factor responsible for the stronger toxicity of CS-CuO NPs compared to CuO NPs. Indeed, our results indicate that CS-CuO NPs toxicity may be related to a higher formation of ROS. When evaluated on the basis of the same amount of copper in the plant, ROS formation was much higher for CS-CuO NPs than for CuO NPs or copper sulfate.

Therefore, polymer coating of CuO NPs increased the induction of ROS formation in *L. gibba* plants.

Surface properties of metal NPs may favorise the formation of ROS by catalytic reduction of oxygen into superoxide anion by the metallic surface or photocatalytic reduction of oxygen by light energy absorbed by NPs (Stark, 2011). Our previous results indicated that the photocatalytic activity of CS-CuO NPs is not higher than for bare CuO NPs (Perreault *et al.*, 2012b). However, the higher concentration of CS-CuO NPs in plant may lead to higher ROS formation by catalytic processes of CS-CuO NPs. Catalytic activity of NPs is also dependent on the specific surface area, which is higher in CS-CuO NPs due to their smaller size and their stability to stay dispersed in solution. Mechanical damage in the cell by NPs may also favorise ROS formation, therefore higher ROS formation by CS-CuO NPs may be due to its high capacity to penetrate the cell. When formed in excess compared to the antioxidant capacity of the cell, ROS can provoke oxidative damages to proteins, lipids, nucleic acids and pigments (Ledford and Niyogi, 2005). It was found in microalgae exposed to silver NPs that ROS formation was closely associated with lipid peroxydation (Oukarroum *et al.*, 2012). Moreover, in photosynthetic organisms, oxidative stress is closely associated with the photoinhibition of PSII and the decrease of photosynthetic efficiency (Nishiyama *et al.*, 2006). Therefore, the induction of oxidative stress may be related to the decrease of growth rate and PSII operational quantum yield (Φ'_{MII}). However, such effect should be further investigated, particularly in plants exposed to CuO NPs, where ROS formation was not significantly different than for plants exposed to copper sulfate.

7.7 Conclusion

In this report, the effect of CuO NPs was investigated in *L. gibba* plant and compared with copper soluble fraction. Toxicity of CuO NPs was found to be mainly driven by the solubilisation of particles into toxic metal ions, although there is evidence of NP-specific interactions within plant cells. Polymer coating of CS-CuO NPs changed the mechanisms of NPs toxicity in *L. gibba* plant and ROS formation was highly induced. These results indicates that surface modification may modify cellular interactions of NPs within the plant cellular system. These findings has significant implications in the evaluation of toxicological risks of

new nanomaterials, especially modified NPs which are improved for colloidal stability or to favorise new properties. Modified nanomaterials should be carefully evaluated to determine if surface modification altered the nature of their toxicological interactions and ensure a safe use of nanomaterials in future applications.

7.8 Acknowledgements

This work was financed by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada) grants awarded to R. Popovic. F. Perreault was supported by a NSERC Ph.D fellowship. The authors thank Pr. Jérôme Claverie (UQAM) for providing the CS-CuO NPs.

7.9 References

- Abe, S., N. Iwadera, T. Narushima, Y. Uchida, M. Uo, T. Akasaka, Y. Yawaka, F. Watari and T. Yonezawa. 2012. "Comparison of Biodistribution and Biocompatibility of Gelatin-Coated Copper Nanoparticles and Naked Copper Oxide Nanoparticles". *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, vol. 10, p. 33-37.
- Aruoja, V., H.-C. Dubourgier, K. Kasemets and A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Sci. Total Environ.*, vol. 407, p. 1461-1468.
- Baek, Y.-W. and Y.-J. An. 2011. "Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*". *Sci. Total Environ.*, vol. 409, p. 1603-1608.
- Cheng, Y., L. Yin, S. Lin, M. Wiesner, E. Bernhardt and J. Liu. 2011. "Toxicity Reduction of Polymer-Stabilized Silver Nanoparticles by Sunlight". *J. Phys. Chem. C.*, vol. 115, p. 4425-4432.
- Cho, W.-S., R. Duffini, C.A. Poland, A. Duschl, G.J. Oostingh, W. Macnee, M. Bradley, I.L. Megson and K. Donaldson. 2012. "Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 22-35.

- Daigle, J.-C. and J.P. Claverie. 2008. "A simple method for forming hybrid core shell nanoparticles suspended in water". *J. Nanomater.*, vol. 2008, p. 1-8, article ID 609184.
- Dastjerdi, R. and M. Montazer. 2010. "A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: Focus on antimicrobial properties". *Colloid. Surfaces B*, vol. 79, p. 5-18.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet and R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 74, p. 150-159.
- Domingos, R.F., D.F. Simon, C. Hauser and K.J. Wilkinson. 2011. "Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticles or the Free Ions?". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 7664-7669.
- Fahmy, B. and S.A. Cormier SA. 2009. "Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells". *Toxicol. in Vitro*, vol. 23, p. 1365-1371.
- Franklin, N.M., M.S. Adams, J.L. Stauber and R.P. Lim. 2001. "Development of an Improved Rapid Enzyme Inhibition Bioassay with Marine and Freshwater Microalgae Using Flow Cytometry". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 40, p. 469-480.
- Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E. and Casey, P.S. 2007. "Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 8484-8490.
- Genty, B., J.M. Briantais and N.R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Gong, N., K. Shao, W. Feng, Z. Lin, C. Liang and Y. Sun. 2011. "Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*". *Chemosphere*, vol. 83, p. 510-516.
- Huh, A.J. and Y.J. Kwon. 2011. "“Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era". *J. Control. Release*, vol. 156, p. 128-45.

- Kitajima, M. and W.L. Butler. 1975. "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 376, p. 105-115.
- Klaine, S.J., P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, T.F. Fernandes, R.D. Handy, D.Y. Lyon, S. Mahendra, M.J. McLaughlin and J.R. Lead. 2008. "Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, p. 1825-1851.
- Ledford, H.K. and K.K. Niyogi. 2005. "Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae". *Plant Cell Environ.*, vol. 28, p. 1037-1045.
- Lin S., P. Bhattacharya, N.C. Rajapakse, D.E. Brune and P.C. Ke. 2009. "Effects of Quantum Dots Adsorption on Algal Photosynthesis". *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, p. 10962-10966.
- Manusadzianas, L., C. Caillet, L. Fachetti, B. Gylte, R. Grigutyte, S. Jurkoniene, R. Karitonas, K. Sadauskas, F. Thomas, R. Vitkus and J.-F. Férard. 2012. "Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 108-114.
- Mayer, P., R. Kuhel and N. Nyholm. 1997. "A simple *in vitro* fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests". *Water Res.*, vol. 31, p. 2525-2531.
- Miao, A.-J., Z. Luo, C.-S. Chen, W.-C. Chin, P.H. Santschi and A. Quigg. 2011. "Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle Toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*". *PLoS ONE*, vol. 5, p. 1-8, article ID e15196.
- Muhling, M., A. Bradford, J.W. Readman, P.J. Somerfield and R.D. Handy. 2009. "An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment". *Mar. Environ. Res.*, vol. 68, p. 278-283.
- Navarro, E., F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra. 2008. "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 8959-8964.
- Nishiyama, Y., S.I. Allakhverdiev and N. Murata. 2006. "A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1757, p. 742-749.

- Nowack, B., J.F. Ranville, S. Diamond, J.A. Gallego-Urrea, C. Metcalfe, J. Rose, N. Horne, A.A. Koelman and S.J. Klaine. 2012. "Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 50-59.
- Oukarroum, A., S. Bras, F. Perreault and R. Popovic. 2012. "Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 78, p. 80-85.
- Peralta-Videa, J.R., L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong and J.L. Gardea-Torresdey. 2011. "Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010". *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, p. 1-15.
- Perreault, F., A. Oukarroum, L. Pirastru, L. Sirois, W.G. Matias and R. Popovic. 2010. "Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll *a* fluorescence imaging in *Lemna gibba*". *J. Botany*, vol. 2010, p. 1-9, article ID 763142.
- Perreault, F., N. Bogdan, M. Morin, J. Claverie and R. Popovic. 2012a. "Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 109-120.
- Perreault, F., A. Oukarroum, S.P. Melegari, W.G. Matias and R. Popovic. 2012b. "Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Chemosphere*, vol. 87, p. 1388-1394.
- Ren, G., D. Hu, E.W.C. Cheng, M.A. Vargas-Reus, P. Reip and R.P. Allaker. 2009. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". *Int. J. Antimicrob. Ag.*, vol. 33, p. 587-590.
- Rohacek, K. and M. Bartak. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynthetica*, vol. 37, p. 339-363.
- Saison, C., F. Perreault, J.-C. Daigle, C. Fortin, J. Claverie, M. Morin and R. Popovic. 2010. "Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, p. 109-114.
- Sebaugh J.L. 2010. "Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation". *Pharm. Stat.*, vol. 10, p. 128-134.

- Stark, W.J. 2011. "Nanoparticles in Biological Systems". *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, p. 1242-1258.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Studer, A.M., L.K. Limbach, L. Van Duc, F. Krumeich, E.K. Athanassiou, L.C. Gerber, H. Moch and W.J. Stark. 2010. "Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles". *Toxicol Lett.*, vol. 197, p. 169-174.
- Verma, A. and F. Stellacci. 2010. "Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions". *Small*, vol. 6, p. 12-21.
- Wang, Y., W.G. Aker, H.-M. Hwang, C.G. Yedjou, H. Yu and P.B. Tchounwou. 2011a. "A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells". *Sci. Total Environ.*, vol. 409, p. 4753-4762.
- Wang, Z. J. Li, J. Zhao and B. Xing. 2011b. "Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 6032-6040.
- Xia, T., M. Kovoichich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sioutas, J.I. Yeh, M.R. Wiesner and A.E. Nel. 2006. "Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm". *Nano Lett.*, vol. 6, p. 1794-1807.

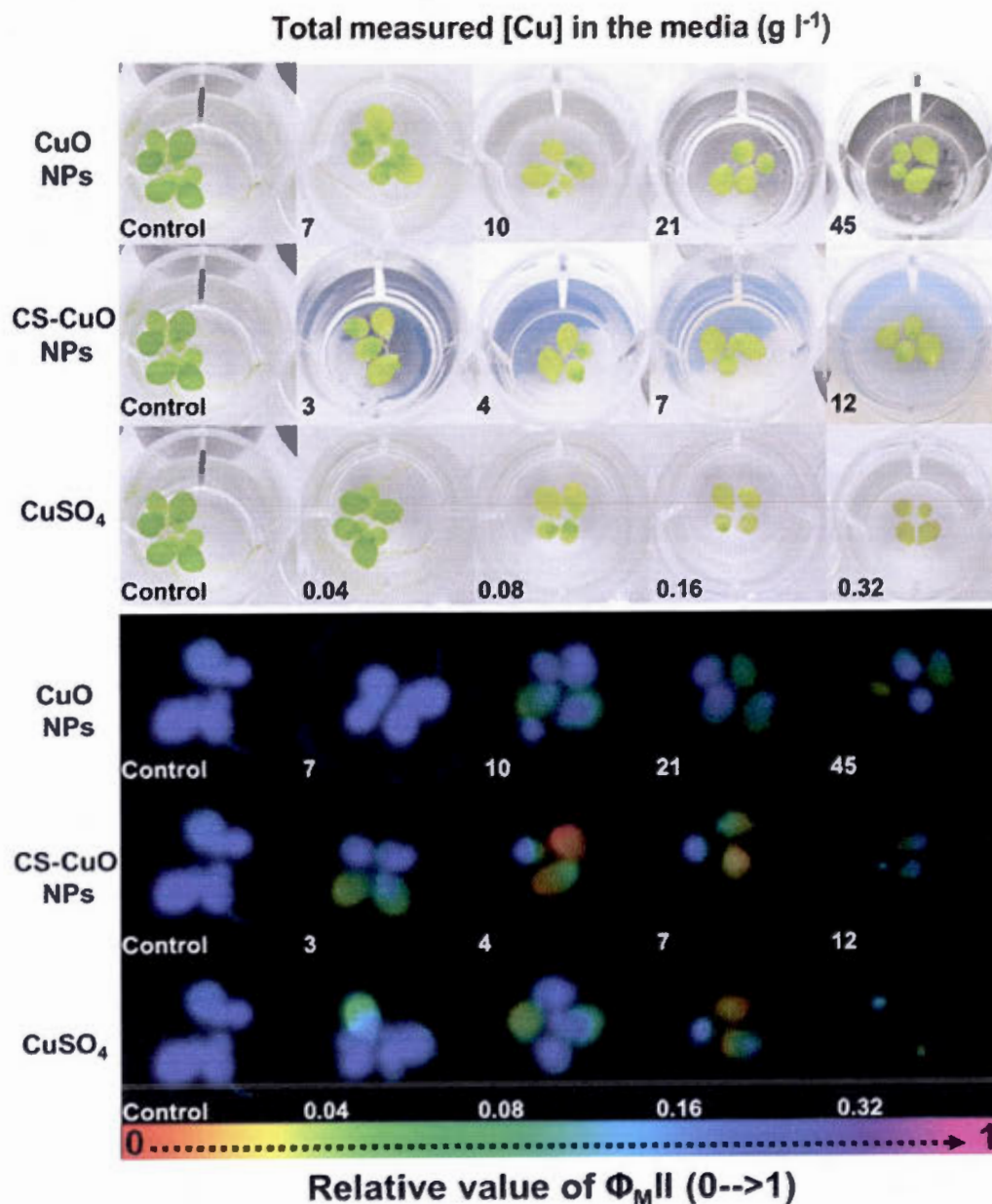


Figure 7.1 Figure 1A. Morphological changes of *L. gibba* plants induced by bare CuO NPs, polymer coated CS-CuO NPs and soluble copper (CuSO₄) after 48h of treatments. Numbers indicate measured amounts of total copper in the media. 1B. Visualization of the maximum PSII quantum yield (Φ_{MII}) in *L. gibba* plants exposed 48h to CuO NPs, CS-CuO NPs and CuSO₄ using chlorophyll fluorescence imaging. Color scale on the bottom of the figure indicates the color associated with the relative value of Φ_{MII} .

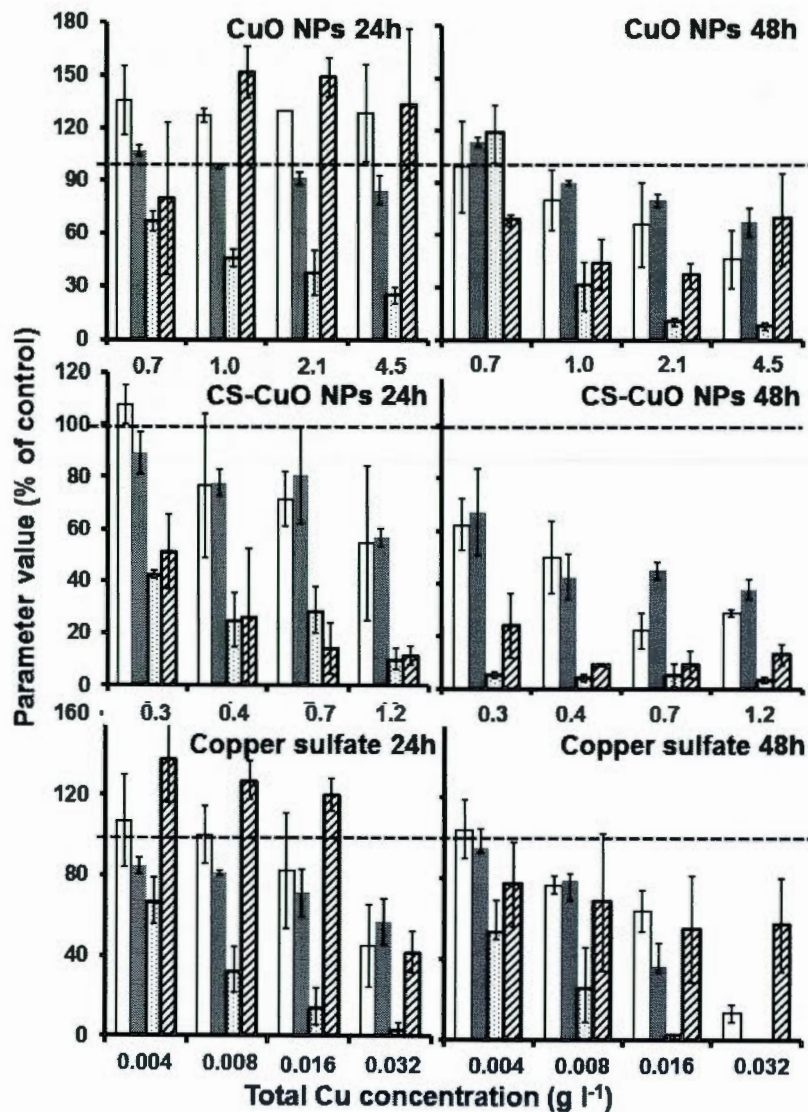


Figure 7.2 Change in growth rate (white bars), operational quantum yield of PSII as Φ'_{MII} (grey bars), PSII performance index as P.I. (dotted bars) and esterase enzymatic activity (slashed bars) for *L. gibba* plants exposed 24 and 48h to CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO_4). The horizontal dashed line indicates the control value (100%). Treatments are compared on the basis of total copper concentration in the media of exposure.

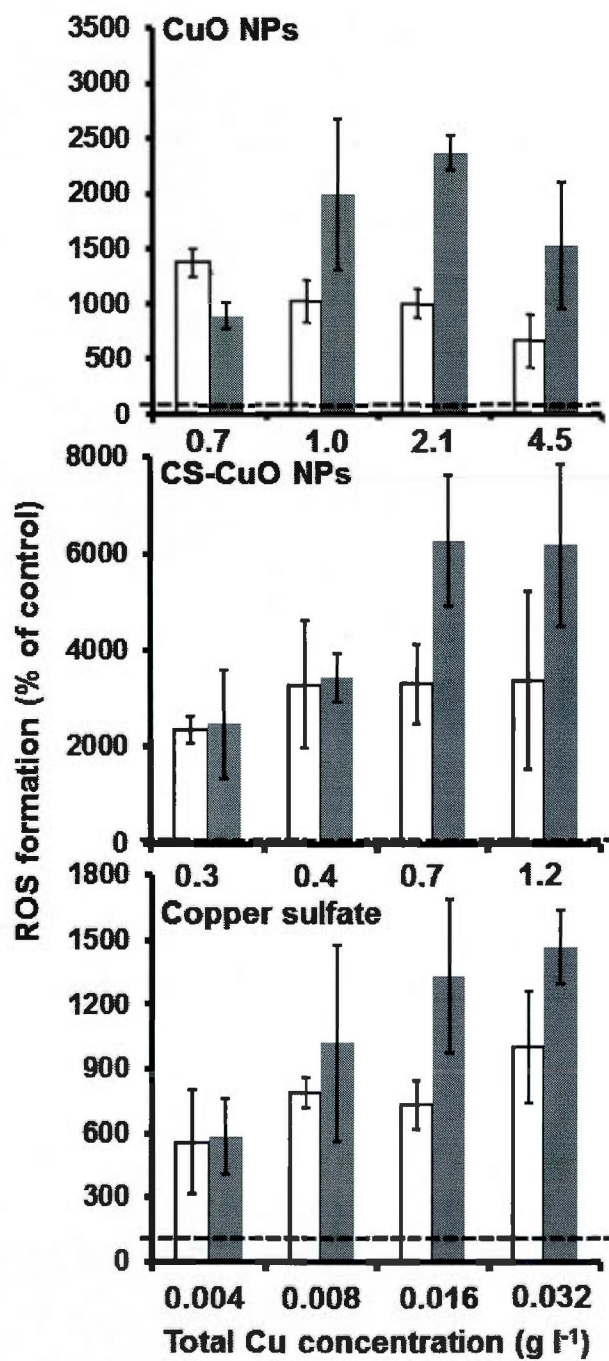


Figure 7.3 Change in ROS formation, indicated by the DCF fluorescence emission, in *L. gibba* plants exposed 24h (white bars) and 48h (grey bars) to CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO₄). The horizontal dashed line indicates the control value (100%). Treatments are compared on the basis of total copper concentration in the media of exposure.

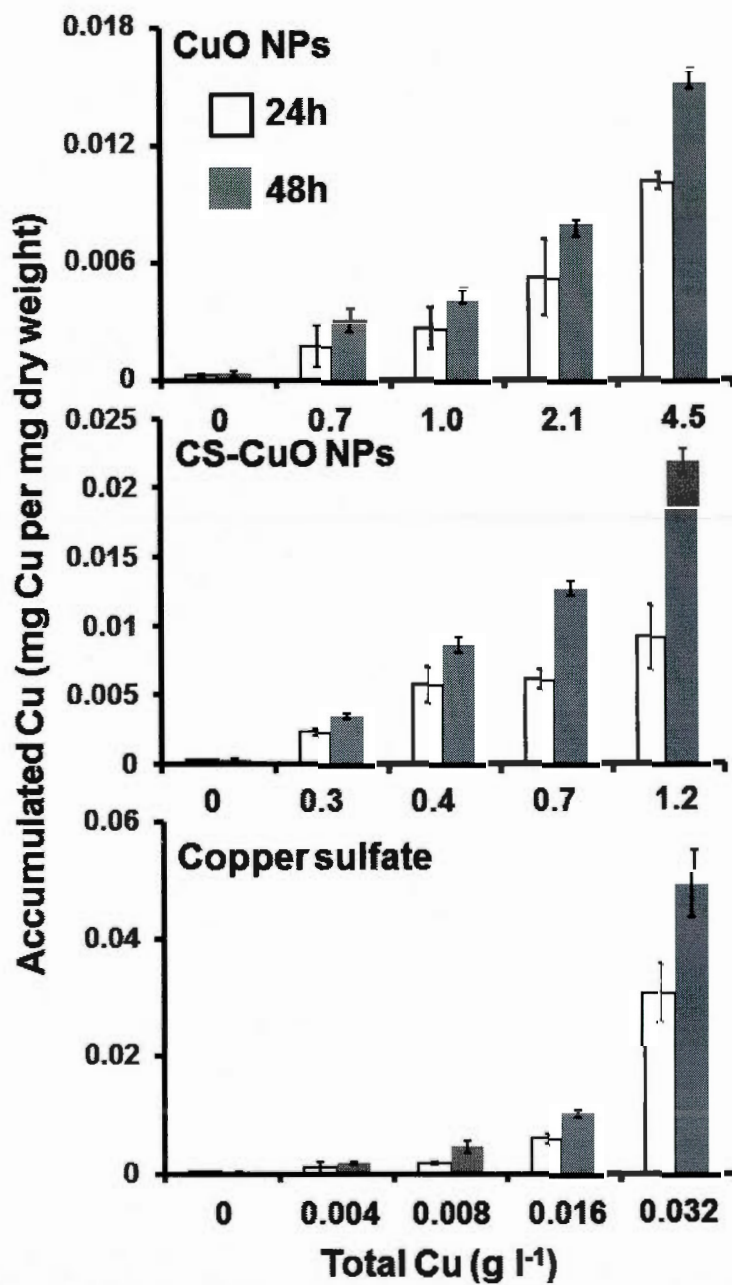


Figure 7.4 Total copper content in *L. gibba* plants (dry weight) exposed 24h (white bars) and 48h (grey bars) to CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate (CuSO_4). Treatments are compared on the basis of total copper concentration in the media of exposure.

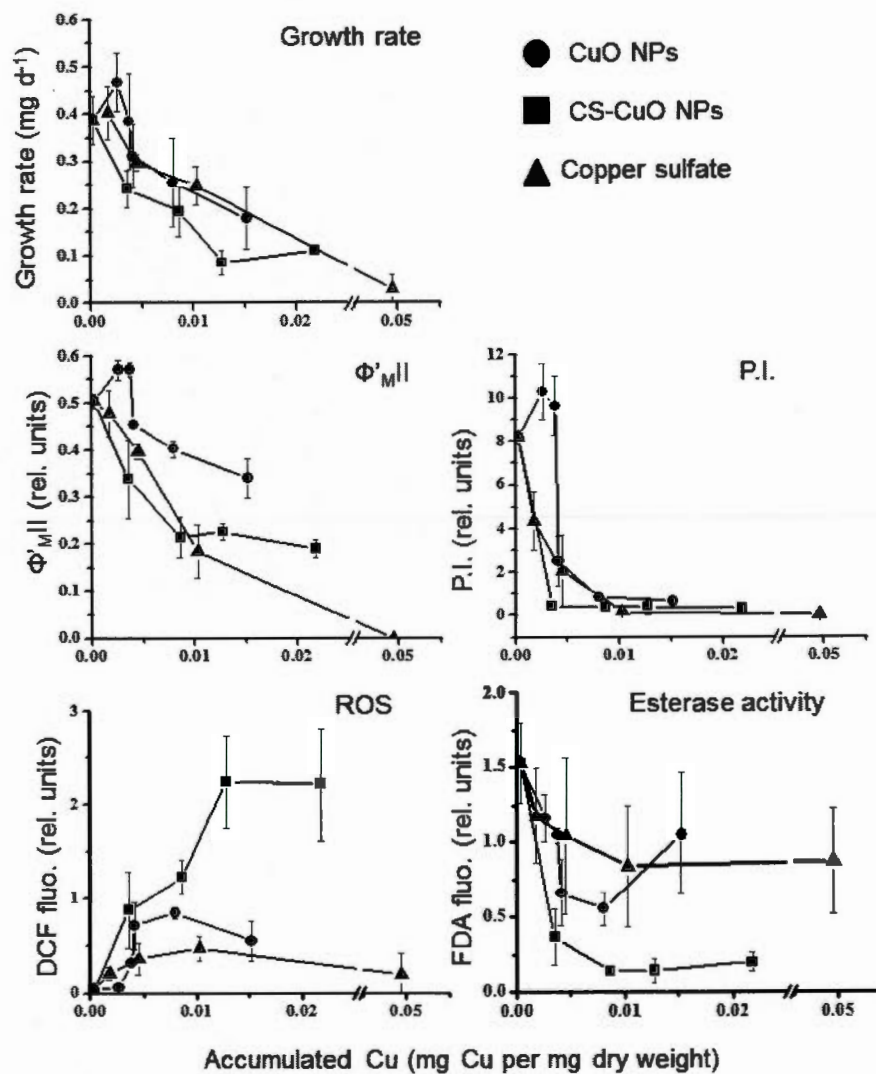


Figure 7.5 Relationship between copper content in the plant and the change of growth rate, operational quantum yield of PSII (Φ'_{MII}), PSII performance index (P.I.), esterase enzymatic activity and the formation of reactive oxygen species (ROS) in *L. gibba* plants exposed 48h to CuO NPs (dots), CS-CuO NPs (squares) and copper sulfate (CuSO_4) (triangles).

Table 7.1 Characterisation of CuO NPs, CS-CuO NPs and copper sulfate in the culture media used for treatments and EC₅₀ value determined using the decrease of growth rate after 48 h of treatments.

Treatment	NP diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Solubility (% of total Cu content)	EC ₅₀ (g l ⁻¹)
CuO NPs	232.8 ± 21.9	-39.7 ± 3.8	6.2	1.60 ± 0.74
CS-CuO NPs	86.1 ± 9.3	-40.5 ± 4.0	3.3	0.31 ± 0.16
Copper sulfate	-	-	100	0.017 ± 0.005

CHAPITRE VIII

TOXICITY OF PAMAM-COATED GOLD NANOPARTICLES IN DIFFERENT UNICELLULAR MODELS

François Perreault^{1,2}, Silvia Pedroso Melegari¹, Cristiane Funghetto Fuzinato¹, Nicoleta Bogdan², Mario Morin², Radovan Popovic² and William Gerson Matias^{1*}

¹Laboratory of Environmental Toxicology - LABTOX –Department of Sanitary and Environment Engineering - Federal University of Santa Catarina – CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC – Brazil.

²Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

*Corresponding author. W.G. Matias. E-mail address: will@ens.ufsc.br. Postal address :Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário - CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC - Brasil - Tel.: +55 48 37217742 - Fax: +55 48 37219823.

Sous presse dans *Environmental Toxicology*, DOI:10.1002/tox.21761.

Contribution dans ce chapitre : J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats. J'ai écrit la première version du manuscrit et participé à la rédaction finale. S.P. Melegari et C.F. Fuzinato ont participé aux mesures des bioessais de toxicité. N. Bogdan a contribué par la synthèse des nanoparticules. M. Morin, R. Popovic et W.G. Matias ont participé à la rédaction de la version finale du manuscrit.

8.1 Résumé

Les dendrimères de type poly(amidoamine) (PAMAM) sont utilisés pour plusieurs applications dans le domaine pharmaceutique. Les risques toxicologiques des composés à base de PAMAM ne sont pas encore complètement élucidés, malgré des évidences de leurs effets délétères sur les membranes biologiques. Dans cette étude, la toxicité des nanoparticules d'or stabilisées par des PAMAM de génération 0 (AuG0 NPs) a été évaluée pour quatre modèles biologiques différents afin de déterminer comment différents systèmes cellulaires sont affectés par les NPs enrobées de PAMAM. La toxicité a été évaluée chez deux lignées cellulaires de mammifères, Neuro 2A et Vero, chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et la bactérie *Vibrio fischeri*. Les traitements aux AuG0 NPs réduisent l'activité métabolique chez les cellules algales et bactériennes, mesurée par l'activité des enzymes estérases (*C. reinhardtii*) et l'émission de luminescence (*V. fischeri*). La valeur EC₅₀ déterminée après 30 minutes de traitement était similaire pour les deux organismes, avec 0.114 et 0.167 mg ml⁻¹ pour *C. reinhardtii* et *V. fischeri*, respectivement. Toutefois, les AuG0 NPs n'induisent aucun changement de l'activité mitochondriale chez les cellules de mammifères après 24 h d'exposition à des concentrations jusqu'à 0.4 mg ml⁻¹. Le changement du spectre d'absorption des AuG0 NPs dans le milieu de culture des cellules de mammifères indique une altération des propriétés des NPs qui peut contribuer à la faible toxicité des AuG0 NPs chez les cellules de mammifères. Pour un développement sécuritaire des nanomatériaux à base de PAMAM, la différence de sensibilité entre les cellules de mammifères et les microorganismes, ainsi que la modulation de la toxicité des NPs par les propriétés du milieu, doivent être prise en considération lors de la création de NPs de PAMAM pour des applications qui peuvent résulter en leur rejet dans l'environnement.

8.2 Abstract

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are used for many pharmaceutical applications however the toxicological risks of several PAMAM-based compounds are still not fully evaluated, despite evidences of PAMAM deleterious effects on biological membranes, leading to toxicity. In this report, we investigated the toxicity of generation 0 PAMAM-coated gold nanoparticles (AuG0 NPs) in four different models to determine how different cellular systems are affected by PAMAM-coated NPs. Toxicity was evaluated in two mammalian cell lines, Neuro 2A and Vero, in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the bacteria *Vibrio fischeri*. AuG0 NPs treatments reduced cell metabolic activity in algal and bacterial cells, measured by esterase enzymatic activity (*C. reinhardtii*) and luminescence emission (*V. fischeri*). EC₅₀ value after 30 min of treatment was similar in both organisms, with 0.114 and 0.167 mg ml⁻¹ for *C. reinhardtii* and *V. fischeri*, respectively. On the other hand, AuG0 NPs induced no change of mitochondrial activity in mammalian cells after 24 h of treatment to up to 0.4 mg ml⁻¹ AuG0 NPs. Change in the absorption spectra of AuG0 NPs in the mammalian cell culture media may indicate an alteration of NPs properties that contributed to the low toxicity of AuG0 NPs in mammalian cells. For a safe development of PAMAM-based nanomaterials, the difference of sensitivity between mammalian and microbial cells, as well as the modulation of NPs toxicity by medium properties, should be taken into account when designing PAMAM NPs for applications that may lead to their introduction in the environment.

Keywords:

Polyamidoamine dendrimer; ecotoxicology; Nanotoxicology; gold nanoparticles; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Vibrio fischeri*; mammalian cell lines

Abbreviations:

AuG0 NPs: G0 polyamidoamine dendrimers-coated gold nanoparticles; FDA: Fluorescein diacetate; FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; N2A: Neuro-2A mouse neuroblastoma cells; NP:

nanoparticle; PAMAM: polyamidoamine; RPMI: RPMI-1640 culture media; TEM: transmission electronic microscopy; Vero: monkey kidney epithelial cells.

8.3 Introduction

In the past decade, the development of new nanomaterials has increased exponentially (Schmid and Riediker, 2008; Peralta-Videa *et al.*, 2011). Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer is a type of nanoscale organic structure that has attracted a lot of attention because of its interesting applications in the biomedical and pharmaceutical fields (Biricova and Laznickova, 2009). The hyper-branched structure of dendrimers increases their affinity for biological interactions (Cloninger, 2002) and PAMAM dendrimers were found to be interesting candidates for nonviral gene transfer (Eichman *et al.*, 2000), drug delivery (Patri *et al.*, 2002), antimicrobial agents (Calabretta *et al.*, 2007) or contrast agents for magnetic resonance imaging (Venditto *et al.*, 2005). Moreover, nanoparticle-dendrimer composites have been engineered in order to combine the advantages of nanoscale particles with PAMAM reactivity and ability to cross biological membranes. For example, PAMAM-coated gold NPs have recently been developed for cancer therapy since gold NPs can efficiently convert light into heat via surface plasmon resonance, a property with potential applications in cancer photothermal therapy (Umeda *et al.*, 2010). However, the growing applications of PAMAM-based nanocomposites increase the risk of human and environmental exposure, making important the evaluation of their toxicological risks.

PAMAM toxicity was observed in a wide variety of organisms (for a review, see Suarez *et al.*, 2011). The most common mechanisms by which PAMAM dendrimers are thought to induce toxicity are membrane disruption (Leroueil *et al.*, 2007) and formation of reactive oxygen species (Naha *et al.*, 2010; Petit *et al.*, in press). These effects are dependent on the different physicochemical properties of dendrimers, such as generation size (number of repeated branching cycles), number of terminal group and surface charge (Suarez *et al.*, 2011). It can also be expected that dendrimer toxicity may change depending on the biological model considered, since the response to toxicants effects can differ widely between different types of organisms (Tsui and Chu, 2003; Rajapaksha *et al.*, 2004; Perreault *et al.*, 2011). For nanomaterials, it was shown that the mechanisms of NPs interactions with cells are highly influenced by the cellular properties of the organism. For example, it was recently

found that plant and animal cells show a different response to carbon NPs effects due to the presence of the rigid cellulosic cell wall of plant cells which, by its thickness and hydrophobic nature, favours the uptake of smaller and more hydrophilic NPs (Chen *et al.*, 2010). In microalgae, the toxicity of gold-glycodendrimer nanocomposites was found to be dependent on their binding to receptors located on the cell wall, since no toxicity was found in a cell wall-deficient strain even though NPs accumulated more in the cytoplasm in the absence of cell wall (Perreault *et al.*, in press). Similar results were found in bacteria, where *Escherichia coli* was more sensitive to the direct effects of CeO₂ NPs than *Synechocystis* due to the presence of exopolymeric substances trapping NPs on cyanobacterial cells (Zeyons *et al.*, 2009). Therefore, when evaluating the toxicological risk of new nanomaterials, several biological models should be used to account for the cell-specific differences in toxicity.

In this report, we investigated the toxicity of generation 0 PAMAM-coated gold nanoparticles (AuG0 NPs) in four different biological models to determine how different cellular systems may respond to the effects of PAMAM-coated NPs. The change of AuG0 NP properties in the different culture media was investigated to determine the effect of the media on the toxicity observed in different organisms.

8.4 Materials and methods

8.4.1 Cell cultures

The Neuro-2A (N2A) mouse neuroblastoma cells were obtained from the National Museum of Nature, Paris, France (European Collection of Cell Cultures cat. no. 89121404). Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, and 50 U ml^{-1} penicillin. The Vero cells (Adolpho Lutz Institute, Brazil), monkey epithelial kidney cells, were grown in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, and 50 U ml^{-1} penicillin. Both cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. For treatments, cells were exposed in RPMI 1640 medium without supplements (Matias and Creppy, 1998; Humpage *et al.*, 2007).

The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (wild type CC-125) was obtained from the Chlamydomonas Genetic Center (Duke University, USA). Cells were cultivated in batch culture of 1 l high salt growth medium (HSM) according to Harris (1989), under continuous illumination ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W) at $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$. The algal culture was permanently aerated to obtain constant CO_2 concentration in the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, an aliquot having a cell density of 1.5×10^6 cells ml^{-1} was used for treatments. Algal culture cell densities were determined using a Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc., USA).

The luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (strain NRRL B-11177, Microtox Acute Reagent) was obtained from Strategic Diagnostic Inc (now SDIX, DE, USA). Bacterial cells in a lyophilized form were resuspended in nanopure water and used immediately. Reconstituted cells were tested using zinc sulfate (10 mg l^{-1}) as a reference toxicant to verify their good sensitivity. For assays, $10 \mu\text{l}$ of bacteria suspension, $200 \mu\text{l}$ of a solution composed of 20 g l^{-1} NaCl, 2.035 g l^{-1} $\text{MgCl}_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g l^{-1} KCl, and $800 \mu\text{l}$ of the AuG0 NP suspension supplemented with 20 g l^{-1} NaCl, were used, according to the ISO 11348-3 standard protocol.

8.4.2 NPs synthesis

PAMAM coated gold NPs were synthesized by the method described in Figure 8.1 according to Bogdan (2009). Amine-terminated G0 PAMAM dendrimers with a disulfide core were first prepared according to Tomalia *et al.* (2003) then adsorbed on the gold NPs using the Brust method (Brust *et al.*, 1994). In this step, G0 PAMAM dendrimers are added to HAuCl_4 solution in methanol, in a molar ratio of 1:2 (Au^{3+} :dendrimer). After 30 min, NaBH_4 was added in a molar ratio 1:15 between Au^{3+} and NaBH_4 . During this reaction, the color of the solution changed from orange to brown. After 2 h, acetone was added to precipitate the PAMAM-coated gold NPs (AuG0) and the solution was filtered on a $0.45 \mu\text{m}$ nylon filter. AuG0 NPs were then purified by rinsing extensively with a methanol:acetone mixture (ratio of 1:5) and then dried under vacuum. Using trinitrobenzenesulfonic acid as the selective amine titrant (Hermanson, 1996), the concentration of amine-terminated PAMAM adsorbed on gold NPs was found to be $2.30 \pm 0.6 \mu\text{moles of NH}_2 / \text{mg of gold NPs}$.

8.4.3 NP characterization in the media

AuG0 NPs were characterized using transmission electronic microscopy (TEM), UV-VIS spectrophotometry and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for AuG0 NP suspensions prepared in each of the three different culture media (N2A/Vero, *V. fischeri* and *C. reinhardtii* assays). To prepare the sample for TEM analysis, a drop of NPs suspension (1 mg ml^{-1}) was placed on a formvar-coated copper grid and, after 1 min, the excess of liquid was removed with a Whatman filter paper. Samples were visualized using a Philips CM200 200 kV TEM microscope and pictures taken with a AMT 2k x 2k CCD camera. For UV-VIS spectrophotometrical analysis, a suspension of 0.1 mg ml^{-1} AuG0 NPs was prepared in each culture media and spectra were measured with a Lambda 40 UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer), using the reference culture medium as a blank. For FTIR analysis, AuG0 NPs suspensions of 20 mg ml^{-1} were prepared in the different culture media. A drop of NPs suspension was placed on the diamond plate and Infrared transmission spectra were measured on a Nicolet 6700 FTIR (Thermo Scientific) equipped with a Smart iTR Attenuated Total Reflectance accessory. For each measurement, 32 spectra were averaged and the background signal (culture medium only) was subtracted from the AuG0 NPs spectra.

8.4.4 Toxicity evaluation

Cell viability was determined for N2A and Vero cells using the mitochondrial activity assay with [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT). The cells ($10^5 \text{ cells ml}^{-1}$) were seeded in 96-well microplates with 5% CO_2 at 37°C for 24 h. The medium was then removed and the cells were exposed to different concentrations of AuG0 NPs (0.0125 , 0.025 , 0.05 , 0.1 , 0.2 and 0.4 mg ml^{-1}) in RPMI medium without supplements. After 24 h of NP treatments, the media was discarded, $200 \mu\text{l}$ of MTT solution (0.5 mg ml^{-1} prepared in RPMI-1640) was added and cells were then re-incubated for 2 h. After incubation, the MTT solution was discarded and $200 \mu\text{l}$ of dimethyl sulfoxide was added to dissolve the formazan crystals formed by MTT reduction inside the cell. The absorbance at 560 nm for each well was measured in the plate by using a microplate reader

(BioTek ELx800, BioTek Instruments). This test was performed in 4 replicates and cyclophosphamide (1 mg l^{-1}) was used as a positive control to validate the assay.

Cell viability was evaluated in *C. reinhardtii* by using the esterase enzymes activity with the fluorescein diacetate (FDA) fluorescent probe (Invitrogen Molecular Probe, USA) (Mayer *et al.*, 1997). FDA was dissolved in methanol to a final stock solution of 100 mM, prepared in the dark. Algal cultures ($1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$) were exposed to different AuG0 NPs concentrations (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg ml^{-1}) in a 96-well microplate in a 200 μl volume. For esterase activity measurements, a final concentration of 2 mM FDA was added and cells were incubated for 30 min in the dark before measurement. FDA fluorescence emission was measured at 530 nm with an excitation at 485 nm, with a SpectraMax M2 microplate fluorometer (Molecular Devices Inc, CA, USA). This test was done in 4 replicates and copper sulfate (10 mM) was used as a positive control to validate the assay.

Toxicity was evaluated in the *V. fischeri* cells by using the bioluminescence inhibition assay according to the ISO 11348-3 standard protocol on a Microtox Model 500 analyzer (Strategic Diagnostic Inc, DE, USA). Cells were incubated for 30 min to AuG0 NPs (0.03125, 0.04165, 0.0625, 0.08335, 0.125, 0.16665, 0.25, 0.4 mg ml^{-1}) for toxicity evaluation and data analyzed with the MicrotoxOmni software. This test was performed in 4 replicates and zinc sulfate (10 mg l^{-1}) was used as a positive control to validate the assay.

Toxicity of AuG0 NPs was evaluated for the *C. reinhardtii* assay using HSM culture medium supplemented with 10% RPMI medium to evaluate the effect of the culture media on AuG0 NP toxicity. This assay was preferred over the *V. fischeri* assay because the freshwater medium of *C. reinhardtii* is closer to the RPMI medium in terms of salinity and osmolarity than the saltwater medium of *V. fischeri*. Even so, a concentration higher than 10% of RPMI in the *C. reinhardtii* culture had deleterious effects on the algal cell viability (data not shown), therefore only 10% of RPMI was used for this test. Esterase enzymes activity was evaluated by the FDA method after 30 min and 24 h of treatment, as already described. This test was performed in 4 replicates.

8.4.5 Data analysis and statistics

The half maximal effective concentration (EC_{50}) and the concentration giving an inhibition of 10% of the maximal response (EC_{10}) were obtained by fitting the toxicity data with a 4 parameter sigmoidal equation (Hill-slope model) using the GraphPad Prism 5 software. EC values were used only when at least two experimental data points were found on both the upper and lower bend of the EC_{50} value, as recommended by Sebaugh (2010). The No Observed Effect Concentration (NOEC) was determined as the highest experimental concentration inducing no statistical difference compared to the control, using an Analysis of Variance (ANOVA) followed by a Tukey Honestly Significant Difference test. Experimental results were compared using an ANOVA followed by a Tukeys' test. EC_{10} and EC_{50} values were analyzed by comparing non-linear regression parameters using a paired Student's t-test. Results were considered significant for $p < 0.05$.

8.5 Results

8.5.1 Characterization of AuG0 NPs in the different culture media

AuG0 NPs suspensions were characterized in the different culture media used for N2A and Vero cells, for *C. reinhardtii* and for *V. fischeri* (see section 8.4.1 for more details). TEM microscopy indicated that NPs had a spherical shape and a size distribution of 2.03 ± 0.55 nm (Figure 8.2). In addition, NPs dispersion in the three different media was homogeneous and no agglomeration was observed. NP size distribution was not found to differ significantly in the different media used for treatment ($p=0.86$).

FTIR spectroscopy was used to confirm the presence of the dendrimer functionalization in the three media. In all three AuG0 NP suspensions, the presence of the dendrimer was identified by the amide I (1630 cm^{-1}) and II (1560 cm^{-1}) bands (Figure 8.3). These bands, attributed to the bending vibration of the N-H bonds and the stretching of the C=O bonds of amides, respectively, are commonly found on PAMAM FTIR spectra (Wang *et al.*, 2005; Bogdan, 2009). The change of the surface properties of AuG0 NPs in the different media was also investigated by UV-VIS spectroscopy. AuG0 NPs suspended in *C. reinhardtii* and *V. fischeri* media do not have the plasmon absorption band around 520 nm usually found for gold NPs (Figure 8.4). This suggests that AuG0 NPs have a diameter of 2

nm or less, as found in Hostetler *et al.* (1998), and is in agreement with the small NP size obtained by TEM microscopy. For AuG0 NPs suspended in the RPMI medium used for N2A and Vero cells, a large absorption peak around 550 nm was found (Figure 8.4).

8.5.2 Toxicity of AuG0 NPs in different unicellular models

In both N2A and Vero cells, 24h exposition to 0.006 to 0.4 mg ml⁻¹ of AuG0 NPs did not result in any significant decrease of mitochondrial activity compared to control (Figure 8.5). The NOEC value for N2A and Vero cells was found to be the highest concentration tested, 0.4 mg ml⁻¹ ($p=0.99$ for both assay) (Table 8.1). On the other hand, AuG0 NPs treatments induced a decrease in cell metabolic activity, measured by the esterase enzymatic activity in *C. reinhardtii* and by bioluminescence emission in *V. fischeri* (Figure 8.5). This decrease reached 54% and 32% of control value, for *C. reinhardtii* and *V. fischeri* respectively, when exposed to 0.4 mg ml⁻¹ AuG0 NPs for 30 min ($p<0.001$ for both assay). For *V. fischeri*, the NOEC concentration could not be obtained since the lowest concentration used, 0.03125 mg ml⁻¹, induced a significant effect compared to control ($p=0.001$). For the *C. reinhardtii* assay, the NOEC concentration was found to be 0.05 mg ml⁻¹ ($p=0.057$). From non-linear modeling of the toxicity data, EC₁₀ and EC₅₀ results were also calculated for the two microbial assays (see Table 8.1). It should be noted that EC₁₀ and EC₅₀ concentrations were not significantly different between *V. fischeri* and *C. reinhardtii*, indicating similar level of sensitivity towards AuG0 NP ($p=0.44$ and 0.76). Exposition was also done for 24 h of treatment in the *C. reinhardtii* assay, to compare with the N2A and Vero MTT assay. Under those conditions, inhibitory effect on the *C. reinhardtii* assay was significantly increased at low AuG0 NPs concentrations only (Figure 8.5). EC₁₀ and EC₅₀ values after 24 h were not significantly different from those obtained after 30 min of treatment in *C. reinhardtii*.

8.5.3 Effect of the medium on AuG0 NPs toxicity

AuG0 NPs suspension was prepared in *C. reinhardtii* medium supplemented with 10% of RPMI medium. Under those conditions, similar interactions between NPs and medium were found by UV-VIS analysis of the absorption spectra of AuG0 NPs, with the

appearance of an absorption peak at 550 nm (Figure 8.6A). The absorption increase at 550 nm was found to be less than in full RPMI medium due to the presence of only 10% of RPMI solution in the NP suspension. When the effect of AuG0 NPs prepared only in the *C. reinhardtii* medium (Figure 8.6B, dashed line) is compared to the effects of AuG0 NPs prepared in 10% RPMI, it was found that AuG0 NPs in 10% RPMI were less toxic to *C. reinhardtii* cells (Figure 8.6B, full line). This difference of toxicity was observed at both 30 min and 24 h of treatment, with the difference after 24 h being more important than after 30 min. After 24 h of exposition, most of the treatments made in 10% RPMI were significantly lower than the same treatment realized in absence of RPMI ($p < 0.05$, indicated by stars in Figure 8.6B). However, toxicity thresholds obtained for AuG0 NPs treatments in 10% RPMI were slightly affected compared to treatments. Indeed, EC_{10} and EC_{50} were not significantly changed and NOEC concentration was increased only for the 24 h treatment (see Table 8.1).

8.6 Discussion

Nanomaterials interactions with biological systems can be different according to the cellular model considered (Chen *et al.*, 2010; Zeyons *et al.*, 2009). Indeed, for the four different models used in this study, AuG0 NPs effect was found to be very different. Almost no toxicity was observed mammalian cells while algal and bacterial cells were more sensitive to AuG0 NPs. *C. reinhardtii* and *V. fischeri* appeared to be equally sensitive to AuG0 NPs effect and no significant differences were found in their EC_{10} or EC_{50} values. In these two biological models, AuG0 NPs effect was found to be rapid and a 30 min treatment was sufficient to induce toxicity. Such fast effect is in agreement with an effect of PAMAM dendrimers on biological membranes, which would rapidly lead to cell disruption (Leroueil *et al.*, 2007). The difference of sensitivity between mammalian cells and microbial cells may be associated with the specific properties (i.e. higher amphiphilicity and fluidity) of mammalian cell membranes compared to algal or bacterial cells, which both possess a cell wall over the plasma membrane, as it was suggested for fullerene (Chen *et al.*, 2010).

It should be noted that AuG0 NPs appear to be significantly less toxic than non-composite PAMAM dendrimers for mammalian cells. In our study, exposition of Vero and N2A cells did not induce significant toxicity for concentrations up to 0.4 mg ml^{-1} while, in

other mammalian cell lines, EC_{50} values of 0.02 to 0.05 mg ml⁻¹ were found for PAMAM of G4 to G6 (Mukherjee *et al.*, 2010, Naha *et al.*, 2010). Our results confirm previous findings by Nair *et al.* (2009), where they concluded that PAMAM-coating of gold NPs reduces their toxicity. However, *V. fischeri* sensitivity to AuG0 NPs was in the same range as previously found for PAMAM dendrimers (EC_{50} of 0.04 to 0.18 mg ml⁻¹) (Mortimer *et al.*, 2008; Naha *et al.*, 2009). Lower EC_{50} values (0.003 to 0.005 ml ml⁻¹) were found for G4 and G5 PAMAM dendrimers in *C. reinhardtii* after 72h of treatment (Petit *et al.*, 2010), however this lower EC_{50} value for PAMAM may be explained by the longer exposure time since, in our study, increasing the exposure time from 30 min to 24 h resulted in a 27% decrease of EC_{50} value (see Table 8.1). Therefore, the difference of toxicity between AuG0 NPs and PAMAM dendrimers appears to be more important in mammalian cells.

RPMI interactions with AuG0 NPs appeared to participate in the reduced toxicity of AuG0 NPs in mammalian cells. In RPMI media, AuG0 NPs optical properties were altered and a large absorption increase was found around 550 nm. Change in the optical properties of gold NPs can be caused by change in NPs size (Link and El-Sayed, 1999) or by an alteration of the surface plasmon properties (Maiorano *et al.*, 2010). The three media used have very different ionic strengths (*C. reinhardtii* medium < RPMI medium < *V. fischeri* medium) and nutrient composition and they may be expected to have different effects on NPs physicochemical properties (Ji *et al.*, 2010). PAMAM functional groups are also sensitive to the ionic strength of biological media, which may induce self-agglomeration and reduce cellular uptake (Fant *et al.*, 2000). However, TEM microscopy showed that AuG0 NPs do not agglomerate in any of the medium and that NPs size was similar for all the media used. Under those conditions, the absorption increase at 550 nm may be explained by an alteration of the surface plasmon properties, probably by binding of macromolecules to the NPs surface, changing its surface refraction index (Sun and Xia, 2002). Such phenomenon may partially account for the lower sensitivity of mammals cells (N2A and Vero) in RPMI medium since it was found that when *C. reinhardtii* is exposed to AuG0 NPs in the presence of 10% RPMI, AuG0 NPs toxicity is significantly lowered. This finding has important implications on the evaluation of the potential risks of toxicity of PAMAM-based nanomaterials. Indeed, the chemical composition of laboratory test media are usually not

representative of biological or environmental conditions and these differences may lead to an erroneous interpretation of the risk of toxicity of nanomaterials.

Based on our results, the toxicological risk of PAMAM-based nanomaterials may still be higher for microbial cells than for mammalian cells, even when media-specific interactions are considered. Since PAMAM are mainly designed for biomedical and pharmaceutical usages, low toxicity of AuG0 NPs in mammalian cells may provide interesting opportunities. However, their eventual release in the ecosystems may induce deleterious effects on microbial life. The release of PAMAM compounds in the environment has not yet been established however, due to the development of nanotechnologies, contamination of ecosystems is expected (Klaine *et al.*, 2008; Bhatt and Tripathi, 2011). Their fate in the ecosystem must be assessed, since most engineered NPs are modified for higher stability, which may result in higher persistence in the ecosystems (Handy *et al.*, 2008). For these reasons, a better understanding of the toxicological interactions of PAMAM compounds will be needed to ensure a safe development of nanotechnologies.

8.7 Conclusions

The toxicological risks of AuG0 NPs were investigated in four different cellular models representing three different biological systems. AuG0 NPs induced very low toxicity in mammalian cells while algal and bacterial cells were more sensitive to AuG0 NPs effect, with EC_{50} values between 0.08 and 0.16 mg ml⁻¹. Based on these results, AuG0 NP toxicity is low compared to other PAMAM-based compounds, however the different sensitivity of mammalian compared to microbial cells indicates that they may still induce deleterious effects in the environment. The possible release route of PAMAM-based nanomaterials in the environment should therefore be determined if PAMAM-based nanomaterials are to be used for biomedical or pharmaceutical applications. Lower sensitivity of the mammalian cells towards AuG0 NPs was found to be associated with both their specific cellular structure and to a modification of the NPs surface properties in the cell culture medium. These findings clearly indicate the need to consider media-specific effects when evaluating the toxicity of new nanomaterials, since toxicity level may differ significantly between different species due to the alteration of the nanomaterials' properties in different media.

8.8 Acknowledgements

This work was funded by grants awarded to W.G.M by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. F.P. received a mobility fellowship from the Ministère de l'Éducation, des Loisirs et du Sport du Québec. The authors thank the staff at the Faculty for Electron Microscopy Research (McGill University).

8.9 References

- Bhatt, I. and B.N. Tripathi. 2011. "Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment". *Chemosphere*, vol. 82, p. 308-317.
- Biricova, V. and A. Laznickova. 2009. "Dendrimers: Analytical characterization and applications". *Bioorg. Chem.*, vol. 37, p. 185-192.
- Bogdan, N. 2009. «Nanoparticules recouvertes de carbohydrates comme biocapteurs de lectines». Thèse de doctorat, Montréal, Université Concordia, 480 p.
- Brust, M., M. Walker, D. Bethel, D.J. Schiffrin and R. Whyman. 1994. "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 7, p. 801-802.
- Calabretta, M.K., A. Kumar, A.M. McDermott, C. Cai. 2007. "Antibacterial Activities of Poly(amidoamine) Dendrimers Terminated with Amino and Poly(ethylene glycol) Groups". *Biomacromolecules*, vol. 8, p. 1807-1811.
- Chen, R., T.A. Ratnikova, M.B. Stone, S. Lin, M. Lard, J.S. Hudson and P.C. Ke. 2010. "Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells". *Small*, vol. 6, p. 612-617.
- Cloninger, M.J. 2002. "Biological applications of dendrimers". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 6, p. 742-748.
- Eichman, J.D., A.U. Bielinska, J.F. Kukowska-Latallo and J.R. Baker Jr. 2000. "The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells". *Pharm. Sci. Technol. To.*, vol. 3, p. 232-245.
- Fant, K., E.K. Esbjorner, A. Jenkins, M.C. Gossel, P. Lincoln and B. Norden. 2010. "Effects of PEGylation and Acetylation of PAMAM Dendrimers on DNA Binding,

- Cytotoxicity and *in Vitro* Transfection Efficiency". *Mol. Pharmaceutics*, vol. 7, p. 1734-1746.
- Handy, R.D., F. von der Kramer, J.R. Lead, M. Hasselov, R. Owen and M. Crane. 2008. "The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles". *Ecotoxicology*, vol. 17, p. 287-314.
- Harris, E.H. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego: Academic Press, 780 p.
- Hermanson, G.T. 1996. *Bioconjugate Technique*. San Diego: Academic press., 785 p.
- Hostetler, M.J., J.E. Wingate, C.-J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M.R. Clark, J.D. Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans and W. Murray. 1998. "Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size". *Langmuir*, vol. 14, p. 17-30.
- Humpage, A.R., A. Ledreux, S. Fanok, C. Bernard, J.F. Briand, G. Eaglesham, J. Papageorgiou, B. Nicholson, D. Steffensen. 2007. "Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic fresh water cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 26, p. 1512-1519.
- Ji, Z., X. Jin, S. George, T. Xia, H. Meng, X. Wang, E. Suarez, H. Zhang, E.M.V Hoek, H. Godwin, A.E. Nel and J.I. Zink. 2010. "Dispersion and Stability Optimization of TiO₂ Nanoparticles in Cell Culture Media". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, p. 7309-7314.
- Klaine, S.J., P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, T.F. Fernandes, R.D. Handy, D.Y. Lyon, S. Mahendra, M.J. McLaughlin and J.R. Lead. 2008. "Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, p. 1825-1851.
- Leroueil, P., S. Hong, A. Mecke, J.R. Baker Jr, B.G. Orr and M.M.B Holl. 2007. "Nanoparticle Interaction with Biological Membranes: Does Nanotechnology Present a Janus Face?". *Acc. Chem. Res.*, vol. 40, p. 335-342.
- Link, S. and M.A. El-Sayed. 1999. "Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles". *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, p. 4212-4217.
- Maiorano, G., S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M.A. Malvindi, R. Cingolani and P.P. Pompa. 2010. "Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response". *ACS Nano*, vol. 4, p. 7481-7491.

- Matias, W.G. and E.E. Creppy. 1998. "5-methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in vero cells". *Environ. Toxicol. Water Qual.*, vol. 4, p. 83-88.
- Mayer, P., R. Kuhel and N. Nyholm. 1997. "A simple *in vitro* fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests". *Water Res.*, vol. 31, p. 2525-2531.
- Mortimer, M., K. Kasemets, M. Heinlaan, I. Kurvet and A. Kahru. 2008. "High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles". *Toxicol. In Vitro*, vol. 22, p. 1412-1417.
- Mukherjee, S.P., M. Davoren and H.J. Byrne. 2010. "*In vitro* mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers — towards quantitative structure activity relationships". *Toxicol. in Vitro*, vol. 24, p. 1169-1177.
- Naha, P.C., M. Davoren, A. Casey and H.J. Byrne. 2009. "An Ecotoxicological Study of Poly(amidoamine) Dendrimers - Toward Quantitative Structure Activity Relationships". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 6864-6869.
- Naha, P., M. Davoren, F. Lyng and H.J. Byrne. 2010. "Reactive Oxygen Species Induced Cytokine Production and Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers in J774a.1 Cells". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 246, p. 91-99.
- Patri, A.K., I.J. Majoros and J.R. Baker Jr. 2002. "Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 6, p. 466-471.
- Petit, A.-N., P. Eullaffroy, T. Debenest and F. Gagné. 2010. "Toxicity of PAMAM dendrimers to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat Toxicol.*, vol. 100, p. 187-193.
- Petit, A.-N., T. Debenest, P. Eullaffroy and F. Gagné. in press. "Effects of a cationic PAMAM dendrimer on photosynthesis and ROS production of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Nanotoxicology*, ahead of print, doi: 10.3109/17435390.2011.579628.
- Peralta-Videa, J.R., L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong and J.L. Gardea-Torresdey. 2011. "Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010". *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, p. 1-15.
- Perreault, F., M.S. Matias, S.P. Melegari, C.R.S. Carvalho Pinto, E.E. Creppy, R. Popovic and W.G. Matias. 2011. "Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, p. 1021-1026.
- Perreault, F., N. Bogdan, M. Morin, J. Claverie and R. Popovic. in press. "Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on

physiological processes". *Nanotoxicology*, in press, doi: 480 10.3109/17435390.2011.562325.

- Rajapaksha, R.M.C.P., M.A. Tobor-Kapłon, E. Baath. 2004. "Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently". *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, p. 2966-2973.
- Schmid, K. and M. Riediker. 2008. "Use of Nanoparticles in Swiss Industry: A Targeted Survey". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 2253-2260.
- Sebaugh, J.L. 2010. "Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation". *Pharmaceut. Statist.*, vol. 10, p. 128-134.
- Suarez, I.J., R. Rosal, A. Rodriguez, A. Ucles, A.R. Fernandez-Alba, M.D. Hernando and E. Garcia-Calvo. 2011. "Chemical and ecotoxicological assessment of poly(amidoamine) dendrimers in the aquatic environment". *Trends Anal. Chem.*, vol. 30, p. 492-506.
- Sun, Y. and Y. Xia. 2002. "Increased Sensitivity of Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoshells Compared to That of Gold Solid Colloids in Response to Environmental Changes". *Anal. Chem.*, vol. 74, p. 5297-5305.
- Tomalia, D.A., B. Huang, D.R. Swanson, H.M. Brothers and J.W. Klimash. 2003. "Structure control within poly(amidoamine) dendrimers: size, shape and regio-chemical mimicry of globular proteins". *Tetrahedron*, vol. 59, p. 3799-3813.
- Tsui, M.T.K. and L.M. Chu. 2003. "Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors". *Chemosphere*, vol. 52, p. 1189-1197.
- Umeda, Y., C. Kojima, A. Harada, H. Horinaka and K. Kono. 2010. "PEG-Attached PAMAM Dendrimers Encapsulating Gold Nanoparticles: Growing Gold Nanoparticles in the Dendrimers for Improvement of Their Photothermal Properties". *Bioconjugate Chem.*, vol. 21, p. 1559-1564.
- Venditto, V.J., C.A.S Regino and M.W. Brechbiel. 2005. "PAMAM Dendrimer Based Macromolecules as Improved Contrast Agents". *Mol. Pharmaceutics*, vol. 2, p. 302-311.
- Wang, Y., Y. Song, D. Kong and Y. Yu. 2005. "Interaction between poly(amidoamine) dendrimers and DNA studied by spectroscopic methods". *Chinese Sci. Bull.*, vol. 50, p. 2161-2165.
- Zeyons, O., A. Thill, F. Chauvat, N. Menguy, C. Cassier-Chauvat, C. Orear, J. Daraspe, M. Auffan, J. Rose, O. Spalla. 2009. "Direct and indirect CeO₂ nanoparticles toxicity for *Escherichia coli* and *Synechocystis*". *Nanotoxicology*, vol. 3, p. 284-295.

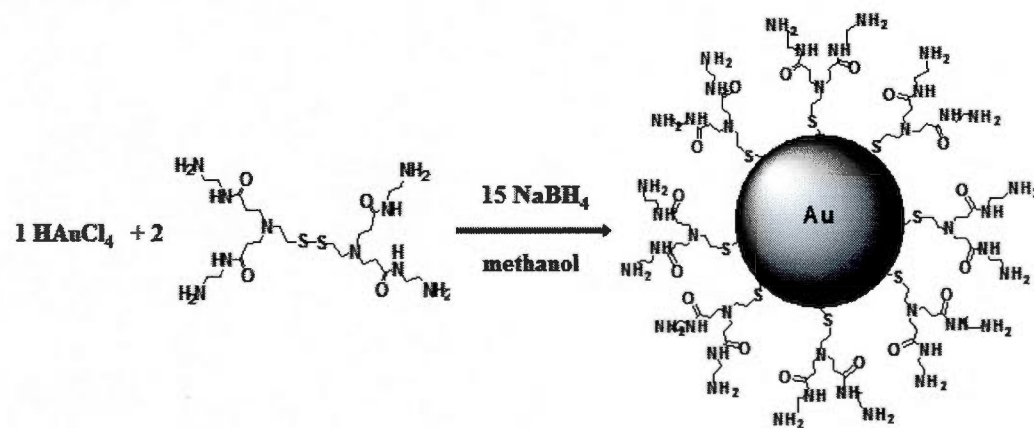


Figure 8.1 Synthesis of gold NP with G0 PAMAM adsorbed on its surface. For details see section 8.4.2.

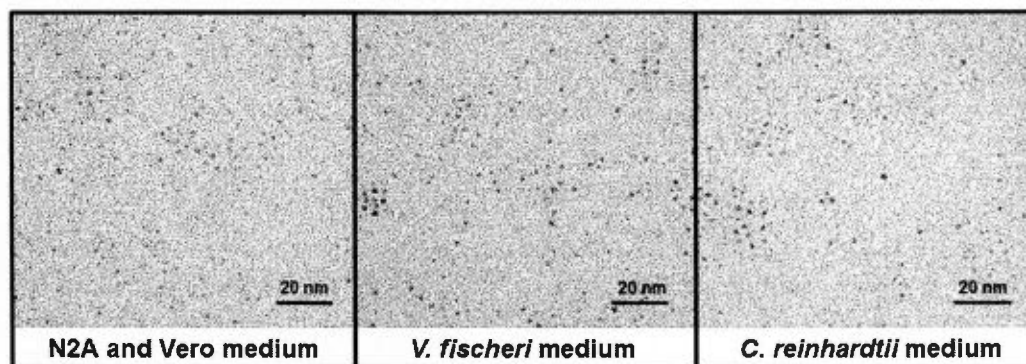


Figure 8.2 TEM microscopy images of AuG0 NPs suspensions (1 mg ml^{-1}) prepared in the different treatment media used for N2A and Vero cells, *C. reinhardtii* and *V. fischeri*. For more details on the culture media, see section 8.4.1.

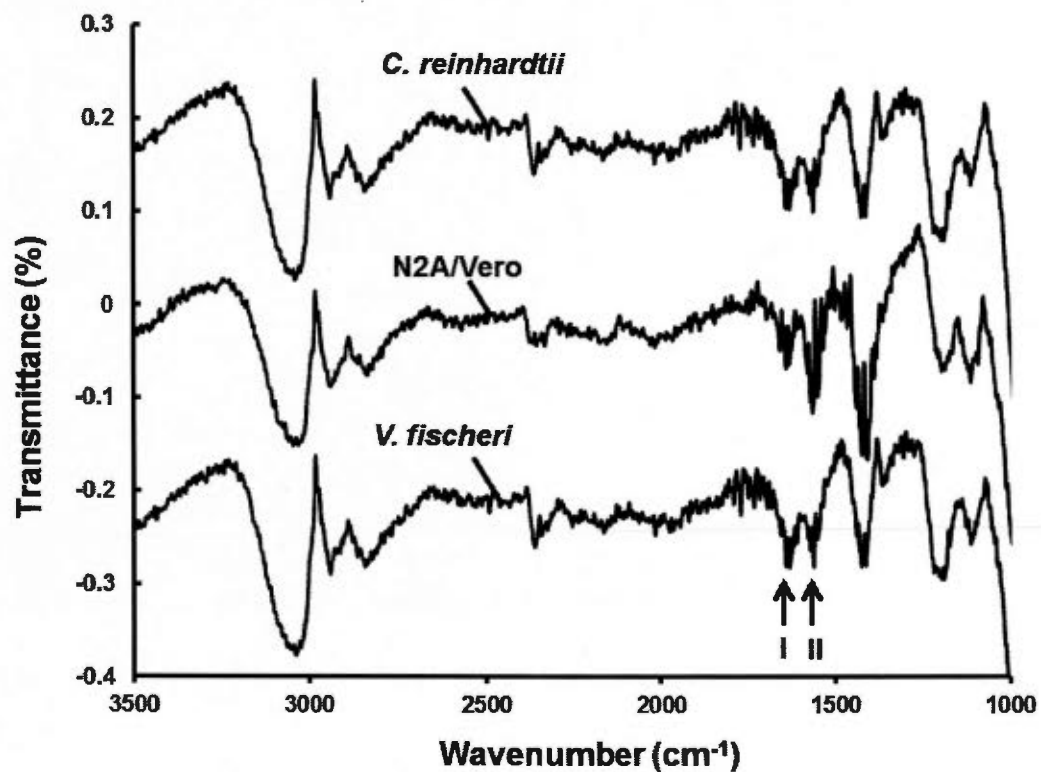


Figure 8.3 FTIR spectra of the AuG0 NPs suspension (20 mg ml⁻¹) in the different culture media used for N2A and Vero cells, *C. reinhardtii* and *V. fischeri*. The arrows indicate the amide I and II peaks found in the three spectra. For more details on the culture media, see section 8.4.1.

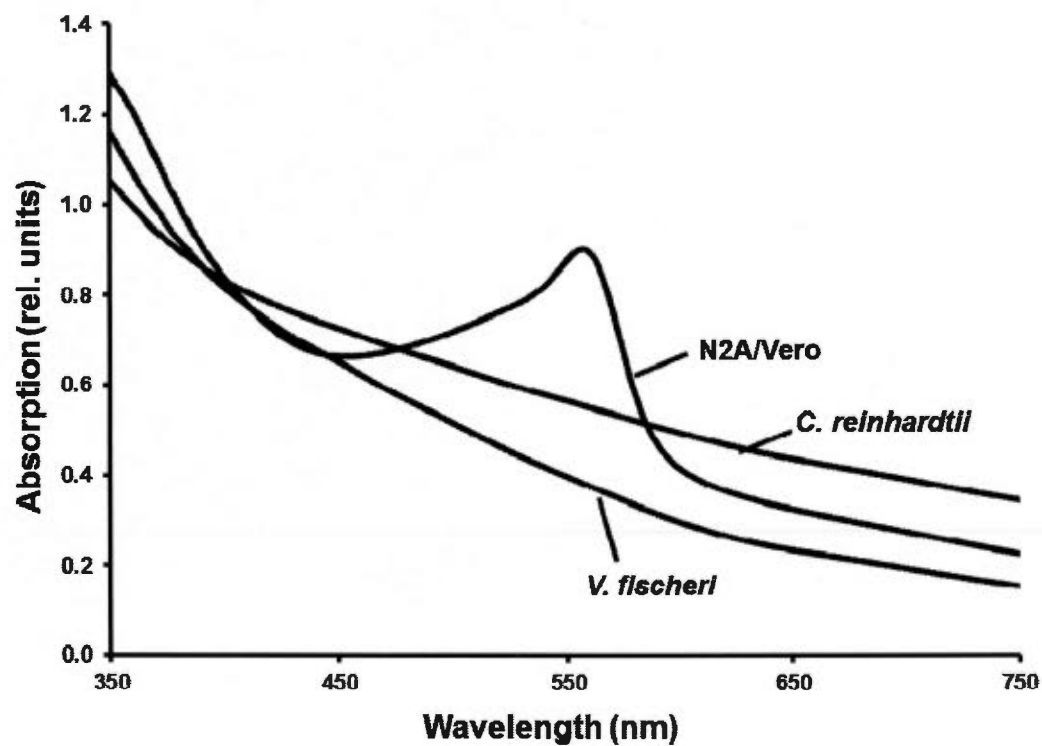


Figure 8.4 Absorption spectra of the Au0 NPs suspension (0.1 mg ml^{-1}) in the different culture media used for N2A and Vero cells, *C. reinhardtii* and *V. fischeri*. For more details on the culture media, see section 8.4.1.

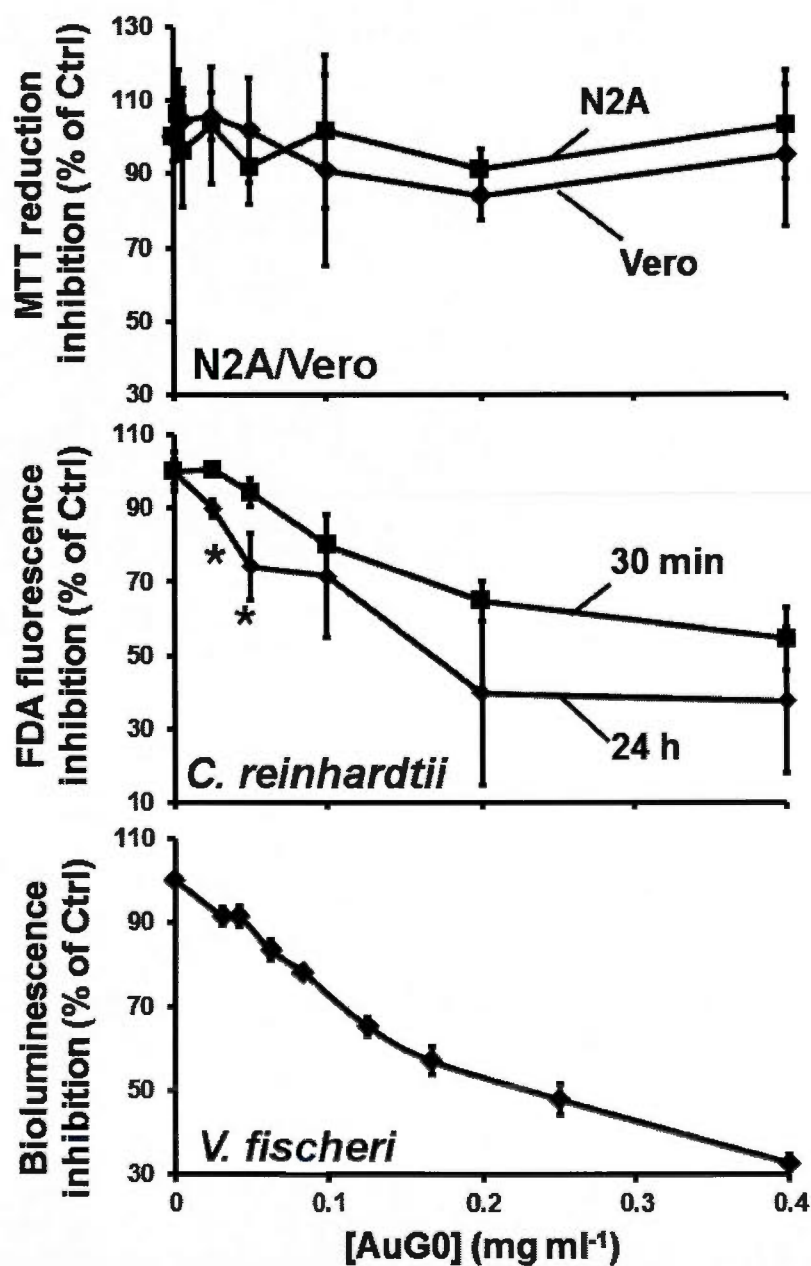


Figure 8.5 Change of cell viability indicators in N2A and Vero cells exposed 24 h, *C. reinhardtii* cells exposed for 30 min and 24 h, and in *V. fischeri* exposed for 30 min to AuG0 NPs. Data are presented as mean \pm standard deviation. Stars indicate results significantly different between the 30 min and 24 h tests (for $p < 0.05$).

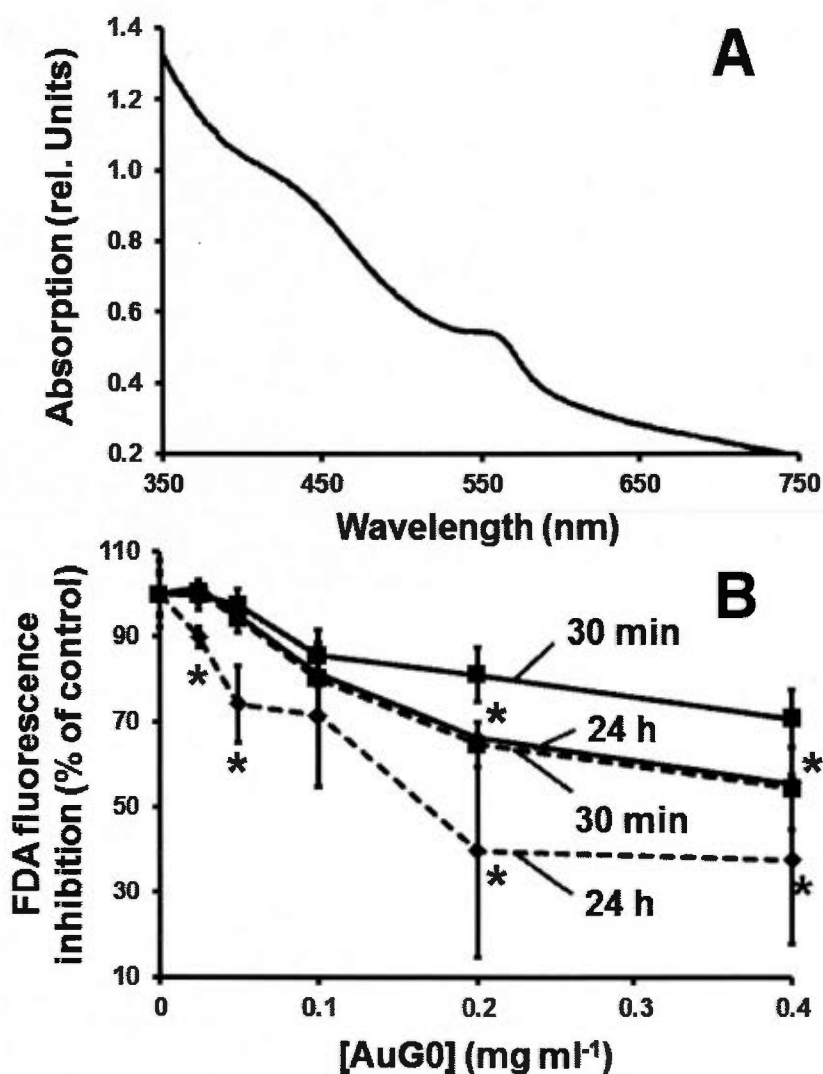


Figure 8.6 A. UV-VIS absorption spectra of AuG0 NPs prepared in the *C. reinhardtii* media with 10% RPMI. B. Effect of AuG0 NPs prepared in RPMI (10% final RPMI concentration in treatment) for *C. reinhardtii*. Data are presented as mean \pm standard deviation. Dashed line indicates the effect of AuG0 NPs in the *C. reinhardtii* media only, to facilitate comparison. Stars indicate significantly different toxicity of AuG0 NP in *C. reinhardtii* medium compared to 10% RPMI medium (for $p < 0.05$).

Table 8.1 NOEC, EC₁₀ and EC₅₀ values of AuG0 NPs obtained using different bioassays. AuG0 NP effects were measured on N2A and Vero cells using the MTT assay, on *C. reinhardtii* with the FDA assay and on *V. fischeri* with the Microtox ISO-11348-3 assay. Letters in superscript indicate significantly different results ($p < 0.05$).

Assay	NOEC (mg ml ⁻¹)	EC ₁₀ (mg ml ⁻¹)	EC ₅₀ (mg ml ⁻¹)
N2A cells, 24 h	0.4	-	-
Vero cells, 24 h	0.4	-	-
<i>C. reinhardtii</i> , 30 min	0.05	0.032 ± 0.010 ^a	0.114 ± 0.034 ^b
<i>C. reinhardtii</i> , 30 min, 10% RPMI	0.05	0.034 ± 0.020 ^a	0.136 ± 0.087 ^b
<i>V. fischeri</i> , 30 min	-	0.035 ± 0.012 ^a	0.167 ± 0.035 ^b
<i>C. reinhardtii</i> , 24 h	0.025	0.016 ± 0.017 ^a	0.083 ± 0.026 ^b
<i>C. reinhardtii</i> , 24 h, 10% RPMI	0.05	0.077 ± 0.051 ^a	0.116 ± 0.042 ^b

CHAPITRE IX

GENOTOXIC EFFECTS OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES IN NEURO-2A CELL CULTURES

François Perreault^{1,2}, Silvia Pedroso Melegari¹, Cristina Henning da Costa¹, Ana Letícia Rossetto¹, Radovan Popovic² and William Gerson Matias^{1*}

¹ Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC – Brasil.

² Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

*Corresponding author. W.G. Matias. E-mail address: will@ens.ufsc.br. Postal address :Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX – Depto. De Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário- CEP: 88040-970 - Florianópolis - SC - Brasil - Tel.: +55 48 37217742 - Fax: +55 48 37219823.

* Corresponding author

Sous presse dans *Science of the Total Environment*, DOI :10.1016/j.scitotenv.2012.09.065.

Contribution dans ce chapitre : J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats. J'ai écrit la première version du manuscrit et participé à la rédaction finale. S.P. Melegari, C.H. da Costa et A.L. Rossetto ont participé aux mesures expérimentales. R. Popovic et W.G. Matias ont participé à la rédaction de la version finale du manuscrit.

9.1 Résumé

Les nanoparticules de CuO (CuO NPs) sont couramment utilisées pour leur potentiel biocide toutefois elles peuvent induire une forte toxicité. Les effets des CuO NPs nécessitent donc une évaluation complète afin de déterminer les processus les plus sensibles aux effets toxiques des CuO NPs. Dans ce rapport, la génotoxicité des NPs de CuO a été étudiée en conditions *in vitro*, en utilisant la lignée cellulaire de neuroblastome de souris, Neuro-2A. Les effets génotoxiques associés à la fragmentation de l'ADN, à la méthylation de l'ADN, aux dommages chromosomiques, ainsi que la peroxydation des lipides, ont été évalués et comparés à la cytotoxicité induite par les NPs de CuO, déterminée par la réduction mitochondriale du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide en formazan, afin d'évaluer les risques de génotoxicité des NPs de CuO. Basée sur l'activité mitochondriale, une EC_{50} de 52.34 mg l⁻¹ a été déterminée après 24h de traitement. Les NPs de CuO ont également montré un effet sur la fragmentation de l'ADN, la peroxydation des lipides et la formation de micronoyaux. Le test du micronoyau était la méthode la plus sensible pour évaluer la génotoxicité des NPs de CuO et une augmentation significative de la fréquence de micronoyaux a été trouvée à 12.5 mg l⁻¹ de CuO NPs après 24h d'exposition. Ces résultats démontrent que l'évaluation de la génotoxicité devrait représenter un aspect important de l'évaluation du risque toxicologique des nanomatériaux à base de NPs de CuO. Ces essais devront donc compléter les essais de cytotoxicité afin de fournir une évaluation fiable de la toxicité des nanomatériaux.

9.2 Abstract

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are used for their biocide potential however they were also shown to be highly toxic to mammalian cells. Therefore, the effects of CuO NPs should be carefully investigated to determine the most sensitive processes for CuO NPs toxicity. In this study, the genotoxicity of CuO NPs was investigated *in vitro*, using the mouse neuroblastoma cell line Neuro-2A. Genotoxic effects related to deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation, DNA methylation and chromosomal damage, as well as lipid peroxidation, were investigated and compared to cytotoxic effects, measured by the mitochondrial reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide into formazan. Based on mitochondrial activity, an EC_{50} cytotoxicity value of 52.34 mg l^{-1} was found after 24 h of treatment. CuO NPs were also found to induce DNA fragmentation, lipid peroxidation and micronucleus formation. The micronucleus assay was the most sensitive to evaluate CuO NPs genotoxicity and micronucleus frequency was increased significantly at 12.5 mg l^{-1} CuO NPs after 24 h of treatment. Therefore, for the evaluation of nanomaterials based on CuO NPs, genotoxicity assays are a more sensitive approach to determine the risk of nanomaterials exposure. These assays should therefore always complement cytotoxicity assays to provide a reliable assessment of nanomaterials toxicity.

Keywords:

Nanotoxicology; micronucleus; DNA methylation; lipoperoxidation; cytotoxicity.

9.3 Introduction

Nanotechnology is a new promising field with potential applications in domestic, industrial and biomedical products (Peralta-Videa *et al.*, 2011). Due to the growing number of applications, there is an increasing risk of human and environmental exposure to nanomaterials. Their potential toxicological impacts are still a matter of investigation and our actual knowledge on the effects of nano-sized contaminants on biological systems remains incomplete (Singh *et al.*, 2009; Skocaj *et al.*, 2011). These effects need to be carefully assessed in order to provide a scientific basis for a safe development of nanotechnologies.

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) possess biocide properties interesting for applications in antimicrobial textiles, paints and plastics (Ren *et al.*, 2009; Dastjerdi and Montazer, 2010; Delgado *et al.*, 2011). However, CuO NPs were found to be highly toxic compared to other carbon or metal oxide nanomaterials (Karlsson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Due to their small size, NPs may cross biological barriers to reach different organs and, according to their size and surface properties, accumulation of metal NPs was previously observed in all the different organs *in vivo* (for a review, see Li and Chen, 2011). Metallic NPs such as MnO₂ NPs or gold NPs were found to accumulate in the brain of rats and mice, respectively (Lasagna-Reeves *et al.*, 2010; Oszlanczi *et al.*, 2011). CuO NPs treatment is known to induce a disruption of the blood-brain barrier *in vivo* in mice and rats (Sharma *et al.*, 2009). Moreover, under *in vitro* conditions, CuO NPs were also found to induce toxic effects in different types of neuronal cells such as the human SH-SY5Y neuroblastoma and H4 neuroglioma cells (Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). However, several aspects of CuO NPs toxicity on such cellular systems remain unknown. Genotoxicity of nanomaterials is of particular concern since an alteration of the genetic material may favour cancer development or fertility impairment (Singh *et al.*, 2009). Nanomaterials were shown to induce DNA alterations by two pathways: via direct association with DNA strands for NPs of small (1-2 nm) diameter (Tsoli *et al.*, 2005), or mediated by oxidative stress induced by NPs (Shukla *et al.*, 2011). Previous studies, using human lung epithelial cells A549 indicated that CuO NPs may have deleterious effects on DNA integrity (Karlsson *et al.*, 2008; Ahamed *et al.*, 2010). However, further investigations are required to provide a better understanding of the risk of genotoxicity of CuO NPs.

Genotoxic effects of contaminants may be induced by different pathways, such as direct DNA damage (Zhivotosky and Orrenius, 2001; Karlsson, 2010) or by chromosomal damage caused by an alteration of DNA integrity or the disruption of cell division processes (Fenech, 2000). Indirect processes may also be implicated in genotoxic effects of contaminants. For example, epigenetic changes such as methylation of cytosine (dC) into 5-methyldeoxycytosine (m⁵dC) may alter gene expression and lead to carcinogenesis (Zukieli *et al.*, 2004). Change in the m⁵dC:dC ratio, in addition to favoring mutagenesis by m⁵dC deamination to thymine, can trigger the activation of proto-oncogenes or the inactivation of tumor suppression genes (Gonzalzo and Jones, 1997). Finally, cellular stress may lead to genotoxic effects via oxidation by-products such as malondialdehyde (MDA), a mutagenic and carcinogenic by-product of lipid peroxidation (Marnett, 1999).

In this report, CuO NPs genotoxic effects were evaluated *in vitro* and compared with cytotoxic effects to better understand the risk of CuO NPs exposure. The Neuro-2A (N2A) mouse neuroblastoma cell line was used as a model to determine the potential effects of CuO NPs transport into the brain. The most sensitive responses to CuO NPs exposure were identified as important processes in CuO NPs risk of toxicity.

9.4 Materials and methods

9.4.1 Cell culture

The N2A mouse neuroblastoma cell line was obtained from the National Museum of Nature, Paris, France (European Collection of Cell Cultures cat. no. 89121404; PortonDown, UK). Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 mg ml⁻¹ streptomycin and 50 U ml⁻¹ penicillin (all reagents were obtained from Sigma-Aldrich, Lyon, France). The culture was maintained at 37 °C in a humidified air:CO₂ (95:5) atmosphere (Humpage *et al.*, 2007).

9.4.2 Preparation of the NP suspension

CuO nanopowder was obtained from MTI corporation (Richmond, CA) and, according to the manufacturer, had an average size of 30-40 nm and a purity higher than

99%. Nanopowder was exposed to UV illumination for 30 min before use to avoid culture contamination. Stock CuO NP suspension (4 mg ml^{-1}) was prepared in sterile nanopure water and sonicated 2 x 150 sec at 50 W, with 10 sec of vortex between each sonication. CuO NPs were stabilised using albumin in a protocol modified from Bihari *et al.* (2008), as this protein is already present in the culture media, has a high affinity to NPs and a low effect on biochemical reactions (Bihari *et al.*, 2008). After the two initial sonication, bovine serum albumin was added to a final concentration of 1.5 mg ml^{-1} and the suspension was sonicated a third time for 60 sec at 37.5 W. The CuO NP suspension was prepared just before treatment.

Raw nanopowder was visualized by scanning electronic microscopy (SEM) to determine initial particle size. CuO NPs were first dispersed in nanopure water, deposited on the sample holder and left to dry. Samples were covered with a 5 nm gold film and desiccated for three days. Analysis was realized on a JEOL JSM-6701F microscope at the Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC, Brazil). CuO NPs were characterized in the RPMI media used for treatments using a ZetaPlus particle sizer (Brookhaven Instruments Corporation, NY). Particle size distribution was determined by dynamic light scattering and zeta potential of NPs by the electrophoretic mobility method. NP size and shape was also verified by transmission electronic microscopy (TEM). For TEM analysis, a drop of NP suspension (1 mg ml^{-1}) was placed on a formvar-coated copper grid and, after 1 min, the media was removed with a Whatman filter paper. Samples were visualized using a FEI Tecnai 12 120 kV microscope and pictures taken with a Gatan 792 Bioscan 1k x 1k Wide Angle Multiscan CCD camera.

9.4.3 NP treatments

N2A cells ($10^5 \text{ cells ml}^{-1}$) were first seeded in 6, 24 or 96-wells microplates (according to the assay used) with 5% of CO_2 at 37°C during 24 h. Then, the medium was removed and cells were exposed to CuO NP concentrations from 6.25 to 400 mg l^{-1} diluted in RPMI 1640 without any supplements to limit cell proliferation. N2A cells were exposed during 24 h to CuO NPs, in 5% of CO_2 at 37°C in the dark.

9.4.4 Mitochondrial activity assay

Cell viability was determined with the mitochondrial activity assay by the measure of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. N2A cells were exposed to CuO NPs in 96-well plates during 24 h. At the end of the treatment, the supernatant was discarded and 200 μl of MTT (0.5 mg ml^{-1} in RPMI-1640) was added and cells were re-incubated for 2 h. Then, the MTT solution was discarded and 200 μl of dimethyl sulfoxide was added to each well to dissolve the formazan crystals formed. Absorbance was read at 560 nm using a BioTek EL 3 800 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT). Reference wells were used to correct for any absorbance of CuO NPs at 560 nm. From the MTT results, the EC_{10} and EC_{50} values were calculated by fitting a 4 parameter sigmoidal equation (Hill-slope model).

Interactions between CuO NPs and the MTT assay was evaluated by the same protocol as described without the N2A cells. For each CuO NPs concentration used, the NPs were incubated in RPMI media supplemented with MTT solution for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. The absorbance at 560 nm was used to monitor MTT reduction into formazan by NPs. Reference wells were used to correct for any absorbance of CuO NPs at 560 nm.

9.4.5 Lipid peroxidation

MDA quantification was performed according to Matias and Creppy (1998), with modifications. N2A cells were exposed to CuO NPs (12.5, 25, 50 and 100 mg l^{-1} in RPMI-1640) in 24-well plates during 24 h. At the end of the exposition, the media was discarded; the cells were collected in 500 μl PBS and centrifuged at 1000 g for 5 min. PBS was discarded and 150 μl of SET buffer (0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) was added. The samples were vortexed and 20 μl was taken to measure the protein content using the Bradford assay (Bradford, 1976). Then, 25 μl of 7% sodium dodecyl sulfate 7%, 300 μl of 0.1 M HCl, 40 μl of 1% phosphotungstic acid 1% and 300 μl of 0.67 % thiobarbituric acid (TBA) were added to each sample and vortexed. Samples were incubated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h in the dark, and then cooled in ice bath for 15 min. 300 μl of n-butanol was added to each sample and vortexed. Samples were centrifuged at 3000 g for 10 min and the n-butanol phase containing the MDA-TBA adduct was separated and quantified using a

HP1050 HPLC system (Hewlett Packard, Barueri, Brazil) equipped with Supelcosil LC-18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of methanol:water 40:60 (v/v), pH 8.4. The flow rate was kept at 0.5 ml min⁻¹, and the injection volume was 50 μ l. Detection was done using a Programmable Fluorescence Detector HP 1064A. The excitation and emission wavelengths were of 515 and 553 nm, respectively. MDA calibration curve was prepared with eight samples of standard MDA concentrations varying between 7.5 and 6 x 10⁷ nM, prepared the same way as samples to form the MDA-TBA complex. Quantification of MDA-TBA was done in relation to the total protein content.

9.4.6 DNA extraction and genotoxicity assay

N2A cells (10⁵ cells ml⁻¹) were seeded in 6-wells microplates and treated with CuO NPs (12.5, 25, 50 and 100 mg l⁻¹ in RPMI-1640). A positive control has been performed using cyclophosphamide (1 mg l⁻¹). After 24 h of treatment, the culture medium was removed and the cells were harvested by scraping with 1 ml of PBS. DNA was extracted from control and treated cells using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturers' protocol. Total DNA was quantified using the ratio of absorbance at 260/280 (adapted from Kouadio *et al.*, 2007).

9.4.7 DNA fragmentation assay in agarose gel electrophoresis

Qualitative evaluation of DNA fragmentation was done by agarose gel electrophoresis. 10 μ g of purified DNA of N2A cells was carried out by electrophoresis (MSMIDI 738, Biosystems) in 1.5% agarose gel prepared in TBE buffer (Tris 44.5 mM, boric acid 44 mM and EDTA 50 mM). DNA migration was carried out in electrophoresis buffer under 70 V during 2h. At the end of the migration, the gel was incubated in TBE buffer containing 0.02 mg ml⁻¹ ethidium bromide and DNA was revealed under UV light using a transilluminator (LTB-ST Loccus Biotecnologia, SP - Brazil). DNA gel images were captured with a digital camera (L-PIX Loccus Biotecnologia, SP - Brazil) and analyzed with the Image J software (Slade *et al.*, 2009).

9.4.8 DNA methylation

For m5dC quantification, 10 μg of purified DNA from exposed N2A cells was dissolved in 10 μl of nanopure water and incubated at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min. Then, 1 μl of 250 mM potassium acetate buffer (pH 5.4), 1 μl of 10 mM zinc sulphate, and 10 μl of nuclease P1 (0,5 U ml^{-1}) was added and samples were kept at 37 $^{\circ}\text{C}$ overnight. After incubation, the samples were treated with 2 μl of 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3), plus 2 μl of the buffer containing 0.31 U ml^{-1} alkaline phosphatase. Samples were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. DNA bases composition was analyzed on a HP1050 HPLC system (Hewlett Packard, Barueri, Brazil) equipped with a HP1050 Series Variable Wavelength Detector and a Agilent Zorbax SB-Phenyl column (250 \times 4.6 mm^2 , 5 μM). Elution was carried out with 6.5 mM $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 3.95 and 4% methanol (v/v) at a flow rate of 1 ml min^{-1} . Eluates were monitored at 254nm. The samples were diluted to 1:4 and the injection volume was 20 μl . Standard DNA bases (dC, dT, dG, dA; 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ each) and m5dC (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were used for quantification. The results in $\mu\text{g ml}^{-1}$ were used to calculate the % rate of m5dC as compared to $[\text{m5dC}+\text{dC}]\times 100$.

9.4.9 Micronucleus assay

Cytochalasin B-blocked micronucleus assay was performed as described in Ouanes et al (2003), with some modification. For micronucleus assay, N2A cells (10^5 cells ml^{-1}) were cultivated for 24 h in 24-well plates, and then exposed to CuO NP, with RPMI 1640 medium as negative control and cyclophosphamide (1 mg l^{-1}) as positive control. Cytochalasin B (Cyt-B, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was subsequently added to the treated cultures after 6 h, for a 18 h incubation. Cells were harvested after 24 h treatment, transferred to 0.075 M KCl for a mild hypotonic treatment and then immediately centrifuged at 5000 g for 5 min. Supernatant was discarded and cells were fixed in 250 μl methanol/acetic acid 3:1 (v:v) for 20 min. Fixed cells were spread on glass slides and dried for 30 min. Staining was done with acridine orange/ethidium bromide and slides were analyzed at 400x magnification using a fluorescent microscope (Olympus BX40, Japan). One thousand binucleated cells were assessed per slide.

9.4.10 Data analysis and statistics

All experiments were done in three replicates. For toxicity thresholds (EC_{50} and EC_{10}), toxicity data were fitted with a 4 parameter sigmoidal equation (Hill-slope model) using the Origin 6.0 software. Results were compared using an ANOVA followed by a Tukeys' test. Results were considered significant for $p < 0.05$.

9.5 Results

9.5.1 CuO NP agglomeration in the media

SEM microscopy visualization of CuO NPs indicated that CuO NPs were agglomerated when in a nanopowder form. Indeed, individual CuO particles in nanopowder possessed a diameter between 70 to 100 nm and larger agglomerates of several hundred nanometers were observed (Figure 9.1A). After sonication and suspension in the culture media, TEM micrographs showed a CuO core of 102 ± 34 nm located inside a less electronically dense material that can be attributed to albumin proteins as described in Bihari et al (2008). The protein-NPs complex had a total average size of 356 ± 70 nm (Figure 9.1B). These values were in agreement with dynamic light scattering analysis, which indicated a NPs size distribution in liquid media mostly centered around 300 nm (99.1% of all particles), with some agglomerate formation with micron-sized diameter (2.1 μm) (Figure 9.2). Similarly to the observation of Bihari *et al* (2008), formation of a protein layer around CuO NPs decreased particle surface charge from -46.05 ± 3.54 to -6.04 ± 1.00 mV.

9.5.2 MTT assay

The MTT mitochondrial activity assay was used to evaluate the effect of CuO NP treatment on N2A cell viability. This approach was evaluated for any interactions between NPs and the MTT assay and it was concluded that CuO NPs alone do not induce a significant reduction of MTT into formazan, which validate this assay for evaluating their effect on N2A cells (Figure 9.3, insert). After 24h of N2A treatment to CuO NPs, low concentrations (6.25 and 12.5 mg l^{-1}) were found to increase mitochondrial activity while higher concentrations

decreased mitochondrial activity (Figure 9.3). At the highest concentration tested (0.4 mg ml^{-1}), mitochondrial activity was decreased to $63.1 \pm 11.7 \%$ of control sample. Based on the MTT results, EC_{10} and EC_{50} values of 18.79 and 52.34 mg l^{-1} were found by fitting a 4 parameter sigmoidal equation to the experimental data. Further exposure to CuO NPs are based on concentrations of 12.5 , 25 , 50 and 100 mg l^{-1} , respectively $\frac{1}{4} EC_{50}$, $\frac{1}{2} EC_{50}$, EC_{50} and $2xEC_{50}$ values, to compare genotoxic effects with cytotoxicity results.

9.5.3 Lipid peroxidation

Exposition of N2A cells to CuO NP treatments resulted in oxidative stress, measured by the formation of MDA. After 24 h of treatment, CuO effect on MDA content was significant from a CuO concentration of 25 mg l^{-1} ($p < 0.05$) or higher. CuO NP treatment at 25 mg l^{-1} increased the MDA content at 217% of the negative control value, while this value reached 543% for 100 mg l^{-1} CuO NPs (Figure 9.4). In comparison, cyclophosphamide treatment, which was used as a positive control, increased the MDA content to 333% of the control value.

9.5.4 DNA fragmentation

Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from N2A cells after 24 h of CuO NP treatments indicated the presence of DNA fragmentation in all treatments (Figure 9.5A). CuO NP exposure, compared to the negative control (untreated sample) increased DNA fragmentation up to a concentration of 50 mg l^{-1} , while exposure of N2A cells to 100 mg l^{-1} reduced DNA fragmentation. Using the image analysis software Image J, DNA fragmentation was quantitatively compared to the control (Figure 9.5B). At 50 mg l^{-1} CuO NPs, DNA fragmentation was increased by 30% compared to control. This effect was similar to the effect of the positive control toxicant cyclophosphamide (1 mg l^{-1}). DNA fragmentation was significantly different from the negative control from a concentration of 25 mg l^{-1} CuO NPs.

9.5.5 DNA methylation

Methylation of dC into m⁵dC was evaluated by the change in the m⁵dC / dC ratio. Negative control N2A cells had an m⁵dC / dC ratio of 0.38 %, which is close to previous findings for this cell line (Perreault *et al.*, 2011). However, CuO NPs treatment did not show any significant change of m⁵dC / dC ratio even at 100 mg l⁻¹ (Figure 9.6). Changes in the m⁵dC / dC ratio induced by CuO NPs were less than 1%, which may indicate that CuO NPs do not alter DNA methylation rate *in vitro*. It should be noted that the positive control, cyclophosphamide, did not result in a significant change of DNA methylation either. Therefore, from such results, no specific conclusions may be done for CuO NPs effect on DNA methylation processes in N2A cells.

9.5.6 Micronucleus formation

Chromosomal damage induced by CuO NPs was evaluated using the cytochalasin B-blocked micronucleus assay, in which cell division is blocked to allow the numbering of dividing cells only (binucleated cells, Figure 9.7A). In the untreated cells, micronucleus frequency was less than two per 1000 binucleated cells (Figure 9.8). CuO NP treatments increased significantly the frequency of micronucleus formation at the lowest concentration tested (12.5 mg l⁻¹, $p < 0.05$) and reached as high as 15 micronuclei per 1000 binucleated cells for 100 mg l⁻¹ CuO NPs (Figure 9.8). CuO NPs treatment induced micronuclei of both type I (micronucleus smaller than ¼ the size of the nucleus, Figure 9.7B) and type II (micronucleus between ¼ and ½ the size of the nucleus, Figure 9.7C and D). Type I micronuclei were more frequent in all CuO NPs treatment, with a frequency between 70 and 80%, and did not increase with increasing concentration of CuO NPs. This stability in the Type I:Type II ratio may be an indicator of clastogenic effects however it should be mentioned that total number of micronucleus counted was not sufficient to distinguish with certainty between aneugenic and clastogenic effect of CuO NPs using the micronucleus size-classification approach (Hashimoto *et al.*, 2010).

9.6 Discussion

CuO NPs was previously identified as a highly toxic nanomaterial with effects on cell viability, mitochondrial activity and cellular oxidative balance (Karlsson *et al.*, 2008; Wang

et al., 2011). Previous studies have indicated a potential of CuO NPs to induce DNA damage and activate DNA repair mechanisms in human lung epithelial cells (Karlsson *et al.*, 2008; Ahamed *et al.*, 2010). However, several aspects of the genotoxicity of CuO NPs, such as epigenetic effects or chromosomal alterations, still remained to be investigated. In this study, we further investigated the genotoxic effects of CuO NPs using the N2A mouse neuroblastoma cell lines and compared the genotoxic effects of CuO NPs with its cytotoxicity.

To evaluate the cytotoxicity of NPs, the MTT assay was previously found to be a very sensitive method (Lanone *et al.*, 2009). Using this approach, we were able to determine an EC₅₀ value of $52.34 \pm 17.5 \text{ mg l}^{-1}$ after 24 h of treatment of N2A cells to CuO NPs. In the human cell lines THP-I and A549, EC₅₀ values ranging between 3.89 and 31.07 mg l⁻¹ for 24 h exposure to CuO NPs of 45 nm (Lanone *et al.*, 2009), while Ahamed *et al.* (2010) indicated a 48% decrease of cell viability, using the MTT assay, in A549 cells exposed to 50 mg l⁻¹ CuO NPs of 65 nm. In comparison, N2A sensitivity to CuO NPs effect was lower. Considering that the NPs fraction reaching the brain *in vivo* only accounts for less than 0.02% of total administrated dose, the risk of neurotoxicity of CuO NPs may be less important than for other organs, such as the liver, that accumulate an higher amount of NPs (Lasagna-Reeves *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2011). However, genotoxicity can often be observed at lower concentrations than cytotoxic effects and should be taken into accounts considering that an alteration of DNA integrity may lead to cancer development.

Genotoxicity of CuO NPs was evaluated in N2A cells using different assays to determine the possible alterations of CuO NPs on DNA. Our results indicate that CuO NPs can induce DNA fragmentation and chromosomal damage to N2A cells. Alteration of DNA methylation rate does not appear to be involved in CuO NPs toxicity, however further studies on epigenetic mechanisms should be realized to provide a better conclusion on this aspect of CuO NPs effect in cellular systems. Oxidative stress, indicated by MDA accumulation, was induced by CuO NP treatments from a CuO NPs concentration of 25 mg l⁻¹. Oxidative stress is often considered as the primary mechanisms of NPs toxicity (Nel *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2011). Treatment of A549 cells to CuO NPs resulted in MDA formation, activation of antioxidant enzymes and increased expression of the DNA repair proteins p53 and Rad51 (Ahamed *et al.*, 2010). In this report, the authors hypothesized that genotoxicity of CuO NPs

may be mediated via oxidative stress and lipid peroxidation. In our study, DNA fragmentation and MDA formation were found significantly at the same concentration (25 mg l^{-1}).

The most significant genotoxic effect of CuO NPs in N2A cells was the induction of micronuclei. At 12.5 mg l^{-1} CuO NPs, which is close to the EC_{10} cytotoxicity concentration, micronucleus frequency was already 5 times the negative control value. Other types of NP, such as TiO_2 , SiO_2 and magnetite, were also found to be able to increase the frequency of micronucleus formation *in vitro* (TiO_2 , SiO_2) and *in vivo* (magnetite) (Rahman *et al.*, 2002; Sadeghiani *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007) however this is the first report of micronucleus induction by CuO NPs. Our results indicate that, similarly to TiO_2 and SiO_2 NPs, chromosomal damage induced by CuO NPs in N2A cells occurs at lower concentration than cytotoxicity, oxidative stress or DNA fragmentation (Rahman *et al.*, 2002; Sadeghiani *et al.*, 2005). Preliminary size-classification analysis of micronucleus indicates a clastogenic effect although this specific aspect of CuO NPs genotoxicity will have to be investigated in more details before identifying a mechanism of chromosomal damage induced by CuO NPs.

9.7 Conclusions

In this study, the genotoxic effects of CuO NPs in N2A cells were investigated and compared to cytotoxicity results to provide a better understanding of the toxicological risks of CuO NPs in future nanotechnology development. Using the MTT assay, an EC_{50} cytotoxicity value of $52.34 \pm 17.5 \text{ mg l}^{-1}$ was found after 24 h of exposure to CuO NPs in N2A cells, while significant chromosomal damage was observed from 12.5 mg l^{-1} . In addition, CuO NPs effects induced DNA fragmentation and MDA formation at 25 mg l^{-1} CuO NPs and higher, while no increase in the DNA methylation rate was found by the m^5dC measurement. The most sensitive assay to measure CuO NPs genotoxic effects was the micronucleus assay. Genotoxic evaluation should therefore be an important aspect for future assessment of the toxicological risks of nanomaterials using CuO NPs.

9.8 Acknowledgements

This work was supported by research grants awarded to W.G. Matias by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil), and to R. Popovic by the Natural Sciences and Engineering Research Council (Canada). F. Perreault was supported by a mobility fellowship from the Ministère de l'Éducation, des Loisirs et du Sport du Québec for his work in the LABTOX.

9.9 References

- Ahamed, M., M.A. Siddiqui, M.J. Akhtar, I. Ahmad, A.B. Pant and H.A. Alhadla. 2010. "Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 396, p.578-583.
- Bihari, P., M. Vippola, S. Schultes, M. Praetner, A.G. Khandoga, C.A. Reichel, C. Coester, T. Tuomi, M. Rehberg and F. Krombach. 2008. "Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies". *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 5, p. 1-14.
- Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye". *Anal. Biochem.*, vol. 72, p. 248-254.
- Dastjerdi, R. and M. Montazer. 2010. "A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: Focus on antimicrobial properties". *Colloid. Surfaces B*, vol. 79, p. 5-18.
- Delgado, K., R. Quijada, R. Palma and H. Palza. 2011. "Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent". *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 53, p. 50-54.
- Fenech, M. 2000. "The *in vitro* micronucleus technique". *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutag.*, vol. 455, p. 81-95.
- Gonzalzo, M.L. and P.A. Jones. 1997. "Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation". *Mutat. Res.*, vol. 386, p. 107-118.
- Hashimoto, K., Y. Nakajima, S. Matsumura and F. Chatani. 2010. "An *in vitro* micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens". *Toxicol. in Vitro*, vol. 24, p. 208-216.
- Humpage, A.R., A. Ledreux, S. Fanok, C. Bernard, J.F. Briand, G. Eaglesham, J. Papageorgiou, B. Nicholson and D. Steffensen. 2007. "Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 26, p. 1512-1519.

- Karlsson, H.L. 2010. "The comet assay in nanotoxicology research". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 298, p. 651-666.
- Kouadio, J.H., S.D. Danob, S. Moukha, T.A. Mobio and E.E. Creppy. 2007. "Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells". *Toxicol.*, vol. 49, p. 306-317.
- Lanone, S., F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix and P. Hoet. 2009. "Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines". *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 6, p. 1-12.
- Lasagna-Reeves, C., D. Gonzalez-Romero, M.A. Barria, I. Olmedo, A. Clos, V.M. Sadagopa Ramanujam, A. Urayama, L. Vergara, M.J. Kogan and C. Soto. 2010. "Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 393, p. 649-655.
- Li, Y.-F. and C. Chen. 2011. "Fate and Toxicity of Metallic and Metal-Containing Nanoparticles for Biomedical Applications". *Small*, vol. 7, p. 2965-2980.
- Marnett, L.J. 1999. "Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde". *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mugag.*, vol. 424, p. 83-95.
- Matias, W.G. and E.E. Creppy. 1998. "5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells". *Environ. Toxic. Water*, vol. 13, p. 83-88.
- Nel, A., T. Xia, L. Madler and N. Lin. 2006. "Toxic potential of materials at the nano-level". *Science*, vo. 311, p. 622-627.
- Oszlanczi, G., T. Vezer, L. Sarkozi, E. Horvath, Z. Konya and A. Papp. 2010. "Functional neurotoxicity of Mn-containing nanoparticles in rats". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 73, p. 2004-2009.
- Ouanes, Z., S. Abid, I. Ayed, R. Anane, T. Mobio, E.E. Creppy and H. Bacha. 2003. "Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E". *Mutat. Res.*, vol. 538, p. 63-70.
- Park, E.-J., H. Kim, Y. Kim and K. Choi. 2010. "Repeated-dose toxicity attributed to aluminum nanoparticles following 28-day oral administration, particularly on gene expression in mouse brain". *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 93, p. 120-133.

- Peralta-Videa, J.R., L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong and J.L. Gardea-Torresdey. 2011. "Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010". *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, p. 1-15.
- Perreault, F., M.S. Matias, S.P. Melegari, C.R.S Carvalho Pinto, E.E. Creppy, R. Popovic and W.G. Matias. 2011. "Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, p. 1021-1026.
- Rahman, Q., M. Lohani, E. Dopp, H. Pemsel, L. Jonas, D.G. Weiss and D. Schiffmann. 2002. "Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts". *Environ. Health Perspect.*, vol. 110, p. 797-800.
- Ren, G., D. Hu, E.W.C. Cheng, M.A. Vargas-Reus, P. Reip and R.P. Allaker. 2009. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". *Int. J. Antimicrob. Ag.*, vol. 33, p. 587-590.
- Sadeghiani, N., L.S. Barbosa, L.P. Silva, R.B. Azevedo, P.C. Morais, Z.G.M. Lacava. 2005. "Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid". *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 289, p. 466-468.
- Shukla, R.K., V. Sharma, A.K. Pandey, S. Singh, S. Sultana and A. Dhawan. 2011. "ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells". *Toxicol. In Vitro*, vol. 25, p. 231-241.
- Singh, N., B. Manshian, G.J.S. Jenkins, S.M. Griffiths, P.M. Williams, T.G.G. Maffei, C.J. Wright and S.H. Doak. 2009. "NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials". *Biomaterials*, vol. 30, p. 3891-3914.
- Skocaj, M., M. Filipic, J. Petkovic and S. Novak. 2011. "Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?". *Radiol. Oncol.*, vol. 45, p. 227-247.
- Slade D, A.B. Lindner, G. Paul and M. Radman M. 2009. "Recombination and Replication in DNA Repair of Heavily Irradiated *Deinococcus radiodurans*". *Cell*, vol. 136, p. 1044-1055.
- Tsoli, M., H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche and G. Schmid. 2005. "Cellular Uptake and Toxicity of Au₅₅ Clusters". *Small*, vol. 1, p. 841-844.
- Wang, J.J., B.J.S. Sanderson and H. Wang. 2007. "Cytotoxicity and Genotoxicity of Ultrafine Crystalline SiO₂ Particulate in Cultured Human Lymphoblastoid Cells". *Environ. Mol. Mutag.*, vol. 48, p. 151-157.
- Wang, Y., W.G. Aker, H.-M. Hwang, C.G. Yedjou, H. Yu and P.B. Tchounwou. 2011. "A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using

- catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells". *Sci. Total Environ.*, vol. 409, p. 4753-4762.
- Xie, G., C. Wang, J. Sun and G. Zhong. 2011. "Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles". *Toxicol. Lett.*, vol. 205, p. 55-61.
- Yasuharu, N. and I. Naoharu. 2006. "Genotoxicity in Cell Lines Induced by Chronic Exposure to Water-Soluble Fullerenes Using Micronucleus Test". *Environ. Health Prev. Med.*, vol. 11, p. 292-297.
- Zhao, J., Z. Wang, X. Liu, X. Xie, K. Zhang and B. Xing. 2011. "Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity". *J. Hazard. Mater.*, vol. 197, p. 304-310.
- Zhivotosky, B. and S. Orrenius. 2001. "Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria". *Curr. Protoc. Cell Biol.*, vol. 18, Unit 18.3.
- Zukiel, R., S. Nowak, A.-M. Barciszewska, I. Gawronska, G. Keith and M.Z. Barciszewska. 2004. "A Simple Epigenetic Method for the Diagnosis and Classification of Brain Tumors". *Mol. Cancer Res.*, vol. 2, p. 196-202.

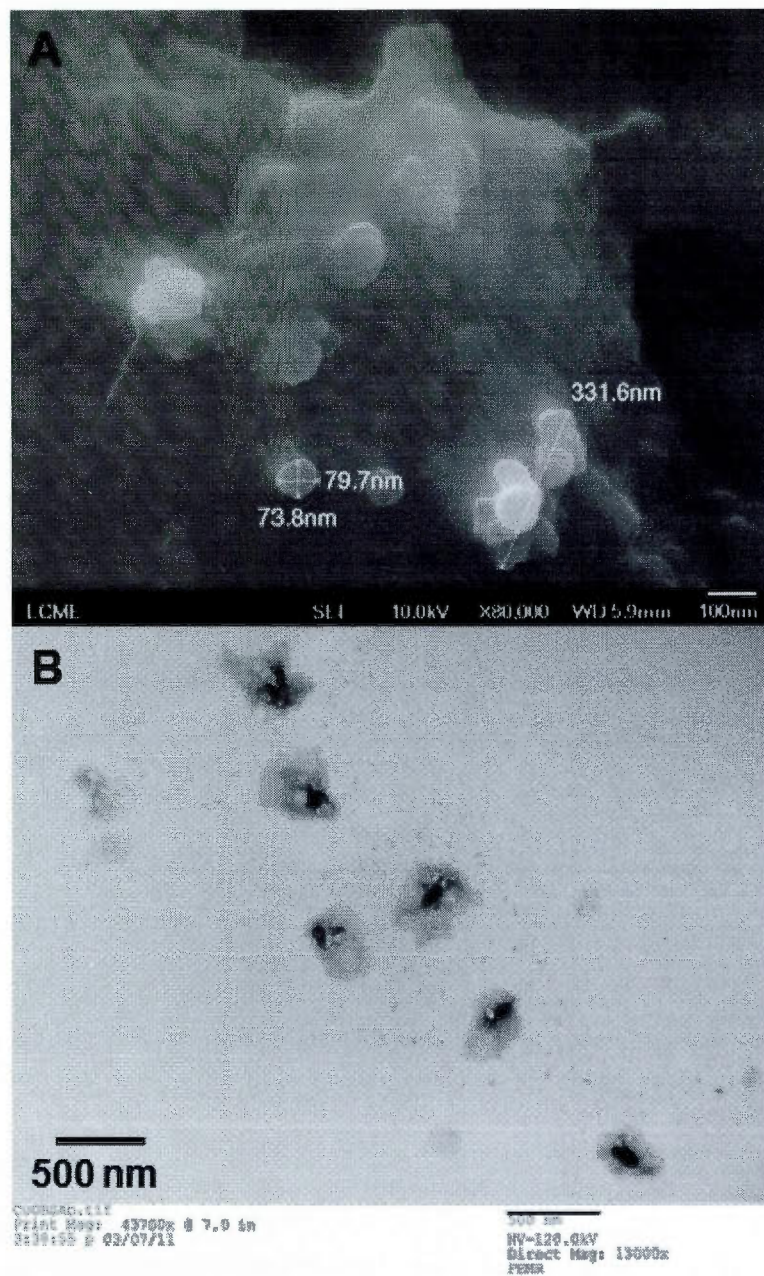


Figure 9.1 A. SEM microscopy picture of CuO NPs in water. B. TEM microscopy picture of CuO NPs in the culture media.

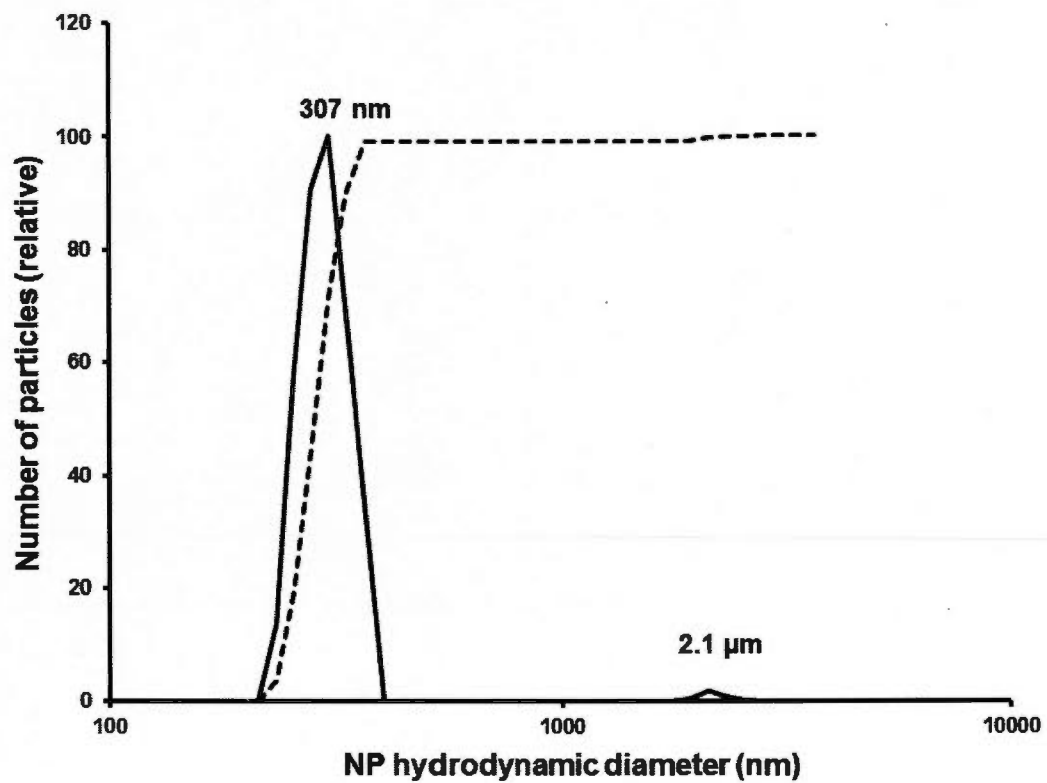


Figure 9.2 Size distribution of BSA-coated CuO NPs in the culture media. Bold line indicates the size distribution of NPs. The dashed line indicates the cumulative total fraction of particles.

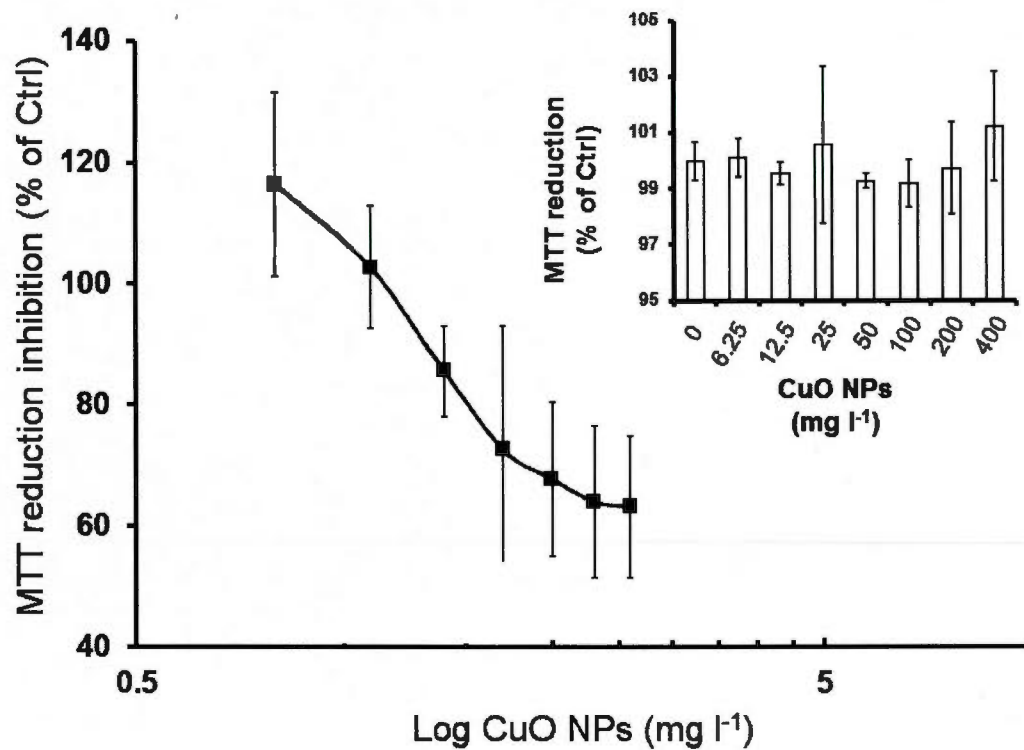


Figure 9.3 Change of N2A cell viability after 24h of exposure to CuO NPs. Cell viability was determined using the mitochondrial MTT assay (n=3). Insert : Change in MTT reduction induced by CuO NPs alone.

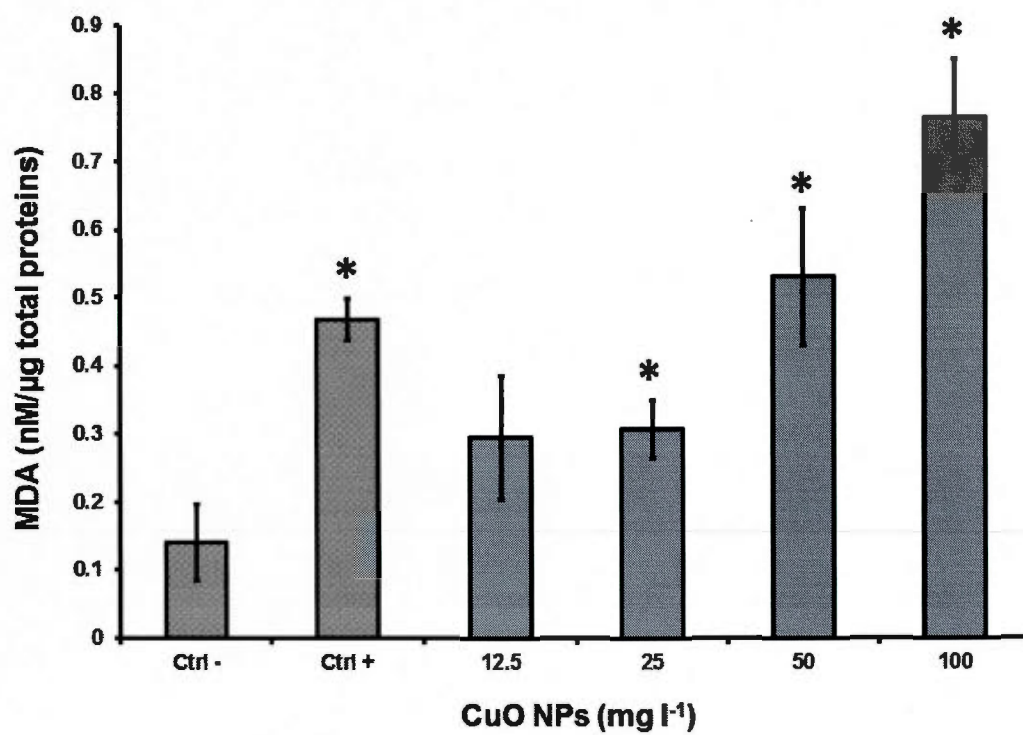


Figure 9.4 MDA concentrations in N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide was used as a positive control (n=3).

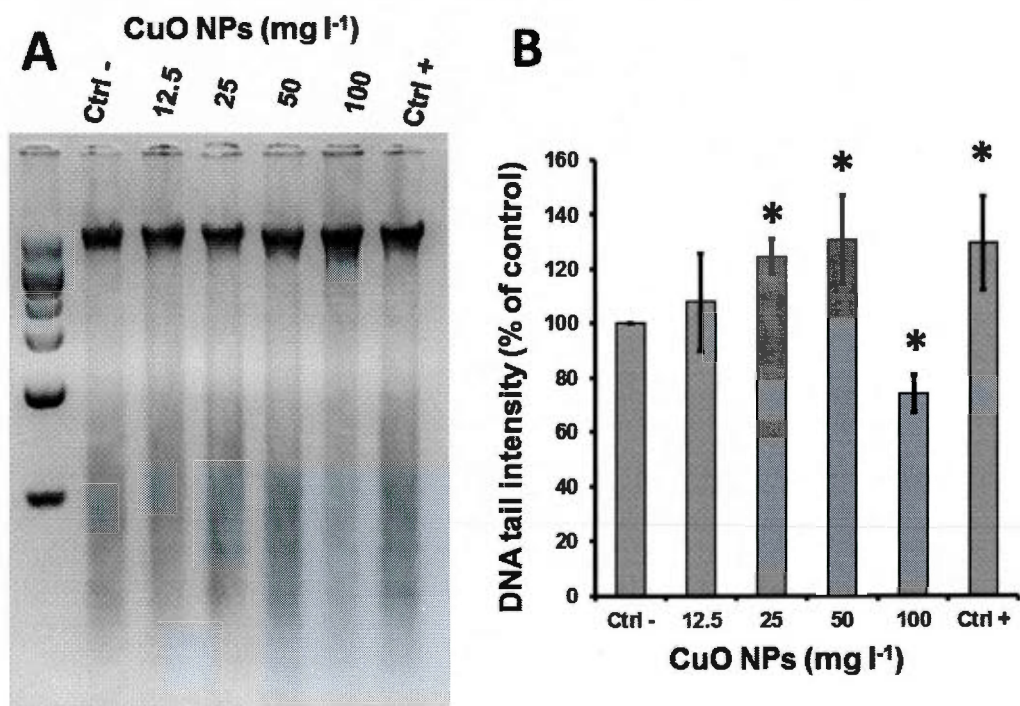


Figure 9.5 DNA fragmentation in N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide was used as a positive control. A. Agarose gel electrophoresis of Neuro-2A DNA extracts; B. Image analysis of DNA band intensity (n=3 gels).

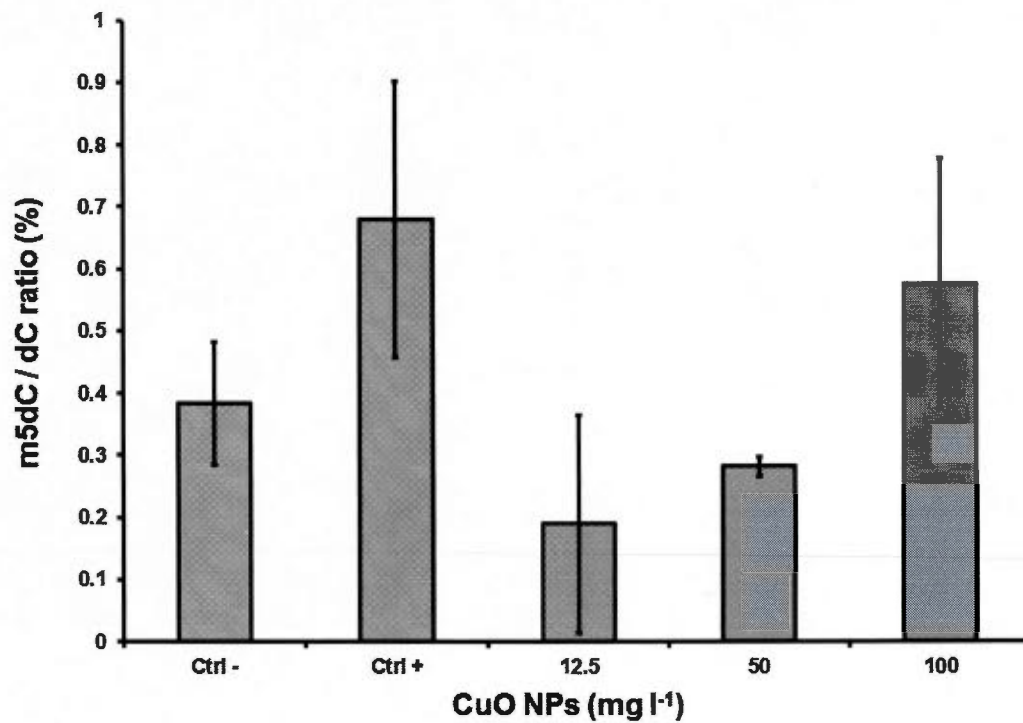


Figure 9.6 Change in the ratio m5dC/(dC+m5dC) in DNA extracts of N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide was used as a positive control (n=3).

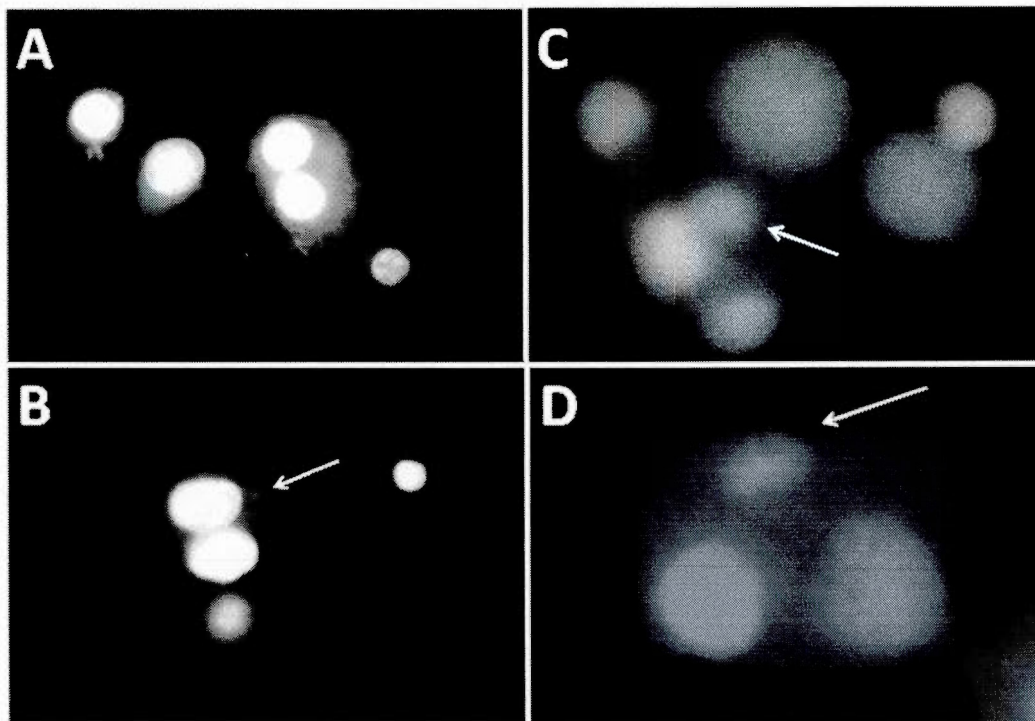


Figure 9.7 Examples of control (A) and micronucleated cells (B,C,D) for N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l⁻¹ CuO NPs.

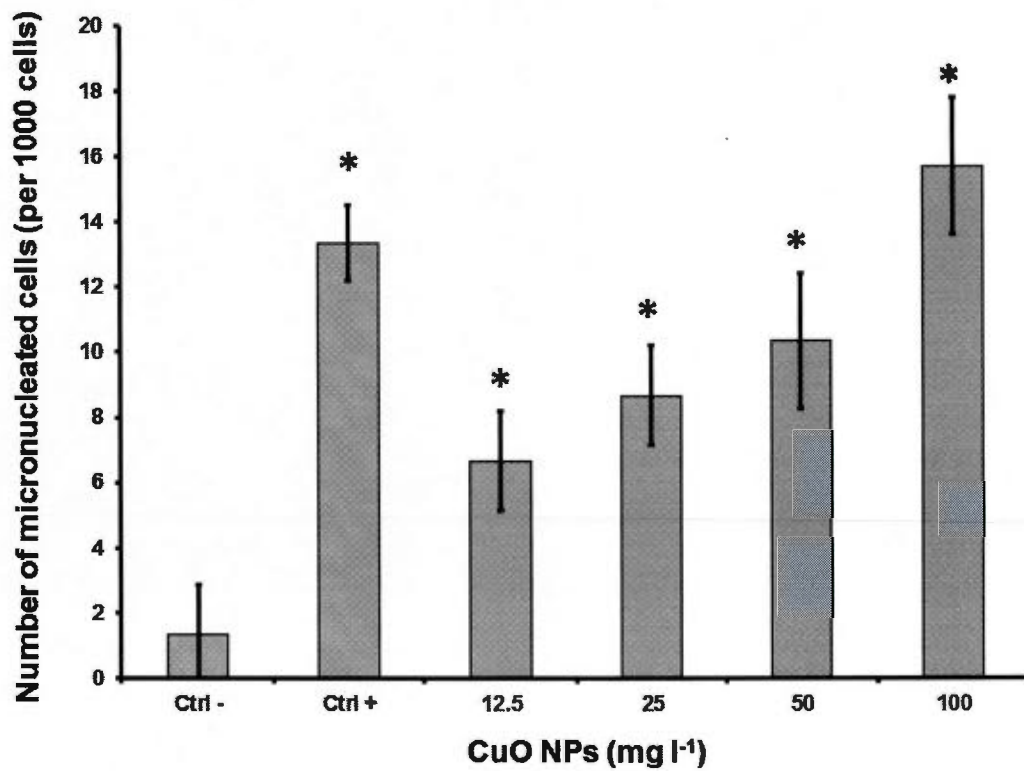


Figure 9.8 Micronucleus count in N2A cells after a 24h exposure to 12.5, 25, 50 and 100 mg l⁻¹ CuO NPs. Cyclophosphamide (1 mg l⁻¹) was used as a positive control (n=3).

CHAPITRE X

CONCLUSION

10.1 Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne en nanotoxicologie

Dans la première partie de cette thèse, les effets des NPs de CuO sur l'activité photosynthétique du macrophyte aquatique *L. gibba* ont été évalués en utilisant la fluorescence chlorophyllienne comme indicateur de l'activité photosynthétique. Nous avons montré l'effet inhibiteur des NPs de CuO sur le transport d'électrons photosynthétique à l'aide de l'imagerie de fluorescence chlorophyllienne mesurée en microplaque. Cette approche expérimentale permet une analyse rapide et à haut débit de l'effet des NPs sur l'activité photosynthétique. Au chapitre IV, l'effet inhibiteur des NPs de CuO encapsulées dans un polymère sur l'activité du PSII a été montré. L'inhibition de l'activité photosynthétique chez *L. gibba* exposée à ces NPs était caractérisé par une diminution de la capacité du PSII à convertir l'énergie lumineuse en transport d'électrons (Φ_{MII}) et une diminution du transport d'électrons du PSII à l'état d'équilibre (Φ'_{MII} et qP). À l'état d'équilibre, le changement de Φ'_{MII} est connu pour être également associé au changement de la fixation du CO₂ par le cycle de Calvin-Benson (Krall et Edwards, 1992), un effet qui a été montré chez la plante aquatique *Elodea densa* exposée aux NPs de CuO (Nekrasova *et al.*, 2011). L'utilisation de *L. gibba* présente plusieurs avantages pour la réalisation d'essais écotoxicologiques par la possibilité de réaliser les essais en microplaques à l'aide de l'imagerie de fluorescence chlorophyllienne. Toutefois, il apparaît également que *L. gibba* est moins sensible que d'autres modèles pour évaluer la toxicité des NPs de CuO puisque les concentrations induisant une inhibition du PSII étaient de 10 à 100 fois supérieures à celles observées chez les algues vertes ou chez d'autres plantes supérieures aquatiques (Saison *et al.*, 2010 ; Nekrasova *et al.*, 2011 ; Shi *et al.*, 2011). Pour le développement de bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne, il serait donc intéressant d'évaluer la sensibilité de différentes lentilles d'eau, comme *L. minor*, *Landoltia punctata* ou *Spirodela polyrrhiza* afin d'identifier l'espèce la plus sensible aux effets des NPs. La simplicité de l'imagerie de fluorescence chlorophyllienne en microplaque offre cependant de grands avantages pour le développement de bioessais standardisés en écotoxicologie des nanomatériaux.

L'utilisation de la fluorescence chlorophyllienne a également permis d'étudier les mécanismes de toxicité des NPs de CuO chez *L. gibba* (Chapitre V). L'effet des NPs de CuO a été comparé à celui du cuivre ionique afin de déterminer si les deux formes de cuivre possèdent le même mode d'action sur l'appareil photosynthétique. Deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour caractériser l'inhibition du transport d'électrons photosynthétique par le cuivre ionique et les NPs de CuO : la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne, une mesure spécifique de la capacité du PSII pour le transport d'électrons, et la fluorométrie PAM qui intègre l'ensemble des processus cellulaires affectant l'état d'équilibre du transport d'électrons entre le PSII, le PSI et la fixation du CO₂ dans le cycle de Calvin-Benson. Nos résultats indiquent que le cuivre ionique a un effet inhibiteur plus important que les NPs de CuO. La comparaison des changements des différents paramètres décrivant le flux d'énergie dans les membranes photosynthétiques ou les différentes voies de dissipation d'énergie du PSII indique cependant que, pour un même effet sur la capacité maximale du PSII pour le transport d'électrons, le cuivre ionique et les NPs de CuO ont un effet similaire. Ces résultats, obtenus par deux approches différentes de fluorescence chlorophyllienne, montrent donc que les processus photosynthétiques de *L. gibba* sont affectés par le même mode d'action pour le cuivre ionique que pour les NPs de CuO. La distinction entre les effets des NPs de CuO et des ions libérés par les NPs est complexe à établir et les résultats observés dans les différentes études ayant abordé la question sont souvent contradictoire (voir section 1.4.3). Cette étude constitue la première indication que l'effet des NPs de CuO sur la photosynthèse est causé par la solubilisation des NPs en ions toxiques. Le rôle prépondérant de la solubilisation des NPs en ions libres dans l'inhibition de l'activité du PSII avaient également été montré pour l'algue verte *C. reinhardtii* exposée aux NPs d'argent (Navarro *et al.*, 2008). Toutefois, cette conclusion ne peut être appliquée à tout les types de NPs métalliques puisque certaines NPs, comme les points quantiques de CdSe/ZnS, ont montré un effet sur l'activité photosynthétique indépendant de la solubilisation en ions (Lin *et al.*, 2009). Les facteurs qui déterminent le mode d'action des NPs métalliques sur l'activité photosynthétique restent encore à être établis pour une plus grande variété de NPs métalliques.

10.2 Effet de la modification de surface sur la toxicité des nanoparticules

Dans la deuxième partie de cette thèse, l'effet de la modification de la surface des NPs de CuO par un polymère organique a été étudié afin de mieux comprendre comment les propriétés de surface peuvent modifier la toxicité des NPs métalliques. Nos résultats du chapitre IV montrent que l'effet inhibiteur des NPs de CuO encapsulées sur l'activité photosynthétique de *L. gibba* ne peut être expliqué par la solubilisation des NPs dans le milieu ou par la présence du polymère organique. L'étude des mécanismes de toxicité des NPs de CuO chez les organismes photosynthétiques fut donc approfondie en évaluant la contribution des phénomènes de surface liés à la taille nanométrique des NPs et de la pénétration intracellulaire des NPs (effet « Cheval de Troie »).

Au chapitre VI, l'effet de la modification des propriétés de surface des NPs de CuO sur leur toxicité a été étudié chez l'algue *C. reinhardtii*. La toxicité des NPs de CuO nues ou encapsulées dans un polymère a été comparée en utilisant des indicateurs de toxicité basés sur l'activité du PSII et la formation d'ERO. L'encapsulation des NPs de CuO permet de réduire l'agglomération et la solubilisation des NPs dans le milieu sans toutefois modifier leur charge de surface (potentiel zeta) ou leur potentiel photocatalytique. L'encapsulation des NPs de CuO augmente la toxicité chez *C. reinhardtii* en comparaison des NPs de CuO nues. La toxicité accrue des NPs de CuO encapsulées fut associée à leur plus grande capacité à pénétrer dans la cellule pour s'accumuler dans le compartiment cytoplasmique. Ces résultats nous permettent de conclure que la toxicité accrue des NPs de CuO encapsulées chez les organismes photosynthétiques est causée par une action intracellulaire des NPs. Cette conclusion est en accord avec l'effet « Cheval de Troie » qui avait été démontré pour les NPs de CuO chez les cellules humaines HeLa (Studer *et al.*, 2010). Chez la lentille d'eau *L. punctata* exposée aux NPs de CuO, l'accumulation de NPs dans la plante fut également identifiée comme un facteur important dans l'induction de la toxicité (Shi *et al.*, 2011). L'encapsulation des NPs de CuO dans un polymère peut donc augmenter le risque écotoxicologique de ce type de nanoparticule.

Au chapitre VII, les mécanismes de toxicité des NPs de CuO nues et encapsulées dans un polymère ont été étudiés en comparaison aux effets du cuivre ionique chez *L. gibba*. La toxicité des NPs de CuO nues et encapsulées a été évaluée en relation avec l'accumulation

de cuivre dans l'organisme en utilisant différents indicateurs de toxicité basés sur l'activité photosynthétique, l'activité des enzymes estérases et la formation d'ERO. Nos résultats indiquent que la toxicité des NPs de CuO nues est causée principalement par la solubilisation des NPs en cuivre ionique alors que les NPs de CuO encapsulées induisent une formation d'ERO beaucoup plus importante que le cuivre sous forme ionique. La modification des propriétés de surface des NPs de CuO par l'encapsulation dans un polymère modifie donc leur mécanisme d'action sur la cellule par l'implication des ERO dans la réponse toxique cellulaire.

L'encapsulation des NPs dans un polymère, en modifiant les propriétés physico-chimiques des NPs, peut influencer la stabilité (Kirchner *et al.*, 2005), la pénétration, la localisation intracellulaire (Asati *et al.*, 2010) et la solubilité des NPs métalliques (Studer *et al.*, 2010). Tous ces facteurs peuvent participer dans la toxicité accrue des NPs de CuO encapsulées. Nos résultats indiquent qu'un mécanisme de toxicité autre que la solubilisation des NPs de CuO en Cu^{2+} agit dans la toxicité des NPs de CuO encapsulées. Pace *et al.* (2010) ont observé un phénomène semblable avec des points quantiques de CdSe/ZnS encapsulés dans un oxyde de polyéthylène chez *Daphnia magna*, où la solubilisation des NPs ne participait pas à la toxicité. Cet effet associé spécifiquement aux NPs de CuO encapsulées peut être lié à la nature du polymère organique sur la surface des NPs, tel que montré par Asati *et al.* (2010) pour des cellules animales, ou à la nature nanométrique des particules de CuO lorsque stabilisées par le polymère, comme suggéré par Kirchner *et al.* (2005). Une investigation future de l'effet de NPs de CuO de différentes tailles ou stabilisées par des polymères différents pourra permettre de déterminer avec plus de certitude la nature du mécanisme de toxicité unique des NPs de CuO encapsulées.

10.3 Effet des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques

La toxicité des nanomatériaux est dépendante des propriétés physico-chimiques tel que la taille, la nature chimique ou la charge de surface. Toutefois, la nature des interactions entre les nanomatériaux et les systèmes biologiques dépend également des propriétés cellulaires du modèle considéré, comme cela fut démontré pour les fullerènes (Chen *et al.*,

2010). Dans le cadre de ce projet de recherche, la toxicité de deux types de NPs métalliques, les NPs d'or et de CuO, a été évaluée chez différents modèles biologiques.

La relation entre la sensibilité de différents modèles biologiques aux effets des NPs et le changement des propriétés des NPs en conditions biologiques a été évaluée au chapitre VIII. Nos résultats montrent que les NPs d'or-PAMAM, un nanocomposite utilisé dans la recherche pharmaceutique, étaient toxiques pour deux espèces de microorganismes aquatiques (*C. reinhardtii* et *V. fischeri*) alors que les cellules animales (N2A et Vero) n'étaient pas affectées par l'exposition aux NPs or-PAMAM. Les différences entre les propriétés cellulaires des différents modèles biologiques, comme la plus grande fluidité des membranes cellulaires animales, peuvent expliquer une partie de la différence de sensibilité observée entre les différents modèles (Chen *et al.*, 2010). Cependant, la modification des propriétés physico-chimiques des NPs or-PAMAM dans les différents milieux peut également affecter la toxicité des NPs d'or-PAMAM. Le changement du spectre d'absorption des NPs or-PAMAM dans le milieu de culture des cellules animales indique une modification des propriétés de surface des NPs qui peut expliquer la faible toxicité des NPs or-PAMAM. Cette hypothèse a été vérifiée en exposant l'algue verte *C. reinhardtii* à des NPs or-PAMAM modifiées par le milieu RPMI. Cette étude révèle la nécessité de caractériser les propriétés des NPs dans le milieu biologique utilisé lors des tests de toxicité des nanomatériaux. Dans les tests *in vitro* utilisés pour évaluer la toxicité sur des cellules de mammifères, les NPs sont fréquemment liées par les protéines que l'on retrouve en abondance dans les milieux de cultures, ce qui modifie significativement leur toxicité (Lundqvist *et al.*, 2008 ; Maiorano *et al.*, 2010). Dans les tests écotoxicologiques, les concentrations en ions et les pH variables vont influencer la stabilité des NPs en suspension et entraîner la formation d'agglomérats de taille variable selon le milieu de culture (French *et al.*, 2009 ; Shih *et al.*, 2012). Ces interactions entre le milieu de culture et les NPs vont modifier l'effet toxique des NPs (Mukherjee *et al.*, 2010 ; Oukarroum *et al.*, 2012). Pour l'évaluation du risque toxicologique des nanomatériaux, cet effet du milieu doit donc être considéré. L'application des tests de toxicité sur une diversité d'organismes comprenant des milieux de culture différents peut permettre d'obtenir une évaluation plus complète des risques que peut entraîner l'utilisation des nanomatériaux.

Les effets des NPs de CuO sur les cellules animales ont été étudiés en conditions *in vitro* chez la lignée cellulaire N2A (chapitre IX). Chez ce type de cellule, nous avons montré que les NPs de CuO sont cytotoxiques avec une EC_{50} de 52.34 mg l⁻¹, ce qui indique que la sensibilité des cellules N2A est légèrement inférieure à celle observée pour les monocytes THP-1 ou les cellules pulmonaires A549 (Lanone *et al.*, 2009 ; Ahamed *et al.*, 2010). Les NPs de CuO induisent également une peroxydation des lipides et des dommages au niveau de l'ADN et des chromosomes, indiqués par la fragmentation de l'ADN et l'augmentation de la fréquence des micronoyaux. Le test du micronoyau indique un effet important sur l'intégrité des chromosomes à des concentrations plus faible que celles nécessaires pour induire une cytotoxicité, ce qui démontre que les effets génotoxiques des NPs de CuO sont un aspect important de leur toxicité au niveau cellulaire. Considérant l'impact que peuvent avoir les effets génotoxiques sur le développement de cancer ou la fertilité, la considération des effets génotoxiques dans l'évaluation des risques toxicologiques des nanomatériaux doit avoir une place prépondérante, particulièrement lorsque le risque d'exposition humaine est élevé. Le risque d'interaction entre les essais standards de génotoxicité et les NPs est un élément qui doit cependant être considéré lors de l'évaluation de la toxicité (Doak *et al.*, 2009). Dans ce travail de recherche, l'absence d'interaction entre le test de MTT et les NPs de CuO a été démontrée, validant ainsi cet essai pour l'évaluation de la toxicité des NPs de CuO. Pour l'essai du micronoyau, il a été montré que la cytochalasine B utilisée dans les tests standardisés du micronoyau pour inhiber la division cellulaire bloque également l'endocytose, une voie majeure d'entrée des NPs dans la cellule. Ainsi, pour obtenir une réponse toxique fiable, l'exposition des cellules aux NPs doit être réalisée avant l'addition de la cytochalasine B, tel que recommandé par Magdolenova *et al.* (2012). L'évaluation du risque toxicologique par une batterie de bioessais différents est cependant recommandée pour obtenir une information complète de la génotoxicité (Singh *et al.*, 2009). Considérant l'effet génotoxique important des NPs de CuO, une évaluation future des différents bioessais de génotoxicité, comme l'essai de comète, le test de Ames et la mesure des sous-produits de l'oxydation de l'ADN (8-oxo-7,8-dihydroguanine), en complément de l'essai du micronoyau, afin de mieux comprendre les effets NPs de CuO sur le matériel génétique et d'identifier les essais les plus sensibles sera nécessaire. De plus, en considérant les conclusions obtenues au

chapitre V, il sera important d'évaluer l'importance de la solubilisation des NPs de CuO dans la réponse génotoxique des cellules.

10.4 Conclusion générale

L'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des NPs métalliques, principalement les NPs de CuO et d'or, afin de favoriser une meilleure gestion des risques de l'utilisation des NPs métalliques dans les applications issues de la nanotechnologie. Les résultats issus de cette thèse contribuent à l'avancement des connaissances sur trois aspects fondamentaux de la toxicologie des NPs métalliques : 1) les mécanismes de toxicité des NPs de CuO chez les organismes photosynthétiques ; 2) l'effet de la modification des propriétés de surface sur la toxicité des NPs de CuO chez les organismes photosynthétiques ; 3) la caractérisation des effets des NPs métalliques chez différents modèles biologiques.

Sur la base de cette thèse, nous pouvons conclure que les NPs métalliques sont toxiques pour plusieurs types d'organismes. Les NPs de CuO induisent une inhibition du transport d'électrons photosynthétique, la formation d'ERO dans la cellule, l'inhibition de l'activité des enzymes estérases et réduisent la formation de biomasse. Chez les cellules animales, ces NPs inhibent l'activité mitochondriale, induisent une peroxydation des lipides et altèrent l'intégrité du matériel génétique cellulaire. Nous avons montré que la toxicité des NPs de CuO et d'or-PAMAM est dépendante de ses propriétés physico-chimiques. Nous avons également montré que la modification de la surface des NPs de CuO modifie leur toxicité chez les algues et les macrophytes aquatiques. Finalement, les mécanismes de toxicité des NPs de CuO chez les organismes photosynthétiques ont été clarifiés. Nous avons montré que les NPs de CuO pénètrent à l'intérieur des cellules et que cette fraction intracellulaire participait significativement à la réponse toxique des cellules exposées aux NPs. Nos résultats nous permettent de conclure que les propriétés de surface des NPs ont un rôle important dans la détermination des mécanismes de toxicité des NPs. Les NPs métalliques, selon leurs propriétés physico-chimiques, peuvent donc induire des effets différents de ceux causés par leurs composantes métalliques en solution.

La solubilisation des NPs métalliques en ions métalliques toxiques apparaît comme un élément majeur de la toxicité des NPs. Cet élément devrait donc être traité avec une attention particulière lors de l'évaluation des risques liés à des nanomatériaux à base de métaux toxiques. La capacité des NPs à pénétrer et à s'accumuler dans la cellule implique également un risque important pour la santé et les écosystèmes. En effet, on possède actuellement peu d'information sur comment les nano-contaminants sont transférés dans la chaîne trophique. La nature unique des nanomatériaux peut impliquer un risque de transfert et d'accumulation différent des contaminants classiques qui reste encore à évaluer.

Dans le contexte du risque écotoxicologique des nanomatériaux, l'altération de la toxicité des NPs métalliques lorsque leurs propriétés de surface sont modifiées implique que l'évaluation des risques de toxicité des nanomatériaux dans l'environnement peut être complexe. Dans l'environnement, la liaison de différents composés à la surface des NPs, comme des substances humiques, des protéines ou des molécules organiques, va altérer la chimie de surface des NPs. La nature des interactions entre les NPs et les systèmes biologiques peut donc en conséquence être modifiée. Afin de mieux prévoir le risque écotoxicologique du développement des nanotechnologies et de l'introduction des nanomatériaux dans les écosystèmes, le type de liaison que ceux-ci peuvent faire avec les composantes du milieu et comment ces interactions affectent les propriétés physico-chimiques devront être évalués. Avec la diversification rapide des nanotechnologies, la compréhension du rôle des propriétés de surface des nanomatériaux dans l'induction de la réponse toxique des cellules devient un enjeu majeur pour mieux évaluer leur toxicité et ainsi favoriser un développement sécuritaire des nanotechnologies.

AUTRES CONTRIBUTIONS

Sur le sujet de la nanotoxicologie:

Perreault, F., N. Bogdan, M. Morin, J. Claverie et R. Popovic. 2012. "Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 109-120.

Oukarroum, A., S. Bras, **F. Perreault** et R. Popovic. 2012. "Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 78, p. 80-85.

Oukarroum, A., S. Polchtchikov, **F. Perreault** et R. Popovic. 2012. "Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 19, p. 1755-1762.

Oukarroum, A., **F. Perreault**, L. Pirastru et D. Dewez. 2012. "Cytotoxicity effect of silver nanoparticles in green alga *Chlorella vulgaris* determined by flow cytometry parameters". *Proceedings of the 3rd International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, article ID 163.

Saison, C., **F. Perreault**, Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M. et R. Popovic. 2010. "Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, p. 109-114.

Sur le sujet de la toxicologie environnementale:

Perreault, F., M.S. Matias, A. Oukarroum, W.G. Matias et R. Popovic. 2012. "Okadaic acid inhibits cell growth and photosynthetic electron transport in the alga *Dunaliella tertiolecta*". *Sci. Total Environ.*, vol. 414, p. 198-204.

Perreault, F., M.S. Matias, S.P. Melegari, C.R.S. de Carvalho Pinto, E.E. Creppy, R. Popovic et W.G. Matias. 2011. "Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, p. 1021-1026.

Melegari, S.P., **F. Perreault**, S. Moukha, R. Popovic, E.E. Creppy et W.G. Matias. 2012. "Induction of oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in animal and algal cells". *Chemosphere*, vol. 89, p. 38-43.

Oukarroum, A., **F. Perreault** et R. Popovic. 2012. "Interactive effects of temperature and copper on photosystem II photochemistry in *Chlorella vulgaris*". *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 110, p. 9-14.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahamed, M., M.A. Siddiqui, M.J. Akhtar, I. Ahmad, A.B. Pant et H.A. Alhadla. 2010. "Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 396, p.578-583.
- Aitken, R.J., M.Q. Chaudhry, A.B.A Boxall and M. Hull. "Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends". *Occup. Med.*, vol. 56, p. 300-306.
- Alkilany, A.M., P.K. Nagaria, C.R. Hexel, T.J. Shaw, C.J. Murphy et M.D. Wyatt. 2009. "Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects". *Small*, vol. 5, p. 701-708.
- Allaker, R.P. 2010. "The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation". *J. Dent. Res.*, vol. 89, p.1175-1186.
- Anandan, S. et S. Yang. 2007. "Emergent methods to synthesize and characterize semiconductor CuO nanoparticles with various morphologies – an overview". *J. Exp. Nanosci.*, vol. 2, p. 23-56.
- Arnall, A.H. 2003. *Future Technologies, Today's Choices*. London: Greepeace Environmental Trust, 69 p.
- Arora, S., J.M. Rajwade et K.M. Paknikar. 2012. "Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 258, p. 151-165.
- Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets et A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Sci. Total Environ.*, vol. 407, p. 1461-1468.
- Asati, A., S. Santra, C. Kaittanis et J.M. Perez. 2010. "Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles". *ACS Nano*, vol. 4, p. 5321-5331.
- Avenson, T.J., A. Kanazawa, J.A. Cruz, K. Takizawa, W.E. Ettinger et D.M. Kramer. 2005. "Integrating the proton circuit into photosynthesis: progress and challenges". *Plant Cell Environ.*, vol. 28, p. 97-109.
- Baalousha, M. 2009. "Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter". *Sci. Total Environ.*, vol. 407, p. 2093-2101.
- Baker, N.R. 2008. "*Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo*". *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 59, p. 89-113.

- Batley GE and McLaughlin MJ. 2010. *Fate of manufactured nanomaterials in the Australian environment*. CSIRO report for the Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities, 76p.
- Baek, Y.-W. et Y.-J. An. 2011. "Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*". *Sci. Total Environ.*, vol. 409, p. 1603-1608.
- Ben-Moshe, T., I. Dror et B. Berkowitz. 2010. "Transport of metal oxide nanoparticles in saturated porous media". *Chemosphere*, vol. 81, p. 387-393.
- Biricova, V. et A. Laznickova. 2009. "Dendrimers: Analytical characterization and applications". *Bioorg. Chem.*, vol. 37, p. 185-192.
- Blaise, C., F. Gagné, J.F. Férard et P. Eullaffroy. 2008. "Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms". *Environ. Toxicol.*, vol. 23, p. 591-598.
- Blankenship, R. E. 2002. "Molecular mechanisms of Photosynthesis". Oxford : Blackwell Science Ltd., pp. 328.
- Blokhina, O. et K.V. Fagerstedt. 2010. "Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems". *Physiol. Plantarum*, vol. 138, p. 447-462.
- Bogdan, N. 2009. «Nanoparticules recouvertes de carbohydrates comme biocapteurs de lectines». Thèse de doctorat, Montréal, Université Concordia, 480 p.
- Bouwmeester, H., I. Lynch, H.J.P. Marvini, K.A. Dawson, M. Berges, D. Braguer, H.J. Byrne, A. Casey, G. Chambers, M.J.D. Clift, G. Elia, T.F. Fernandes, L.B. Fjellsbo, P. Hatto, L. Juillerat, C. Klein, W.G. Kreyling, C. Nickel, M. Riediker et V. Stone. "Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices". *Nanotoxicology*, vol. 5, p. 1-11.
- Boverhof, D.R. et R.M. David. 2010. "Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, p. 953-961.
- Boxall, A.B.A., Q. Chaudhry, C. Sinclair, A. Jones, R. Aitken, B. Jefferson et C. Watt. 2007. *Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles*. York: Central Science Laboratory, 89 p.
- Brain, R.A. et K.R. Solomon. 2007. "A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with *Lemna gibba*". *Nature Protocols*, vol. 2, p. 979-987.
- Brain, R.A. et N. Cedergreen. 2008. "Biomarkers in Aquatic Plants: Selection and Utility". *Rev. Environ. Contam. T.*, vol. 198, p. 49-109.

- Brewer, G.J. 2010. "Risks of Copper and Iron Toxicity during Aging in Humans". *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 23, p. 319-326.
- Brown, C.L., M.W. Whitehouse, E.R.T. Tiekink and G.R. Bushell. 2008. "Colloidal metallic gold is not bio-inert". *Inflammopharmacology*, vol. 16, p. 133-137.
- Campbell, P.G.C. et Y. Couillard. 2004. "Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques". Dans *Écotoxicologie Moléculaire*. Editeurs, E. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau, p. 10-61. Canada, Presses de l'Université du Québec.
- Cardol, P., G. Forti et G. Finazzi. 2011. "Regulation of electron transport in microalgae". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1807, p. 912-9188.
- Chang, E., N. Thekkek, W.W. Yu, V.L. Colvin et R. Drezek. 2006. "Evaluation of Quantum Dot Cytotoxicity Based on Intracellular Uptake". *Small*, vol. 2, p. 1412-1417.
- Chen, K.L. et M. Elimelech. 2008. "Interaction of Fullerene (C₆₀) Nanoparticles with Humic Acid and Alginate Coated Silica Surfaces: Measurements, Mechanisms, and Environmental Implications". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 7607-7614.
- Chen, R., T.A. Ratnikova, M.B. Stone, S. Lin, M. Lard, J.S. Hudson et P.C. Ke. 2010. "Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells". *Small*, vol. 6, p. 612-617.
- Chithrani, B.D., A.A. Ghazani et W.C.W. Chan. 2006. "Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells". *Nano Lett.*, vol. 6, p. 662-668.
- Cho, W.-S., R. Duffini, C.A. Poland, A. Duschl, G.J. Oostingh, W. Macnee, M. Bradley, I.L. Megson et K. Donaldson. 2012. "Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 22-35.
- Connor, E.E., J. Mwanuka, A. Gole, C.J. Murphy et M.D. Wyatt. 2005. "Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity". *Small*, vol. 1, p. 325-327.
- Collins, A.R. 2005. "Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols". *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, p. 261S-267S.
- Colvin, V.L. 2003. "Toxicological Profiles of Nanomaterials". *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, p. 1166-1170.

- da Silva, B.F., S. Perez, P. Gardinalli, R.K. Singhal, A.A. Mozeto et D. Barcelo. 2011. "Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments". *Trend Anal. Chem.*, vol. 30, p. 528-540.
- Dastjerdi, R. et M. Montazer. 2010. "A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: Focus on antimicrobial properties". *Colloid. Surfaces B*, vol. 79, p. 5-18.
- D'Autréaux, B. et M.B. Toledano. 2007. "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis". *Nature Reviews*, vol. 8, p. 813-824.
- De Jong, W.H., W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J.A.M. Sips et R.E. Geertsma. 2008. "Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration". *Biomaterials*, vol. 29, p. 1912-1919.
- Delay, M. et F.H. Frimmel. 2012. "Nanoparticles in aquatic systems". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, p. 583-592.
- Delgado, K., R. Quijada, R. Palma et H. Palza. 2011. "Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent". *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 53, p. 50-54.
- Deonaraine A., B.L.T. Lau, G.R. Aiken, J.N. Ryan et H. Hsu-Kim. 2011. "Effects of Humic Substances on Precipitation and Aggregation of Zinc Sulfide Nanoparticles". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 3217-3223.
- Dhawan, A., V. Sharma et D. Parmar. 2009. "Nanomaterials : a challenge for toxicologists". *Nanotoxicology*, vol. 3, p. 1-9.
- Diamanti-Kandarakis, E., J.-P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller et A. C. Gore. 2009. "Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement". *Endocrine Reviews*, vol. 30, p. 293-342.
- Doak, S.H., S.M. Griffiths, B. Manshian, N. Singh, P.M. Williams, A.P. Brown et G.J.S. Jenkins. 2009. "Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology". *Mutagenesis*, vol. 24, p. 285-293.
- Domingos, R.F., D.F. Simon, C. Hauser et K.J. Wilkinson. 2011. "Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticles or the Free Ions?". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 7664-7669.
- Donner, M., L. Tran, J. Muller et H. Vrijhof. 2010. "Genotoxicity of engineered nanomaterials". *Nanotoxicology*, vol. 4, p. 345-346.

- El Badawy, A., R.G. Silva, B. Morris, K.G. Scheckel, M. T. Suidan et T.M. Tolaymat. 2011. "Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 283-287.
- ETC Group. 2003. *No small matter II: the case for a global moratorium*. Ottawa: Occasional Paper Series, 14 p.
- Fenech, M., J. Crott, J. Turner et S. Brown. 1999. "Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide". *Mutagenesis*, vol. 14, p. 605-612.
- Feynman, R. 1959. "There's plenty of room at the bottom". *Annual meeting of the American Physical Society*, conference présentée le 29 décembre 1959.
- Food and Drug Administration. 1999. *Sunscreen Drug Products For Over-The-Counter Human Use; Final Monograph*. US Federal Register 64, no. 98, p. 27671.
- Franklin, NM, N.J. Rogers, S.C. Apte, G.E. Batley, G.E. Gadd et P.S. Casey, P.S. 2007. "Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 8484-8490.
- French, R.A., A.R. Jacobson, B. Kim, S.L. Isley, R. L. Penn et P.C. Baveye. 2009. "Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 1354-1359.
- Geranio, L., M. Heuberger et B. Nowack. 2009. L. "The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 8113-8118.
- Giardi, M.T., M. Koblizek et J. Masojidek. 2001. "Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, p. 1027-1033.
- Gong, N., K. Shao, W. Feng, Z. Lin, C. Liang et Y. Sun. 2011. "Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*". *Chemosphere*, vol. 83, p. 510-516.
- Goodman, C.M., C.D. McCusker, T. Yilmaz et V.M. Rotello. 2004. "Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains". *Bioconjugate Chem.*, vol. 15, p. 897-900.
- Gottschalk, F., T. Sonderer, R.W. Scholz et B. Nowack. 2009. "Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 9216-9222.

- Gottschalk, F., T. Sonderer, R.W. Scholz et B. Nowack. 2010. "Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, p. 1036-1048.
- Gottschalk, F. et B. Nowack. 2011. "The release of engineered nanomaterials to the environment". *J. Environ. Monit.*, vol. 13, p. 1145-1155.
- Grass, R.N., L.K. Limbach, E.K. Athanassiou et W.J. Stark. 2010. "Exposure of aerosols and nanoparticle dispersions to *in vitro* cell cultures: A review on the dose relevance of size, mass, surface and concentration". *J. Aerosol Sci.*, vol. 41, p. 1123-1142.
- Grassian, V.H. 2008. "When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments". *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, p. 18303-18313.
- Grativol, C., A.S. Hemerly et P.C.G. Ferreira. 2012. "Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1819, p. 176-185.
- Greco, M., A. Chiappetta, L. Bruno et M.B. Bitonti. 2012. "In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning". *J. Exp. Bot.*, vol. 63, p. 695-709.
- Greenberg, B.M., X.-D. Huang et D.G. Dixon. 1992. "Applications of the aquatic higher plant *Lemna gibba* for ecotoxicological assessment". *J. Aquat. Ecosyst. Health*, vol. 1, p. 147-155.
- Han, X., R. Gelein, N. Corson, P. Wade-Mercer, J. Jiang, P. Biswas, J.N. Finkelstein, A. Elder et G. Oberdörster. 2011. "Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity". *Toxicology*, vol. 287, p. 99-104.
- Hanagata, N., F. Zhuang, S. Connolly, J. Li, N. Ogawa et M. Xu. 2011. "Molecular Responses of Human Lung Epithelial Cells to the Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles Inferred from Whole Genome Expression Analysis". *ACS Nano*, vol. 5, p. 9326-9338.
- Hanikenne, M. 2003. "*Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance". *New Phytol.*, vol. 159, p. 331-340.
- Harris, E.H. 2001. "*Chlamydomonas* as a model organism". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 52, p. 363-406.
- Head, J.A., D.C. Dolinoy et N. Basu. 2012. "Epigenetics for Ecotoxicologists". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 221-227.

- Heinlaan, M., A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier et A. Kahru. 2008. "Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*". *Chemosphere*, vol. 71, p. 1308-1316.
- Hirn, S., M. Semmler-Behnke, C. Schleh, A. Wenk, J. Lipka, M. Schäffler, S. Takenaka, W. Möller, G. Schmid, U. Simon et W.G. Kreyling. 2011. "Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 77, p. 407-416.
- Huh, A.J. et Y.J. Kwon. 2011. "“Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era". *J. Control. Release*, vol. 156, p. 128-45.
- International Organization for Standardization. 2008. *Nanotechnologies — Terminology and definitions for nanoobjects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*. Geneva, Switzerland: ISO/TS 27687 First edition 20080815, 16 p.
- Ioannou, Y.A. et F.W. Chen. 1996. "Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis". *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, p. 992-993.
- Ivask, A., O. Bondarenko, N. Jepihhina et A. Kahru. "Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO₂, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, p. 701-716.
- Jennings, T. et G. Strouse. 2007. "Past, present, and future of gold nanoparticles". *Adv. Experim. Med. Biol.*, vol. 620, p. 34-47.
- Jin, H., D.A. Heller, R. Sharma et M.S. Strano. 2009. "Size-Dependent Cellular Uptake and Expulsion of Single-Walled Carbon Nanotubes: Single Particle Tracking and a Generic Uptake Model for Nanoparticles". *ACS Nano*, vol. 3, p. 149-158.
- Johnston, H.J., G.R. Hutchison, F.M. Christensen, K. Aschberger et V. Stone. 2010. "The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity". *Toxicol. Sci.*, vol. 114, p. 162-182.
- Jomova, K. et M. Valko. 2011. "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease". *Toxicology*, vol. 283, p. 65-87.
- Kaegi, R., A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt et M. Boller. 2008. "Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment". *Environ. Pollut.*, vol. 156, p. 233-239.

- Karlsson, H.L., P. Cronholm, J. Gustafsson et L. Moller. 2008. "Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes". *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, p. 1726-1732.
- Karlsson, H.L. 2010. "The comet assay in nanotoxicology research". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, p. 651-666.
- Karuppanapandian, T. J.-C. Moon, C. Kim, K. Manoharan et W. Kim. 2011. "Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms". *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 5, p. 709-725.
- Keelan, J.A. 2011. "Nanoparticles versus the placenta". *Nature Nanotechnology*, vol. 6, p. 263-264.
- Kharisov, B.I. 2008. "A review for synthesis of nanoflowers". *Recent Patents on Nanotechnology*, vol. 2, p. 190-200.
- Kim, J.H., J.H. Kim, K.-W. Kim, M.H. Kim et Y.S. Yu. 2009. "Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity". *Nanotechnology*, vol. 20, p. 1-8.
- Kirchner, C., T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A.M. Javier, H.E. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig et W.J. Parak. 2005. "Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles". *Nano Lett.*, vol. 5, p. 331-338.
- Kirsch-Volders, M. G. Plas, A. Elhajouji, M. Lukamowicz, L. Gonzalez, K.V. Looock et I. Decordier. 2011. "The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance". *Arch. Toxicol.*, vol. 85, p. 873-899.
- Klaine, S.J. 2009. "Considerations for research on the environmental fate and effects of nanoparticles". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 28, p. 1787-1788.
- Krall, J.P. et G.E. Edwards. 1992. "Relationship between Photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves". *Physiol. Plantarum*, vol. 86, p. 180-187.
- Kramer, D.M., G. Johnson, O. Kiirats et G.E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes". *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Krug, H.F. et P. Wick. 2011. "Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge". *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, p. 1260-1278.
- Kulthong, K., S. Srisung, K. Boonpavanitchakul, W. Kangwansupamonkon et R. Maniratanachote. 2010. "Detemination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat". *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, p. 1-9.

- Lanone, S., F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix et P. Hoet. 2009. "Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines". *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 6, p. 1-12.
- Lanone, S. and J. Boczkowski. 2010. "Les sources de nanoparticules". *Revue française d'allergologie*, vol. 50, p. 211-213.
- Lavoie, M., C. Fortin et P.G.C. Campbell. 2012. "Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 1445-1452.
- Lead, J.R. et K.J. Wilkinson. 2007. "Environmental colloids and particles: Current knowledge and future developments". IUPAC series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, vol 10: Environmental colloids: behaviour, structure and characterisation, vol. 10, p. 405-467. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Lepadatu, C., M. Enache et J.D. Walker. 2009. "Toward a More Realistic QSAR Approach to Predicting Metal Toxicity". *QSAR Comb. Sci.*, vol. 28, p. 520-525.
- Leroueil, P., S. Hong, A. Mecke, J.R. Baker Jr, B.G. Orr et M.M.B Holl. 2007. "Nanoparticle Interaction with Biological Membranes: Does Nanotechnology Present a Janus Face?". *Acc. Chem. Res.*, vol. 40, p. 335-342.
- Letelier, M.E., A.M. Lepe, M. Faúndez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena et H. Speisky. 2005. "Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity". *Chem. Biol. Interact.*, vol. 151, p. 71-82.
- Li, Y.-F. et C. Chen. 2011. "Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications". *Small*, vol. 7, p. 2965-2980.
- Lin, S., P. Bhattacharya, N.C. Rajapakse, D.E. Brune et P.C. Ke. 2009. "Effects of Quantum Dots Adsorption on Algal Photosynthesis". *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, p. 10962-10966.
- Lundqvist, M., J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall et K.A. Dawson. 2008. "Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 105, p. 14265-14270.
- Ma, R., C. Levard, S.M. Marinakos, Y. Cheng, J. Liu, F.M. Michel, G.E. Brown Jr. et G.V. Lowry. 2012. "Size-Controlled Dissolution of Organic-Coated Silver Nanoparticles". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, p. 752-759.

- Magdolenova, Z., Y. Lorenzo, A. Collins et M. Dusinska. 2012. "Can Standard Genotoxicity Tests be Applied to Nanoparticles?" *J. Toxicol. Environ. Health A*, vol. 75, p.800-806.
- Maiorano, G., S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M.A. Malvindi, R. Cingolani and P.P. Pompa. 2010. "Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response". *ACS Nano*, vol. 4, p. 7481-7491.
- Makarucha, A.J., N. Todorova et I. Yarovsky. 2011. "Nanomaterials in biological environment: a review of computer modelling studies". *Eur. Biophys. J.*, vol. 40, p. 103-115.
- Malkin, R. et K.K. Niyogi. 2000. "Photosynthesis". In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American society of plant physiologists. Rockville: Maryland, pp. 568-628.
- Marnett, L.J. 1999. "Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde". *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mugag.*, vol. 424, p. 83-95.
- Matias, W.G. et E.E. Creppy. 1998. "5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells". *Environ. Toxic. Water*, vol. 13, p. 83-88.
- McCarty, L.S. et K.R. Munkittrick. 1996. "Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional ?". *Human Ecol. Risk Assess.*, vol. 2, p. 268-274 .
- Merchant, S. et M.R. Sawaya. 2005. "The Light Reactions: A Guide to Recent Acquisitions for the Picture Gallery". *Plant Cell*, vol. 17, p. 648-663.
- Meyer, D.E., M.A. Curran and M.A. Gonzalez. 2009. "An examination of existing data for the industrial manufacture and use of nanocomponents and their role in the life cycle impact of nanoproducts". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 1256-1263.
- Mikhailenko, V.M. A.A. Philchenkov et M.P. Zavelevich. 2005. "Analysis of ¹H NMR-detectable mobile lipid domains for assessment of apoptosis induced by inhibitors of DNA synthesis and replication". *Cell Biol. Int.*, vol. 29, p. 33.39.
- Mortelmans, K. et E. Zeiger. 2000. "The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay". *Mutat. Res.*, vol. 455, p. 29-60.
- Mortimer, M., K. Kasemets, A. Kahru. 2010. "Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophile*". *Toxicology*, vol. 269, p. 182-189.
- Mueller, N.C. et B. Nowack. 2008. "Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 4447-4453.

- Muhling, M., A. Bradford, J.W. Readman, P.J. Somerfield and R.D. Handy. 2009. "An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment". *Mar. Environ. Res.*, vol. 68, p. 278-283.
- Mukherjee, S.P., M. Davoren et H.J. Byrne. 2010. "In vitro mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers — towards quantitative structure activity relationships". *Toxicol. in Vitro*, vol. 24, p. 1169-1177.
- Murr, L.E. and K.M. Garza. 2009. "Natural and anthropogenic environmental nanoparticulates: Their microstructural characterization and respiratory health implications". *Atmos. Environ.*, vol. 43, p. 2683-2692.
- Murrell, A., V.K. Rakyan et S. Beck. 2005. "From genome to epigenome". *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, p. R3-R10.
- Myung, C.L. and S. Park. 2012. "Exhaust nanoparticle emissions from internal combustion engines: a review". *Int. J. Automotive Technology*, vol. 13, p. 9-22.
- Nabeshi, H., T. Yoshikawa, K. Matsuyama, Y. Nakazato, A. Arimori, M. Isobe, S. Tochigi, S. Kondoh, T. Hirai, T. Akase, T. Yamashita, K. Yamashita, T. Yoshida, K. Nagano, Y. Abe, Y. Yoshioka, H. Kamada, T. Imazawa, N. Itoh, S.-I. Tsunoda, et Y. Tsutsumi. 2010. "Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells". *Pharmazie*, vol. 65, p. 199-201.
- Naha, P.C., M. Davoren, A. Casey et H.J. Byrne. 2009. "An Ecotoxicological Study of Poly(amidoamine) Dendrimers - Toward Quantitative Structure Activity Relationships". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 6864-6869.
- Navarro, E., F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra. 2008. "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 8959-8964.
- Nekrasova, G.F., O.S. Ushakova, A.E. Ermakov, M.A. Uimin et I.V. Byzov. 2011. "Effects of Copper(II) Ions and Copper Oxide Nanoparticles on *Elodea densa* Planch". *Russ. J. Ecol.* vol. 42, p. 458-463.
- Nel, A., T. Xia, L. Madler et N. Li. 2006. "Toxic Potential of Materials at the Nanolevel". *Science*, vol. 311, p. 622-627.
- Niyogi, K.K. 2000. "Safety valves for photosynthesis". *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 3, p. 455-460.
- Nowack, B. and T.D. Bucheli. 2007. "Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment". *Environ. Pollut.*, vol. 150, p. 5-22.

- Nowack, B., J.F. Ranville, S. Diamond, J.A. Gallego-Urrea, C. Metcalfe, J. Rose, N. Horne, A.A. Koelman et S.J. Klaine. 2012. "Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 50-59.
- Oberdorster, G., J. Ferin, J. Finkelstein, P. Wade et N. Corson. 1990. "Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies". *J. Aerosol. Sci.*, vol. 21, p. 384-387.
- Oberdorster, G., J. Ferin, R. Gelein, S.C. Soderholm, J. Finkelstein. 1992. "Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles". *Environ. Health Perspect.*, vol. 97, p. 193-197.
- Oberdorster, G., V. Stone et K. Donaldson. 2007. "Toxicology of nanoparticles: A historical perspective". *Nanotoxicology*, vol. 1, p. 2-25.
- Oukarroum, A., S. Bras, F. Perreault et R. Popovic. 2012. "Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 78, p. 80-85.
- Pace, H.E., E.K. Leshner et J.F. Ranville. 2010. "Influence of stability on the acute toxicity of CdSe/ZnS nanocrystals to *Daphnia magna*". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, p. 1338-1344.
- Pan, Y., S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau et W. Jahnen-Dechent. 2007. "Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles". *Small*, vol. 3, p. 1941-1949.
- Pan, Y., A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon et W. Jahnen Dechent. 2009. "Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage". *Small*, vol. 5, p. 2067-2076.
- Panyala, N.R., E.M. Pena-Mendez et J. Havel. 2009. "Gold and nanogold in medicine: Overview, toxicology and perspectives". *J. Appl. Biomed.*, vol. 7, p. 75-91.
- Perreault, F., A. Oukarroum, L. Pirastru, L. Sirois, W.G. Matias et R. Popovic. 2010. "Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll *a* fluorescence imaging in *Lemna gibba*". *J. Botany*, vol. 2010, Article ID 763142, p. 1-9.
- Perreault, F., Bogdan, N., Morin, M., Claverie, J. Et R. Popovic. 2012. "Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 109-120.
- Petit, A.-N., P. Eullaffroy, T. Debenest et F. Gagné. 2010. "Toxicity of PAMAM dendrimers to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat Toxicol.*, vol. 100, p. 187-193.

- Petit, A.-N., T. Debenest, P. Eullaffroy and F. Gagné. 2012. "Effects of a cationic PAMAM dendrimer on photosynthesis and ROS production of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Nanotoxicology*, vol. 6, p. 315-326.
- Petosa, A.R., S.J. Brennan, F. Rajput et N. Tufenkji. 2012. "Transport of two metal oxide nanoparticles in saturated granular porous media: Role of water chemistry and particle coating". *Water Res.*, vol. 46, p. 1273-1285.
- Philip., D. 2008. "Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles". *Spectrochim. Acta Part A*, vol. 71, p. 80-85.
- Ponti, J., R. Colognato, F. Franchini, S. Giora, F. Simonelli, K. Abbas, C. Uboldi, C.J. Kirkpatrick, U. Holzwarth et F. Rossi. 2009. "A quantitative *in vitro* approach to study the intracellular fate of gold nanoparticles: From synthesis to cytotoxicity". *Nanotoxicology*, vol. 3, p. 296-306.
- Popovic, R., D. Dewez et P. Juneau. 2003. "Applications of Chlorophyll Fluorescence in Ecotoxicology: Heavy Metals, Herbicides, and Air Pollutants". Dans *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Editors, J. R. DeEll et P. Toivonen, p. 151-184. Norwell, Massachussets: Kluwer Academic Publishers.
- Project on Emerging Nanotechnologies. 2010. *An inventory of nanotechnology-based consumer products currently on the market*. <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer>. Mis à jour : mars 2011.
- Pujalté, I., I. Passagne, B. Brouillaud, M. Tréguer, E. Durand, C. Ohayon-Courtès et B. L'Azou. 2011. "Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells". *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 8, p. 1-16.
- Rehman, S., A. Mumtaz et S.K. Hasanain. 2011. "Size effects on the magnetic and optical properties of CuO nanoparticles". *J. Nanopart. Res.*, vol. 13, p. 2497-2507.
- Ren, G., D. Hu, E.W.C. Cheng, M.A. Vargas-Reus, P. Reip et R.P. Allaker. 2009. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". *Int. J. Antimicrob. Ag.*, vol. 33, p. 587-590.
- Robichaud, C.O., A.E. Uyar, M.R. Darby, L.G. Zucker et M.R. Wiesner. 2009. "Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 4227-4233.
- Roco, M.C. 2001. "International strategy for nanotechnology research and development". *J. Nanopart. Res.*, vol. 3, p. 353-360.
- Roduner, E. 2006. "Size matters: why nanomaterials are different". *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, 583-592.

- Ryan, A.C., J.R. Tomasso et S.J. Klaine. 2009. "Influence of pH, hardness, dissolved organic carbon concentration, and dissolved organic matter source on the acute toxicity of copper to *Daphnia magna* in soft waters: implications for the biotic ligand model". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 28, p. 1663-1678.
- Saison, C., F. Perreault, J.-C. Daigle, C. Fortin, J. Claverie, M. Morin et R. Popovic. 2010. "Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, p. 109-114.
- Sakai, N., Y. Matsui, A. Nakayama, A. Tsuda et M. Yoneda. 2011. "Functional-dependent and size-dependent uptake of nanoparticles in PC12". *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 304, p. 012049.
- Sau, T.K., A.L. Rogach, F. Jackel, T.A. Klar et J. Feldmann. 2010. "Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles". *Adv. Mater.*, vol. 22, p. 1805-1825.
- Schiller, C.F., J. Gebhart, J. Heydeer, G. Rudolf, W. Stahlhofen. 1986. "Factors influencing total deposition of ultrafine aerosol particles in the human respiratory tract". *J. Aerosol. Sci.*, vol. 17, p. 328-332.
- Schmid, G. 2008. "The relevance of shape and size of Au55 clusters". *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 1909-1930.
- Schrand, A.M., M.F. Rahman, S.M. Hussain, J.J. Schlager, D.A. Smith et A.F. Syed. 2010. "Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment". *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, p. 544-568.
- Schreiber, U., U. Schliwa et W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Shi, J., A.D. Abid, I.M. Kennedy, K.R. Hristova et W.K. Silk. 2011. "To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution". *Environ. Pollut.*, vol. 159, p. 1277-1282.
- Shih, Y.-H., W.-S. Liu et Y.-F. Su. 2012. "Aggregation of stabilized TiO₂ nanoparticle suspension in the presence of inorganic ions". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, p. 1693-1698.
- Shukla, R.K., V. Sharma, A.K. Pandey, S. Singh, S. Sultana et A. Dhawan. 2011. "ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells". *Toxicol. In Vitro*, vol. 25, p. 231-241.

- Simonet, B.M. et M. Valcarcel. 2009. "Monitoring nanoparticles in the environment". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, p. 17-21.
- Singh, N., B. Manshian, G.J.S. Jenkins, S.M. Griffiths, P.M. Williams, T.G.G. Maffei, C.J. Wright et S.H. Doak. 2009. "NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials". *Biomaterials*, vol. 30, p. 3891-3914.
- Sonavane, G., K. Tomoda, A. Sano, H. Ohshima, H. Terada et K. Makino. 2008. "In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size". *Colloid Surface B*, vol. 65, p. 1-10.
- Sperling, R.A. et W.J. Parak. 2010. "Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles". *Phil. Trans. R. Soc. A*, vol. 368, p. 1333-1383.
- Stone, V., H. Johnston et R.P.F. Schins. 2009. "Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations". *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 39, p. 613-626.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria". *Photochem. Photobiol.*, vol. 61, p. 32-42.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Studer, A.M., L.K. Limbach, L. Van Duc, F. Krumeich, E.K. Athanassiou, L.C. Gerber, H. Moch et W.J. Stark. 2010. "Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles". *Toxicol Lett.*, vol. 197, p. 169-74.
- Suarez, I.J., R. Rosal, A. Rodriguez, A. Ucles, A.R. Fernandez-Alba, M.D. Hernando et E. Garcia-Calvo. 2011. "Chemical and ecotoxicological assessment of poly(amidoamine) dendrimers in the aquatic environment". *Trends Anal. Chem.*, vol. 30, p. 492-506.
- Swift, D.L., N. Montassier, P.K. Hopke, K. Karpen-Hayes, Y.S. Cheng, Y.F. Su, H.C. Yeh et J.C. Strong. 1992. "Inspiratory deposition of ultrafine particles in human nasal replicate cast". *J. Aerosol. Sci.*, vol. 23, p. 65-72.
- Swift, D.L., N. Montassier, P.K. Hopke, K. Karpen-Hayes, Y.S. Cheng, Y.F. Su, H.C. Yeh et J.C. Strong. 1994. "Inspiratory deposition of ultrafine particles in human nasal replicate cast". *J. Aerosol. Sci.*, vol. 23, p. 65-72.
- Takahashi, S. et N. Murata. 2008. "How do environmental stresses accelerate photoinhibition?". *Trends Plant Sci.*, vol. 13, p. 178-182.

- Tatara, C.P., M.C. Newman, J.T. McCloskey et P.L. Williams. 1997. "Predicting relative metal toxicity with ion characteristics: *Caenorhabditis elegans* LC50". *Aquat. Toxicol.*, vol. 39, p. 279-290.
- Tatara, C.P., M.C. Newman, J.T. McCloskey et P.L. Williams. 1998. "Use of ion characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions: *Caenorhabditis elegans* LC50". *Aquat. Toxicol.*, vol. 42, p. 255-269.
- Tenzer, S., D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S.K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild et R.H. Stauber. 2011. "Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona: A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis". *ACS Nano*, vol. 5, p. 7155-7167.
- Uriu-Adams, J.Y. et C.L. Keen. 2005. "Copper, oxidative stress, and human health". *Mol. Aspects Med.*, vol. 26, p. 268-298.
- Van Hoecke, K., K.A.C. De Schampheleere, P. Van der Meeren, S. Lucas et C.R. Janssen. 2008. "Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* : importance of surface area". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, p. 1948-1957.
- Wang, J., X. Zhang, Y. Chen, M. Sommerfeld et Q. Hu. 2008. "Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Chemosphere*, vol. 73, p. 1121-1128.
- Wang, Y., W.G. Aker, H.-M. Hwang, C.G. Yedjou, H. Yu et P.B. Tchounwou. 2011. "A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells". *Sci. Total Environ.*, vol. 409, p. 4753-4762.
- Warheit, D.B. 2008. "How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization?". *Toxicol. Sci.*, vol. 101, p. 183-185.
- Wei, L., M. Thakkar, Y. Chen, S.A. Ntim, S. Mitra, X. Zhang. 2010. "Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 100, p. 194-201.
- Wick, P., A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P.-A. Diener, A. Zisch, H.F. Krug et U. von Mandach. 2010. "Barrier Capacity of Human Placenta for Nanosized Materials". *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, p. 432-436.
- Wilkinson, K.J. Sous presse. "Emerging issues in ecotoxicology: Characterization of (metallic) nanoparticles in aqueous media". *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Editeurs, J.F. Féraud et C. Blaise, 13 p.

- Witschger, O. et J.F. Fabries. 2005. « Particules ultra-fines et santé au travail. 1 – Caractéristiques et effets potentiels sur la santé ». *Hygiène et Sécurité au Travail*, vol. 199, p. 21-35.
- Wong, S.W.Y., T.Y. Leung, A.B. Djuriscic et K.M.Y. Leung. 2010. "Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility". *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, p. 609-618.
- Worms, I., D.F. Simon, C.S. Hassler et K.J. Wilkinson. 2006. "Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake". *Biochimie*, vol. 88, p. 1721-1731.
- Xiao, Z. et A.G. Wedd. 2010. "The challenges of determining metal-protein affinities". *Nat. Prod. Rep.*, vol. 27, p. 768-789.
- Yamamoto, A., R. Honma et M. Sumita. 1998. "Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells". *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 39, p. 331-340.
- Zhang, T., J.L. Stilwell, D. Gerion, L. Ding, O. Elboudwarej, P.A. Cooke, J. W. Gray, A.P. Alivisatos et F.F. Chen. 2006. "Cellular Effect of High Doses of Silica-Coated Quantum Dot Profiled with High Throughput Gene Expression Analysis and High Content Cellomics Measurements". *Nano Lett.*, vol. 6, p. 800-808.
- Zhang, K., G. Dong, A. Thurber, Y. Hou, M. Gu, D.A. Tenne, C. B. Hanna et A. Punnoose. 2012. "Tuning the Properties of ZnO, Hematite, and Ag Nanoparticles by Adjusting the Surface Charge". *Adv. Mater.*, vol. 24, p. 1232-1237.
- Zukiel, R., S. Nowak, A.-M. Barciszewska, I. Gawronska, G. Keith and M.Z. Barciszewska. 2004. "A Simple Epigenetic Method for the Diagnosis and Classification of Brain Tumors". *Mol. Cancer Res.*, vol. 2, p. 196-202.