



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Toxicité de deux types de nanoparticules d'argent sur la cyanobactérie modèle : *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Rapport de stage déposé le

13/06/2014

Par

Matthieu HEMMERLIN

Master BioMANE – Biotechnologies Microbiennes

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)

Campus Metz Bridoux – rue du Général Delestraint

Du 13/01/2014 aux 11/07/2014. Travaux dirigés par Christophe PAGNOUT (MCU)



Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier le Professeur Pascale BAUDA, directrice adjoint du LIEC, pour son offre de stage transmise à la direction du master BioMANE et sans qui ce stage n'aurait pas été possible. Merci également à la direction du LIEC pour l'acceptation de ma candidature.

Merci également à Christophe PAGNOUT pour sa patience, sa compassion lors des multiples obstacles rencontrés pendant ce stage, son encadrement et son soutien tout au long de cette formation.

Je n'oublie pas Bénédicte SOHM, qui a mis au point le protocole d'extraction des ARN de la cyanobactéries et pris en charge une partie des tests présentés dans ce manuscrit.

Merci à Marie-Andrée DOLLARD pour son professionnalisme, sa bonne humeur et pour les précieux conseils qu'elle aura su me prodiguer.

Un grand merci à tous les doctorants et tous les stagiaires du LIEC pour la joie et la bonne humeur dont ils rayonnent tous au quotidien et sans qui ce stage aurait été tellement moins joyeux. J'en profite pour remercier tout particulièrement Anne VICENTE, qui m'aura soutenu et remonté le moral suite aux nombreuses embuches rencontrées au cours de ce stage.

Un grand MERCI à tous !

Table des matières

1.	Introduction.....	1
1.1.	Les nanoparticules.....	1
1.1.1.	Généralités	1
1.1.1.1.	Les nanotechnologies	1
1.1.1.2.	Qu'est-ce qu'une nanoparticule ?	2
1.1.2.	Aspects sociétal, économique et écologique	3
1.1.2.1.	Débats actuels et perception par le grand public	3
1.1.2.2.	Aspect économique.....	4
1.1.2.3.	Aspect écologique	5
1.2.	Toxicité des nanoparticules et intérêt de l'étude	5
1.2.1.	Nanoparticules et nanotoxicologie	5
1.2.2.	Progression actuelle et intérêt de l'étude.....	7
1.3.	Nanoparticules d'argent et modèle biologique	7
1.3.1.	Les nanoparticules d'argent	7
1.3.1.1.	Présentation générale	7
1.3.1.2.	Difficultés d'étude	8
1.3.2.	La cyanobactérie modèle : <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942	9
1.3.2.1.	Les cyanobactéries	9
1.3.2.2.	La cyanobactérie modèle : <i>Synechococcus elongatus</i>	9
1.4.	Intérêt de l'étude.....	10
2.	Matériel et méthode	11
2.1.	Souche utilisée et culture bactérienne.....	11
2.1.1.	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942	11
2.1.2.	Conditions de culture	11
2.2.	Nanoparticules d'argent.....	11
2.3.	Tests de survie des cyanobactéries aux sels et nanoparticules d'argent.....	12
2.3.1.	TraITEMENT de la verrerie	12
2.3.2.	Préparation des cellules	12
2.3.3.	Dialyse des nanoparticules.....	12
2.3.4.	Exposition de <i>Synechococcus elongatus</i> aux nanoparticules d'argent	12
2.3.5.	Exposition de <i>Synechococcus elongatus</i> aux ions argent.....	13
2.3.6.	Dosage des concentrations en nanoparticules et argent ionique.....	13

2.3.7. Mesure de la survie de <i>Synechococcus elongatus</i>	13
2.4. Exposition de <i>S. elongatus</i> en vue d'études transcriptomiques	14
2.5. Extraction et purification des ARN totaux de <i>S. elongatus</i>	15
2.5.1. Extraction des ARN	15
2.5.2. Purification des ARN et traitement à la DNase I	15
2.5.3. Mesure de l'intégrité et de la pureté des ARN.....	15
3. Résultats	16
3.1. Détermination des concentrations efficaces médianes aux nano-argent et aux ions argent chez <i>S. elongatus</i>	16
3.1.1. Protocole expérimental.....	16
3.1.1.1. Vérification de l'efficacité du marquage	16
3.1.1.2. De la toxicité des ions argent.....	16
3.1.1.3. ...A la nécessité d'une dialyse des nano-argent.....	18
3.1.1.4. Impact du temps d'ouverture du contenant des NP.....	19
3.1.2. Détermination des CE 50 aux nano-argent et nitrate d'argent	20
3.2. Mise en place du protocole d'extraction d'ARN de <i>S. elongatus</i>	21
4. Discussion	23
4.1. De la difficulté de l'étude des nano-argent.....	23
4.1.1. Stabilité des nano-argent.....	23
4.1.2. Hypothèse de l'impact de l'enrobage	24
4.2. A l'étude de la tox sur la cyanobactérie	25
4.2.1. Hypothèses permettant d'expliquer la toxicité.....	25
4.2.2. Toxicité des sphères et des plaques	26
4.3. Conclusion et perspectives.....	26
4.3.1. Toxicité des nanoparticules d'argent sur <i>S. elongatus</i>	26
4.3.2. Un regard vers l'avenir	27

Abréviations

- **°C** : degré Celsius
- **µl** : microlitre ($1 \mu\text{l} = 10^{-3} \text{ ml} = 10^{-6} \text{ L}$)
- **µM** : Micro molaire ($1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mol/L}$)
- **µm** : Micromètre ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$)
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **ARN** : Acide Ribonucléique
- **DO** : densité optique
- **h** : heure(s)
- **L** : litre
- **mg** : miligramme ($1 \text{ mg} = 10^{-3} \text{ g}$)
- **min** : minutes
- **ml** : millilitre ($1 \text{ ml} = 10^{-3} \text{ L}$)
- **nm** : Nanomètre ($1 \text{ nm} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10^{-9} \text{ m}$)
- **PVP** : Polyvinylpyrrolidone
- **RIN** : RNA Integrity Number

1. Introduction

1.1. Les nanoparticules

1.1.1. Généralités

1.1.1.1. Les nanotechnologies

Avec la Révolution Industrielle au XIX^e siècle, la société subit un tournant dans les domaines de la politique, de l'économie et de l'environnement grâce à des innovations concernant notamment les textiles, la métallurgie et les transports. A la fin du XX^e et au début du XXI^e siècle, on assiste dans les pays industrialisés à l'essor des nanosciences et nanotechnologies, lesquelles procurent à l'Homme de nombreuses innovations à l'instar de l'utilisation des nanoparticules, si bien que les spécialistes parlent de « Révolution Nanotechnologique »

Le concept de nanotechnologies fut introduit par le physicien Richard Feynman en 1959 à l'Institut Américain des Technologies durant son discours intitulé "There's plenty of Room at the Bottom". Il y évoquait la possibilité de développement de technologies à l'échelle moléculaire, en argumentant que les connaissances de l'époque permettraient en théorie de manipuler des éléments au niveau de l'atome. A la fin du XX^e siècle, Miheil Roco, conseillé en nanotechnologies à la Fondation Scientifique Nationale, projetait en 2005 que les innovations nanotechnologiques dépasseraient de loin l'impact provoqué par la Révolution Industrielle, avec un marché atteignant un milliard de dollars en 2015 et la création de deux millions d'emplois (Roco, 2005).

L'utilisation de nanoparticules n'est cependant pas récente. En effet, les romains utilisaient pour donner un aspect esthétique à leur verre des nanoparticules d'or et d'argent, lesquelles donnaient alors à l'objet des propriétés optiques faisant varier sa couleur selon la luminosité. Au VII^e siècle, en Mésopotamie, les artisans utilisaient également des particules d'or et d'argent pour donner de la brillance à leurs vernis. Cette technique fut conservée au Moyen-âge par les maîtres verriers qui utilisaient ces particules pour colorer les vitraux des cathédrales.

En 1985, Robert F. CURL, Harold W. KROTO et Richard E. SMALLEY observent que des particules comportant 60 et 70 atomes sont extrêmement stables. Suite à une étude, ils estiment que ces particules ont une structure en cage constituée de pentagones et d'hexagones. Cette structure fut appelée C60 *buckminsterfulleren*, puis rebaptisé *fullerene*. La synthèse de ces fullerènes (Liu *et al.*, 1986 ; Smalley & Yakobson, 1998) a valu à R. CURL, H. KROTO et E. SMALLEY le prix Nobel de chimie en 1996. Grâce à la géométrie presque sphérique de ces molécules, placées entre deux surfaces elles jouent un rôle de roulement à billes et servent donc de lubrifiant très efficace.

Ainsi, la synthèse de ces molécules a permis de définir le concept de nanosciences, bien que les nanoparticules aient été utilisées depuis des temps beaucoup plus anciens. Cependant, avec l'apparition de ces sciences de l'infiniment petit, le nouveau concept relève de l'étude des nanoparticules. Outre leur aspect technologique, l'usage de ces dernières est vivement critiqué du fait de leur toxicité sur les organismes à leur contact.

1.1.1.2. Qu'est-ce qu'une nanoparticule ?

Le terme nano-objet est employé si au moins une de ses dimensions est inférieure à 100 nm (firgure 1). La suite de ce paragraphe contient les définitions des différents termes à dissocier en parlant de nano-objets.

- Nanoparticules ou particules ultrafines : Ils regroupent les nano-objets dont les trois dimensions sont inférieures à 100 nm. Le terme nanoparticules correspond plutôt aux particules fabriquées et réservées à l'industrie, alors que le terme particule ultrafine est généralement associé à des particules présentes dans l'environnement indépendamment de cette fabrication par l'Homme.
- Nanofibres, nanotubes, nanofilaments et nanobâtonnets : Ces nano-objets ont pour particularité de posséder une dimension supérieure à 100 nm. Classiquement, ces termes désignent des nano-objets longilignes dont la section fait de 1 à quelques dizaines de nanomètres de diamètre, et de 500 nm à 10 µm pour la longueur.
- Nanofilms, nanocouches et nanorevêtements : Ils ont deux de leurs dimensions supérieures à 100 nm.

Remarque : L'ensemble des expérimentations présentées dans ce mémoire porteront sur l'utilisation de nanoparticules.

Cette définition à l'échelle nanométrique n'est pas le seul paramètre permettant de distinguer les nanomatériaux et leurs homologues non nanométriques. En effet leurs propriétés physiques diffèrent grandement. Par exemple, l'ajout de nanotubes de carbones à une matrice composite augmente grandement sa conductivité (Zhan *et al.*, 2003a ; Zhan *et al.*, 2003b). Du fait de leurs propriétés quantiques, les nanoparticules de TiO₂, ZnO et CeO₂ font également de très bons

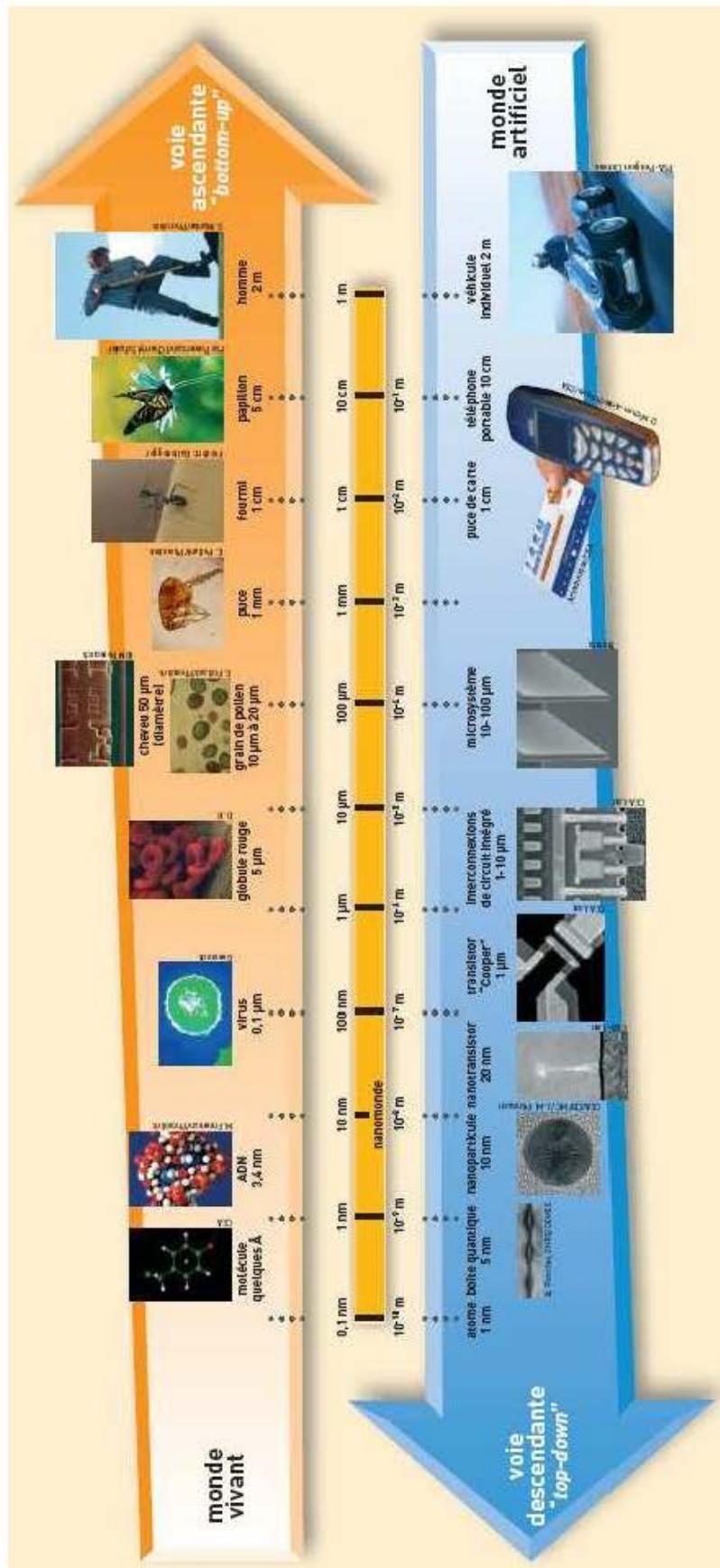


Figure 1 : Place des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux.
(Commissariat à l'Energie atomique, 2005)

Introduction

catalyseurs (Kamat, 2002) et sont incorporées à des surfaces pour leur conférer des propriétés autonettoyantes, ce qui leur vaut d'ailleurs d'être largement utilisées aussi bien dans le bâtiment que dans le textile (Qi *et al.*, 2006 ; Vigneshwaran *et al.*, 2006). Les propriétés mécaniques des nanoparticules ne sont pas en reste. En effet, l'incorporation de nanocristaux de cuivre à une matrice lui confère des propriétés super-élastiques (Lu *et al.*, 2000) tandis que l'ajout de nanotubes de carbones multicouches décuple la résistance du matériau dans lequel ils sont incorporés (la dureté de ces nanoparticules peut atteindre celle du diamant) (Qi *et al.*, 2003).

Du fait de leur petite taille, les nanoparticules interagissent avec les systèmes biologiques (membranes, protéines, acides nucléiques) de sorte que leur utilisation dans le domaine médical est envisagée depuis une vingtaine d'années, que ce soit par exemple dans le contrôle de la libération de médicaments ou dans l'imagerie (Couvreur et Puisieux, 1993 ; Moghimi *et al.*, 2005 ; Bertorelle *et al.*, 2006). Cependant, l'utilisation de nanoparticules en diagnostic ne sera envisagé qu'une fois les études portant sur la toxicité réalisées en amont.

1.1.2. Aspects sociétal, économique et écologique

1.1.2.1. Débats actuels et perception par le grand public

Avec l'avènement des nanotechnologies, la communauté scientifique a tenté d'éviter le scandale des organismes génétiquement modifiés, dans lequel la population se plaignait du manque de transparence des informations diffusées (Ebbesen, 2006). Ainsi plusieurs agences gouvernementales ont publié les risques suspectés des nanoparticules et des nanotechnologies en général sur internet. Par exemple, au Royaume-Uni, la FSA (Food Standards Agency) a publié un rapport informant la population de l'implication de nanomatériaux et nanotechnologies dans l'amélioration du goût de nombreux aliments, cependant tous ces produits sont soumis à un contrôle par un comité d'experts (<http://food.gov.uk/policy-advice/novel/nano>).

Par ailleurs, ces mêmes agences ont soulevé l'hypothèse de la mise en place d'un étiquetage spécifique à la signalisation des nanoparticules. La mise en place d'une telle campagne reste néanmoins délicate, étant donné que les risques liés à la présence des nano-objets – bien que suspectés – ne sont toujours pas à ce jour clairement définis. L'hypothèse de la non dangerosité pour l'Homme des nanoparticules ainsi que leur impact restreint sur l'environnement aux concentrations présentes dans ces produits ne pouvant à l'heure actuelle pas être écartée, se pose une question particulièrement délicate : doit-on étiqueter ces produits comme potentiellement dangereux au

Introduction

risque d'engendrer leur boycott dans l'hypothèse où l'étiquetage devrait disparaître si ces produits ne sont pas néfastes pour l'Homme ou l'environnement ?

De son côté, l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) s'alarme sur la présence croissante de nano-objets dans les produits de grande consommation (textile, ciment, plastiques, etc.) et demande la mise en place systématique d'une signalisation relative à la présence de nanotechnologies sur l'ensemble des produits concernés. Entre les chaussettes antibactériennes contenant des nanoparticules d'argent et le ciment supplémenté en nanoparticules de titane, le terme « risque non exclu » devient récurrent dans ce rapport. En plus de ce bulletin, l'ANSES finance le projet Européen de recherche « Nanogenotox », impliquant 18 organismes et 13 pays, dont le but vise à l'étude de la toxicité sur les gènes et l'ADN de 14 nanomatériaux (rapport ANSES, 2010).

Cependant, aucune réponse particulière n'a été constatée venant du grand public concernant les nanotechnologies en général et plus particulièrement les nanoparticules, malgré l'augmentation dans la presse d'articles traitant du sujet (Anderson *et al.*, 2005). A ce constat, deux hypothèses majeures se distinguent. La première est que les informations mises à disposition de la population permettent aux gens de mieux appréhender l'utilisation croissante des nanotechnologies et donc diminuent les craintes vis-à-vis des nano-objets. La seconde est que le grand public ne comprend pas les informations qui sont mises à sa disposition du fait de leur complexité, et de ce fait ne prend pas conscience des risques présentés dans ces données (Gaskell *et al.*, 2004 ; Cobb, 2005 ; Lee *et al.*, 2005).

1.1.2.2. Aspect économique

Du fait de leur large spectre d'utilisations, la place des nanotechnologies sur le marché est de plus en plus importante au cours du temps (Figure 2). Ainsi, le marché mondial a suivi une hausse relativement linéaire durant les premières années de commercialisation des nanotechnologies, puis a très rapidement suivi un profil exponentiel, permettant aux experts de prédire une hausse très importante pour les années à venir. Concernant les chiffres, le marché des nanotechnologies était estimé à plus de 40 milliards d'euros en 2004, contre 1 000 milliards en 2010. Les estimations des experts en économie permettent quant à elles d'estimer ce marché à 2 600 milliards en 2015. Ces chiffrent placent ainsi le marché des nanotechnologies à 15% du marché global. (www.NSF.com)

Concernant la distribution des différentes sous-catégories de nanotechnologies dans ces estimations de marché pour 2015, la première place est occupée par les nanomatériaux, avec 30-35% des parts, soit une valeur d'environ 340 milliards de dollars par an, suivie par la composante

Nanoparticules	Exemples d'applications
Métaux	
Fe	Enregistrement magnétique de données analogiques et digitales, décontamination des nappes phréatiques
Al	Agent antimicrobien, circuits électroniques, Cellules solaires,...
Ni	Capaciteur céramique
Ag	Biocide (USA), Encre conductrice transparente
Au	Applications catalytiques (production propylène, oxydation CO,...), applications électriques et optiques (détecteur, appareil optique)
Oxydes	
Al ₂ O ₃	Polissage des puces électroniques, Composant de céramique, agent retardant les flammes, enduit de papier d'impression,...
ZrO ₂	Céramique (capteur oxygène, composant pompe), Spray thermique, prothèses orthopédiques et dentaires, vecteur de médicaments
TiO ₂	Crème solaire, catalyseur, Carrelage et vitre autonettoyante
ZnO	Crème solaire, antifongique, nanolaser, céramique
SiO ₂	Polissage des puces semiconductrices
Carbones	
Fullerène	Cellules solaires, batterie lithium, Membrane proton conductrice, médicaments
SWCNT	Matériaux résistants aux radiations
MWCNT	Peinture automobile, batteries

Figure 2 : Principales nanoparticules manufacturées ayant un intérêt commercial.
(Theodore and Kunz, 2005)

Introduction

électronique avec 25% correspondant à environ 300 milliards de dollars. La branche médicale se place en troisième position, avec 20% des parts, soit 180 milliards de dollars. (Shkarovskiy, 2013)

1.1.2.3. Aspect écologique

Même si le récent avènement des nanotechnologies a conduit à un relargage de nanomatériaux dont des nanoparticules dans l'environnement, l'activité anthropique n'est pas la seule responsable de la présence de ces nanoparticules dans la nature. En effet, de nombreux phénomènes naturels, à l'instar des éruptions volcaniques, de l'érosion, des feux de forêt ou des conversions gaz/particules (Nowak et Bucheli, 2007). Ces particules naturellement présentes dans l'environnement sont connues sous le terme de colloïdes, dont la distribution de taille est comprise entre 1 nm et 1 µm, bien que la majorité de ces particules suivent la définition des nanoparticules donnée précédemment (Buffie et Van Leeuwen, 1992). Il est important de noter que ces colloïdes peuvent constituer la grande partie des composés organiques (pollens, etc.) et inorganiques dans certains environnements. On en retrouve même associés à des organismes biologiques, comme les bactéries magnétotactiques, ou même des poissons, oiseaux et dans le cerveau humain (Oberdörster *et al.*, 2005 ; Kirschvink *et al.*, 1992).

Concernant les nanoparticules rejetées dans l'environnement suite à une activité humaine, on distingue d'une part les nanoparticules intentionnelles, issues des nanosciences et rejetées suite au processus de synthèse, et les non-intentionnelles, provenant de la combustion des moteurs à explosion, des centrales thermiques, des fumées issues d'une activité sidérurgique, ou encore des incinérateurs (Oberdörster *et al.*, 2005).

Ainsi, même si l'activité anthropique joue un rôle dans la présence de nanoparticules dans l'environnement, ces dernières y sont déjà présentes de façon naturelle, ce qui ne met pas en cause leur dangerosité. En effet, leur toxicité a déjà été démontrée par le passé sur des modèles animaux (Oberdörster *et al.*, 2005) ou même des cellules humaines (Xia *et al.* 2006).

1.2. Toxicité des nanoparticules et intérêt de l'étude

1.2.1. Nanoparticules et nanotoxicologie

La libération de nanoparticules de synthèse dans l'environnement s'effectue donc de façon non-intentionnelle au niveau des sites de synthèse ou au cours du transport de ces produits, ainsi que par des mécanismes rejetant des nanoparticules, tels que la combustion des moteurs à

Introduction

explosion ou le fonctionnement des centrales thermiques visant à produire de l'électricité. Cependant, il convient également de noter que cette libération de nanoparticules dans l'environnement peut se faire de façon intentionnelle, comme c'est le cas par exemple lors de campagnes de dépollution des eaux (NZVI : Nano Zero-Valent Iron). Dans les deux cas, ces nanoparticules se retrouvent directement dans l'air, l'eau et le sol, ce qui implique leur contact immédiat avec de nombreuses espèces animales, dont l'Homme.

Dans un état de l'art de 2005, Oberdörster définit la nanotoxicologie comme un lien entre les nanosciences, les nanotechnologies et la toxicité des composés qui en résultent sur les organismes vivants. Puis dans une publication de 2007, il présente un graphique illustrant l'augmentation du nombre de publications disponibles sur PubMed présentant les termes « nanoparticules » ou « ultrafine » et « toxicity » entre janvier 1990 et janvier 2007 et note une augmentation globale de 2500%, dont environ 350% juste sur la dernière année. (Oberdörster *et al.*, 2007)

A l'heure actuelle, les mêmes paramètres de recherche sur PubMed renvoient vers 8265 publications, soit une augmentation d'environ 3200% par rapport à 2007 (janvier 2007 à mai 2014).

Bien que tous les types de nanoparticules soient concernés par ces études de nanotoxicité, la consultation des ressources bibliographique montre une tendance à l'étude des trois types de nanoparticules les plus utilisés : le dioxyde de titane, les nanotubes de carbone et les nanoparticules d'argent.

- Le dioxyde de titane (TiO_2) est utilisé dans les emballages plastiques pour leur conférer leur couleur blanche, mais également dans les produits cosmétiques, notamment les crèmes solaires pour ses propriétés anti-UV. On en incorpore également dans certains matériaux, ce qui leur confère des propriétés autonettoyantes basées sur l'activité photocatalytique de ces nanoparticules.
- Les nanotubes de carbone sont principalement intégrés à des structures afin de significativement augmenter leur dureté. En effet, les propriétés physiques de ces nanoparticules leur confèrent une robustesse proche de celle du diamant.
- Les nanoparticules d'argent sont notamment utilisées pour leur propriété biocide, on les retrouve donc dans les textiles antibactériens et anti-odeurs, ainsi que dans les emballages et plastiques antibactériens.

Dans la suite de ces travaux, seule la toxicité aux nanoparticules d'argent sera étudiée, du fait de la connaissance de l'activité biocide de ce type de nanoparticules et de leur large spectre d'utilisation dans de nombreux types de produits.

1.2.2. Progression actuelle et intérêt de l'étude

Dans une publication de 2012, Burchardt et son équipe décrivent l'impact de solutions de nanoparticules d'argent sphériques et plaques sur la croissance d'une diatomée, *Thalassiosira pseudonana* et une cyanobactérie, *Synechococcus sp.* Cette étude a démontré que la toxicité des nanoparticules vient en partie de la présence d'ions argent libérés par solubilisation de ces nanoparticules au moment de l'exposition. De plus, les résultats montrent une synergie entre la toxicité aux ions argent d'une part et la toxicité aux nanoparticules d'argent d'autre part (Burchardt *et al.*, 2012). A l'heure actuelle on ne connaît donc pas l'impact des nanoparticules seules sur la toxicité. Par ailleurs, les travaux actuels sur ces nanoparticules et ce modèle biologique ne font état que d'une inhibition de la croissance bactérienne, mais en aucun cas des mécanismes de toxicité, il convient donc de réaliser des tests supplémentaires afin d'expliquer cette inhibition de croissance afin de mettre en cause un ralentissement du cycle de division ou une mortalité cellulaire.

1.3. Nanoparticules d'argent et modèle biologique

1.3.1. Les nanoparticules d'argent

1.3.1.1. Présentation générale

Les nanoparticules d'argent ou nano-argent sont des molécules ayant une taille de 20-40 nm, composées à 80% d'atomes d'argent et à 20% d'ions argent. Elles sont, devant les nanotubes de carbone et les nanoparticules de titane, les nanoparticules les plus vendues et relâchées dans l'environnement. Les nano-argent sont très prisés par l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire, de part notamment leur propriété biocide. Néanmoins, l'utilisation de ces nanoparticules reste controversée de par leur risque sur la santé et l'environnement (Rapport du PEN du 9/09/08 ; Arora *et al.*, 2009).

Une illustration de la taille et de la forme des deux types de nanoparticules d'argent sphériques et plaques utilisées dans la suite de ces travaux est disponible en annexe (figure 3).

Introduction

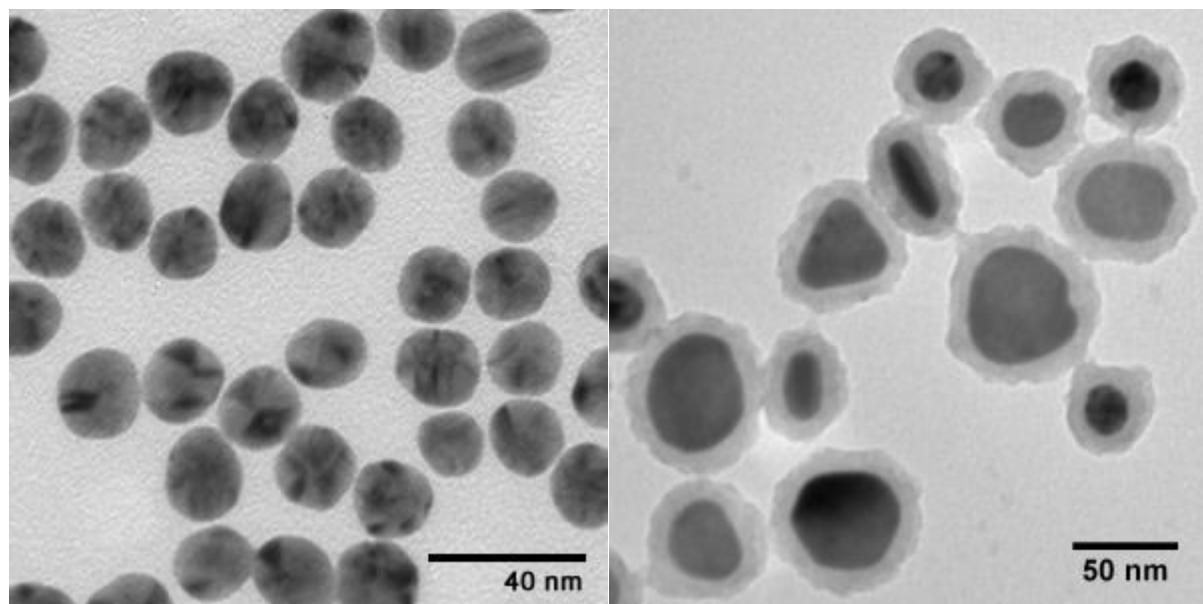


Figure 3 : Photo en microscopie de la taille et forme des deux types de nanoparticules utilisées dans ces travaux, à gauche les nano-sphères d'argent (20 nm) et à droite les nano-plaques d'argent (40 nm)

1.3.1.2. Difficultés d'étude

Du fait de leur petite taille, les nano-argent sont, à l'instar des autres types de nanoparticules insensibles aux forces pouvant s'exercer au sein de leur environnement. Les déplacements de ces nanomatériaux sont donc exclusivement dus à des mouvements Browniens. Au cours de ces déplacements, il est probable que plusieurs nanoparticules entrent en contact et s'agrègent, changeant ainsi leurs propriétés physiques et toxicologiques. Par ailleurs, les nanoparticules d'argent ont tendance à solubiliser en solution, impliquant la libération dans le milieu d'ions argent, dont la toxicité est prouvée à faible concentration sur les communautés bactériennes.

Afin de palier à ce problème, les suspensions de nanoparticules sont additionnées d'agents stabilisateurs et les nano-argent sont enrobés à l'aide de citrate ou de polyvinylpyrrolidone (PVP). Or, l'utilisation de ces agents d'enrobage peut également perturber l'étude de la toxicité des nanoparticules, en créant par exemple des interférences dans les interactions cellules-nanoparticules, ou en produisant une toxicité cellulaire pouvant être interprétée à tort comme provoquée par les nanoparticules. Les mêmes questions se posent quant à l'effet des agents stabilisateurs présents dans la suspension de nanoparticules sur les résultats des études de toxicologie.

Concernant l'utilisation et le stockage des nanoparticules d'argent, leur instabilité implique de les éloigner le plus possible des sources de lumière, ainsi que de les conserver à 4°C. Ces précautions d'emploi impliquent que la manipulation des nano-argent doit se faire de façon très rigoureuse, sans quoi il devient extrêmement difficile d'obtenir des résultats reproductibles, rendant toute étude de toxicité très délicate à réaliser.

Du fait de leurs propriétés physiques, les nano-argent peuvent également biaiser l'interprétation d'un résultat. En effet, la fixation en grande quantité de ces nano-composés à la surface cellulaire peut par exemple engendrer un écrantage d'un signal fluorescent, diminuant son intensité, ce qui peut conduire à de mauvaises interprétations. Par ailleurs, la capacité de ces nanoparticules à se solubiliser peut provoquer l'apparition d'une toxicité à l'argent ionique, faussant l'étude de toxicité de la nanoparticule elle-même.

Compte tenu de tous ces points, la mise en place de protocoles expérimentaux utilisant des nanoparticules d'argent peut être très longue afin de prendre en considération l'ensemble des propriétés physico-chimiques de ces particules pouvant biaiser l'expérimentation et l'analyse des résultats. Il convient donc lors d'utilisation des nano-argent d'être particulièrement rigoureux dans

le respect des protocoles et des conditions d'utilisation, car le moindre écart peut rendre les résultats d'un test extrêmement difficiles à reproduire.

1.3.2. La cyanobactérie modèle : *Synechococcus elongatus* PCC7942

1.3.2.1. Les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont un embranchement du règne bactérien anciennement connues sous le nom d'algues bleues. Ces microorganismes, largement présents dans différents écosystèmes, sont un des régulateurs clés de la concentration en carbone atmosphérique, de par leur capacité photosynthétique libérant du dioxygène (Vermaas, 2001). Ces microorganismes sont également étudiés pour leur capacité à consommer le carbone inorganique présent dans l'environnement, et certaines peuvent fixer le diazote dans certaines conditions.

D'un point de vue structural, les cyanobactéries possèdent une paroi de peptidoglycane incluant un pigment, la phycocyanine, leur conférant leur couleur bleue-verte. Leur propriété photosynthétique leur est conférée par leurs membranes thylakoïdes, hautement spécialisée et comportant les différents acteurs de la photosynthèse (Larkum and Vest, 2003). La disposition de ces thylakoïdes varie par ailleurs suivant la souche cyanobactérienne, mais d'une manière générale, cette disposition est relativement uniforme au sein de la cellule.

Les cyanobactéries n'ont pas de noyau ni de mitochondries. En revanche, elles disposent au sein de leur cytosol de tous les organites nécessaires à la photosynthèse, notamment la RuBisCo (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) et à la fixation du carbone (carboxysome).

Les cyanobactéries sont largement étudiées, notamment pour leur réponses à différents stress nutritifs, mais surtout pour leur cycle physiologique réglé par un rythme circadien. Certains genres sont néanmoins plus étudiés que d'autres, comme *Synechocystis* sp. ou *Synechococcus* sp.

1.3.2.2. La cyanobactérie modèle : *Synechococcus elongatus*

Synechococcus elongatus PCC 7942 est une cyanobactérie d'eau douce anciennement connue sous le nom d'*Anacystis nidulans* R2 et issue de la collection de cultures bactériennes de l'Institut Pasteur (PCC : Pasteur Cultures Collection). Cet organisme a joué un rôle clé dans la mise au point d'outils microbiologiques et génétiques chez les cyanobactéries, notamment la mise au point de protocoles de transformation par de l'ADN exogène. *S. elongatus* PCC 7942 est organisme photoautotrophe obligatoire, particulièrement étudié pour sa capacité de fixation de l'azote

Introduction

atmosphérique, mais aussi du carbone inorganique et pour son acclimatation aux variations environnementales de températures et de luminosité.

S. elongatus PCC 7942 est très proche phylogénétiquement d'une autre souche de la collection Pasteur, *S. elongatus* PCC 6301, si bien que ces deux souches sont considérées comme étant la même espèce. Le génome de cette cyanobactéries mesure environ 2,7 Mb et a été séquencé et annoté et comprend le chromosome ainsi que deux plasmides ayant des tailles de 8 et 48 kb (Sugita *et al.*, 2007).

Au laboratoire, *S. elongatus* est cultivée dans un milieu « eau douce » appelé BG11, dans une pièce équipée de néons de type lumière naturelle avec une agitation douce. Dans ces conditions, le temps de génération de cette cyanobactéries est d'environ 10h (Mori *et al.*, 1996).

1.4. Intérêt de l'étude

L'utilisation croissante des nano-argent a permis de démontrer l'efficacité de leur activité biocide. En effet, avec le temps de plus en plus de publications voient le jour traitant de l'efficacité de ces nanomatériaux pour éliminer les communautés bactériennes. Cependant, si la toxicité a bien été prouvée par des études d'inhibition de croissance, ces mécanismes sont à l'heure actuelle toujours inconnus.

Par ailleurs, la récente prolifération des cyanobactéries dans les cours d'eau inquiète les écologistes. En effet une telle eutrophisation du milieu pourrait à terme déséquilibrer de nombreux écosystèmes. De plus, ces cyanobactéries sont responsables du colmatage des filtres de nombreuses stations d'épuration, et libèrent dans l'eau des cyanotoxines dont les effets neurotoxiques ont été démontrés. Ces toxines donnent un goût nauséabond à l'eau et peuvent à haute concentration être mortelles pour de nombreux animaux dont l'Homme.

Cette étude aura donc deux objectifs principaux :

- Un objectif de recherche fondamentale à court terme, qui concerne la compréhension des mécanismes de toxicité des nanoparticules d'argent sur *S. elongatus* d'un point de vue cellulaire, communautaire et génétique.
- Un objectif environnemental et sanitaire à long terme, qui concerne l'application des travaux de recherche dans le traitement des eaux contaminées par des cyanobactéries.

2. Matériel et méthode

2.1. Souche utilisée et culture bactérienne

2.1.1. Synechococcus elongatus PCC7942

La souche de *Synechococcus elongatus* est issue de la collection de cyanobactéries de l’Institut Pasteur, avec comme numéro d’accession 7942.

2.1.2. Conditions de culture

La cyanobactérie modèle *Synechococcus elongatus* PCC 7942 est cultivée dans un volume de 50 ml de milieu « eau douce », appelé milieu BG11, dont la composition est détaillée en annexe (figure 4). La culture est placée sous agitation (120 rpm) à température ambiante pendant une semaine (correspondant à une DO à 600 nm comprise entre 1 et 1,2) dans une pièce équipée d’une source lumineuse de type « lumière naturelle ». La culture n’est pas soumise à un cycle jour-nuit.

Des ensemencements au 100^{ème} sont réalisés tous les 7 jours afin de renouveler le stock de cyanobactéries.

2.2. Nanoparticules d’argent

Les nanoparticules d’argent sphères et plaques sont fournies et caractérisées par la société NanoComposix. L’enrobage des nano-argent est réalisé à l’aide de PVP.

Les nanosphères d’argent ont une distribution de taille centrée sur 25 nm de diamètre. Leur absorbance maximale est obtenue à 393 nm. La suspension est réalisée à concentration 0,021 mg/ml dans du citrate 2 mM. Le pH de la solution est 7,9.

Les nanoplaques ont une taille se situant aux alentours de 40 nm et disposent des propriétés optiques leur conférant une absorbance maximale à 572 nm. La suspension de nanoparticule est réalisée à concentration de 0,022mg/ml dans du borate 5 mM. Le pH de la solution est 9,0.

Toutes les caractérisations des nanoparticules d’argent utilisées sont répertoriées en annexe (Figures 5 et 6).

Le stockage est réalisé suivant les recommandations de la société NanoComposix, c'est-à-dire entre 4 et 6°C à l’abri de toute source lumineuse.

Matériel et méthode

Ingrédient	Quantité (g/L)
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,04
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,036
Acide citrique	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Mix de métaux traces	1 mg/L
Eau distillée	Qsp 1 L

Figure 4 : Composition du milieu « eau douce » BG11 utilisé pour la culture de la cyanobactérie *S. elongatus*.

Matériel et méthode

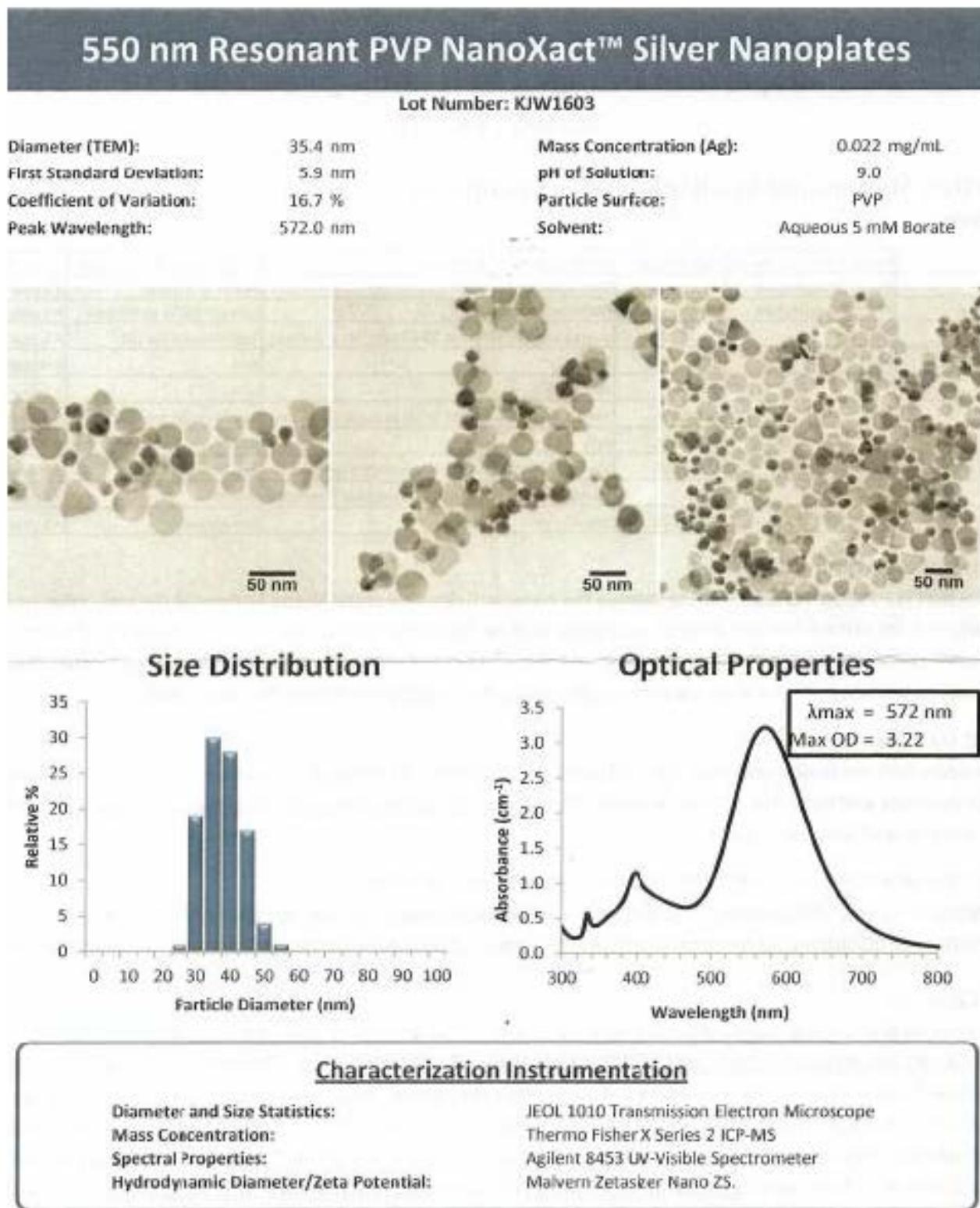


Figure 5 : Caractérisation des nano-plaques d'argent fournies par la société NanoComposix. (nanocomposix.com)

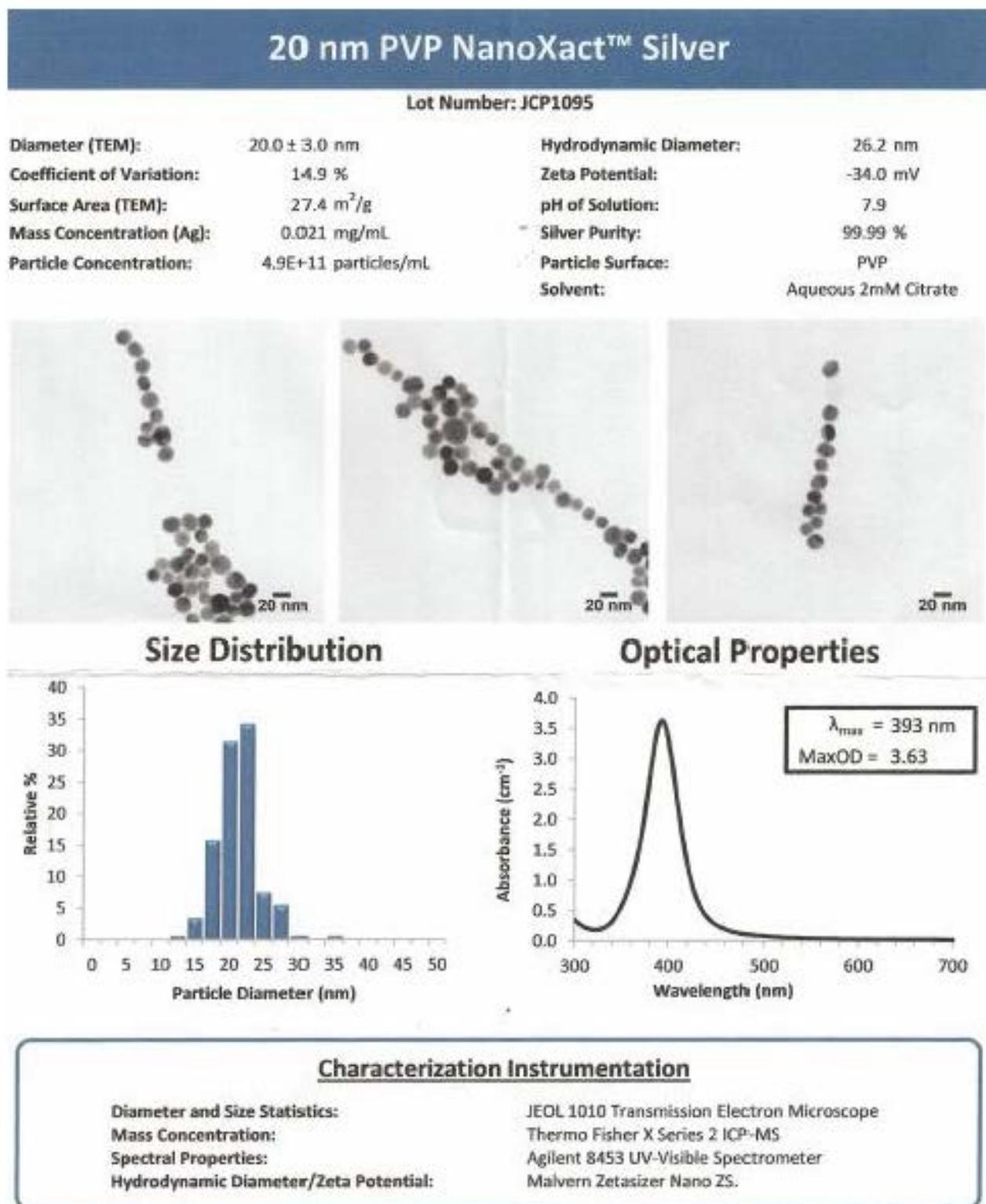


Figure 6 : Caractérisation des nano-sphères d'argent fournies par la société NanoComposix (nanocomposit.com)

2.3. Tests de survie des cyanobactéries aux sels et nanoparticules d'argent

2.3.1. Traitement de la verrerie

Afin d'éliminer toute trace de nanoparticules, les erlenmeyers utilisés pour l'exposition sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes puis plongés dans un bain d'acide pendant 24h. Suite à ce traitement, ils sont rincés 2 fois à l'eau, puis 2 fois à l'eau distillée et 2 fois à l'eau ultrapure. Ils sont ensuite stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

2.3.2. Préparation des cellules

Après une semaine d'incubation, la culture cellulaire décrite ci-dessus est diluée au ½ dans du milieu BG11. L'exposition concerne un volume de 10 ml de cette culture diluée par concentration de nanoparticules testée.

2.3.3. Dialyse des nanoparticules

Afin d'éliminer toute trace d'ions argent ainsi que tout produit pouvant interférer dans les mesures de toxicité présents dans les solutions mères de nanoparticules d'argent sphères et plaques, un volume de 20 ml de chaque solution est placé dans une membrane de dialyse plongée dans un volume de 5 L d'eau ultrapure pendant 5 h avec agitation douce et à l'obscurité totale afin de permettre une dialyse dans des conditions optimales. L'eau est ensuite renouvelée et la dialyse se poursuit pendant encore une heure afin d'éliminer les derniers ions argents potentiellement encore présents dans le dialysat. Suite à cette dialyse, les nanoparticules sont recueillies dans un contenant recouvert d'une feuille de papier aluminium afin de les préserver au maximum de la lumière. L'exposition des cyanobactéries est réalisée immédiatement après la dialyse afin d'éviter une agrégation ou une solubilisation des nanoparticules.

2.3.4. Exposition de *Synechococcus elongatus* aux nanoparticules d'argent

La gamme de concentrations de nanoparticules d'argent sphères et plaques est réalisée immédiatement après la dialyse à l'aide d'eau ultrapure dans un volume final de 10 ml par concentration, dans des erlenmeyers traités suivant le protocole décrit ci-dessus. Un volume équivalent de la culture de cyanobactéries à DO 1 diluée au ½ comme décrit précédemment est ajouté aux 10 ml de solutions de nanoparticules. L'exposition se fait sur une table d'agitation (120 rpm) avec un éclairage de type « lumière du jour » pendant 5h.

2.3.5. Exposition de *Synechococcus elongatus* aux ions argent

Le même protocole d'exposition est réalisé à partir d'une gamme de concentrations en AgNO_3 (0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L et 0,5 mg/L) afin de déterminer la toxicité des ions Ag^+ sur *Synechococcus elongatus*. L'objectif étant d'observer l'importance d'éliminer tout résidu ionique dans la dialyse avant de réaliser le test de mesure de la toxicité aux nanoparticules d'argent.

Dans la suite de ce rapport, deux termes seront employés pour parler des concentrations en ions argent et nanoparticules :

- Concentration de la gamme : concentration en argent ionique/nano-argent avant dilution par addition de la culture cellulaire.
- Concentration totale : concentration en argent ionique/nano-argent après dilution par addition de la culture cellulaire.

2.3.6. Dosage des concentrations en nanoparticules et argent ionique

La concentration des nano-argent est déterminée par dosage réalisés sur des échantillons après dialyse. 6 ml de la solution de nanoparticules sont additionnés à 18 ml d'eau ultrapure. Ce mélange est réalisé deux fois : le premier échantillon est centrifugée à 300 000 G pendant 90 minutes afin de culoter les nanoparticules, puis 15 ml de surnageant sont prélevés afin de doser l'argent ionique présent après dialyse. Le second échantillon est traité à l'acide nitrique 1% afin de solubiliser la totalité des nanoparticules, puis l'argent ionique est également dosé sur un volume de 15 ml de cette solution afin de déterminer la concentration totale en argent. La concentration en nanoparticule est déterminée par soustraction des deux dosages.

Par ailleurs, le même protocole est réalisé sur une concentration de nanoparticules traitée comme indiqué dans le paragraphe 2.2.3.4. Ce dosage permet de contrôler la solubilisation des nanoparticules d'argent au cours de l'exposition.

2.3.7. Mesure de la survie de *Synechococcus elongatus*

La mesure de survie bactérienne est basée sur l'utilisation de la fluorescence naturelle de la cyanobactérie due à la chlorophylle ainsi que d'un colorant vital, le SYTOX Green (SYTOX® Green Dead Cells Stain, Life Technologies). Le SYTOX Green est incorporé dans un échantillon à une concentration finale de 100 μM . L'échantillon est ensuite placé à l'obscurité pendant 5 minutes avant d'être directement placé entre lame et lamelle pour comptage en microscopie à fluorescence.

Matériel et méthode

L'excitation de l'échantillon se fait à 488 nm, ce qui a pour effet l'obtention de deux signaux, un rouge correspondant à la chlorophylle présente dans *S. elongatus* et un vert correspondant à un marquage des cellules mortes par le SYTOX Green.

Dans le cadre de la mesure de survie aux nanoparticules d'argent et au nitrate d'argent, la coloration est réalisée sur des volumes de 49 µl de chaque condition testée additionnés à 1 µl de SYTOX Green dilué au préalable à 10%. Ce prélèvement est réalisé toutes les heures pendant 5h.

Après 5 minutes d'incubation nécessaires au bon marquage des cellules mortes, 3 µl du mélange sont prélevés et placés entre lame et lamelle. La mesure de la survie est ensuite réalisée en microscopie à fluorescence et dans l'obscurité afin de ne pas altérer le SYTOX Green, ce qui aboutirait à la perte du marquage vert. Le pourcentage de survie est mesuré dans 6 champs de microscopie par condition, ce qui permet de réaliser la moyenne et l'écart-type de la survie pour chaque condition.

2.4. Exposition de *S. elongatus* en vue d'études transcriptomiques

L'exposition de *S. elongatus* à l'argent ionique et aux deux types de nano-argent est réalisée en quadriplica. Les solutions de nano-argent sont préparées après dialyse à une concentration de 5 mg/L, puis additionnées d'un volume équivalent d'une culture cellulaire à DO 600nm comprise entre 1,1 et 1,3.

La verrerie utilisée correspond à la même que celle ayant permis la réalisation des tests de survie décrits ci-dessus, après traitement nécessaire à l'élimination des résidus de nano-argent et de l'argent ionique persistants suite aux mêmes tests de survie, tel que décrit en 2.3.1. Les conditions de lumière et de température sont également strictement identiques.

Un total de 16 expositions est réalisé, à savoir :

- 4 non exposées, dans lesquels la solution d'argent est remplacée par 10 ml d'eau ultrapure.
- 4 exposées à une CE50 d'argent ionique, correspondant à une concentration finale en AgNO_3 de 0,15 mg/L.
- 4 exposées à une CE50 de nano-sphères d'argent, correspondant à une concentration finale en nanoparticules de l'ordre de 2,5 mg/L
- 4 exposées à une CE50 de nano-plaques d'argent, correspondant à une concentration finale en nanoparticules de l'ordre de 2,5 mg/L

Matériel et méthode

L'exposition est réalisée sur une base de 2h. Passé ce délai, les cultures sont centrifugées à 8000 g pendant 5 minutes. Le culot est repris dans 200 µl de Qiagen Protect (stabilisateur des ARN totaux) puis mis à incuber 5 minutes. L'échantillon est ensuite re-centrifugé à 8000 g pendant 5 minutes, le Qiagen Protect est évacué et les culots sont stockés à -80°C.

2.5. Extraction et purification des ARN totaux de *S. elongatus*

2.5.1. Extraction des ARN

L'extraction est réalisée à partir des culots obtenus dans le paragraphe précédent. Ceux-ci sont additionnés de 500 µl de Trizol puis vortexés pendant 10 s. Les échantillons sont ensuite congelés à l'azote liquide puis décongelés pendant 2 minutes à 70°C avant d'être vortexés pendant 10s. Ce cycle de congélation, décongélation, vortex est répété 4 fois. 100 µl de chloroforme sont ensuite ajoutés aux échantillons. Après une forte agitation, ces derniers sont laissés à incuber pendant 2 min puis centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes. La phase aqueuse (supérieure) est ensuite prélevée, alors que la phase inférieure est soigneusement évitée. Le volume prélevé correspond environ à 220 µl. Un volume équivalent d'isopropanol 100% est ajouté afin de précipiter les ARN, puis les échantillons sont incubés dans la glace pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 18000 g et les culots sont lavés à l'éthanol 70%. Les échantillons sont ensuite re-centrifugés 15 min à 18000 g, l'éthanol est retiré soigneusement puis les culots sont laissés à sécher à température ambiante (15 minutes maximum). L'ARN est ensuite dissout dans 50 µl d'eau « RNase free », puis la concentration et les ratios sont mesurés au nanodrop.

2.5.2. Purification des ARN et traitement à la DNase I

Le traitement suivant correspond à une quantité de l'ordre de 5 µg d'ARN. Un volume de 10 µl de DNasel ainsi que 6 µl de tampon est ajouté, puis les échantillons sont incubés à 24°C pendant 20 minutes. Le volume est ensuite ajusté à 100µl avec de l'eau « RNase free ». La suite du protocole correspond à celui décrit dans le kit « RNA purification RNeasy Qiagen ».

2.5.3. Mesure de l'intégrité et de la pureté des ARN

Suite à ces deux étapes, les échantillons sont examinés au bioanalyseur, lequel permet de déterminer la qualité des ARN en se basant sur l'analyse des ARNr (ribosomiques). En effet, ces derniers étant surexprimés dans les cellules, leur quantité permet de mieux apprécier la qualité globale des ARN totaux. Le bioanalyseur fournit un coefficient d'intégrité (RIN : RNA Integrity Number), correspondant à la qualité de l'ARN analysé et variant entre 0 et 10, 10 correspondant à un ARN d'excellente qualité. Afin de réaliser une PCR quantitative, un RIN minimum de 8 est demandé.

3. Résultats

3.1. Détermination des concentrations efficaces médianes aux nanoparticules d'argent et aux ions argent chez *S. elongatus*

3.1.1. Protocole expérimental

3.1.1.1. Vérification de l'efficacité du marquage

Afin de tester l'efficacité de marquage des cellules mortes par le SYTOX Green, des cyanobactéries sont tuées suivant deux modes expérimentaux. Le premier consiste à plonger une culture cellulaire dans un bain-marie à 50°C pendant 30 minutes, alors que le second est un traitement à l'éthanol, au cours duquel la culture cellulaire est préalablement centrifugée avant d'être re-suspendue dans de l'éthanol 70%. La durée d'exposition à l'éthanol est également de 30 minutes.

Suite à ce traitement, les échantillons sont marqués au SYTOX Green puis placés entre lame et lamelle. Une culture non traitée est marquée de la même manière et utilisée comme témoin négatif. L'observation au microscope à fluorescence permet de montrer que les cellules traitées à la chaleur ou à l'éthanol présentent à 100% une coloration orange ou verte, alors que les cellules non traitées apparaissent en rouge (figure 7).

Par ailleurs, la même expérience est réalisée sans marquage au SYTOX Green. Le témoin négatif apparaît toujours en rouge, alors que les cellules qui apparaissent en vert lors d'une coloration n'émettent plus de signal, et celles qui apparaissent en orange émettent un signal rouge très faible en l'absence de marquage. Un traitement de ces échantillons au Syto9 (colorant vert permettant le marquage de l'ensemble des cellules – vivantes ou mortes – d'un échantillon et classiquement utilisé en association avec de l'iodure de propidium dans les tests de viabilité cellulaire) permet de révéler que l'absence de signal des cellules traitées à l'éthanol ou à la chaleur n'est pas dû à une lyse cellulaire, mais bien à une perte du signal rouge induit par la chlorophylle.

3.1.1.2. De la toxicité des ions argent...

Au cours de cette démarche expérimentale, différentes conditions ont été testées vis-à-vis de l'utilisation des deux types de nanoparticules d'argent. Le premier essai d'exposition des cyanobactéries fut réalisé à partir de stocks de nanoparticules tels qu'ils furent fourni par la société NanoComposix. L'exposition est réalisée sur des cyanobactéries traitées aux nano-sphères et aux nano-plaques d'argent, ainsi qu'au nitrate d'argent. Un témoin négatif constitué d'une culture

Résultats

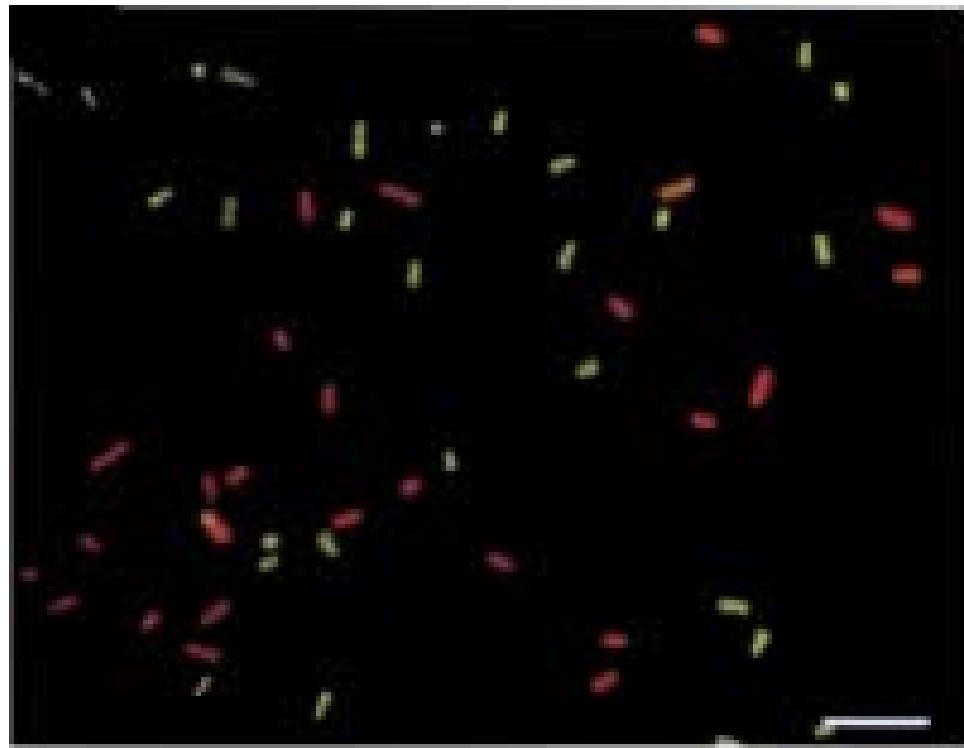


Figure 7 : Photo prise en microscopie à fluorescence d'une culture de cyanobactéries *S. elongatus* PCC 7942 marquée au SYTOX Green. Les cellules vertes et oranges correspondent aux cellules mortes, alors que les rouges sont vivantes. La concentration en SYTOX Green nécessaire à la réalisation de ce marquage est fixée à 50 µM. Cette concentration est doublée dans le cadre des travaux décrits dans ce rapport.

La barre correspond à une longueur de 10 µm. (D'après Sato *et al.*, 2004)

Résultats

cellulaire non traitée est également déposé, de même qu'un témoin positif constitué de cellules chauffées à 60°C au bain-marie pendant 30 minutes. La lecture de la toxicité est réalisée après incorporation du SYTOX Green dans tous les échantillons et incubation 5 minutes à l'obscurité. Un total de 4 lectures est réalisé (correspondant à T = 0, 1, 2 et 3 heures). Pour chaque condition, un total de 200 cellules est compté, puis un ratio cellules vivantes/total est calculé pour donner les pourcentages de survie présenté ci-dessous.

Au cours de cet essai, les concentrations finales en nanoparticules testées (5 mg/L et 10 mg/L) ont fourni des résultats de toxicité intéressants semblant montrer une toxicité plus importante des sphères par rapport aux plaques d'argent. En effet, avec une concentration à 5 mg/L de sphères d'argent, la survie mesurée au bout de 3 h d'exposition est identique à celle obtenue avec 10 mg/L de plaques d'argent (60%), alors qu'une concentration à 10 mg/L de sphères aboutit en 3 h à une survie de l'ordre de 10% (figure 8).

Quant à la toxicité du nitrate d'argent, les 4 concentrations testées (0,025 mg/L, 0,05 mg/L, 0,15 mg/L et 0,3 mg/L) ont permis de mettre en évidence une concentration minimale induisant une toxicité significativement différente de 0 comprise entre 0,05 mg/L et 0,15 mg/L. Ces mesures ont également permis d'identifier une mortalité d'environ 50 à 60% des cellules en 3 h avec les 2 concentrations les plus élevées. Les deux concentrations les plus faibles n'induisent quant à elles pas de toxicité significative et aboutissent en 3 h à une survie cellulaire comprise entre 90 et 95% (Figure 9).

Si la reproductibilité de cette expérience n'a pas été testée, les mesures ainsi réalisées ont permis de mettre en évidence l'effet toxique des ions argent à très faible concentration sur *S. elongatus*, ainsi qu'un effet toxique important des solutions de nano-argent fournies par NanoComposix. Cependant, des dosages d'ions argent présents dans ces solutions de nanoparticules ont été réalisés et ont montré que la suspension de nano-plaques d'argent présente une concentration en ions argent de l'ordre de 0,11 mg/L et la solution de nano-sphères d'argent une concentration de l'ordre de 0,69 mg/L. Ainsi, la toxicité mesurée lors de ce premier essai pourrait en fait correspondre à une toxicité de l'argent ionique présent dans ces solutions stock, et non à un impact des nanoparticules sur *S. elongatus*, ce qui pose un problème pour la suite de l'étude toxicologique, nécessitant d'éliminer l'argent ionique des solutions stock utilisées avant de procéder à l'exposition de la cyanobactérie.

Résultats

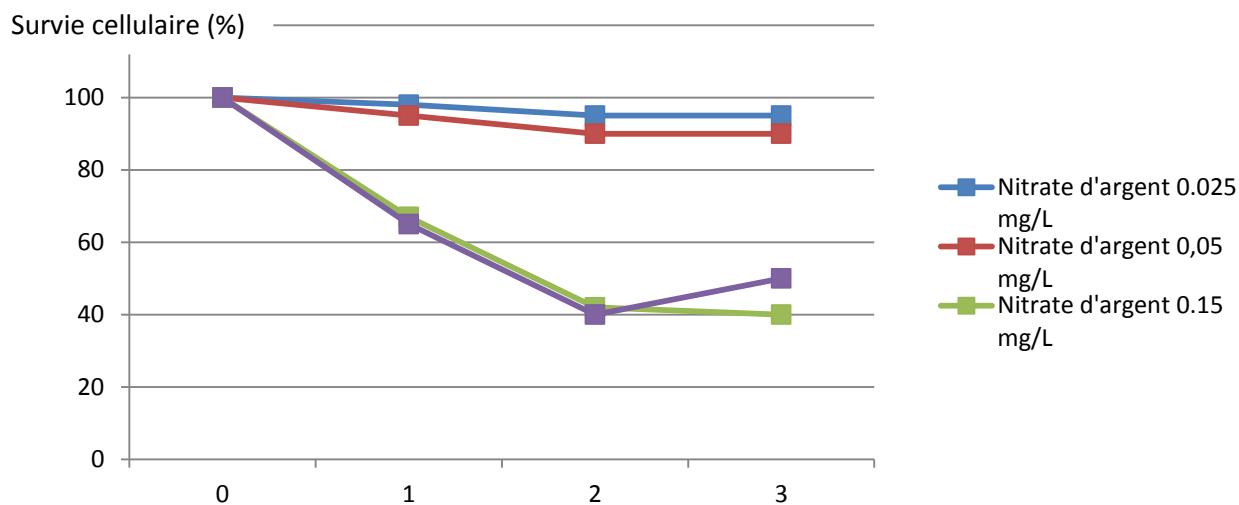
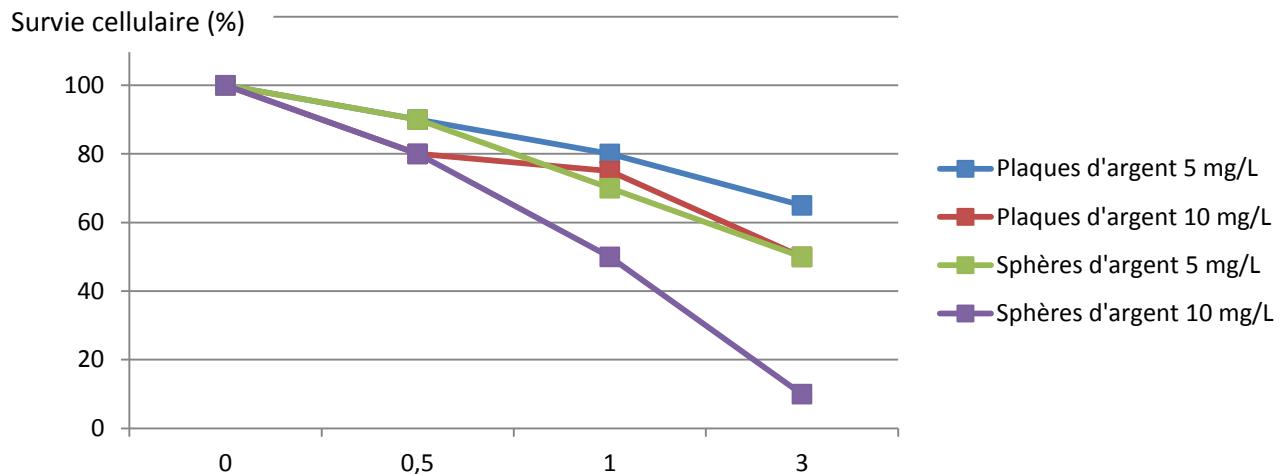


Figure 9 : Mesure sur 3 heures de la toxicité de différentes concentrations de nitrate d'argent sur *S. elongatus*. Les concentrations affichées sont les concentrations finales, c'est-à-dire correspondant aux solutions de nitrate d'argent additionnées de la culture cellulaire. L'axe des ordonnées correspond à la survie cellulaire en pourcentage alors que l'axe des abscisses donne le temps en heures.

Résultats

3.1.1.3. ...A la nécessité d'une dialyse des nano-argent

Avec la prise de conscience de la toxicité des ions argent présents dans les suspensions de nanoparticules vient la nécessité d'éliminer cet argent ionique afin de pouvoir apprécier précisément la toxicité des nano-argent uniquement. La dialyse des solutions apparait alors comme une solution valable à cette problématique.

Etant donné l'efficacité croissante d'une dialyse au cours du temps, le premier essai fut réalisé à l'obscurité totale sur une durée de 16h en « overnight » à partir de 20 ml de chaque solution stock de nanoparticules, l'idée étant d'éliminer la totalité de l'argent ionique présent en solution afin de conserver uniquement les nanoparticules enrobées. Au moment de la récupération des solutions dialysées, un changement de couleur des nano-plaques (du bleu vers le jaune) a été constaté. Il a néanmoins été décidé de poursuivre la manipulation, afin de mesurer l'impact de ce changement d'aspect sur la toxicité de ces nanoparticules sur *S. elongatus*.

Des dilutions sont réalisées à partir des nanoparticules dialysées. Les stocks étant concentrés à 20 mg/L et la dialyse supposée ne pas réduire cette concentration, les solutions préparées sont donc à concentration 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L et 10 mg/L. A ces solutions est additionné un volume de la culture cellulaire telle que présentée dans la section matériel et méthode. Les mesures de viabilité cellulaire suite à cette exposition ont donné des résultats semblant montrer une non toxicité des nanoparticules d'argent sur *S. elongatus*, avec des survies de l'ordre de 95% (+/- 6%) pour les sphères et 90% (+/- 10%) pour les plaques après 5h d'exposition.

Suite à ces résultats, le protocole de dialyse a été réétudié. Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire et ayant nécessité une dialyse de ces mêmes nano-argent ont permis de montrer qu'une dialyse de 5 h de 20 à 40 ml de chaque solution dans 5 litres d'eau ultrapure, suivie d'une seconde dialyse dans les mêmes conditions pendant une heure dans un nouveau volume d'eau permettent d'éliminer environ 99,9% de l'argent ionique en solution, tout en conservant les concentrations initiales des stocks de nanoparticules.

Un second essai d'exposition post-dialyse a donc été réalisé utilisant ce protocole. La même gamme de concentration a été préparée, et l'exposition s'est déroulée avec une culture cellulaire ayant la même DO que celle du premier essai, la même source lumineuse, pendant une durée strictement identique. Les analyses de survie effectuées suite à ce second test ont permis de mettre en évidence une toxicité beaucoup plus importante, avec une survie quasiment nulle au bout de 5 h d'exposition avec les solutions à 10 mg/L de nanoparticules, que ce soit pour les sphères (16% (+/-5%)) ou les plaques (5% (+/-9%)).

Résultats

Suite aux analyses réalisées dans ces 2 conditions de dialyse, il apparaît que la durée de cette dernière a un impact important sur les expériences de toxicité réalisées à posteriori, avec des écarts de survie cellulaire de *S. elongatus* de l'ordre de 100% en 5 h avec les concentrations maximales testées (figure 10). La toxicité observée lors du second essai apparaît par ailleurs clairement comme due à la présence des nanoparticules d'argent dans le milieu de culture, étant donné que la survie du témoin négatif (dans lequel la solution de nanoparticules est remplacée par la même eau ultrapure que celle ayant servi à réaliser les dilutions des nano-argentés dialysés) est toujours aux alentours de 100% après 5 h d'exposition dans les mêmes conditions.

3.1.1.4. Impact du temps d'ouverture du contenant des NP

Une fois le protocole de dialyse mis en place, une nouvelle exposition a été réalisée, permettant de déterminer la concentration efficace médiane (CE50) des deux types de nanoparticules d'argent sur *S. elongatus*. Les résultats ont été obtenus au après que la dialyse et l'exposition ait été réalisées dans les conditions décrites ci-dessus. La semaine suivante, un second réplique biologique est réalisé à partir d'une culture cellulaire au même stade physiologique, à une densité optique à 600 nm identique. La dialyse est réalisée dans des conditions strictement identiques à partir des mêmes suspensions stock de nanoparticules, de même que l'exposition. Le troisième réplique est quant à lui réalisé 2 semaines plus tard, à partir d'un nouveau stock de nanoparticules d'argent en provenance de la même société et ayant été transporté, stocké et manipulé dans des conditions strictement identiques.

Si dans les trois cas la survie du témoin négatif est identique et constante au cours du temps (comprise entre 95 et 100%), des variations significatives de survies sont obtenues avec les 2 types de nanoparticules d'argent en fonction du temps après l'ouverture de la bouteille contenant la suspension. Le premier réplique a en effet été réalisé à partir d'une suspension réceptionnée et ouverte 3 semaines plus tôt. Dans le cas du deuxième réplique, le contenant avait donc été ouvert 4 semaines plus tôt, alors que lors du troisième réplique, la suspension avait été ouverte le jour de la dialyse. Lors de l'analyse de la survie cellulaire, une différence significative est constatée sur la toxicité induite en 3 h par les deux types de nanoparticules d'argent sur *S. elongatus*. En effet, la nouvelle suspension induit un effet maximal dans le cas des solutions de nanoparticules les plus concentrées (7,5 mg/L et 10 mg/L) au bout de ces 3 h d'exposition, alors que la suspension ouverte depuis un mois n'induit aux mêmes concentrations qu'une toxicité médiane, avec 50% de survie pour les sphères et les plaques. La survie mesurée après exposition avec la suspension ouverte depuis 3 semaines induit une toxicité intermédiaire, sans variation significative avec les deux autres conditions (figure 11).

Résultats

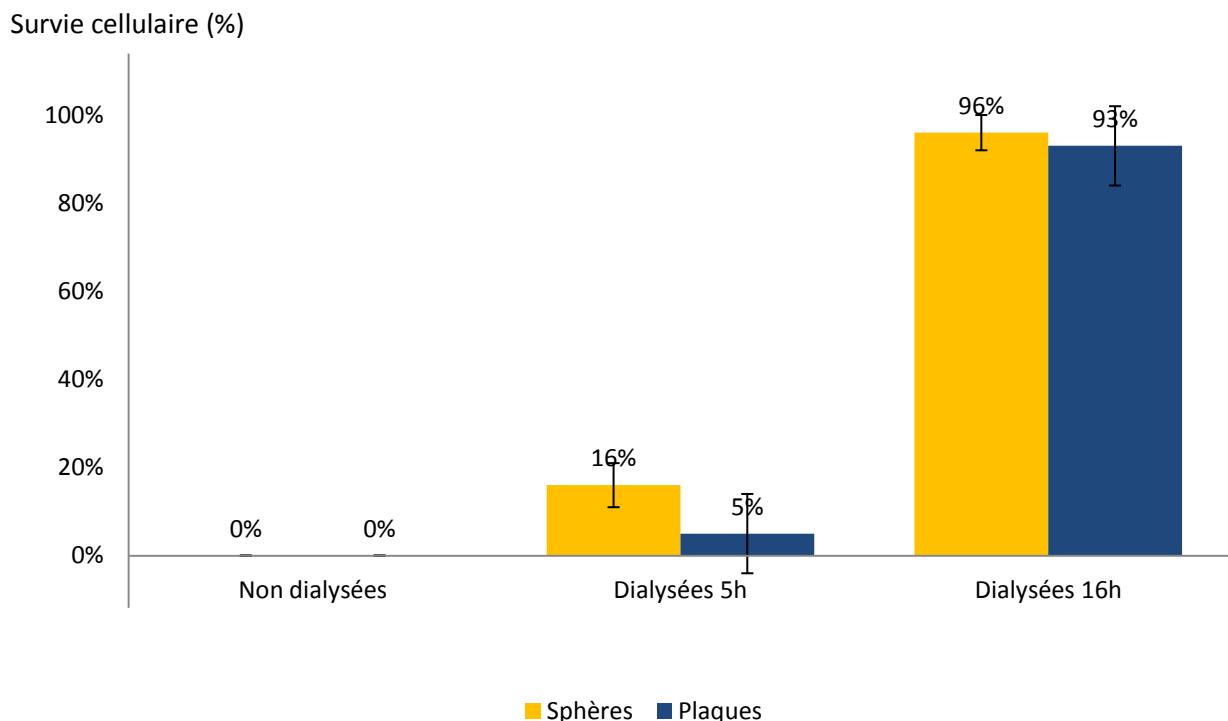


Figure 10 : Impact de la durée de la dialyse sur la toxicité mesurée chez *S. elongatus* après 5 h d'exposition à une concentration finale en nanoparticules de 5 mg/L. L'axe des ordonnées représente la survie cellulaire. Les barres d'erreurs et les valeurs affichées sont réalisées sur la base de 6 mesures par condition.

Résultats

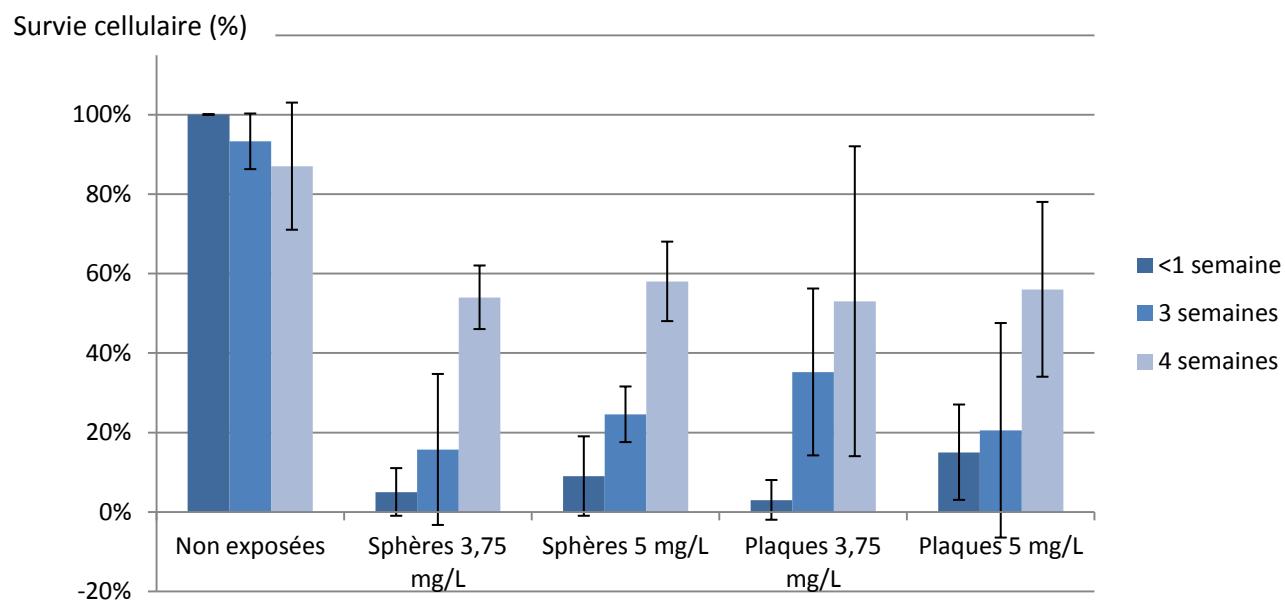


Figure 11 : Impact du temps d'ouverture des bouteilles contenant les suspensions de nanoparticules sur la toxicité observée chez *S. elongatus* après une exposition de 3 h. Les concentrations indiquées représentent les concentrations finales en nano-argent, c'est-à-dire celles de la gamme de dilution des nanoparticules additionnées de la culture cellulaire. L'axe des ordonnées représente le pourcentage de survie cellulaire et l'axe des abscisses différentes concentrations des deux types de nanoparticules d'argent étudiés. Les barres d'erreur sont calculées sur une base de 6 mesures par échantillon.

3.1.2. Détermination des CE 50 aux nano-argent et nitrate d'argent

La détermination des CE50 à l'argent ionique ainsi qu'aux deux types de nano-argent étudiés (sphères et plaques) est réalisée suite à la mise en place du protocole expérimentale, sur une base de 3 répliques biologiques, que ce soit pour la gamme de nitrate d'argent (AgNO_3) ou pour chacune des deux gammes de nanoparticules. Les gammes testées sont réalisées :

- Pour les solutions de nitrate d'argent à partir d'une solution mère à 100 mg/L par des dilutions en cascade d'un facteur par dilution.
- Pour les solutions de nano-argent à partir d'un volume de 15 ml des solutions stocks dialysé au préalable à l'obscurité totale pendant 5 h dans 5 litres d'eau ultrapure, puis 1h dans un nouveau volume d'eau ultrapure.

Dans les 2 cas, l'hypothèse de la conservation des concentrations est faite, et les différentes concentrations composant les gammes de dilutions de l'argent ionique et des nano-argent. Les concentrations effectives seront dosées à une date ultérieure à la publication de ces travaux dans des conditions de traitement des solutions mères identiques. Les gammes de concentrations testées sont détaillées dans la suite de ce paragraphe :

- Nitrate d'argent : les concentrations de la gamme sont les suivantes : 0, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L et 0,5 mg/L.
- Nano-argent : les concentrations de la gamme sont les suivantes : 0, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L et 10 mg/L

Cette gamme de dilution, correspondant à un volume de 10 ml de solution, est additionnée à un volume égal d'une culture de *S. elongatus* diluée au ½ dans du milieu BG11 pour atteindre une DO 600 nm finale de 0,6 (puis 0,3 une fois la culture incorporée à la solution d'argent). Les différentes conditions sont ensuite incubées à des conditions de lumière et de températures identiques à celles détaillées dans le protocole expérimental. Les prélèvements nécessaires pour la mesure de la survie grâce au marquage SYTOX Green sont réalisés toutes les heures sur un total de 5 h.

Après que les résultats aient été recueillis, leur analyse a permis de constater plusieurs faits. Tout d'abord, une mortalité cellulaire est observée dans le cas d'une exposition aux deux types de nano-argent étudiés. En effet, pour la concentration la plus forte testée (5 mg/L en concentration finale) en sphères et en plaques, la mortalité cellulaire atteint voire dépasse 50% en 1 h d'exposition.

Résultats

Par ailleurs une tendance est observée entre les deux types de nanoparticules d'argent étudiées, montrant une différence significative de mortalité observée chez *S. elongatus* pour une même concentration sauf à la 5^{ème} heure d'exposition (une tendance semblable aux 4 autres mesures est néanmoins observée). En effet, il semblerait que les plaques d'argent induisent une toxicité supérieure à celle observée avec les sphères, et ce quelque soit la concentration testée ou le temps d'exposition dans ces conditions d'étude.

Enfin, si les nano-argent utilisés induisent bien une toxicité, cette dernière est bien inférieure à la toxicité provoquée par l'argent ionique. En effet, les CE50 observées pour les nanoparticules se situent entre 5,5 mg/L en 1h et 1,3 mg/L pour les sphères ou 4mg/L en 1h et 1 mg/L en 5h pour les plaques, alors que celle observée pour l'argent ionique est de l'ordre 0,18 mg/L en 1h et de 0,13 mg/L au bout de 5 h. L'évolution de l'ensemble des valeurs de CE50 au cours du temps est détaillée en annexe (figure 12).

3.2. Mise en place du protocole d'extraction d'ARN de *S. elongatus*

Les essais d'extraction des ARN totaux de *S. elongatus* ont été réalisés à partir de cultures cellulaires non exposées ayant le même état physiologique que celles utilisées dans les expérimentations décrites ci-dessus. Les cellules sont aliquotées par 5 ml, puis centrifugées à 8000 g pendant 5 min. Le surnageant est ensuite retiré, et le culot est repris dans 200 µl de Qiagen Protect. Après 5 min d'incubation à température ambiante, les échantillons sont à nouveau centrifugés à 8000 g pendant 5 min, le surnageant est éliminé et les culots stockés à -80°C.

Dans un premiers temps, 2 culots ont été utilisés pour tenter de réaliser l'extraction à partir du kit RNA purification RNeasy Qiagen, en respectant rigoureusement le protocole décrit dans ce dernier. La mesure de la concentration en ARN et des ratios via nanodrop a donné dans les deux cas des résultats montrant que le signal obtenu à 260 nm (correspondant à la longueur d'onde à laquelle le signal ARN est maximal) est principalement dû à un bruit de fond. Par ailleurs, les ratios 260/230 (permettant d'observer une contamination aux solvants organiques de type éthanol, etc.) et 260/280 (permettant d'observer une contamination aux protéines) étant tous les deux inférieurs à 1,8 – valeur seuil que ces ratio doivent atteindre pour être utilisables lors de tests en transcriptomique – les échantillons traités par ce kit en suivant le protocole qui y est associé ne sont donc pas utilisables. Ces résultats ont permis de conclure que ce protocole ne permet pas d'obtenir d'ARN de *S. elongatus* avec une qualité et une concentration suffisantes pour procéder à des analyses ultérieures.

Résultats

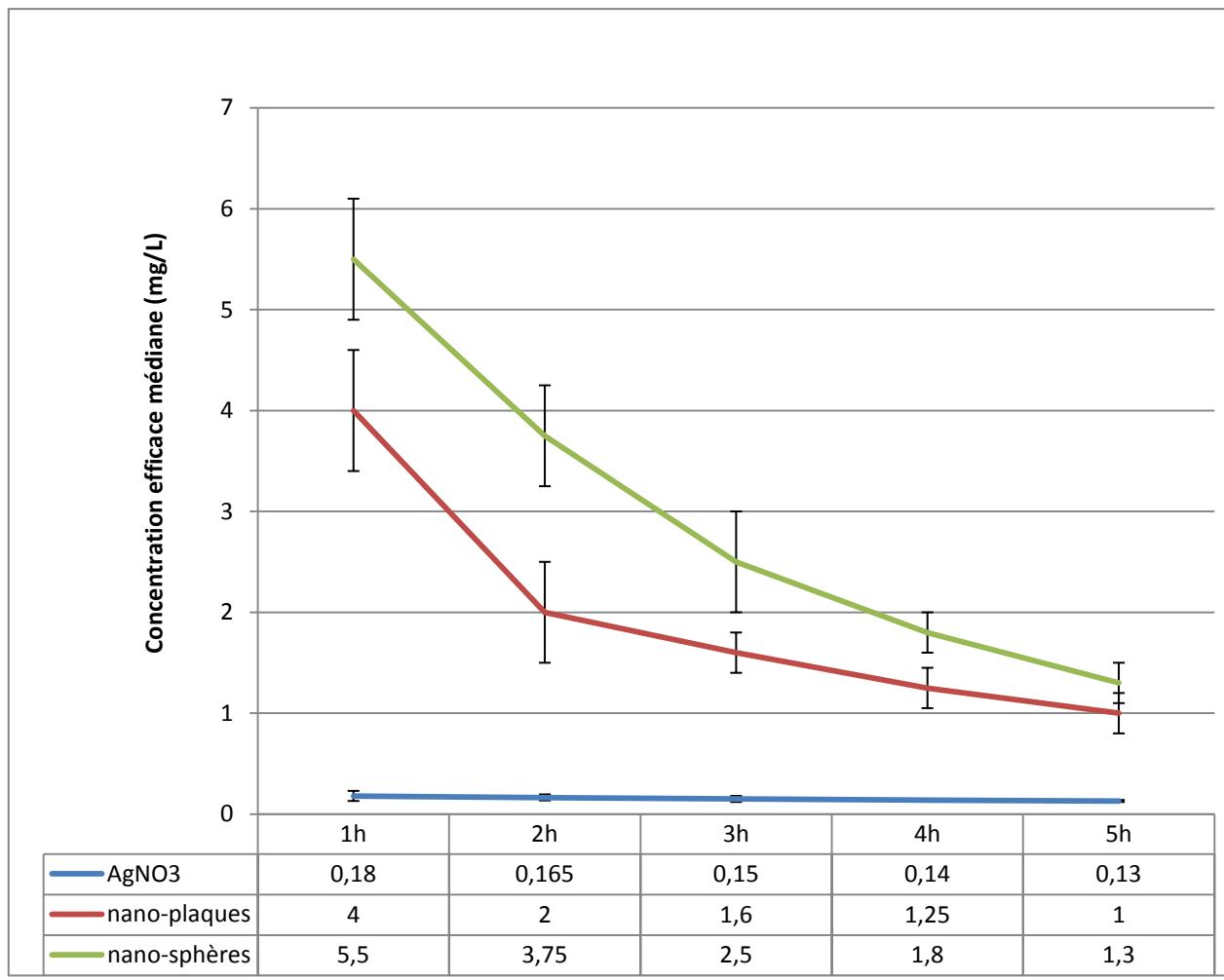


Figure 12 : Evolution des CE50 au nitrate d'argent et aux deux types de nano-argent étudiés (sphères et plaques) sur *S. elongatus*. L'axe des ordonnées représente la CE50 (en mg/L) et l'axe des abscisses le temps en heures. Les barres d'erreurs sont calculées sur la base de 3 répliques biologiques.

Résultats

Suite à cet essai, un second kit d'extraction, « Mobio RNA Power Soil Total RNA Isolation Kit » a été testé sur des culots issus de la même culture de *S. elongatus* et ayant été traités dans des conditions identiques. Une fois de plus, le protocole fourni à l'intérieur du kit d'extraction a été rigoureusement suivi. Une fois le protocole réalisé dans son intégralité, les échantillons ont également été soumis à une vérification des ratios et une mesure de la concentration en ARN par nanodrop. Il a été mesuré pour les deux échantillons une concentration infime en ARN ainsi que des ratios 260/230 et 260/280 inférieurs à la valeur seuil de pureté. De fait, ce second kit ne semble pas non plus adapté à l'extraction des ARN totaux de la cyanobactérie *S. elongatus*.

Les résultats des mesures au nanodrop réalisées suite à l'utilisation du kit MoBio ne sont pas disponibles mais sont en revanche similaires à ceux obtenus avec le kit Qiagen, présentés en annexes (figure 13).

Après documentation concernant les extractions d'acides nucléiques chez les cyanobactéries, il a été décidé de procéder à une extraction suivant le protocole décrit dans la rubrique « matériel et méthode », partie 2.5. Une fois de plus, de nombreux essais ont été réalisés afin de déterminer les volumes et temps d'attentes permettant d'obtenir les meilleurs résultats.

L'extraction des ARN totaux de *S. elongatus* ont été réalisés en 2 réplicas. Les mesures en nanodrop ont montré des concentrations égales à 262 et 265 ng/µl ainsi que des ratios 260/280 et 260/23 respectivement à 1,88 et 2,25 pour le premier échantillon et 2,01 et 2,05 pour le second. De tels résultats permettent d'entamer la seconde étape du traitement des acides nucléiques, correspondant à la purification des ARN. Après cette étape, les échantillons sont passés au bioanalyseur.

Les mesures au bioanalyseur des deux échantillons purifiés montrent des concentrations respectivement à 32 ng/µl et 65 ng/µl, soit des pertes de 88% et 75% par rapport aux mesures réalisées au nanodrop. Cependant, ces pertes sont toujours rencontrées lors du processus de purification, il convient donc de ne pas s'inquiéter pour autant. Concernant la mesure de la qualité des ARNr, le RIN obtenu pour le premier échantillon se situe à 8,01, soit une qualité suffisante pour permettre une amplification par PCR quantitative. En revanche, le second échantillon donne au bioanalyseur une courbe beaucoup moins précise, traduisant une qualité bien inférieure, et ne permettant pas d'aboutir à la définition du RIN. Cet échantillon n'est donc pas utilisable pour la suite de l'analyse (figure 14).

D'une manière générale, ces tests ont donc permis de montrer que le protocole mis en place ci-dessus permet d'obtenir après purification un ARN en qualité suffisante pour des tests en qPCR.

Résultats

Echantillon	260/230	260/280	Concentration (ng/μl)
1	1,00	1,68	13,6
2	0,74	1,55	40,1
3	2,25	1,88	262
4	2.05	2.01	265

Figure 13 : résultats des mesures nanodrop réalisées sur les 2 échantillons de cyanobactéries après réalisation du protocole d'extraction des ARN via le kit RNA Purification RNeasy Qiagen (échantillons 1 et 2) ou via le protocole décrit dans la rubrique matériel et méthode (3 et 4). Le ratio 260/230 permet de déceler une contamination par un solvant (éthanol...) et doit être supérieur à 1,8. Le ratio 260/280 permet de mesurer la contamination par des protéines et doit idéalement être compris entre 1,8 et 2,2. Les concentrations et ratios obtenus pour les échantillons 1 et 2 montrent qu'ils ne sont pas utilisables pour la suite de l'analyse transcriptomique, alors que les échantillons 3 et 4 disposent de ratios et d'une concentration permettant cette analyse.

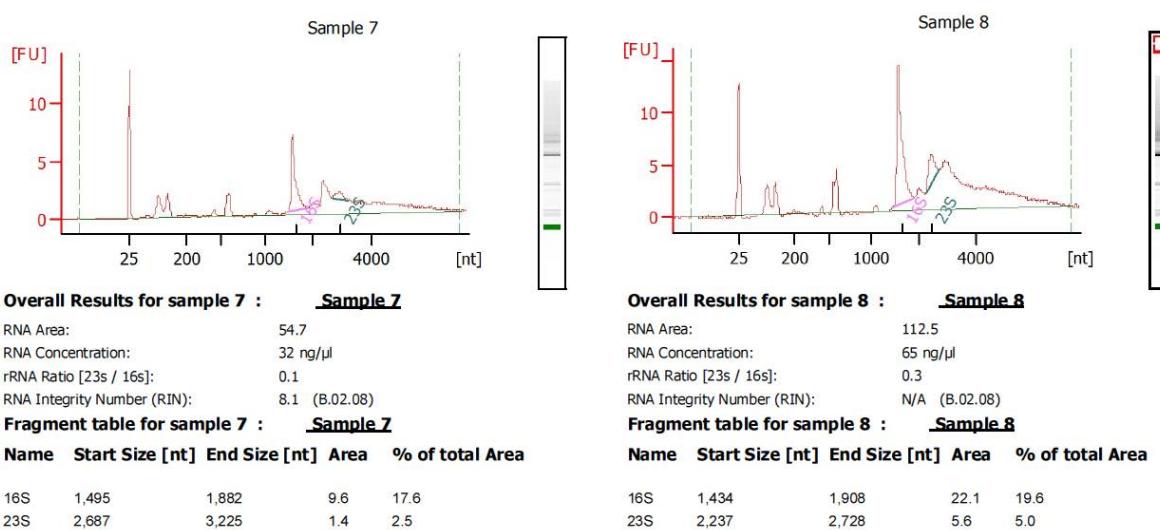


Figure 14 : Résultats obtenus après passage des échantillons d'ARN de cyanobactéries après purification. Les concentrations obtenues sont bien inférieures à celles obtenues au nanodrop et présentées dans la figure 13, mais cette diminution est toujours observée entre ces deux étapes et est due à une perte importante au moment du processus de purification. L'échantillon de gauche présente un RIN de 8,1, satisfaisant pour réaliser une PCR quantitative, alors que l'échantillon 8 n'est pas suffisamment pur pour permettre la définition d'un RIN, et ne peut donc pas être utilisé pour cette même qPCR.

4. Discussion

4.1. De la difficulté de l'étude des nano-argent...

4.1.1. Stabilité des nano-argents

Si les travaux présentés dans ce mémoire ont permis d'identifier une toxicité provoquée par les nano-argent sur la cyanobactérie modèle *S. elongatus* PCC 7942, ils ont surtout permis de confirmer la difficulté de l'étude liée à ces nanoparticules, notamment vis-à-vis de leur instabilité. En effet, une particularité des nano-argent par rapport à d'autres types de nanoparticules, à l'instar du TiO₂ vient de sa capacité à solubiliser en milieu aqueux, provoquant un relargage massif d'argent ionique en solution. Cet argent ionique étant particulièrement toxique au niveau des systèmes biologiques, il est d'ailleurs souvent mis en cause dans la toxicité des nano-argent comme acteur principal de la mortalité cellulaire.

Cependant, la solubilisation des nanoparticules d'argent n'est pas le seul frein à l'étude de la toxicité de leur forme nanoparticulaire, puisqu'en présence d'une concentration élevée de nano-argent, plusieurs colloïdes peuvent entrer en contact et former des complexes d'agrégation, dont on sait suite à des travaux antérieurs au laboratoire qu'ils ont pour effet de diminuer les effets toxiques observés sur les divers systèmes biologiques étudiés.

Ces deux points concernant la stabilité des nanoparticules d'argent sphériques et plaques sont les deux hypothèses avancées concernant la réduction de la toxicité observée en utilisant des solutions plus ou moins âgées. En effet, même si le stockage à 4°C est censé limiter les mouvements browniens des suspensions de nanoparticules et par conséquent leur agrégation, le fait est que ces mouvements, bien que fortement réduits, existent toujours. Ainsi, ce stockage permet uniquement de réduire ce phénomène d'agrégation.

Concernant les précautions de stockage et d'emploi visant à préserver les nanoparticules d'argent de toute source lumineuse, ce point a pour effet de limiter la solubilisation de ces nanoparticules. Si en condition d'obscurité totale, la solubilisation est donc très limitée, cela n'est plus le cas au cours des manipulations présentées au cours de ces travaux, pendant lesquelles les cultures de cyanobactéries exposées aux nanoparticules sont incubées à une source artificielle de lumière du jour.

Ces observations ont également été faites par d'autres équipes ayant utilisé ce type de nanoparticules, qui préconisaient même de ne pas réutiliser la même suspension pour deux tests,

Discussion

afin d'éviter toute variation dues à ce paramètre dans les résultats. Ces observations remettent en cause les conseils de conservation de NanoComposix, qui préconise une conservation maximale de six mois. En effet, si des variations significatives de toxicité sont observées en un mois, ces variations risquent d'être de plus en plus importantes avec le temps.

4.1.2. Hypothèse de l'impact de l'enrobage

Pour les raisons discutées lors du paragraphe précédent, il a donc été décidé d'utiliser des nanoparticules enrobées. En effet, l'utilisation d'un enrobage permet une augmentation de la stabilité des nano-argent en suspension, et donc une limitation les effets toxiques liés à leur solubilisation ou des effets liés à leur agrégation. L'enrobage PVP a été préféré à l'enrobage citrate, du fait de sa résistance à la dialyse. En effet, des essais de dialyse ont été réalisés avec un enrobage citrate, montrant que ces ions sont rapidement éliminés en cours de processus, laissant les nanoparticules à nu et donc capables de très rapidement s'agrérer, ce qui peut s'observer moins de dix minutes après récupération des suspensions de nano-argent dialysées par un changement de couleur du jaune (sphères) ou bleu (plaques) au gris, puis à l'incolore.

Cependant, la présence d'une molécule d'enrobage introduit une question supplémentaire sur l'impact sur la toxicité observé au cours de ces travaux. Cet enrobage peut provoquer une toxicité supplémentaire sur les cyanobactéries en facilitant par exemple les interactions entre la membrane bactérienne et la nanoparticule, ou au contraire réduire la toxicité en limitant ces interactions. Des études réalisées parallèlement à ces travaux ont montré que la toxicité des sphères et des plaques d'argent est significativement différente selon que l'enrobage soit citrate ou PVP, laissant supposer qu'il existe effectivement un lien entre le type d'enrobage et l'impact sur la toxicité observée. Cependant, ces travaux étaient réalisés sur un organisme différent, de type diatomée et à partir de suspensions de nanoparticules non dialysées. Ainsi, si la différence de toxicité observée pourrait effectivement être due à la variation de la molécule d'enrobage, elle pourrait tout aussi bien être due à une variation des agents de suspension des nanoparticules présents dans la solution mère non dialysée et pouvant également créer des biais de caractérisation de la toxicité.

Ainsi, si la question de l'impact de l'enrobage n'est pas levée au cours de ces travaux, le choix de ce type de stabilisateur pour les nanoparticules étudiées aura tout de même permis d'obtenir des résultats plus facilement répétables qu'en utilisant des nanoparticules nues. Il convient cependant de poursuivre les travaux afin de mettre en évidence les effets liés strictement à l'enrobage sur la toxicité mesurée chez *S. elongatus*, afin de pouvoir définir plus précisément la part de la toxicité provoquée par les nanoparticules d'argent seules sur cet organisme.

4.2. A l'étude de la tox sur la cyanobactérie

4.2.1. Hypothèses permettant d'expliquer la toxicité

Même si l'étude de la toxicité des deux types de nano-argent étudiés dans ces travaux n'en est qu'à ses balbutiements, quelques hypothèses permettent d'expliquer les résultats de toxicité obtenus après exposition de *S. elongatus* aux deux types de nanoparticules d'argent.

Dans un premier temps, l'hypothèse la plus probable est que cette toxicité serait due à une solubilisation des nanoparticules d'argent dialysées du fait de la luminosité présente au moment de l'exposition. En effet, comme décrit dans le point précédent, la lumière favorise la solubilisation des nanoparticules d'argent. De ce fait, l'argent ionique se retrouvant en solution pourrait être mis en cause dans la toxicité observée. Cependant, Burchardt et son équipe ont montré dans une publication de 2012 que la solubilisation des nanoparticules d'argent dans le milieu de culture utilisé pour la croissance de *S. elongatus* – le milieu BG11 – est de l'ordre de 0,1 à 0,2 µM en 24 h à partir d'une solution concentrée à 10 µM, soit une solubilisation de l'ordre de 1% en 24 h, ne permettant donc probablement pas d'obtenir en 5 h une concentration en argent ionique suffisante pour induire une toxicité telle qu'elle a été observée au cours de ces tests (Burchardt *et al.*, 2012). Le fait est que dans le cadre des expositions présentées dans ce mémoire, le mélange final contient un volume de solution de nanoparticule d'argent préparée avec de l'eau ultrapure, et un volume de culture cellulaire dans du BG11. Ainsi le BG11 utilisé est concentré au 1/2, ce qui pourrait aboutir à une solubilisation plus importante des nanoparticules par rapport à celle observée dans du BG11 1x. Afin de confirmer ou d'invalider cette hypothèse, des dosages de l'argent ionique présent après exposition sont prévus, et seront réalisés de façon postérieure au dépôt de ce manuscrit.

L'autre hypothèse avancée est que les nano-argent pourraient avoir un effet toxique de par une interaction avec la chlorophylle de *S. elongatus*. En effet, au lendemain des différents tests de survie, il apparaît que les conditions les plus concentrées en nanoparticules ont perdu toute trace de coloration verte, ce qui implique une perte totale de la chlorophylle. Le même phénomène est constaté au cours de l'exposition, avec un gradient de décoloration allant dans le sens de l'augmentation de la concentration en nanoparticules. Le fait est que cette décoloration n'a en revanche pas été observée lors des expositions au nitrate d'argent, ce qui conforte l'hypothèse qu'il s'agit là d'un mécanisme de toxicité propre à la forme nanoparticulaire de l'argent. Des culots cellulaires ont été prélevés à chaque heure et pour chaque condition dans le but de procéder à une extraction de la chlorophylle afin de valider ou d'invalider cette hypothèse.

Concernant les mécanismes moléculaires de la toxicité des nanoparticules d'argent chez *S. elongatus*, les essais d'extraction des ARN totaux réalisés ont été concluants, ce qui va permettre dans un futur proche de mettre en place des tests sur puces à ADN permettant idéalement d'élucider ces mécanismes de toxicité. Cependant à l'heure actuelle, aucune hypothèse ne peut être formulée concernant les gènes impliqués dans la réponse de la cyanobactérie à ce stress.

4.2.2. Toxicité des sphères et des plaques

Au cours des tests de survie cellulaire aux nano-argent, il est apparu que les sphères d'argent provoquent une mortalité cellulaire inférieure à celle observée pour les mêmes concentrations avec les plaques. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat est que la toxicité augmente avec la taille des nanoparticules. En effet, les sphères d'argent utilisées dans cette étude suivent une distribution de tailles centrée sur 20 nm, alors que les plaques sont plutôt situées aux alentours de 40 nm. Ainsi, pour une même quantité de nanoparticules en solution, les plaques qui s'adsorberont à la membrane bactérienne recouvriront plus d'espaces que les sphères, limitant ainsi beaucoup plus les échanges entre les compartiments intra et extracellulaires. Par ailleurs, considérant l'hypothèse suivant laquelle la toxicité des nano-argent serait dû à une libération d'argent ionique dans le milieu, la taille plus importante des plaques aboutirait à une libération plus importante au cours du temps. Cette hypothèse est également valable dans le cas d'une synergie entre la toxicité propre aux nanoparticules elles-mêmes et la toxicité provoquée par l'argent ionique.

L'hypothèse du rôle de la taille des nanoparticules dans la toxicité tend à se confirmer grâce à des travaux de stage réalisés parallèlement à cette étude au sein du laboratoire, au cours desquels un plus large panel de tailles de nanoparticules a été utilisé, allant de 20 nm à 100 nm. Bien que ces travaux aient été réalisés par exposition des microorganismes à des solutions non dialysées de nanoparticules, le fait d'observer une toxicité croissante avec l'augmentation de la taille de ces nano-argent permet de conforter l'hypothèse suivant laquelle le même effet devrait être observé avec des solutions de nanoparticules dialysées.

4.3. Conclusion et perspectives

4.3.1. Toxicité des nanoparticules d'argent sur *S. elongatus*

Au cours des travaux présentés dans ce mémoire, la cyanobactérie modèle *S. elongatus* PCC 7942 a été exposée à deux types de nanoparticules d'argent (sphères et plaques). Il s'est avéré que ces deux nanomatériaux ont effectivement un effet toxique sur la cyanobactérie, induisant rapidement une forte mortalité cellulaire.

Discussion

Si à l'heure actuelle les mécanismes de fonctionnement de cette toxicité restent un mystère, les ions argent, acteurs incontestés du stress occasionné semblent bel et bien impliqués dans cette toxicité. Cependant, il semblerait que les nanoparticules elles-mêmes puissent induire cette mortalité, sans nécessité de synergie avec l'argent ionique. L'hypothèse majeure à cet état d'avancement est qu'avec l'augmentation de la taille de la nanoparticule, la gêne provoquée par absorption à la membrane cellulaire limite de plus en plus les échanges entre les compartiments intra et extracellulaires. Par ailleurs, cette adsorption permettrait au moment de la solubilisation des nanoparticules de favoriser la pénétration des ions argent dans la cellule du fait du contact immédiat, provoquant ainsi une mortalité beaucoup plus rapide que si cet argent ionique était réparti de façon homogène dans le milieu.

4.3.2. Un regard vers l'avenir

Concernant le devenir à court terme de ces travaux, les dosages d'argent ionique après exposition seront réalisés afin de vérifier si la solubilisation des nanoparticules en quelques heures d'exposition pourrait être responsable de la mortalité cellulaire observée. De même, un dosage de l'argent sous forme nanoparticulaire sera réalisé après dialyse, afin de vérifier la justesse des concentrations efficaces médianes présentées dans ce mémoire. Par la suite, compte tenu des résultats présentés suite à l'extraction des ARN totaux de *S. elongatus*, les études transcriptomiques seront initiées afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité et réponse au stress d'un point de vue moléculaire et génétique.

A moyen terme, la connaissance des effets des nanoparticules d'argent sur d'autres organismes, à l'instar des mammifères dont l'Homme, permettrait de mieux appréhender les effets négatifs liés à leur utilisation. Cette connaissance aurait pour finalité d'adapter les produits contenant ces nanoparticules dans une multitude de domaines de sorte que leurs effets soient connus, mieux compris et contrôlés.

Enfin à long terme, cette étude pourrait fournir tout ou partie des résultats permettant au mieux d'exploiter les nanoparticules d'argent afin de limiter la colonisation des filtres des stations de traitement des eaux par les cyanobactéries, ce qui permettrait d'augmenter la qualité de l'eau. Avec le temps, d'autres études permettront par ailleurs probablement de dissocier les nanoparticules utilisées au cours de ce processus de dépollution de l'eau, afin d'éviter tout risque pour la santé et l'environnement.

Bibliographie

- Andersen, A., Allan, S., Petersen, A. and Wilkinson, C.** (2005). The framing of nanotechnologies in the British newspaper press. *Science Communication*, 27, 200 – 220.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, JM., Paknikar, K. M.** (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 236: 310-318.
- Asharani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., Valiyaveettil, S.** (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3, 279-290.
- average doubling times of less than 24 hours. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10183-10188.
- Bertorelle, F., Wilhelm, C., Roger, J., Gazeau, F., Menager, C., and Cabuil, V.** (2006). Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: Intracellular uptake and use in cellular imaging. *Langmuir*, 22(12), 5385-5391.
- Buffel, J. & Van Leeuwen, H.** (1992). Environmental Particles. Lewis Publishers: Chelsea, MI.
- Burchardt, A. D., Raquel, N. Carvalho, Valente, A., Nativo, P., Gilliland, D., García, C. P., Passarella, R., Pedroni, V., Rossi, F., and Lettieri, T.** (2012). Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11336-11344.
- Cobb, M. D.** (2005) Framing effects on public opinion about nanotechnology. *Science Communication*, 27, 221-239.
- Couvreur, P. and Puisieux, F.** (1993). Nanoparticles and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10(2-3), 141-162.
- Ebbesen, M.** (2006) Nanofood: Lessons to be learnt from the debate on GM crops? In M. Kaiser and M. E. Lien (eds.) *The Ethics and Politics of Food* (Wageningen: Academic Publishers), 314-319.
- Gaskell, G., Eyck, T. T., Jackson, J. and Veltri, G.** (2004) Public attitudes to nanotechnology in Europe and the United States. *Nature Materials*, 3, 496.
- Kamat, P. V.** (2002). Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(32), 7729–7744.

Bibliographie

Kirschvink, J. L., Kobayashi-Kirschvink, A. & Woodford, B. J. (1992). Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7683-7687.

Larkum, A. W. D., Vesk M. (2003) in *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers, 11–28.

Lee, C. J., Scheufele, D. A. and Lewenstein, B. V. (2005) Public attitudes toward emerging technologies Examining the interactive effects of cognitions and affect on public attitudes toward nanotechnology. *Science Communication*, 27, 240-267.

Liberton M., Pakrasi H. B. (2008) in *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution*. Horizon Scientific Press, 217–287.

Liu, Y., O'Brien, S. C., Zhang, Q., Heath, J. R., Tittel, F. K., Curl, R. F., Kroto, H. W. & Smalley, R. E. (1986). Negative carbon cluster ion beams: New evidence for the special nature of C₆₀. *Chemical Physics Letters*, 126(2), 215-217.

Moghimi, S. M., Hunter, A. C., and Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal*, 19(3), 311-330.

Mori, T., Binder, B., Johnson, C. H. (1996). Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with **Nowack, B. & Bucheli, T.** (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 1-18.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 113(7), 823-839.

Oberdörster, G., Stone, V. & Donaldson, K. (2007). Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1(1), 2-25.

Qi, H. J., Teo, K. B. K., Lau, K. K. S., Boyce, M. C., Milne, W. I., Robertson, J., and Gleason, K. K. (2003). Determination of mechanical properties of carbon nanotubes and vertically aligned carbon nanotube forests using nanoindentation. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 51(11-12), 2213-2237.

Qi, K., Daoud, W., Xin, J., C.L., M., Tanga, W., and Cheunga, W. (2006). Self-cleaning cotton. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 4567-4574.

Bibliographie

- Roco, M. C.** (2005). Environmentally responsible development of nanotechnology. *Environmental Science & Technology*, 39(5), 106A-112A.
- Shkarovskiy, S.** (2013) Trends of the Nanomaterial Market. *Mediterranean Journal of Social Sciences*, 4(9) 2039-2117.
- Smalley, R. E. & Yakobson, B. I.** (1998). The future of the fullerenes. *Solid State Communications* 107(11), 597-606.
- Sugita, C., Ogata, K., Shikata, M., Jikuya, H., Takano, J., Furumichi, M., Kanehisa, M., Omata, T., Sugiura, M., Sugita, M.** (2007). Complete nucleotide sequence of the freshwater unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 6301 chromosome: gene content and organization. *Photosynth Res*, 93(1-3), 55-67.
- Vermaas, W. F. J.** (2001). Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria, *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Vigneshwaran, N., Kumar, S., Kathe, A. A., Varadarajan, P. V., and Prasad, V.** (2006). Functional finishing of cotton fabrics using zinc oxide–soluble starch nanocomposites. *Nanotechnology*, 17, 5087-5095.
- Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R. & Nel, A. E.** (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters* 6(8), 1794-1807.
- Zhan, G. D., Kuntz, J. D., Garay, J. E., and Mukherjee, A. K.** (2003a). Electrical properties of nanoceramics reinforced with ropes of single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters*, 83(6), 1228-1230.
- Zhan, G. D., Kuntz, J. D., Wan, J. L., and Mukherjee, A. K.** (2003b). Single-wall carbon nanotubes as attractive toughening agents in alumina-based nanocomposites. *Nature Materials*, 2(1), 38-42.

Avec l'avènement récent des nanotechnologies et leur utilisation croissante dans tous les domaines, il devint nécessaire de se poser des questions concernant les risques éventuels sur la santé et l'environnement. Par exemple, des nanoparticules d'argent sont déversées en grandes quantités dans les cours d'eau lors de campagnes de dépollution, mais sans possibilité d'élimination ultérieure. Dans le cadre de ces travaux, les effets toxicologiques de deux types de nanoparticules d'argent seront testés sur la cyanobactéries modèle d'eau douce, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, connue sous le nom d'algue bleue pour sa capacité à proliférer et former des marées vertes, ou encore à contaminer les filtres des stations de traitement des eaux, ce qui donne à l'eau un goût nauséabond. Cette étude visera à déterminer les concentrations efficaces médianes aux nanoparticules et à l'argent ionique chez *S. elongatus*, puis à utiliser ces résultats pour mettre en place une étude des mécanismes de toxicité.

With the recent arrival of nanotechnologies and their growing use in every domain, it became necessary to ask questions about potentially risks on health and environment. For example, silver nanoparticles are discharged in huge quantities in water courses during water treatment campaigns, without any possibility of removing them after. During this work, toxicological effects of two silver nanoparticles types will be tested on a fresh water model cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, known for its ability of proliferating and forming green tides, or introducing in filters of water treatment stations, giving water a nauseating taste. This study will aim to determine median effective concentrations of ionic silver and nanoparticles on *S. elongatus* in order to use these results to plan a study of toxicity mechanisms.