

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Centre Eau Terre Environnement

**PRISE EN CHARGE DE L'ARGENT DISSOUS ET NANOPARTICULAIRE PAR DES
LIPOSOMES ET PAR UNE CHAÎNE TROPHIQUE SIMPLE**

Par
Camille GUILLEUX

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en **Sciences de l'eau**

Jury d'évaluation

Examineur externe	Prof. Jean-Philippe Bellenger Université de Sherbrooke
Examineur externe	Dr Nicolas Gruyer Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Examineur interne	Prof. Simon Barnabé INRS-ETE (prof. associé)
Directeur de recherche	Prof. Claude Fortin INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Prof. Peter G.C. Campbell INRS-ETE

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur Claude Fortin et mon co-directeur de recherche Peter Campbell de m'avoir offert l'opportunité de vivre cette expérience enrichissante. Je les remercie pour leur disponibilité, leur patience, leur rigueur scientifique et leurs conseils prodigués tout au long de cette thèse, j'ai beaucoup appris grâce à eux.

Je remercie également tous les techniciens de l'INRS-ETE, en particulier Lise Rancourt, Stéphane Prémont, Julie Perrault, Anissa Bensadoune, René Rodrigue et Jean-François Dutil, pour leur très précieuse aide au laboratoire.

Merci à tous les étudiants et post-doctorants du groupe d'écotoxicologie de l'INRS-ETE qui ont égayé mon quotidien, au bureau comme au laboratoire, notamment Caroline Doose, Vincent Laderrière, Kim Racine, Emeric Kochoni, Liu Fengjie, Geneviève Rioux, Séverine Le Faucheur et Anne Crémazy. J'ai beaucoup apprécié faire partie de cette équipe, basée sur l'excellence, l'entraide, le respect mutuel et la bonne humeur. J'aimerais tout particulièrement remercier Zhongzhi Chen, avec qui j'ai travaillé sur le projet mésocosme et qui fut un très bon allié durant ce doctorat. Merci également à Isabelle Lavoie notamment pour son aide avec les statistiques.

Je remercie également tous mes amis du monde du théâtre (la liste est trop longue mais ils se reconnaîtront), pour leur soutien, leur joie de vivre et pour les soirées organisées qui m'ont souvent servies d'exutoire. Je les remercie de m'avoir accepté dans leur cercle, je les remercie pour ces moments partagés, ces répétitions de folie et ces spectacles grandioses que nous avons produits et qui m'ont tellement apporté. Je remercie tous mes autres amis, du Québec, Stéphane Laurin, Adèle Morel, Marie Bolante, Félix Laberge, Jonathan Côté, et de France, Sophie Rodrigues, Laure Guillotin, Cindy Geninet, pour ne citer qu'eux, d'avoir toujours été présents, sur place ou à distance, dans les bons comme dans les mauvais moments.

Je tiens spécialement à remercier les créateurs et organisateurs des retraites de rédaction Thèsez-vous, notamment Sara Mathieu-C. de l'Université de Montréal. Ces retraites ont été extrêmement bénéfiques pour mon doctorat et ma santé mentale.

Je remercie enfin mes parents qui, même loin, ont toujours été prêts de moi, je les remercie pour m'avoir épaulé lors de mon parcours, financièrement d'abord mais aussi psychologiquement et de n'avoir jamais douté de mon potentiel.

RÉSUMÉ

La présence croissante de nanomatériaux dans les produits de consommation a amené la communauté scientifique à étudier le devenir environnemental de ces contaminants d'intérêt émergent. Comprendre leurs transformations et leurs interactions avec les organismes vivants est une étape cruciale dans l'étude de leurs impacts sur les écosystèmes aquatiques. Les nanoparticules d'argent, utilisées principalement pour leurs propriétés antibactériennes, sont parmi les nanomatériaux les plus courants. La façon dont ils interagissent avec les organismes aquatiques, et en particulier la façon dont ils traversent la membrane biologique, demeure incertaine.

Dans ce projet, nous avons étudié la prise en charge des nanoparticules d'argent et de l'argent dissous par des liposomes. Ces vésicules unilamellaires composées de phospholipides ont longtemps été utilisées pour modéliser les membranes biologiques naturelles. Cela permet d'étudier l'internalisation potentielle de l'argent par diffusion passive à travers la bicouche phospholipidique.

Les liposomes ont été synthétisés en utilisant des techniques d'extrusion et les fuites potentielles de la membrane ont été contrôlées tout au long des expériences. La chromatographie d'exclusion stérique a été utilisée pour séparer les liposomes de leur milieu de préparation pour ensuite les exposer pour une courte période de temps (100 min) à de l'argent dans différentes conditions où Ag^+ , AgS_2O_3^- ou AgCl^0 étaient les espèces dominantes. À la fin de l'exposition, une résine échangeuse de cations Ambersep GT74 (0,3 g par échantillon, >95% efficacité) a été utilisée pour lier le métal dissous non assimilé. Des expériences similaires ont été menées avec les complexes HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, tous deux hydrophobes et connus pour diffuser de façon passive à travers les membranes biologiques. Enfin, les liposomes ont été mis en contact avec des nanoparticules d'argent recouvertes de PVP de 5 nm de diamètre, en utilisant la même technique (résine Ambersep GT74, 0,5 g par échantillon, >90% efficacité).

La cinétique d'absorption de Ag^+ , HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ ne montre pas d'augmentation dans le temps, contrairement à AgS_2O_3^- et AgCl^0 , qui semblent traverser la bicouche phospholipidique. Cela semble en contradiction avec notre hypothèse initiale selon laquelle les complexes lipophiles de Hg et Cd pourraient traverser la membrane alors que l'argent ne le pourrait pas. Cependant, les résultats de la littérature montrant la diffusion passive de HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ ont été réalisées avec des bicouches lipidiques planaires, dont la perméabilité, liée à leur rayon de courbure, semble être plus élevée que celle des liposomes. En outre, la perméabilité des liposomes semble être sélective aux ions, permettant aux anions de passer plus facilement que les cations. Cela expliquerait pourquoi AgS_2O_3^- pourrait traverser la membrane alors que Ag^+ ne pouvait pas ou très peu. Dans le cas des nanoparticules d'argent, seule une adsorption à la surface des liposomes semble se produire. Nous n'avons observé ni de rupture de la membrane ni d'invagination des nanoparticules à l'intérieur des liposomes. Par extrapolation, nous pouvons donc faire l'hypothèse que, dans le cas des nanoparticules d'argent, le risque principal pour les cellules biologiques non endocytotiques serait l'élévation de la concentration en argent libre aux abords

de la membrane cellulaire due à l'adsorption des AgNPs sur celle-ci. Nous avons pu confirmer cette hypothèse lors de l'exposition en mésocosmes d'une chaîne trophique simple aux nanoparticules d'argent. Les AgNPs n'étaient pas biodisponibles aux algues *Chlamydomonas reinhardtii*. Les daphnies, exposées aux algues et à l'eau douce des mésocosmes contenant les nanoparticules, n'ont pris en charge les AgNPs, à hauteur de quelques ng par organisme, que via l'ingestion d'eau et/ou l'adsorption à leur surface.

ABSTRACT

The increasing presence of nanomaterials in consumer products has led the scientific community to study the environmental fate of these contaminants of emerging concern. Understanding their transformations and interactions with living organisms is a crucial step in the study of their impacts on aquatic ecosystems. Silver nanoparticles, used mainly for their antibacterial properties, are among the most common nanomaterials. How they interact with aquatic organisms, especially how they cross biological membranes, remains uncertain.

This project focused on the uptake of dissolved silver and silver nanoparticles by liposomes. These unilamellar vesicles composed of phospholipids have long been used to model natural biological membranes. This approach allows one to study the potential uptake of silver by passive diffusion through phospholipid bilayers.

The liposomes were synthesized using extrusion techniques and potential membrane leakage was monitored throughout. Size exclusion chromatography was used to remove the outer buffer and the liposomes were then exposed over time to silver under different conditions where Ag^+ , $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3^-$ or AgCl^0 were the dominant species. At the end of the exposure, Ambersep GT74 cation exchange resin (0.3 g per sample, > 95% efficient) was used in order to bind the non-assimilated dissolved metal. Similar experiments were conducted with the complexes HgCl_2^0 and $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, both hydrophobic and both known to diffuse passively through biological membranes. Finally, liposomes were put in contact with 5-nm polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles, using the same technique (Ambersep GT74 resin, 0.5 g per sample, > 90% efficient).

The uptake kinetics of Ag^+ , HgCl_2^0 and $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ show no increase over time, unlike $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3^-$ and AgCl^0 , which appear to go through the phospholipid bilayer. This observation seems to be in contradiction with our initial hypothesis that lipophilic Hg and Cd complexes would be able to cross the membrane whereas silver would not. However, experiments in the scientific literature showing passive diffusion of HgCl_2^0 and $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ have been performed with planar lipid bilayers, whose permeability, linked to their radius of curvature, seems to be higher than that of liposomes. Moreover, the permeability of liposomes seems to be ion-selective, allowing anions to pass more easily than cations. This would explain why $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3^-$ could cross the membrane while Ag^+ could not. Only adsorption of silver nanoparticles on the surface of the liposomes occurred. We observed neither disruption of the membrane nor invagination of the nanoparticles into the liposomes. By extrapolation, we can therefore hypothesize that, in the case of silver nanoparticles, the main risk for non-endocytotic biological cells would be the elevation of the free silver concentration near the membrane surface due to adsorption of the AgNPs. We were able to confirm this hypothesis during the exposure of a simple trophic chain to silver nanoparticles in mesocosms. Silver nanoparticles (AgNPs) were not bioavailable to the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Daphnids, exposed to the same alga and to fresh water from mesocosms to which AgNPs had been

added, accumulated AgNPs, up to a few ng per animal, only by ingestion of non-algal particles and / or by adsorption on their surface.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS...	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT.....	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
1. INTRODUCTION	1
1.1. Mise en contexte.....	1
1.2. Membranes modèles.....	2
1.2.1. Structure et préparation	2
1.2.1.1. Liposomes.....	3
1.2.1.2. Film lipidique	4
1.2.1.3. Membranes supportées	5
1.2.2. Quelques utilisations des liposomes	5
1.2.3. Propriétés	6
1.2.3.1. Perméabilité à l'eau.....	6
1.2.3.2. Perméabilité aux ions.....	6
1.2.4. Nanoparticules et membranes modèles	9
1.3. Le modèle du ligand biotique (BLM)	11
1.4. L'argent dissous.....	13
1.4.1. Spéciation dans l'environnement.....	13
1.4.2. Assimilation par les algues	17
1.4.3. Assimilation par les daphnies.....	18
1.5. Les nanoparticules d'argent	19
1.5.1. Structure.....	19

1.5.2.	Applications principales.....	21
1.5.3.	Rejets dans l'environnement.....	22
1.5.4.	Transformations dans l'eau douce	23
1.5.5.	Assimilation par les algues	27
1.5.6.	Effets observés sur les algues.....	32
1.5.7.	Assimilation par les daphnies.....	35
1.5.8.	Effets observés sur les daphnies	38
1.6.	Travaux en mésocosmes	42
2.	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	43
3.	MÉTHODOLOGIE	46
3.1.	Expériences en laboratoire.....	46
3.1.1.	Conditions d'exposition.....	46
3.1.1.1.	Tampons interne et externe.....	46
3.1.1.2.	Modélisation thermodynamique	47
3.1.2.	Synthèse des liposomes	50
3.1.2.1.	Choix du modèle.....	50
3.1.2.2.	Protocole de synthèse.....	50
3.1.2.3.	Détermination de la taille des liposomes.....	51
3.1.2.4.	Changement de milieu	52
3.1.2.4.1.	Résine Sephadex G50 : description et préparation.....	52
3.1.2.4.2.	Chromatographie d'exclusion stérique	52
3.1.2.5.	Détermination de la concentration en LUVs.....	53
3.1.2.6.	Efficacité du piège à métaux : évolution de la concentration en thiosulfate dans la solution tampon interne	54
3.1.3.	Exposition des liposomes	55
3.1.3.1.	À l'eau tritiée.....	55

3.1.3.2.	Résine Ambersep GT 74 : description et efficacité	55
3.1.3.3.	Aux métaux dissous (Ag, Cd et Hg).....	56
3.1.3.4.	Aux nanoparticules d'argent	59
3.1.3.4.1.	Digestion des AgNPs.....	59
3.1.3.4.2.	Détermination de la concentration d'exposition en AgNPs.....	59
3.1.3.4.3.	Étude de l'oxydation des AgNPs en fonction du temps	60
3.1.3.4.4.	Intégrité des liposomes en présence de AgNPs	60
3.1.3.4.5.	Protocole d'exposition	61
3.1.3.5.	Intégrité des liposomes pendant les expériences d'assimilation.....	61
3.1.3.6.	Adsorption des métaux sur les parois des bouteilles.....	61
3.1.3.7.	Traitement statistique des données	62
3.2.	Expériences en mésocosmes.....	62
3.2.1.	Modèles biologiques	65
3.2.1.1.	Chlamydomonas reinhardtii.....	65
3.2.1.2.	Daphnia magna	65
3.2.2.	Détermination de l'argent dialysable à la surface des mésocosmes	66
3.2.3.	Culture d'algue et densité cellulaire dans les mésocosmes.....	67
3.2.4.	Bioaccumulation de l'argent par les algues.....	71
3.2.5.	Bioaccumulation de l'argent par <i>Daphnia magna</i>	72
3.2.5.1.	Élevage de <i>Daphnia magna</i>	72
3.2.5.2.	Exposition des daphnies en laboratoire.....	73
4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	73
4.1.	Synthèse des liposomes	73
4.1.1.	Taille des liposomes	73
4.1.2.	Changement de milieu	75
4.1.3.	Concentration en LUVs.....	76
4.1.4.	Efficacité du piège à métaux	77

4.2.	Perméabilité des liposomes à l'eau.....	78
4.3.	Efficacité de la résine Ambersep GT 74.....	80
4.4.	Intégrité des liposomes pendant les expériences d'exposition	82
4.5.	Adsorption des métaux sur les parois des bouteilles.....	83
4.6.	Perméabilité des liposomes aux métaux dissous.....	86
4.6.1.	Perméabilité à l'argent	86
4.6.2.	Perméabilité au mercure et au cadmium.....	89
4.7.	Perméabilité des liposomes aux nanoparticules d'argent	91
4.7.1.	Digestion des AgNPs.....	91
4.7.2.	Concentration d'exposition en AgNPs.....	92
4.7.3.	Oxydation des AgNPs en fonction du temps	93
4.7.4.	Intégrité des liposomes en présence de AgNPs	94
4.7.5.	Résultats de l'exposition	95
4.8.	Expériences en mésocosmes.....	99
4.8.1.	Évolution de l'argent dissous en fonction du temps.....	99
4.8.2.	Densité cellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> dans les mésocosmes.....	102
4.8.3.	Accumulation de l'argent par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	104
4.8.4.	Accumulation de l'argent par <i>Daphnia magna</i>	113
5.	CONCLUSION.....	116
6.	BIBLIOGRAPHIE	120
	Annexe 1 : Différents protocoles expérimentaux pour la préparation de LUVs.....	135
	Annexe 2 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les algues.....	138
	Annexe 3 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les daphnies	142
	Annexe 4 : Séparation entre le Blue Dextran (2 000 kDa) et l'acétone (58 Da) sur colonne Sephadex 20 cm x 1 cm, analyses des fractions collectées effectuées sur spectrophotomètre UV-visible à 620 et 280 nm.....	147

Annexe 5 : Pr�equilibre des bouteilles en HDPE avant les expériences d'exposition des liposomes aux métaux dissous.....	148
Annexe 6 : Synthèse des résultats et comparaison avec la littérature	149
Annexe 7 : Analyse ICP-MS des eaux de Rimouski, utilisées dans l'expérience en mésocosmes.....	150

Liste des figures

Figure 1-1 : Coupe transversale d'un liposome unilamellaire (Villarreal, 2007).....	3
Figure 1-2 : Montage expérimental et structure d'un film lipidique (Anonyme, 2009).....	4
Figure 1-3 : Schéma conceptuel représentant les interactions métal/organisme. Adapté de Campbell <i>et al.</i> (2002). M^{z+} = ion métallique libre; L^{z-} = ligand; ML = complexe métallique en solution; K_1 = constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML; M-X complexe métallique de surface; k_f , k_r = constantes de vitesse pour la formation du complexe de surface; k_d , k_d' = constantes de vitesse pour la dissociation du complexe de surface; k_{int} = constante de vitesse pour l'internalisation du métal.....	12
Figure 1-4 : Spéciation de l'argent en fonction de la concentration en a) ions chlorure et b) thiosulfate, déterminée à l'aide du logiciel MINEQL+ (pH 7, [Ag]total = 1 nM).....	15
Figure 1-5 : L-cystéine (Sigma-Aldrich).....	16
Figure 1-6 : Structure et composition des nanoparticules d'argent (BSA : sérum-albumine bovin, PVP : polyvinylpyrrolidone, PAAM : polyallylamine), adapté de Levard <i>et al.</i> (2012).....	20
Figure 1-7 : Paramètres caractéristiques des nanoparticules, adapté de Fabrega <i>et al.</i> (2011).	21
Figure 1-8 : Observation au microscope électronique à balayage de fibres de coton traitées avec des nanoparticules d'argent (Xue <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figure 1-9 : Composition et structure de la membrane plasmique chez les cellules eucaryotes (Ruiz & Grandjean, 2007).....	28
Figure 1-10 : Voies endocytiques potentielles qui pourraient être empruntées par les nanoparticules d'argent (Moore, 2006).....	29
Figure 1-11 : Images de l'algue <i>Ochromonas danica</i> en présence de nanoparticules d'argent (93 μ M) sous TEM (a) et STEM en champ noir à contraste en nombre atomique z (b). V : vacuole ; C : chloroplaste ; P : membrane plasmique ; les flèches indiquent l'emplacement des AgNPs (Miao <i>et al.</i> , 2010).....	31
Figure 1-12 : Rendement photosynthétique : courbe dose réponse pour <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (AgNPs) (adapté de Navarro <i>et al.</i> (2008b)).....	34
Figure 1-13 : Rendement photosynthétique : courbe dose-réponse de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> exposée a) aux AgNPs ; Concentrations de cystéine (nM) à côté de chaque point (adaptée de Navarro <i>et al.</i> (2008b)) et b) à $AgNO_3$ (adaptée de Navarro <i>et al.</i> (2008b)).	35

Figure 1-14 : Vitesse d’internalisation des AgNPs (4,6 μM) chez *Daphnia magna* (Zhao & Wang, 2012b). C = enrobage en citrate; T = enrobage en acide tannique. Les nombres 20, 50 et 100 correspondent aux diamètres..... 36

Figure 1-15 : *Daphnia magna* observée au microscope optique après 24 h d’exposition à une suspension d’AgNPs (20 nm ; 1,4 μM), agglomérats de nanoparticules adsorbées aux antennes entourées en rouge (Zhao & Wang, 2012b) 37

Figure 1-16 : Distribution de sensibilité chronique des espèces (SSD) exposées à des AgNPs-PVP, élaborée en utilisant cinq espèces (*C. reinhardtii*, *E. gracilis*, *D. magna*, *D. rerio* et *O. latipes*) provenant de quatre groupes taxonomiques différents (algues, flagellés, crustacés et poissons). HC₅ chronique = 0,614 $\mu\text{g/L}$ AgNP. Adaptée de Kwak *et al.* (2016). 41

Figure 1-17 : Effet de A) AgNPs-alcane (3-8 nm) et de B) AgNO₃ sur la reproduction de *Daphnia magna* (Ribeiro et al., 2013)..... 41

Figure 3-1 : Positions potentielles des métaux après interaction avec les liposomes : A. dans la solution d’exposition, B. et (B) adsorbés à la surface des liposomes, C. à l’intérieur de la bicouche lipidique, D. adsorbés à la surface des liposomes dans la solution tampon interne, E. dans la solution tampon interne avant a) et après b) le traitement avec la résine Ambersep GT 74, (B) théoriquement présents en moins grande quantité qu’avant traitement. 58

Figure 3-2 : Schéma expérimental pour les travaux en mésocosmes..... 64

Figure 3-3 : Observation au microscope électronique à balayage de l’algue *Chlamydomonas reinhardtii* (Dartmouth Electron Microscope Facility, 2007) 65

Figure 3-4 : *Daphnia magna* : femelle adulte (Watanabe, 2011) 66

Figure 3-5 : Schéma de fonctionnement du chémostat..... 68

Figure 4-1 : Distribution de taille en volume d’une suspension de liposomes après synthèse, rapportée par le Zetasizer Nano ZS. 75

Figure 4-2 : Éluion des liposomes sur colonne de chromatographie d’exclusion stérique en vue de leur transfert de la solution tampon interne vers la solution tampon externe : (A) photo retournée de la colonne et (B) absorbance à 432 nm des fractions collectées. Moyenne \pm écart type (n=3). Vitesse moyenne d’éluion: 3 mL/min..... 76

Figure 4-3 : Courbe d’étalonnage donnant la concentration en phosphore total en fonction de l’absorbance à 432 nm d’un volume de 300 μL de LUVs analysé sur microplaques. 77

Figure 4-4 : Analyse sur spectrophotomètre UV-visible et compteur bêta des fractions collectées après élution des liposomes contenant de l'eau tritiée sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Moyenne \pm écart type (n=2)..... 79

Figure 4-5 : Efficacité de la résine Ambersep GT74 à capter (A) Ag^+ (36 nM) (B) AgS_2O_3^- (31 nM) (C) AgCl^0 (31 nM) et (D) AgNPs (50,5 nM) et comparaison avec l'efficacité de la résine Dowex Optipore L493 et l'adsorption seule sur les parois des bouteilles). Masse de résine utilisée : 0,3 g (Ag dissous) et 0,5 g (AgNPs). Moyenne \pm écart type (n=3)..... 81

Figure 4-6 : Influence de la masse de résine Ambersep GT74 sur son efficacité à capter Ag^+ . $[\text{Ag}] = 40,4 \pm 2,2$ nM. Temps de traitement de 5 min. Volume traité = 4,9 mL. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les points (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$)..... 82

Figure 4-7 : Concentrations en phosphore total dans les fractions LUVs collectées en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion stérique après élution de liposomes soumis à différents traitements. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les traitements (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$). 83

Figure 4-8 : Adsorption en fonction du temps des complexes d'argent sur les parois des bouteilles de 125 mL en HDPE. Moyenne \pm écart type (n=3). 84

Figure 4-9 : (A) Concentrations en Ag total en fonction du temps dans des bouteilles de 125 mL en HDPE et 250 mL en PC et (B) proportion de l'argent adsorbé sur les parois en fonction du temps. Moyenne \pm écart type (n=3). (A) Les lettres minuscules représentent les différences significatives entre les concentrations en Ag total après 2 h pour les bouteilles en HDPE (aucune différence significative n'a été observée pour les bouteilles en PC) (ANOVA à un facteur, $p < 0,05$). (B) Pour chaque temps, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les taux d'adsorption pour PC et HDPE (test de Student, $p > 0,05$)..... 85

Figure 4-10 : Accumulation de (A) Ag^+ ; (B) AgCl^0 ; (C) AgS_2O_3^- (LUVs préparés dans solution tampon interne avec piège) ; (D) AgS_2O_3^- (LUVs préparés dans solution tampon interne sans piège) par les liposomes en fonction du temps, corrigée pour la quantité résiduelle de métal dissous. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune augmentation statistiquement significative observée pour (A) et (D). Augmentation significative observée pour b) et c) (régression non linéaire : exponentielle à plafonnement, Boulemant *et al.* (2009))..... 88

Figure 4-11 : Accumulation de (A) HgCl_2^0 et (B) $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par les liposomes en fonction du temps, corrigée pour la quantité résiduelle de métal dissous. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune augmentation

statistiquement significative observée (régression non linéaire : exponentielle à plafonnement, Boulemant <i>et al.</i> (2009)).....	90
Figure 4-12 : Concentrations en Ag ultrafiltré (3 kDa) selon le nombre de centrifugations successives. Les différents symboles représentent les concentrations totales en Ag, incluant les AgNPs. Moyenne ± écart type (n=3). L’astérisque indique qu’aucune différence significative n’a été observée entre les points (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$).	93
Figure 4-13 : Oxydation des AgNPs en fonction du temps, dans la solution d’exposition 6 (Tampon MOPS 7,5 mM; NaOH 5,6 mM; AgNPs-PVP 72,5 nM; KNO ₃ 19,8 mM, Tableau 3-2) en présence de liposomes. Moyenne ± écart type (n=3).	94
Figure 4-14 : Absorbance en fonction du temps d’une suspension de liposomes seule ou exposée à des nanoparticules d’argent. Moyenne ± écart type (n=3). Aucune différence statistiquement significative n’a été observée entre les deux distributions (test de Student, $p > 0,05$).....	95
Figure 4-15 : (A), (B) et (C) Accumulation des AgNPs par les liposomes en fonction du temps et (D) regroupement des résultats des trois expériences précédentes. Moyenne ± écart type (n=3). La ligne horizontale correspond à la quantité résiduelle de métal dissous. Aucune augmentation statistiquement significative observée pour (A), (C) et (D). Augmentation statistiquement significative observée pour (B) (régressions linéaire et non linéaire : exponentielle à plafonnement, Boulemant <i>et al.</i> (2009)).	97
Figure 4-16 : Concentrations en argent total dans les eaux à la surface du mésocosme 2 (en noir) et 3 (en blanc) en fonction du temps (échantillons non filtrés, non centrifugés). Moyenne ± écart type (n = 3). Les concentrations en argent total dans le mésocosme 1 (témoin) étaient négligeables.....	99
Figure 4-17 : Concentrations en argent dialysable dans les eaux à la surface des mésocosmes 2 et 3, mesurées par dialyse <i>in situ</i> , en fonction du temps. Moyenne ± écart type (n = 3). Les concentrations en argent dialysable dans le mésocosme 1 (témoin) étaient négligeables.	100
Figure 4-18 : Pourcentage d’argent dialysable en fonction du temps. Moyenne ± écart type (n = 3).	101
Figure 4-19 : Relation entre la concentration en chlorophylle a et la densité cellulaire de <i>C. reinhardtii</i> dans l’eau du mésocosme 1 (témoin).	103
Figure 4-20 : Densités cellulaires de <i>C. reinhardtii</i> en fonction du temps dans les mésocosmes 1 (témoin) (●), 2 (▼) et 3 (■). Moyenne ± écart type (n = 3). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2).	104
Figure 4-21 : Turbidité du surnageant provenant de l’eau des mésocosmes 1, 2 et 3 après centrifugation (15 min) ou filtration (0,2 µm filtre en polycarbonate). Les barres d’erreur correspondent à l’écart type sur les résultats de turbidité des trois mésocosmes (une répétition pour chaque mésocosme). Les	

astérisques indiquent qu'aucune différence significative n'a été observée avec la filtration sur une membrane de porosité de 0,2 μm (test de Student, $p > 0,05$).	105
Figure 4-22 : Concentrations initiales en argent dans les mésocosmes 2 et 3 (sans filtration, ni centrifugation : "contrôle"), comparées aux concentrations dans le filtrat après passage à travers un filtre en polycarbonate de 0,2 μm et aux concentrations dans le surnageant après 15 min de centrifugation à différentes vitesses (5 000 à 10 000 g). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type sur les concentrations en argent dans les mésocosmes 2 et 3 ($n = 2$; une répétition pour chaque mésocosme).....	106
Figure 4-23 : Concentrations en argent avant (en noir) et après 1 h d'exposition (en blanc) avec ou sans algues. Les surnageants de chaque mésocosme récupérés après 15 min de centrifugation à 10 000 \times g ont servi de solutions d'exposition. La concentration en argent après exposition est définie comme la concentration en argent dans le filtrat (deux filtres en polycarbonate superposés, 2 μm porosité). Moyenne \pm écart type ($n = 3$). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Les astérisques correspondent à des différences significatives entre avant et après exposition pour chaque mésocosme, avec ou sans algues (test de Student, $p < 0,05$).	107
Figure 4-24 : Concentrations en argent dissous dans l'eau des trois mésocosmes avant (en noir) et après 1 h d'exposition (en blanc) avec ou sans algues. La concentration en argent dissous est définie comme la concentration en argent dans le filtrat après ultrafiltration par centrifugation à 3 700 \times g pendant 20 min. Moyenne \pm écart type ($n = 3$). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Les astérisques correspondent à des différences significatives entre avant et après exposition pour chaque mésocosme, avec ou sans algues (test de Student, $p < 0,05$).	109
Figure 4-25 : Proportion en argent dans le filtrat, mesuré après n centrifugations successives de 20 min à 3 700 \times g de 4,5 mL d'une solution de concentration en argent total de : 85,8 (\bullet) et 144,6 ng/L (\circ). Moyenne \pm écart type ($n = 3$)......	111
Figure 4-26 : Argent retenu sur le filtre supérieur (en noir), inférieur (en rouge) et différence entre les deux filtres (en vert) après passage des solutions d'exposition de trois mésocosmes avec et sans algues. Deux filtres en polycarbonate superposés de 2 μm ont été utilisés. Moyenne \pm écart type ($n = 3$). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Aucune différence statistiquement significative entre la quantité d'argent récupérée sur les filtres avec et sans algues n'a été observée (test de Student, $p > 0,05$)......	112
Figure 4-27 : Concentrations en argent adsorbé récupéré des filtres utilisés pour filtrer les eaux d'exposition des mésocosmes avec ou sans algues. La concentration en argent adsorbé est définie	

comme la concentration en argent dans la solution de lavage (200 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 4 \times 10 mL). Moyenne \pm écart type (n = 3). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Aucune différence statistiquement significative entre les concentrations en argent adsorbé avec et sans algues n'a été relevée (test de Student, $p > 0,05$) 113

Figure 4-28 : Concentrations en argent total dans la solution d'exposition des trois mésocosmes (sans filtration, ni centrifugation) avant (en noir) et après exposition de *Daphnia magna* (en blanc). Moyenne \pm écart type (n = 5). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les concentrations en Ag total retrouvées dans la solution avant et après exposition des daphnies (test de Student, $p > 0,05$)..... 114

Figure 4-29 : Accumulation de l'argent provenant des différents mésocosmes dans *Daphnia magna* après 24 h d'exposition. Moyenne \pm écart type (n = 5). Les astérisques indiquent qu'une différence statistiquement significative a été observée avec les résultats du mésocosme 1 (témoin) (test de Student, $p < 0,05$)..... 115

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Nombre de transport cationique du film lipidique préparé à partir de différents phospholipides, adapté de Hopfer et al. (1970). Si $T_{\text{cation}} > 0,5$, la membrane est plus perméable aux cations; si $T_{\text{cation}} < 0,5$, la membrane est plus perméable aux anions.	8
Tableau 1-2 : Constantes de formation et produits de solubilité de l'Ag (ligands inorganiques), provenant de la base de données thermodynamiques NIST (National Institute of Standards and Technology) version 8.0 (Martell <i>et al.</i> , 2004).....	14
Tableau 1-3 : Constantes de formation de complexes entre l'Ag et quelques ligands organiques, provenant de la base de données thermodynamiques NIST (National Institute of Standards and Technology) version 8.0 (Martell <i>et al.</i> , 2004)	16
Tableau 3-1 : Composition des solutions tampons (force ionique et spéciation calculées avec MINEQL+ v.4.6).....	48
Tableau 3-2 : Composition des solutions d'exposition, après dilution avec la dispersion de liposomes (force ionique et spéciation calculées avec MINEQL+ v.4.6)	49
Tableau 3-3 : Composition de la solution de culture MHSM-1	70
Tableau 4-1 : Distributions de taille des liposomes, déterminées par diffusion dynamique de la lumière, après leur synthèse, après leur changement de milieu et après leur exposition au mercure. Moyenne \pm écart type. Des différences significatives ont été observées entre les deux distributions après synthèse et entre les distributions après synthèse et les distributions après changement de milieu (test de Student, $p < 0,05$).....	74
Tableau 4-2 : Analyse par ICP-AES de solutions de AgNPs digérées suivant trois différents protocoles. Moyenne \pm écart type (n=2).....	92
Tableau 4-3 : Valeurs des différents paramètres calculés lors des expériences (a, b et c) d'accumulation des AgNPs par les liposomes en fonction du temps. Moyenne \pm écart type (n=3) quand applicable. Ads : adsorption sur les parois des bouteilles; Eff. résine : efficacité de la résine Ambersep GT 74 à adsorber l'argent en solution; R^2 : coefficient de détermination appliqué aux régressions exp (exponentielle, selon l'équation 6-4) et lin (linéaire); Pente : 1 significative et 0 non significative; n.d. non déterminé.....	98
Tableau 4-4 : Bilan de masse effectué avec les résultats obtenus après exposition de l'argent aux algues (résultats $\pm 1\sigma$).	108

Tableau 4-5 : Argent retenu sur deux filtres en nitrocellulose de 3 µm superposés après passage des eaux des mésocosmes avec (250 mL) et sans algues (400 mL) (résultats ± 1σ) 110

Liste des abréviations

α	valeur seuil du test statistique
AAP	algal assay procedure
AAS	spectroscopie d'absorption atomique
ACS	American Chemical Society
AFM	microscope à force atomique
$[Ag]_L$	concentration totale en argent dans les liposomes ($\mu\text{mol Ag/g P}$)
$[AgL]^0$	concentration du complexe neutre dans la solution d'exposition ($\mu\text{mol/L}$)
AgNPs	nanoparticules d'argent
APHA	American Public Health Association
AuNPs	nanoparticules d'or
β	constante de formation du complexe
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
BLM	modèle du ligand biotique
CE ₅₀	concentration efficace moyenne
CI ₅₀	concentration inhibitrice médiane
CL ₅₀	concentration létale médiane
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DOLT-4	<i>Dogfish liver certified reference material for trace metals</i>
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
ϵ	constante diélectrique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
EDX	analyse dispersive en énergie
FIAM	modèle de l'ion libre
f_L	fraction métallique labile intracellulaire
GA	gomme arabique
Glu	Glucosyl
Gly	Glycéride
GUVs	<i>giant unilamellar vesicles</i>
HDPE	polyéthylène haute densité
ICP-AES	spectrométrie d'émission atomique avec plasma à couplage inductif
ICP-MS	spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif
ISE	électrode sélective
ISMER	Institut des sciences de la mer
ISO	<i>International Standards Organization</i>
K	constante d'équilibre réactionnelle
K ₁	constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML
k _d , k _{d'}	constantes de vitesse pour la dissociation du complexe de surface
k _e	constante d'élimination (min^{-1})
K _f	constante de formation du complexe M _n L _m
k _f , k _{f'}	constantes de vitesse pour la formation du complexe de surface
k _i	constante d'internalisation (L/g P/min)
k _{int}	constante de vitesse pour l'internalisation du métal

K_{ow}	coefficient de partage octanol/eau
K_{ps}	produit de solubilité du précipité $M_xL_y(s)$
LUVs	<i>large unilamellar vesicles</i>
LysPG	Lysyl phosphatidylglycérol
L^{z-}	ligand
MES	acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique
MHSM	<i>Modified High Salt Medium</i> (milieu de culture algale)
ML	complexe métallique en solution
MLVs	<i>multilamellar vesicles</i>
MO	matière organique
MOD	matière organique dissoute
MOPS	acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (limite d'exclusion de taille des filtres)
M-X	complexe métallique de surface
M^{z+}	ion métallique libre
n	nombre d'expériences réalisées
N_a	nombre d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
N_{lip}	nombre total de liposomes
N_{PC}	nombre total de molécules de phosphatidylcholine par fraction
NTA	analyse du suivi individuel de nanoparticules
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
p	probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle d'un test statistique
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PEG	polyéthylène glycol
PG	phosphatidylglycérol
[P_{total}]	concentration en phosphore total (g/L)
PdI	indice de polydispersité
pKa	constante d'acidité d'un équilibre acido-basique
PVP	polyvinylpyrrolidone
QCM-D	microbalance à cristal de quartz
R^2	coefficient de détermination
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>
ROS	espèces oxygénées réactives
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SNPs	nanoparticules de silice
SP-ICP-MS	<i>Single Particle – Inductively Coupled Plasma – Mass spectrometry</i>
SRFA	<i>Suwannee River Fulvic Acid</i>
SRHA	<i>Suwannee River Humic Acid</i>
STEM	microscope électronique à balayage par transmission
SUVs	<i>small unilamellar vesicles</i>
SWy	<i>Wyoming montmorillonite</i>
TEM	microscope électronique à transmission
T_{ion}	nombre de transport d'un ion
TPB ⁻	tétraphénylborate
TPP ⁺	tétraphénylphosphonium

TOC-Vcph	<i>total organic carbon analyzer</i>
TTFs	<i>trophic transfer factors</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	ultraviolet
χ	électronégativité

1. INTRODUCTION

1.1. Mise en contexte

L'argent présente des propriétés physico-chimiques très intéressantes qui ont depuis longtemps été exploitées, notamment par l'industrie de la photographie (Purcell & Peters, 1998). À partir des années 1980, de nouvelles technologies permettant de développer des structures nanométriques font leur apparition. De par leur taille, ces nouvelles structures possèdent des propriétés novatrices et avantageuses, très différentes de celles des plus gros matériaux de même composition. C'est le cas des nanoparticules d'argent (AgNPs). Ces nanoparticules sont essentiellement d'origine anthropique, synthétisées en laboratoire, principalement par réduction de sels d'argent. Mais, elles peuvent être également d'origine naturelle, les acides humiques présents dans l'eau pouvant servir de réducteur (Akaighe et al., 2011).

Les nanoparticules d'argent ont commencé à être utilisées il y a plus de 120 ans; elles étaient alors connues sous le nom d'argent colloïdal. Le premier rapport en attestant date en effet de 1889 (Nowack et al., 2011). Néanmoins, c'est à partir des années 1990 que l'emploi de ces dernières a augmenté de manière exponentielle. En 2008, la production mondiale de nanoparticules d'argent a été estimée à 500 tonnes/an (Mueller & Nowack, 2008). La base de données du centre international Woodrow Wilson répertorie depuis 2005, à l'échelle de la planète, les produits contenant des nanomatériaux. Initialement, seulement 54 produits avaient été mis sur le marché. En 2017, c'est plus de 1800 produits qui ont été répertoriés, dont 442 contenaient des nanoparticules d'argent (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2017). De tous les nanomatériaux existant à ce jour, ce sont les nanoparticules d'argent que l'on retrouve en majorité dans ces produits.

Cette production croissante suscite beaucoup d'inquiétude, car le lavage répété de vêtements contenant des nanoparticules d'argent peut les mobiliser; de même, l'emploi de nanoargent comme bactéricide dans les piscines et spas, par exemple (Luoma, 2008) y contribue également. Les nanoparticules d'argent (ou l'argent dissous) ainsi libérées pourraient se retrouver en quantités non négligeables dans l'environnement et notamment dans les eaux douces naturelles. Les concentrations en nanoparticules d'argent dans les eaux américaines et européennes ont été estimées grâce à des modèles respectivement entre 0,09-0,43 ng/L et 40-320 ng/L (Nowack et al., 2011). Les études visant à prédire leur comportement dans les eaux naturelles sont donc essentielles pour faire avancer nos connaissances sur le sujet (Gottschalk et al., 2013). Il est, en outre, important de préciser qu'à l'heure actuelle, seules quelques techniques permettant d'analyser les nanoparticules d'argent dans les milieux naturels, et en

particulier dans l'eau douce, existent (ex. : *single particle*-inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS)), mais qu'elles sont souvent non nano-spécifiques (argent total ou dissous le plus souvent détecté; impossible de distinguer une nanoparticule seule d'un agrégat de nanoparticules). Un plus large développement de celles-ci est donc encore nécessaire afin de récolter des informations sur la quantité et la qualité des AgNPs réellement présentes dans l'environnement.

Ces nanoparticules, une fois rejetées dans l'environnement, pourraient avoir un impact sur les écosystèmes aquatiques. Le stress oxydant est l'effet principal observé chez les organismes exposés aux nanoparticules d'argent. Celles-ci favorisent en effet l'accumulation d'espèces oxygénées réactives (ROS) dans le milieu ainsi qu'à l'intérieur des organismes, pouvant mener à leur mort. En outre, il n'existe aucun règlement spécifique à l'introduction de produits contenant des nanomatériaux, que ce soit au niveau québécois, canadien, américain ou européen (Lord, 2011). Bien que d'autres réglementations existantes peuvent s'appliquer aux nanotechnologies (telle que REACH¹ en Europe) et que celles-ci ne peuvent donc pas être librement introduites, une meilleure compréhension de la nocivité de ces nanomatériaux pourrait permettre de mieux contrôler les risques potentiellement spécifiques qu'ils présentent pour l'environnement et d'adapter les règlements déjà existants (Lord, 2011).

La première partie de ce chapitre est consacrée aux bicouches artificielles, utilisées dans cette thèse afin de modéliser la membrane des cellules biologiques. Nous présenterons leurs différentes structures, utilisations et propriétés. Nous développerons dans une deuxième partie le modèle du ligand biotique (BLM), modèle théorique permettant de prédire la biodisponibilité des métaux. Dans une troisième et une quatrième partie, nous étudierons les propriétés, la biodisponibilité et la toxicité des nanoparticules d'argent et de l'argent dissous en milieu aquatique. Enfin, les travaux réalisés en mésocosmes sur les nanoparticules d'argent seront décrits dans une dernière partie.

1.2. Membranes modèles

1.2.1. Structure et préparation

Il existe deux modèles principaux qui ont été développés afin de simuler les membranes biologiques naturelles : les liposomes et les films lipidiques. Ils sont utilisés depuis les années 60 et ont été décrits en

¹ REACH : Règlement de l'Union Européenne concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances, en vigueur depuis le 1^{er} juin 2007 (Règlement (CE) No 1907/2006).

détail par Bangham (1968). Les travaux présentés dans cette thèse se sont focalisés sur le premier modèle. Néanmoins, les résultats obtenus avec les films lipidiques ont été utilisés à titre de comparaison dans nos interprétations. Ce modèle va donc également être présenté dans la partie suivante. Enfin, les liposomes et les films lipidiques déposés sur un support, évoqués notamment dans la partie 1.2.4, seront brièvement décrits dans une troisième partie.

1.2.1.1. Liposomes

La structure générale des liposomes (smectic mesophase, phospholipid spherules ou lipid bilayer vesicles) est présentée à la Figure 1-1.

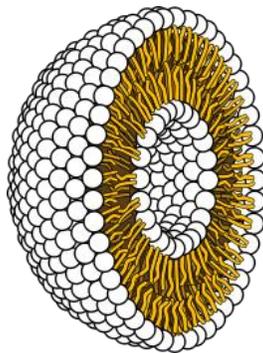


Figure 1-1 : Coupe transversale d'un liposome unilamellaire (Villarreal, 2007)

Ces vésicules sphériques sont constituées d'une ou de plusieurs bicouches phospholipidiques séparant le milieu intravésiculaire du milieu extérieur, leur diamètre variant de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres. Elles peuvent être classées en plusieurs catégories, en fonction de leur taille et du nombre de bicouches qu'elles possèdent (unilamellaires : SUV (petites), LUV (grandes), GUV (géantes), et multilamellaires : MLV). Différents protocoles expérimentaux pour la préparation de LUVs, trouvés dans la littérature, sont réunis dans le tableau de l'Annexe 1 : Différents protocoles expérimentaux pour la préparation de LUVs. Les vésicules multilamellaires se forment spontanément lorsque des phospholipides sont placés en milieu aqueux : c'est, en effet, la configuration la plus stable, permettant de réduire l'exposition de leurs chaînes apolaires à l'eau (Lorin *et al.*, 2004). Les vésicules unilamellaires sont ensuite formées soit par extrusion (formation de LUV) soit par sonification (formation de SUV). Différents paramètres peuvent être modifiés dans la synthèse des liposomes en fonction du but recherché, tels que le type de phospholipides utilisés, la force ionique, le pH et la composition du milieu aqueux (lequel sera capté dans l'espace intravésiculaire) (Sessa & Weissmann, 1968). Une étape de congélation/décongélation est appliquée aux MLVs avant extrusion afin de fragiliser les membranes et de permettre la formation de LUVs. L'extrusion, sur un filtre de diamètre de pore dépendant de la taille

finale des LUVs désirée, permet l'élimination des MLVs résiduels ainsi que des LUVs de diamètre supérieur à celui désiré (Lorin *et al.*, 2004).

1.2.1.2. Film lipidique

Le montage expérimental ainsi que la structure des films lipidiques (planar lipid bilayer, aussi appelés black lipid ou thin lipid membrane) sont présentés sur la figure suivante.

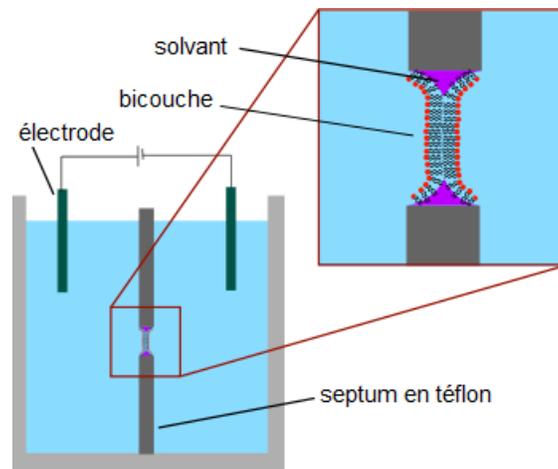


Figure 1-2 : Montage expérimental et structure d'un film lipidique (Anonyme, 2009).

Un septum en Téflon, perforé en son milieu par une ouverture d'environ 1 mm², est placé dans une chambre expérimentale, créant deux compartiments de même volume, remplis d'une solution aqueuse de composition donnée. Des lipides, dissous dans un solvant organique, sont injectés à l'aide d'une pipette Pasteur dans un des compartiments près de l'ouverture du septum. Le film lipidique est alors créé en faisant passer une bulle d'air de la pipette vers l'ouverture (Szabo *et al.*, 1969). Les lipides peuvent également être appliqués sur le septum, par-dessus l'ouverture, grâce à un pinceau (Finkelstein, 1972). Le film est une fine bicouche lipidique (< 100 Å, (Finkelstein, 1972)) plane sur toute sa longueur et tordue à ses extrémités, reliées au septum la supportant. Les têtes polaires des phospholipides sont tournées vers les solutions aqueuses et les queues apolaires se font face, comme présenté sur la Figure 1-2 (Szabo *et al.*, 1969). Une partie du solvant organique, utilisé pour dissoudre les lipides, est retenu par la bicouche (Figure 1-2). À cause de son extrême finesse, le film apparaît noir sous lumière réfléchie, car toutes les longueurs d'onde sont en interférence destructive, d'où son appellation de « black lipid membrane » (Finkelstein, 1972). Deux électrodes (ex. : argent/chlorure d'argent), immergées dans chacun des compartiments et connectées à un convertisseur courant-tension, sont utilisées afin de mesurer les potentiels ainsi que les conductances membranaires (Szabo *et al.*, 1969).

1.2.1.3. Membranes supportées

Les membranes supportées constituent un autre système pouvant également être utilisé pour modéliser les membranes cellulaires. La création de membranes supportées s'effectue en étalant des liposomes sur un support hydrophile. Soit ces vésicules se brisent et forment un film lipidique supporté (sur la silice, le verre et le mica), soit elles restent intactes et forme une couche de liposomes supportés (sur l'oxyde de titane et l'or). Des interactions électrostatiques rentrent en jeu dans la formation de ces membranes (Richter *et al.*, 2003). Elles sont utilisées pour l'étude des interactions entre les contaminants extérieurs comme les nanoparticules et la surface de la bicouche (adsorption, déséquilibre, déstructuration, etc...) (Bailey *et al.* (2015), Leroueil *et al.* (2008), Yi & Chen (2013)). Elles ne peuvent néanmoins pas être utilisées pour détecter des flux transmembranaires.

1.2.2. Quelques utilisations des liposomes

Les liposomes sont très utilisés dans le domaine pharmaceutique, car ce sont de bons vecteurs de principes actifs. Les médicaments hydrophiles sont encapsulés dans le volume interne des liposomes, tandis que s'ils sont hydrophobes ils sont dissous dans la bicouche lipidique. Injectés dans l'organisme, les liposomes vont pouvoir fusionner (ou non, comme dans le cas de l'encapsulation de la morphine) avec les membranes cellulaires et relarguer plus ou moins rapidement leur principe actif. Ils sont également utilisés en thérapie génique afin de délivrer des gènes ou des plasmides (Lorin *et al.*, 2004).

En cosmétique, ils peuvent encapsuler des substances actives (antioxydantes, collagène,...) et ainsi remplacer les émulsions huileuses ou solutions alcooliques généralement utilisées qui peuvent à terme abîmer la peau. En outre, leur capacité à fusionner avec les cellules de la peau permet d'augmenter l'efficacité de leur action (Lorin *et al.*, 2004).

La membrane des liposomes peut en effet fusionner avec les membranes biologiques, car leurs compositions sont similaires. Les liposomes peuvent donc, dans les domaines de la biochimie, de la biophysique ou de l'écotoxicologie par exemple, servir de modèle pour l'étude des propriétés membranaires ou dans notre cas, l'étude des interactions des cellules biologiques avec des contaminants. Le modèle n'est cependant pas sans faille, les liposomes ne reproduisant pas parfaitement la structure et les propriétés des membranes biologiques. La plus grande variabilité des chaînes d'acides gras chez les membranes cellulaires ou les milieux intravésiculaires complexes, bien différents des tampons de pH généralement utilisés dans la synthèse des liposomes, peuvent difficilement être pris en compte. De plus, en l'absence de transporteurs spécifiques, seule la diffusion

passive des composés à travers la bicouche phospholipidique devrait être possible. Les grosses molécules neutres et polaires, de par leur taille, ne devraient donc pas pouvoir passer. C'est également le cas pour les ions, hydrophiles de par leur charge (négative ou positive). Néanmoins, comme cela va être présenté dans la partie suivante, les membranes artificielles (films lipidiques et liposomes), peuvent être relativement perméables, notamment aux ions.

Les liposomes sont malgré tout très utilisés comme modèle, car ils permettent d'obtenir un bon aperçu des processus intervenants au niveau membranaire (Lorin et al., 2004).

1.2.3. Propriétés

1.2.3.1. Perméabilité à l'eau

Les membranes modèles, comme les membranes naturelles, sont très perméables à l'eau. La perméabilité des membranes lipidiques à l'eau est cruciale, car elle permet aux membranes biologiques de réguler leur volume interne. Les membranes présentent une large gamme de coefficients de perméabilité à l'eau (de 10^{-5} à 10^{-3} cm/s pour les films lipidiques et de 10^{-6} à 10^{-4} cm/s pour les liposomes), ceux-ci dépendant de la composition lipidique (longueur des chaînes et insaturations) et de la présence ou non de cholestérol dans la bicouche (Deamer & Bramhall, 1986). Deux modèles ont été proposés pour décrire le passage des molécules d'eau à travers la membrane phospholipidique. Le plus commun est le modèle de solubilité-diffusion, décrit par Deamer & Bramhall (1986) : les molécules d'eau se dissoudraient dans la partie apolaire de la bicouche et la traverseraient par simple diffusion. Le second modèle a été proposé après avoir observé que la perméabilité des membranes était plus importante pour des lipides à l'état liquide cristallin ($T^\circ > T^\circ_{\text{transition}}$) que pour des lipides à l'état gel (Huster *et al.*, 1997). Des fluctuations de température, particulièrement lorsque celles-ci conduisent à un changement d'état, pourraient donc créer des anomalies dans la membrane qui permettraient aux molécules d'eau voire à d'autres solutés de la traverser (Deamer & Bramhall, 1986).

1.2.3.2. Perméabilité aux ions

Parsegian (1969) fut le premier à décrire la perméabilité des membranes lipidiques aux ions en termes d'énergie dite de Born, définie comme étant l'énergie d'un ion dans un environnement de constante diélectrique ϵ . Celle-ci est dépendante de la charge et de la taille de l'ion ainsi que de la structure et de la polarisabilité du milieu. La différence d'énergie d'un ion passant de la solution aqueuse fortement diélectrique (ou polaire) à la membrane lipidique faiblement diélectrique (ou apolaire) pourrait théoriquement atteindre plusieurs dizaines de kcal/mol, niveau d'énergie jamais rencontré en conditions

physiologiques normales. Ceci a été considéré comme étant une explication acceptable à l'imperméabilité relative des membranes lipidiques aux ions. L'augmentation de la constante diélectrique membranaire, par l'ajout de transporteurs ou la modification du solvant organique (film lipidique), permettrait de réduire cette énergie et favoriserait le passage des ions à travers la bicouche (Deamer & Bramhall, 1986).

Certaines faiblesses dans le modèle de Born ont néanmoins été relevées par Flewelling & Hubbell (1986). Les perméabilités relatives de certains anions et cations hydrophobes, tels que le tétraphénylborate (TPB⁻) et le tétraphénylphosphonium (TPP⁺), deux ions analogues de par leur structure et leur hydrophobicité, différaient en effet de trois ordres de grandeur, contrairement aux prévisions du modèle. Ces résultats peuvent être étendus aux ions hydrophiles. Andreoli *et al.* (1967) ont en effet déterminé que la membrane d'un film lipidique, formé à partir de lipides extraits de globules rouges de mouton (principalement phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine), était plus perméable aux cations ($T_{Na}, T_K \sim 0,8$, avec $^2T_{ion}$ = nombre de transport de l'ion) qu'aux anions monovalents ($T_{Cl} \sim 0,2$). Hopper *et al.* (1970) ont découvert que, dépendamment de la composition lipidique de la membrane, celle-ci pouvait être plus perméable aux cations ou aux anions (Tableau 1-1). Ils ont fait l'hypothèse que cette différence était due à la charge des phospholipides dont la membrane était constituée. Les forces répulsives ou attractives entre les têtes polaires des phospholipides et les ions, contrôlant la concentration de ces derniers à la surface de la membrane, seraient donc un facteur déterminant de la perméabilité des bicouches. Hopper *et al.* (1970) ont également fait l'hypothèse que les cations et les anions pouvaient avoir une mobilité différente lors de leur passage à travers la partie hydrocarbonée de la membrane.

² T_{ion} désigne le nombre de transport d'un ion (*ion transport number* ou *transference number*). Il est défini comme le rapport entre la conductance de l'ion et la conductance totale de la membrane.

Tableau 1-1 : Nombre de transport cationique du film lipidique préparé à partir de différents phospholipides, adapté de Hopfer et al. (1970). Si $T_{\text{cation}} > 0,5$, la membrane est plus perméable aux cations; si $T_{\text{cation}} < 0,5$, la membrane est plus perméable aux anions.

Lipide	Source	Charge totale	Charge nette	Nombre de transport cationique T_{cation}		
				NaCl	KCl	HCl
LysPG ^a	<i>S. aureus</i>	+ + -	+	0,05	0,04	0,09
PG ^a	<i>S. aureus</i>	-	-	0,95	0,95	0,95
DiPG ^a	<i>S. aureus</i>	--	--	0,86	0,87	/
DiGluDiGly ^a	<i>S. aureus</i>	0	0	0,61	0,55	0,82
PE ^a	<i>B. megaterium</i>	+ -	0	/	/	0,81
PE ^b	<i>B. megaterium</i>	+ -	0	0,56	0,61	/
PE ^b	<i>E. coli</i>	+ -	0	0,55	0,62	0,79

^a 1% lipides, 0,4% cholestérol dans du décane

^b 1% lipides dans du décane

LysPG : Lysyl phosphatidylglycérol, Glu : Glucosyl, Gly : Glycéride, PE : Phosphatidyléthanolamine

S. aureus : *Staphylococcus aureus*, *B. megaterium* : *Bacillus megaterium*, *E. coli* : *Escherichia coli*

Les films lipidiques préparés à partir de phospholipides possédant une charge nette nulle, tels que PE (Tableau 1-1, Hopfer *et al.* (1970)) ou phosphatidylcholine (PC) (Andreoli *et al.*, 1967), semblent n'être que faiblement plus perméables aux cations qu'aux anions. En revanche, Bangham *et al.* (1965) ont démontré que des liposomes préparés à partir de PC étaient largement plus perméables à Cl⁻ qu'à Na⁺ ou K⁺. Ohki *et al.* (1986) ont démontré que la membrane des liposomes faite de PC laissait passer 0,07 ± 0,03 mmol Ca²⁺/mol lipide en une heure, mais possiblement aidée par la présence de failles dans la bicouche lipidique. Les propriétés des films lipidiques et des liposomes, quant à la perméabilité aux ions, semblent donc être différentes. Bangham (1968) et Sessa & Weissmann (1968) ont souligné que la perméabilité de liposomes aux cations dépendait du signe de la charge prévalant à la surface de la membrane, mais que les anions semblaient pouvoir diffuser plus facilement, que celle-ci soit chargée positivement ou négativement. Andreoli *et al.* (1967) ont remarqué que dès que leur film lipidique se courbait, la tension à travers la membrane déclinait. Ils ont suggéré que la membrane avait pu subir une modification dans son architecture moléculaire ou dans sa composition et que cela avait entraîné une modification de la

perméabilité ionique. Enfin, Bangham (1968) a émis l'hypothèse que l'alignement des dipôles permanents dans la membrane des liposomes pouvait jouer un rôle important dans la diffusion sélective des ions.

1.2.4. Nanoparticules et membranes modèles

Des membranes modèles (liposomes ou films lipidiques, supportés ou non) ont été utilisées afin d'étudier l'interaction entre les nanoparticules et la membrane lipidique. Trois processus principaux interviennent lors de leur exposition: l'adsorption des nanoparticules à la surface de la bicouche, leur pénétration à travers celle-ci et/ou la dégradation de la membrane (Chen & Bothun, 2014)

L'attachement des nanoparticules à la surface de la bicouche est une étape clé qui précède et souvent favorise leur internalisation. L'adsorption des nanoparticules d'argent, dont l'action toxique est censée être principalement reliée à la libération d'ions Ag^+ , permet en outre d'augmenter l'exposition des cellules à l'argent ionique. Les nanoparticules, tout comme les membranes naturelles, possèdent des charges de surface. Des interactions attractives (type Van der Waals) et répulsives (double couche électrique), considérées ensemble dans la théorie DLVO³ (Israelachvili, 2011), contrôlent alors vraisemblablement l'attachement des nanoparticules aux membranes (Chen & Bothun, 2014). Cela a été confirmé par Wang *et al.* (2016a), qui ont étudié les interactions entre des nanoparticules d'argent enrobées de citrate et un film lipidique supporté composé de DOPC (1,2-dioleil-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine). À l'aide d'une microbalance à cristal de quartz avec surveillance de la dissipation d'énergie (QCM-D), ils ont déterminé que la vitesse d'attachement des nanoparticules à la surface du film lipidique augmentait avec la concentration d'électrolyte (NaCl et $CaCl_2$) en solution, indiquant que l'adsorption des nanoparticules était contrôlée par des interactions électrostatiques. La composition de la solution pourrait donc avoir une influence sur l'adhésion des nanoparticules à la surface des membranes. Il en va de même pour la composition des nanoparticules, et particulièrement leur enrobage. En effet, Hou *et al.* (2012), en étudiant les interactions entre des nanoparticules d'or et des liposomes supportés, ont remarqué que les nanoparticules d'or enrobées d'acide tannique présentaient une plus grande affinité pour les membranes lipidiques que celles enrobées de PVP (polyvinylpyrrolidone). Enfin, Melby *et al.* (2016) ont déterminé qu'en modifiant la composition de films

³ Théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) : Théorie permettant de décrire l'ensemble des interactions électriques entre deux particules sphériques chargées se rapprochant l'une de l'autre et dont les nuages électroniques commencent à se chevaucher. Le potentiel d'interaction total entre ces deux particules est la somme du potentiel attractif dispersif (Van der Waals) et répulsif de double couche électrique (et, éventuellement, d'autres potentiels d'interaction à très court rayon d'action).

lipidiques supportés (microdomaines ou *rafts* lipidiques enrichis en sphingomyéline et en cholestérol), l'adhésion des nanoparticules d'or au film lipidique augmentait. La composition des membranes modèles en lipides, voire en d'autres composants tels que les protéines, pourrait donc aussi avoir une influence sur l'adsorption des nanoparticules.

Après l'adsorption, certaines nanoparticules peuvent pénétrer la membrane lipidique sans la dégrader. Le Bihan *et al.* (2009) ont étudié le transport de nanoparticules de silice (SNPs, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$) à travers des liposomes composés de DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) par cryotomographie électronique. Les nanoparticules, d'un diamètre variant de 30 à 190 nm, s'internalisaient par invagination dans les liposomes, suivant un procédé similaire à l'endocytose cellulaire. Michel & Gradzielski (2012) ont indiqué que ce mécanisme était régi par le même équilibre énergétique que dans le cas de la formation de film lipidique supporté. Le Bihan *et al.* (2009) ont découvert que la taille des nanoparticules avait une influence sur ce procédé. Les SNPs possédant un diamètre inférieur à 20 nm restaient en effet adsorbées à la surface des liposomes, leur force d'adhésion étant considérée comme trop faible pour induire une torsion de la membrane et provoquer l'invagination. De plus, une taille minimum des liposomes (> 300 nm) comme condition nécessaire au passage de particules colloïdales à travers les membranes cellulaires, définie par Deserno & Gelbart (2002), ne semblait plus être une exigence d'après les résultats expérimentaux obtenus par Le Bihan *et al.* (2009). Ces derniers ont en effet observé l'invagination des SNPs par des liposomes de 100 à 300 nm de diamètre.

L'adsorption de nanoparticules peut également provoquer des altérations dans la membrane phospholipidique. Moghadam *et al.* (2012) ont étudié l'influence de la fonctionnalité de surface de nanoparticules d'or (AuNPs) sur des liposomes composés de DOPC, par la détection de fuites d'un colorant, la carboxyfluorescein, initialement présente à l'intérieur des vésicules. Ils ont déterminé que les nanoparticules chargées positivement (ex. : AuNPs enrobées de diallyldiméthylammonium) dégradaient plus rapidement et de manière plus importante les liposomes que les nanoparticules chargées négativement (ex. : AuNPs enrobées d'acide tannique). Ils ont fait l'hypothèse que les fuites étaient dues à des pores se formant dans la membrane à la suite de son interaction avec les nanoparticules. Leroueil *et al.* (2008) ont observé la différence de mécanismes de dégradation entre des nanoparticules d'or de 2 nm de diamètre (AuNPs-NH₂) et des nanoparticules de silice de 50 nm de diamètre sur microscope à force atomique (AFM). Les AuNPs s'agrégeaient à la surface d'un film lipidique supporté, diffusaient à travers la membrane par les endroits présentant des défauts et provoquaient leur élargissement. Les SNPs, quant à eux, étaient capables de créer des ouvertures à travers la membrane, confirmant l'influence de la taille des nanoparticules sur l'interaction avec les bicouches lipidiques.

1.3. Le modèle du ligand biotique (BLM)

La biodisponibilité d'un métal peut être définie comme la capacité de ce métal à se bioaccumuler dans un organisme c'est-à-dire à s'associer à la membrane cellulaire et à s'internaliser (Croteau *et al.*, 2011).

Le modèle de ligand biotique (BLM), dérivé du modèle de l'ion libre (FIAM), a pour but de prédire la biodisponibilité des métaux en fonction de leur spéciation en solution. Il est en effet à présent connu que la spéciation d'un métal, c'est-à-dire les différentes formes que ce métal peut prendre en solution, va fortement affecter sa disponibilité vis-à-vis des organismes aquatiques.

Avant de s'accumuler dans un organisme et de potentiellement provoquer un effet, l'argent doit interagir avec une membrane biologique. Les différentes étapes du transport du métal vers l'intérieur de la cellule sont présentées sur la Figure 1-3 :

1. Diffusion du métal M de la solution externe vers la surface biologique,
2. Complexation du métal à des sites de liaisons de la surface biologique (X : ligand biotique),
3. Transport du métal à travers la membrane plasmique (ou internalisation) : généralement transport facilité du cation métallique via un site de transport spécifique pour les métaux essentiels.

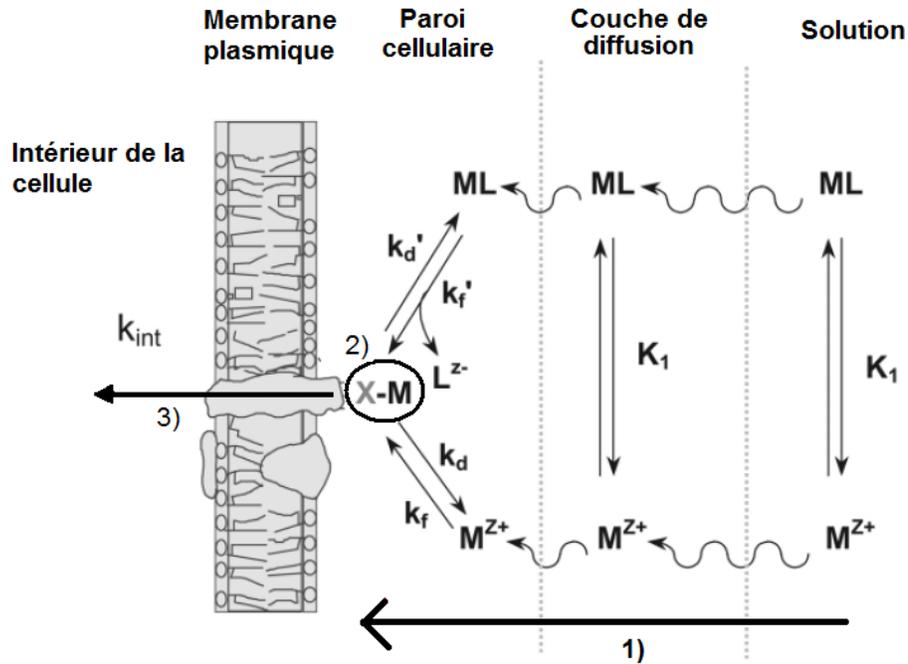


Figure 1-3 : Schéma conceptuel représentant les interactions métal/organisme. Adapté de Campbell *et al.* (2002). M^{Z+} = ion métallique libre; L^{Z-} = ligand; ML = complexe métallique en solution; K_1 = constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML; M-X complexe métallique de surface; k_f, k_f' = constantes de vitesse pour la formation du complexe de surface; k_d, k_d' = constantes de vitesse pour la dissociation du complexe de surface; k_{int} = constante de vitesse pour l'internalisation du métal.

Pour des milieux à pH et à dureté ($[Ca^{2+}]$, $[Mg^{2+}]$) constants, le modèle du ligand biotique prédit que la réponse biologique sollicitée par un métal M dissous est directement fonction de l'activité de l'ion métallique libre M^{Z+} (Campbell & Fortin, 2013).

Le modèle repose sur les hypothèses suivantes :

- La diffusion du métal vers la surface biologique (1) et sa complexation avec les sites de liaison (2) se font plus rapidement que son internalisation (3) (Figure 1-3);
- La membrane plasmique est le principal site où ont lieu les interactions métal-organisme, via une réaction d'échange de ligand;
- La réponse biologique dépend de la concentration du complexe de surface M-X-cellule;
- Les variations de l'activité du complexe de surface (M-X-cellule) suivent celles de la concentration en métal libre en solution $[M^{Z+}]$;

- La nature de la surface biologique reste constante pendant l'exposition au métal d'intérêt.

Le BLM ne s'applique que si toutes ces hypothèses sont respectées.

Le modèle du ligand biotique, comme tout modèle, n'est pas exempt de limites. Les cas où le BLM ne s'applique pas peuvent être classés en quatre catégories (Campbell et al., 2002):

- i. Des expériences avec des ligands formant des complexes métalliques hydrophobes ou avec des composés organométalliques hydrophobes, qui seraient transportés par diffusion passive à travers la membrane plasmique;
- ii. Quelques cas avec des ligands formant des complexes hydrophiles (métabolites de poids moléculaire faible) pouvant être internalisés ;
- iii. Les cas dans lesquels la diffusion du métal vers la surface biologique est l'étape limitante (hypothèse 1 non respectée);
- iv. Des expériences avec des espèces réagissant à la surface cellulaire et provoquant une toxicité sans entrer dans la cellule.

La manière dont les hypothèses du BLM vont s'appliquer aux nanoparticules d'argent n'est pas encore très claire.

Une des principales interrogations au sujet de la bioaccumulation des nanoparticules d'argent est de savoir si celles-ci peuvent pénétrer ou non à l'intérieur de l'organisme (Fabrega *et al.*, 2011). Si oui, dans quelles conditions cela est possible et quels sont les mécanismes mis en jeu? Si non, il convient de déterminer si la toxicité est seulement due à l'oxydation des nanoparticules d'argent suivie de la bioaccumulation des ions Ag^+ ainsi libérés, comme le prédit le modèle du ligand biotique, ou s'il existe d'autres mécanismes d'action.

La prise en charge spécifique de l'argent et des nanoparticules d'argent par les algues et les daphnies sera explicitée plus en détail dans ce document (cf. paragraphes 1.4.2, 1.4.3, 1.5.5 et 1.5.7).

1.4. L'argent dissous

1.4.1. Spéciation dans l'environnement

La spéciation de l'argent est une information importante qui permet, grâce au BLM, de prédire sa biodisponibilité dans le milieu naturel, tel qu'indiqué dans la partie précédente. Dans le Tableau 1-2 sont

présentées les constantes de formation et de solubilité des complexes d'argent avec les ligands inorganiques pouvant se trouver en plus ou moins forte concentration dans l'environnement.

Tableau 1-2 : Constantes de formation et produits de solubilité de l'Ag (ligands inorganiques), provenant de la base de données thermodynamiques NIST (National Institute of Standards and Technology) version 8.0 (Martell *et al.*, 2004)

Complexe M_nL_m	Log K_f avec $K_f = [M_nL_m] / [M]^n \cdot [L]^m$	Complexe M_nL_m	Log K_f avec $K_f = [M_nL_m] / [M]^n \cdot [L]^m$
$AgNO_3^0$	-0,10	$AgS_2O_3^-$	9,60
AgF^0	0,40	$Ag(S_2O_3)_2^{3-}$	13,70
$AgSO_4^-$	1,30	$Ag(S_2O_3)_3^{5-}$	12,80
$AgOH$	2,00	$AgHS^0$	13,60
$Ag(OH)_2^-$	3,99	$Ag(HS)_2^-$	17,70
$AgCl^0$	3,31	Précipité $M_xL_y(s)$	Log K_{ps} avec $K_{ps} = [M]^x \cdot [L]^y$
$AgCl_2^-$	5,25	$Ag_2S(s)$	-29,2
$AgCl_3^{2-}$	5,20	$Ag_2CO_3(s)$	-11,09
$AgCl_4^{3-}$	5,32	$AgCl(s)$	-9,75

Les constantes de formation des sulfures d'argent sont très élevées (13,60 et 17,70), ce qui signifie que l'affinité de l'argent pour les ions sulfures est très importante et que les complexes sont très stables. La spéciation de l'argent va donc être fortement influencée par la présence d'ions sulfures tant que la concentration de ces derniers reste supérieure à celle de l'argent. C'est le cas notamment dans les effluents d'eaux usées et dans les milieux récepteurs de ces effluents où les concentrations en sulfure inorganique sont parfois 200 à 300 fois supérieures aux concentrations en argent. C'est encore plus le cas dans les eaux interstitielles des sédiments de lacs anoxiques où les concentrations en sulfure inorganique sont 1000 à 15 000 fois supérieures aux concentrations en argent (Adams & Kramer, 1999). Celui-ci a également été retrouvé à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans des eaux de surface oxygènes (Adams & Kramer, 1999).

En l'absence de sulfure inorganique, ce sont les ions chlorure et thiosulfate qui vont pouvoir potentiellement contrôler la spéciation de l'argent. Ceux-ci forment en effet des complexes stables avec ce métal (Tableau 1-2). Les ions chlorures sont présents à des concentrations très élevées dans les

estuaires et les océans (de l'ordre de 10^{-1} M, US Department of Energy (1994)) mais on les retrouve également dans les eaux douces de surface (rivières et lacs) à des concentrations pouvant aller de 10^{-5} à 10^{-3} M (Buffle & Stumm, 1994). C'est à partir d'environ 0,4 mM en Cl^- que les chloro-complexes vont commencer à dominer la spéciation de l'argent, comme nous le montre la 0a ci-dessous. En outre, l'argent est peu soluble en présence de chlorure (Fortin, 2000) : le précipité AgCl(s) se forme dès lors que $[\text{Ag}^+][\text{Cl}^-] \geq K_{ps}$ ($10^{-9.75}$) (ex : dans une eau douce à 10^{-3} M Cl^- , il y a précipitation quand la concentration en Ag^+ atteint environ 10^{-7} M = 100 nM).

Le thiosulfate est présent à des concentrations relativement faibles dans les eaux naturelles, les sulfates étant les espèces chimiques soufrées les plus stables en milieu oxygène (Stumm & Morgan, 1996). En revanche, le thiosulfate sera retrouvé dans les effluents des industries photographiques, étant utilisé dans le traitement d'image (Purcell & Peters, 1998), dans les eaux interstitielles des sédiments à des concentrations pouvant aller de 50 nM à 100 μM (Thamdrup *et al.*, 1994), Luther *et al.* (1986) et dans les eaux usées des industries minières, des thio-sels se formant au cours de la flottation du minerai sulfuré (Vigneault *et al.*, 2003). À partir d'environ 4 nM en thiosulfate, les thio-complexes commencent à dominer la spéciation de l'argent (0b), ce qui est très inférieur à la concentration en Cl^- produisant le même effet (Fortin, 2000).

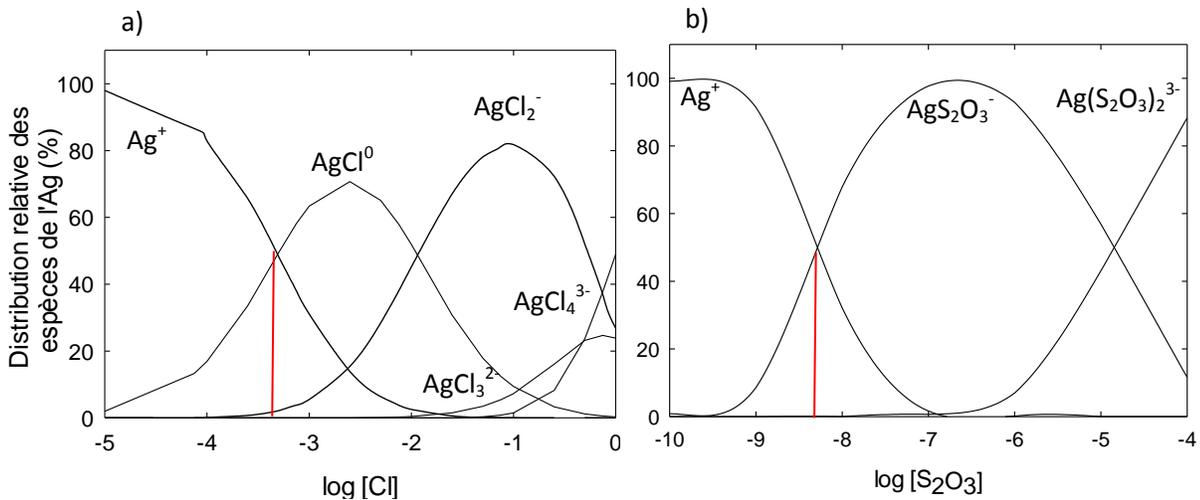


Figure 1-4 : Spéciation de l'argent en fonction de la concentration en a) ions chlorure et b) thiosulfate, déterminée à l'aide du logiciel MINEQL+ (pH 7, $[\text{Ag}]_{\text{total}} = 1$ nM)

Enfin, la formation d'hydroxo-complexes et de carbonato-complexes d'argent ne devient significative qu'à $\text{pH} > 10$. L'argent peut également former des complexes stables avec des ligands organiques possédant (cystéine, glutathion) ou non (EDTA) des fonctions thiols (Tableau 1-3). Notons que les constantes de formation et donc la stabilité des complexes organiques sulfurés sont plus élevées que

celles avec des ligands dotés de groupements carboxyles. Ceci s'explique par le fait que l'argent est un métal « mou », c'est-à-dire qu'il a plus tendance à se lier à des atomes peu électronégatifs, tels que le soufre (électronégativité $\chi = 2,58$), comparativement à l'oxygène par exemple ($\chi = 3,44$) (Fortin, 2000). En outre, la cystéine (Figure 1-5) a été utilisée afin de permettre de faire la distinction entre les contributions respectives des nanoparticules et de l'argent dissous dans l'accumulation de l'argent dans les organismes aquatiques. Elle a été utilisée de manière à neutraliser la toxicité des ions argent en les rendant moins biodisponibles aux organismes aquatiques. Ainsi, seules les nanoparticules restent potentiellement biodisponibles (Zhao & Wang (2012b) ; Navarro *et al.* (2008b)) et il est alors possible de déterminer leur effet propre. Néanmoins, certains paramètres, tels que la concentration en cystéine et son effet en fonction du type de nanoparticules (notamment du type d'enrobage) doivent être élucidés. En effet, la cystéine peut provoquer l'agrégation des nanoparticules, dépendamment de leur enrobage : elle a été observée par Zhao & Wang (2012b) à 1 μM (enrobage avec citrate ou acide tannique), mais aucune agrégation entre 1 nM et 2 μM (enrobage avec carbonate) (Navarro *et al.*, 2008b). La cystéine se lie aux ions d'argent, mais sa fonction thiol peut également se lier aux nanoparticules. Des liaisons hydrogène peuvent alors se créer entre nanoparticules, ce qui provoque leur agrégation (Mandal *et al.*, 2001).

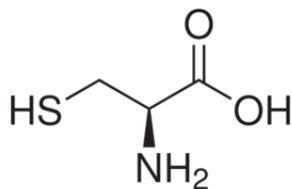


Figure 1-5 : L-cystéine (Sigma-Aldrich)

Tableau 1-3 : Constantes de formation de complexes entre l'Ag et quelques ligands organiques, provenant de la base de données thermodynamiques NIST (National Institute of Standards and Technology) version 8.0 (Martell *et al.*, 2004)

Complexe	Log K
AgEDTA ³⁻	7,20
Ag-cystéine	11,90
Ag-glutathion	12,30

La matière organique naturelle dissoute (MOD) possède principalement des groupements phénoliques et carboxyliques. Le soufre sous forme réduite n'est présent qu'à faible concentration dans les substances humiques et fulviques (55% du soufre total présent sous forme réduite dans les acides humiques; Xia *et al.* (1998)). En se liant à la MOD, l'argent commencera par se lier aux groupements thiols. Ces sites de très haute affinité vont se saturer dès que la concentration en argent total aura dépassé environ 1 nM (pour 5 mg C/L), l'argent pouvant alors se lier aux sites de moindre affinité : carboxyles et phénols (Chen *et al.*, 2012). Dans l'eau de mer, l'argent va majoritairement former des complexes avec les ions chlorures, présents en très forte concentration; Cowan *et al.* (1985) ont démontré que la complexation de l'argent avec la MOD était négligeable.

1.4.2. Assimilation par les algues

Selon le BLM, seul l'argent libre Ag^+ pourrait traverser la membrane algale. Cette bioaccumulation serait accidentelle, car l'argent n'est pas un élément essentiel. Fortin & Campbell (2000) ont formulé l'hypothèse que l'argent empruntait le transporteur du cuivre(I) pour s'internaliser dans *Chlamydomonas reinhardtii*, ces deux éléments ayant des propriétés chimiques similaires et pouvant donc être confondus par l'algue. Ils ont en effet démontré que l'accumulation de l'argent dans les algues était inhibée en présence d'une concentration sous létale de cuivre, suggérant un effet antagoniste du cuivre sur la bioaccumulation de l'argent (Howe & Merchant, 1992). Néanmoins, comme indiqué dans la partie 1.3., il existe des cas où le BLM semble ne pas s'appliquer.

Fortin & Campbell (2000) ont déterminé qu'en présence de chlorure et à une concentration en argent inférieure à 100 nM, celui-ci se bioaccumulait de manière plus importante chez des cellules de *C. reinhardtii* que dans des milieux avec la même concentration en Ag^+ mais en absence de complexes $AgCl_n^{(1-n)+}$. Le fait que l'internalisation de l'argent se fasse très rapidement, relativement à sa diffusion à partir de la solution externe, a été déterminé comme étant la cause de la défaillance du BLM, ceci entrant en contradiction avec la première hypothèse du modèle.

Afin d'expliquer ces données, il avait également été envisagé que le complexe de charge neutre $AgCl^0$ pouvait s'internaliser dans la cellule par diffusion passive, à l'instar du complexe de mercure $HgCl_2^0$. Cependant, deux observations sont venues réfuter cette hypothèse. Tout d'abord, le coefficient de partage octanol/eau d' $AgCl$ est faible ($\log K_{ow} = 0,09$ pour $AgCl$, $0,03$ pour Ag^+) relativement à celui de $HgCl_2^0$ (3,3), ce qui indique que le chlorure d'argent est significativement moins liposoluble que le dichlorure de mercure. De plus, l'internalisation de l'argent radioactif est fortement réduite en présence d'un excès d'argent non-radioactif, ce qui démontre une compétition entre ces deux formes pour les

sites de transport, théoriquement inexistante dans le cas où AgCl^0 diffuserait à travers la membrane plasmique.

Le transport accidentel du complexe anionique AgCl_2^- via le transporteur peu sélectif du chlorure, du nitrate ou du sulfate aurait également pu expliquer l'augmentation de l'accumulation de l'argent dans les algues. Mais cette hypothèse a également été réfutée, car le flux associé à ce transporteur n'était pas assez élevé pour expliquer l'importante accumulation de l'argent observée.

Afin de tester l'influence de l'espèce algale sur la bioaccumulation de l'argent, des expériences similaires ont été effectuées par Lee et al. (2004) sur deux algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella pyrenoidosa* sans aboutir aux mêmes résultats. L'accumulation de l'argent dans les algues dépendait bien de la concentration en argent libre présente en solution, quelles que soient les conditions, comme le prédisait le BLM. Dans ce cas-là et contrairement au test avec *Chlamydomonas reinhardtii*, la vitesse d'internalisation de l'argent dans ces deux algues était bien l'étape limitante, ce qui satisfait à la première hypothèse du modèle. La vitesse de prise en charge de l'argent dissous dépend donc du type d'algue avec lequel il est en présence.

En présence de thiosulfate, Fortin & Campbell (2001) ont également observé une augmentation de l'internalisation de l'argent dans *C. reinhardtii*. Ils ont démontré que celle-ci était due au transport des complexes argent/thiosulfate via les transporteurs du sulfate et du thiosulfate. Le sulfate agissait en outre comme compétiteur dans ce mécanisme de transport.

La présence de substances humiques peut également influencer la bioaccumulation de l'argent. Chen et al. (2013) ont démontré que les complexes ternaires acides humiques/argent pouvaient s'adsorber à la surface des algues *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata* et entraîner une augmentation de la bioaccumulation apparente. Même si l'argent ne s'internalise pas plus dans les algues ni ne conduit à une augmentation de la toxicité, l'argent adsorbé pourrait néanmoins être transféré aux brouteurs par transfert trophique.

1.4.3. Assimilation par les daphnies

La prise en charge des métaux par les daphnies et notamment la contribution relative de l'eau et de la nourriture varient selon le type de métal étudié. Lam & Wang (2006) ont démontré que l'argent (8-880 ng Ag/L) s'accumulait chez les daphnies principalement à partir de l'eau. Bianchini & Wood (2003) ainsi que Lam & Wang (2006) ont suggéré que l'argent pourrait inhiber le transport du sodium. Cependant, vu les propriétés ioniques très différentes de ces deux ions, il est peu probable qu'il s'agisse d'une inhibition

compétitive. Il est plus probable que l'argent inhibe le transport du sodium de manière non compétitive.

Le transfert trophique via les algues est relativement moins important. Lam & Wang (2006) ont observé que l'efficacité d'assimilation de l'argent par cette voie dépendait significativement de la densité algale : plus la densité était élevée, moins l'argent s'accumulait dans les daphnies (l'efficacité d'assimilation de l'argent passe de 44% pour une densité algale de $5 \cdot 10^3$ cellules/mL à 1% pour 10^5 cellules/mL). À partir de $5 \cdot 10^4$ cellules/mL, plus de 98% de l'argent ingéré était libéré dans les 12 h après le début de la dépuration. Selon Lam & Wang (2006), l'argent aurait une réactivité importante vis-à-vis des particules et se désorberait difficilement une fois celles-ci arrivées dans les intestins ce qui expliquerait les faibles efficacités d'assimilation observées.

La composition du milieu, et notamment la présence de la MOD, peut modifier fortement la bioaccumulation de l'argent chez les daphnies. La MOD, comme les substances humiques par exemple, forme en effet des complexes avec l'argent et réduit la biodisponibilité du métal vis-à-vis des daphnies. De plus, les substances humiques augmenteraient le flux d'internalisation du sodium dans les organismes et ainsi assureraient une protection supplémentaire contre la toxicité de l'argent (Glover & Wood, 2004).

1.5. Les nanoparticules d'argent

1.5.1. Structure

Les nanoparticules d'argent, faisant partie des nanomatériaux, ont une taille comprise entre 1 et 100 nm. Leur structure générale est présentée sur la Figure 1-6 : elles sont composées d'un cœur en argent métallique (Ag^0) entouré d'un revêtement organique ou inorganique. Ce revêtement, adsorbé ou relié au cœur par covalence, servant parfois directement de réducteur dans la synthèse des nanoparticules (ex. : citrate), a pour but de limiter leur agrégation par la création de forces répulsives entre les particules. Les différentes interactions pouvant se produire entre le noyau et le revêtement et leur environnement proche sont illustrées sur la Figure 1-6 (doubles flèches). On remarque ainsi que le revêtement n'est pas continu et que le noyau peut réagir avec son environnement (Levard *et al.*, 2012).

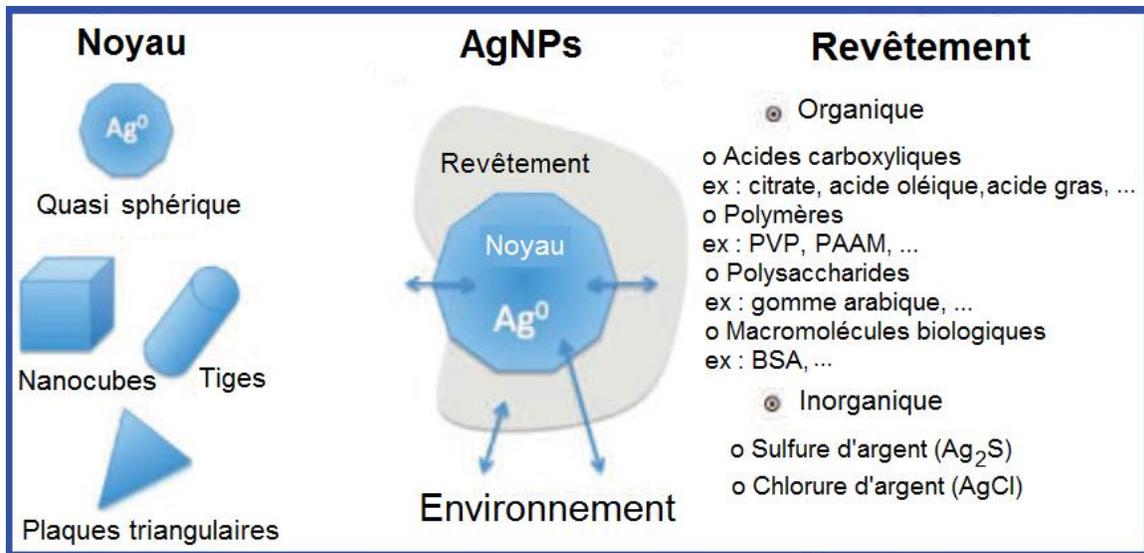


Figure 1-6 : Structure et composition des nanoparticules d'argent (BSA : sérum-albumine bovin, PVP : polyvinylpyrrolidone, PAAM : polyallylamine), adapté de Levard *et al.* (2012).

Les transformations ainsi que les effets potentiels sur l'environnement des nanoparticules d'argent dépendent directement de leurs caractéristiques, présentées sur la Figure 1-7, d'où l'intérêt de bien les définir. Il existe déjà, pour cela, différentes techniques, microscopique (microscopie électronique, microscopie à force atomique), de séparation (centrifugation, ultrafiltration, ...), spectroscopique (SP-ICP-MS, spectroscopie d'absorption atomique (AAS), analyse dispersive en énergie (EDX), ...) et autres (diffusion dynamique de la lumière (DLS), électrophorèse capillaire, ...) capables de mesurer certains de ces paramètres. Néanmoins, la plupart des études menées jusqu'à maintenant ont utilisé des solutions commerciales d'AgNPs, dont les propriétés physico-chimiques étaient peu connues, car il reste encore de nombreux obstacles à l'analyse des suspensions de nanoargent (méthodes inexistantes ou insuffisamment développées, pas d'accès aux appareils adaptés, ...). Cette complexité dans l'analyse est en outre renforcée quand la matrice des échantillons se complique (Fabrega *et al.*, 2011).

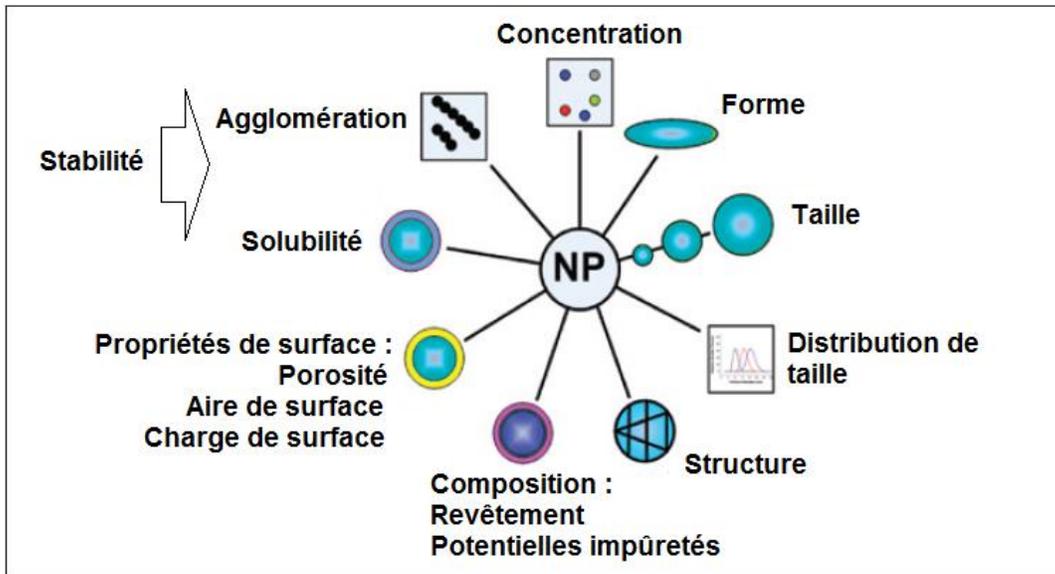


Figure 1-7 : Paramètres caractéristiques des nanoparticules, adapté de Fabrega *et al.* (2011).

1.5.2. Applications principales

L'argent colloïdal a commencé à être utilisé au début du XXème siècle, notamment avec la commercialisation du Collargol, une suspension colloïdale de particules d'argent, utilisée en médecine comme agent antiseptique (Nowack *et al.*, 2011). Les nanoparticules d'argent sont toujours utilisées dans ce domaine, pour réduire les infections lors de la pose de cathéters ou de drains par exemple (Furno *et al.*, 2004).

En 2017, le centre Woodrow Wilson a recensé sur le marché quelque 442 produits contenant des nanoparticules d'argent (non exhaustif) (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2017). Depuis 2005, le nombre ne cesse d'augmenter. La majorité de ces produits exploite les propriétés antibactériennes des nanoparticules. Contenants alimentaires, poignée de porte, lisseur à cheveux, chaussettes anti-odeurs, serviettes de toilette, aspirateur, lessive, souris d'ordinateur, sèche-cheveux, vêtement, purificateur d'air et peluche, sont autant d'exemples de produits contenant des nanoparticules d'argent, dont les compagnies vantent les propriétés antiseptiques.

À titre d'exemple, une image d'une fibre de coton traitée avec des nanoparticules d'argent est présentée sur la Figure 1-8.

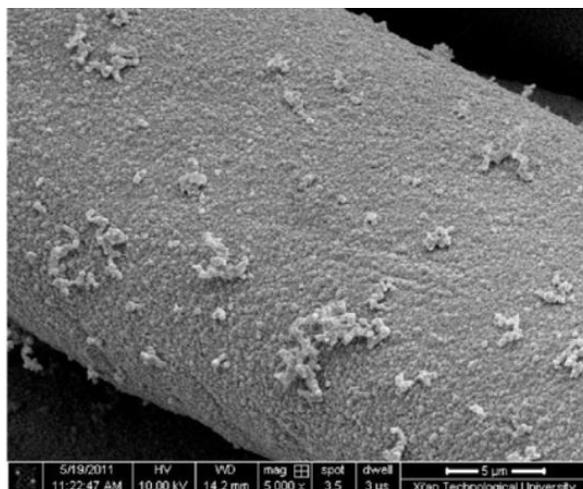


Figure 1-8 : Observation au microscope électronique à balayage de fibres de coton traitées avec des nanoparticules d'argent (Xue et al., 2012).

Les autres propriétés des nanoparticules d'argent sont également exploitées : insérées dans l'encre de circuits imprimés, elles conduisent l'électricité; utilisées comme substrat actif en spectroscopie Raman, elles permettent d'augmenter le signal de manière assez importante pour permettre de détecter des objets de la dimension d'une molécule (Ravindran et al., 2013). Elles sont aussi utilisées comme chromophores dans la synthèse de pigments jaunes pour céramiques (Mestre et al., 2012).

1.5.3. Rejets dans l'environnement

Les nanoparticules d'argent et l'argent dissous peuvent être rejetés dans l'environnement à toutes les étapes du cycle de vie d'un produit de consommation : lors de la synthèse des AgNPs et lors de la production du produit (rejets industriels), lors de son utilisation, de sa dégradation et de son élimination (McGillicuddy *et al.*, 2017).

Cette libération de l'argent a principalement été étudiée dans le cas des nanotextiles (Benn & Westerhoff (2008), Geranio *et al.* (2009), Limpiteeprakan *et al.* (2016), Lombi *et al.* (2014), Lorenz *et al.* (2012), Mitrano *et al.* (2014), Yetisen *et al.* (2016)). Geranio *et al.* (2009) ont, par exemple, mesuré la quantité d'argent libérée lors du lavage de neuf textiles différents, dans lesquels l'argent avait été incorporé sous forme nanoparticulaire ou dissoute, soit dans ou sur les fibres (cf. Figure 1-8). Ils ont déterminé que la quantité d'argent libérée variait énormément selon les produits (<1 à 45%) et qu'elle dépendait du type d'incorporation de l'argent dans le textile. De plus, la dissolution des nanoparticules d'argent, 10 fois moins importante à pH 10 qu'à pH 7, augmentait fortement en présence d'agents blanchissants tels que le peroxyde d'hydrogène ou l'acide peracétique. L'argent libéré lors du lavage

était en outre majoritairement de taille supérieure à 450 nm, alors que lors de la simple immersion des textiles dans l'eau, l'argent libre était principalement relargué, indiquant le rôle prédominant de la contrainte mécanique sur la libération de l'argent.

Une étude a été effectuée sur des peintures extérieures contenant des nanoparticules d'argent. Kaegi *et al.* (2010) ont démontré que 30% des nanoparticules initialement présentes sur la peinture des murs étaient relarguées par lessivage après un an. Celles-ci avaient un diamètre inférieur à 15 nm, une concentration maximale retrouvée dans l'eau de ruissellement de 145 µg Ag/L et étaient rattachées à des liants organiques de la peinture.

Farkas *et al.* (2011) ont étudié les effluents provenant de machines à laver utilisant des nanoparticules d'argent comme agent antimicrobien. Ils ont démontré que des nanoparticules d'un diamètre moyen de 10 nm (microscope électronique à transmission (TEM)) à 60-130 nm (analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA)) et d'une concentration moyenne de 11 µg Ag/L se retrouvaient dans l'eau de lavage, leur présence ayant été confirmée par l'utilisation d'un *Single Particle*-ICP-MS (80 millions de nanoparticules par mL), d'une électrode sélective (ISE) et de techniques de filtration.

Mackevica *et al.* (2017) ont déterminé qu'une brosse à dent contenant des nanoparticules d'argent pouvait rejeter jusqu'à 10,2 ng Ag, les particules rejetées ayant un diamètre moyen de 42 à 47 nm. Mittelman *et al.* (2015) ont étudié la libération de nanoparticules à partir de filtres à eau en céramique, utilisés dans le traitement des eaux ménagères. Ils ont démontré que la composition de l'eau avait une influence, notamment qu'à pH acide ou à force ionique élevée, la libération des nanoparticules était plus importante.

Les nanoparticules ainsi rejetées sont entraînées en même temps que les effluents vers les usines de traitements des eaux usées. Tiede *et al.* (2010) ont démontré qu'après 6 h, 90% des nanoparticules d'argent se sont associées aux boues d'épuration, probablement sous la forme du précipité Ag₂S (Kaegi *et al.*, 2011). Suite à l'épandage de ces boues sur les terres agricoles, une partie de l'argent va potentiellement se retrouver dans les eaux de surface après lessivage du sol par les eaux de pluie par exemple. Il se rajoutera alors à l'argent non retenu lors du traitement des effluents (Farkas *et al.*, 2011).

1.5.4. Transformations dans l'eau douce

La biodisponibilité des nanoparticules d'argent va dépendre en grande partie des transformations qu'elles auront subies. Rejetées dans l'eau douce, celles-ci peuvent rester en suspension en tant que particules individuelles, s'agréger (et sédimenter), se dissoudre ou réagir avec du matériel naturel

(Luoma, 2008). Cette (in)stabilité va dépendre de plusieurs facteurs tels que la structure (revêtement, taille, charge de surface), la concentration des nanoparticules et les caractéristiques physicochimiques du milieu récepteur (pH, force ionique, composition) (El Badawy et al., 2010).

Suspension et agrégation

L'agrégation des nanoparticules est favorisée par leur mouvement brownien et est contrôlée par des forces électrostatiques répulsives et attractives (Van der Waals) (Dwivedi *et al.*, 2015). Deux types d'agrégation peuvent avoir lieu dans le milieu naturel : l'homoagrégation, entre plusieurs nanoparticules de même nature et l'hétéroagrégation, entre des particules de nature différente (ex. : agrégation des AgNPs et des minéraux argileux). Étant donné les concentrations importantes de particules naturelles dans l'environnement, l'hétéroagrégation va y être prédominante (Lowry *et al.*, 2012b).

Un grand nombre de revêtements ont été testés afin d'améliorer la stabilité des nanoparticules. En effet, tel qu'explicité dans la partie 1.5.1., ces agents d'enrobage permettent de limiter l'agrégation des particules, par la création de forces répulsives (électrostatiques ou stériques) car celle-ci a pour effet de réduire leur pouvoir antibactérien. Ces forces répulsives peuvent être affectées par les paramètres du milieu (pH, force ionique).

La composition du revêtement peut en outre évoluer quand les nanoparticules se retrouvent en solution dans le milieu. C'est également le cas pour les particules nues : un revêtement inorganique naturel composé de groupements hydroxo,- oxo- ou sulfure- (dépendamment du milieu) peut se créer autour d'elles et assurer une stabilité électrostatique contre l'agrégation en raison des charges négatives en surface (Levard *et al.*, 2012). Ces charges peuvent être neutralisées et donc les forces répulsives entre nanoparticules réduites si le milieu contient, en quantité suffisante, des cations, tels que les ions calcium Ca^{2+} ou sodium Na^+ . Li *et al.* (2010) ont démontré qu'à partir d'une concentration de 10 mM en cations monovalents et 1 mM en cations bivalents, les nanoparticules d'argent sans revêtement organique commençaient à s'agglomérer. On peut noter l'influence plus importante des ions bivalents, cohérente avec le fait que leur rapport charge sur nombre de moles soit plus élevé. Un comportement similaire a été observé pour les nanoparticules d'argent stabilisées électrostatiquement par des revêtements tels que citrate, carbonate ou borohydrure (BH_4^-). Piccapietra et al. (2012b) ont rappelé que l'agglomération de différentes nanoparticules d'argent électrostatiquement stabilisées commençait à être observée quand les ions sodium atteignaient une concentration allant de 10 à 100 mM ou une concentration de 2 à 10 mM pour les ions calcium. Les nanoparticules d'argent stériquement stabilisées par des revêtements tels que PVP ou Tween (appelé aussi ester de sorbitan : agent tensioactif non ionique)

apparaissent comme étant beaucoup plus stables, ne s'agrégeant pas sous l'effet d'une telle augmentation de force ionique. Ceci est cohérent avec le fait que ces revêtements ne sont pas chargés et ne peuvent donc pas être influencés par les contre-ions présents en solution (Levard *et al.* (2012), Huang *et al.* (2014), Jang *et al.* (2014)). Néanmoins, Topuz *et al.* (2014) ont obtenu des résultats différents en étudiant l'influence de cations mono- (Na^+ , K^+) ou bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) à force ionique constante sur l'agglomération d'AgNPs recouverts de PVP, exceptés pour Mg^{2+} . La taille des nanoparticules était en effet significativement plus élevée en présence d'ions magnésium que dans les autres cas. Topuz *et al.* (2014) ont fait l'hypothèse que Mg^{2+} formait des complexes avec le revêtement en PVP. La présence d'ions chlorure à des concentrations relativement faibles peut en outre entraîner la formation de ponts de AgCl(s) entre les nanoparticules et ainsi favoriser leur agrégation (Levard *et al.*, 2012).

Le pH de l'eau douce peut également avoir un impact sur l'agrégation des nanoparticules. El Badawy *et al.* (2010) ont démontré que l'agrégation de nanoparticules d'argent non enrobées ou électrostatiquement stabilisées, telles que citrate-AgNPs et NaBH_4 -AgNPs, augmentait avec la diminution du pH. Piccapietra *et al.* (2012b) ont observé le même comportement pour les nanoparticules d'argent stabilisées avec le carbonate. Ceci s'explique par le fait qu'en modifiant le pH de la solution, on modifie la spéciation du revêtement. Pour le carbonate par exemple (pK_a 6,35 et 10,33), à pH basique et neutre, il y a équilibre entre les formes CO_3^{2-} et HCO_3^- et les nanoparticules sont stables. À $\text{pH} < 5$, la forme H_2CO_3 domine et peut être libérée de la surface des nanoparticules sous forme de CO_2 ; il s'ensuit une déstabilisation des nanoparticules et une augmentation de l'agrégation. L'effet du pH n'est, en revanche, pas observé dans le cas des nanoparticules d'argent stériquement stabilisées, comme dans le cas de PVP-AgNPs, la polyvinylpyrrolidone étant un polymère non chargé ne se (dé)protonant pas sous l'effet du pH (El Badawy *et al.*, 2010).

La présence d'acides humiques et fulviques peut, selon les cas, mener à une agrégation plus importante des nanoparticules d'argent. Piccapietra *et al.* (2011) ont conclu que l'effet des substances humiques et fulviques (*Suwannee River Humic (SRHA) and Fulvic (SRFA) Acid*) à une concentration de 5 à 20 mg/L sur l'agglomération de nanoparticules d'argent enrobées de citrate était négligeable. En revanche, Cumberland & Lead (2009) ont démontré que la présence de 10 mg/L de substances humiques (SRHA) stabilisait les nanoparticules d'argent enrobées de citrate, dans une solution contenant des ions sodium et calcium (concentrations entre 10^{-2} et 10^{-3} M) et réduisait donc l'agrégation.

Dissolution et réaction avec du matériel naturel

Dans l'eau douce, l'argent métallique qui compose le cœur des nanoparticules est instable thermodynamiquement et il aura tendance à s'oxyder en Ag^+ . La quantité d'argent dissous formé va dépendre de la taille des nanoparticules : à mesure que la taille des nanoparticules diminue, leur rapport surface/volume augmente, entraînant un accroissement de leur réactivité. Les petites particules vont donc libérer plus rapidement des ions Ag^+ que les grosses. En outre, le revêtement entourant les nanoparticules pourrait jouer un rôle : Dobias & Bernier-Latmani (2013) ont en effet démontré que les nanoparticules enrobées de citrate se dissolvaient moins que celles enrobées de PVP ou de Tan (acide tannique). Le citrate pourrait agir comme agent réducteur à la surface des nanoparticules et limiter la dissolution de l'argent.

En milieu aérobie, Ag^0 sera oxydé par l'oxygène et formera une couche d'oxyde d'argent Ag_2O , susceptible de libérer des ions Ag^+ , surtout en milieu acide. Par ailleurs, cette oxydation de Ag^0 est elle-même accélérée en milieu acide (Équation 1-1 ; Mittelman *et al.* (2015)) :



En revanche, l'oxydation de Ag^0 est réduite par l'addition de matière organique. Plusieurs hypothèses ont été formulées par Liu *et al.* (2010a) pour expliquer ce phénomène : la matière organique pourrait s'adsorber à la surface des nanoparticules, empêchant ainsi l'oxydation ; les acides humiques ou fulviques pourraient servir de réducteur et permettre de reformer Ag^0 à partir des ions Ag^+ ; la matière organique pourrait être préférentiellement oxydée par H_2O_2 , ce qui réduirait l'oxydation de Ag^0 par H_2O_2 ; la matière organique pourrait catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 , l'empêchant d'oxyder ultérieurement Ag^0 . L'oxydation de Ag^0 est également réduite par la diminution de la température, ce paramètre agissant généralement comme catalyseur chimique (Liu *et al.*, 2010a). La spéciation de l'argent dissous en solution va alors être fortement influencée par la présence de ligands inorganiques (ex. : chlorure, thiosulfate), de polysulfures et de ligands organiques contenant des groupements thiols (ex. : cystéine) (Herrin *et al.* (2001a), Herrin *et al.* (2001b)). La concentration en ions chlorures a une influence sur la dissolution des AgNPs. En effet, à des concentrations faibles en Cl^- , le précipité AgCl(s) se forme à la surface des nanoparticules et inhibe leur dissolution. Si les concentrations en chlorure sont plus élevées, les complexes $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ vont se former et entraîner une augmentation de la dissolution (Levard *et al.*, 2012).

En milieu anaérobie, dans l'eau interstitielle de sédiments riches en carbone, dans l'eau souterraine ou en station d'épuration, où les concentrations en sulfures sont élevées, les $\text{Ag}_2\text{S(s)}$ va précipiter. L'argent étant un métal mou, il possède des affinités importantes pour les ligands inorganiques ou organiques

sulfurés (cf. 1.4.1). Un précipité insoluble de sulfure d'argent $\text{Ag}_2\text{S}(s)$ va donc se former autour des nanoparticules par sulfuration, inhiber leur dissolution et potentiellement entraîner leur agrégation. Dans les eaux naturelles, où les concentrations en sulfures sont plus faibles, une dissolution oxydative des AgNPs va précéder la précipitation de $\text{Ag}_2\text{S}(s)$ (Levard *et al.*, 2012).

Les nanoparticules d'argent sont des matériaux photosensibles, c'est-à-dire que l'irradiation lumineuse induit des changements dans les processus physicochimiques subis par les AgNPs. Il a été démontré que l'exposition à la lumière (UV et lumière solaire) favorise l'oxydation, la dissolution et l'agrégation des AgNPs (Li & Lenhart (2012), Cheng *et al.* (2011), Shi *et al.* (2012). Li *et al.* (2013) ont étudié l'influence des conditions d'irradiation (UV-365 et 254, lampe à xénon) sur la dissolution et l'agrégation de nanoparticules d'argent (nues, PVP et citrate) ainsi que sur la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS). Ils ont démontré qu'en absence de lumière, les nanoparticules étaient peu oxydées. La dissolution des nanoparticules était plus importante quand celles-ci étaient exposées à de la lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm. L'agrégation, se produisant en même temps que la dissolution, était également plus importante dans le cas des nanoparticules exposées à de la lumière UV (365 nm). Notons en outre que le revêtement en PVP peut se désintégrer sous l'effet de l'irradiation et augmenter ainsi l'agrégation. Exposées au même type d'irradiation, les nanoparticules d'argent nues ont produit des radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\bullet-}$ et hydroxyles $\bullet\text{OH}$, les AgNPs-citrate seulement des radicaux superoxydes, en quantité plus importante que pour les nues, et les AgNPs-PVP n'ont produit aucun ROS. Li *et al.* (2013) ont fait l'hypothèse que les AgNPs-nues engendraient moins de radicaux libres, car celles-ci libéraient plus d'ions Ag^+ , consommant plus de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Jones *et al.* (2011) ont en effet démontré que la réduction de l'argent dissous par les radicaux superoxydes pouvait permettre la formation de nanoparticules d'argent. De plus, la vitesse d'agrégation, plus importante dans le cas des nanoparticules nues, tel que démontré ci-dessus, aurait permis de diminuer la surface spécifique des AgNPs et ainsi de réduire la vitesse de génération des radicaux libres. Le revêtement PVP, plus dense, aurait assuré la protection des sites donneurs et accepteurs d'électrons, situés sur la surface des nanoparticules, et aurait ainsi permis d'éviter la formation de ROS (Li *et al.*, 2013). Notons que Sigg & Lindauer (2015) ont démontré que le peroxyde d'hydrogène, une autre espèce oxygénée réactive très oxydante, produite et libérée par les algues, augmentait de façon significative la dissolution des AgNPs.

1.5.5. Assimilation par les algues

Les algues possèdent une paroi cellulaire qui constitue un premier rempart contre les contaminants. Cette paroi cellulaire est constituée de glycoprotéines et de polysaccharides (et de dioxyde de silicium

hydraté dans le cas particulier des diatomées) et est semi-perméable. Elle permet donc le passage des nanoparticules possédant une taille inférieure à celle des plus larges pores de la paroi (diamètre des pores : 5-20 nm; Piccapietra *et al.* (2012a)). En outre, sa perméabilité est susceptible de changer pendant le stade de reproduction, tel que Ovecka *et al.* (2005) et Wessels (1993) l'ont observé chez, respectivement, des plantes (poils racinaires) et des champignons, et à la suite des interactions avec les nanoparticules d'argent et ainsi de faciliter le passage de ces dernières (Navarro *et al.*, 2008a).

Le deuxième rempart que rencontrent les nanoparticules d'argent est la membrane plasmique dont la composition et la structure sont décrites sur la Figure 1-9 (Fabrega *et al.*, 2011).

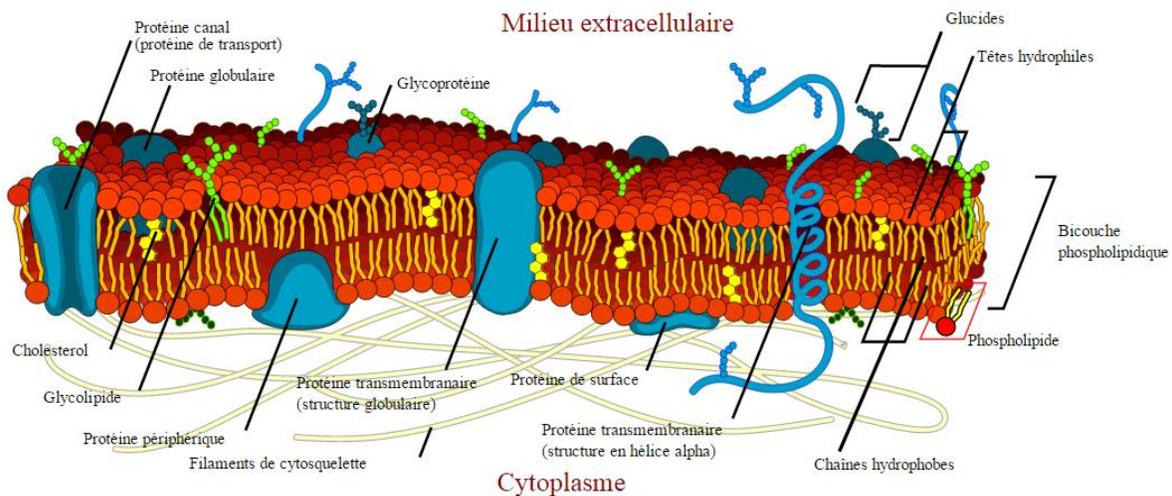


Figure 1-9 : Composition et structure de la membrane plasmique chez les cellules eucaryotes (Ruiz & Grandjean, 2007)

Celle-ci est organisée de manière à limiter le passage de certaines substances tout en permettant à d'autres, les éléments essentiels à l'organisme par exemple, d'atteindre l'intérieur de la cellule en traversant des pores ou en empruntant des transporteurs membranaires.

Différentes voies d'entrée des nanoparticules d'argent et de l'argent dissous qu'elles libèrent ont été envisagées :

- L'endocytose : les voies potentielles d'entrée des nanoparticules dans la cellule via ce mécanisme sont présentées à la Figure 1-10. Les nanoparticules d'argent pourraient être transportées soit par endocytose classique et se retrouver dans des endosomes et des lysosomes soit via des cavéoles. Ces vésicules sont formées par invagination de la membrane plasmique. Elles permettraient d'internaliser les nanoparticules et de les amener vers l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique ou de les renvoyer vers le milieu extracellulaire sans les transformer

(Moore, 2006). En outre, Treuel *et al.* (2013) et Kettler *et al.* (2014) ont démontré qu'en présence de protéines dans le milieu, une couronne (« protein corona ») se forme autour des nanoparticules. Celles-ci peuvent alors être reconnues par les récepteurs spécifiques de la cellule, permettant ainsi de déclencher l'endocytose.

- La diffusion passive des nanoparticules d'argent à travers la membrane plasmique : cette hypothèse, suggérée par exemple par von Moos *et al.* (2014), n'a encore jamais été vérifiée. C'est l'un des principaux objectifs de ce doctorat.
- L'internalisation de l'argent inorganique libéré par les nanoparticules adsorbée à la surface des cellules : dans ce cas-là, la contamination viendrait bien des ions Ag^+ mais les nanoparticules adsorbées créeraient des circonstances favorisant leur bioaccumulation en agissant comme vecteur livrant les ions Ag^+ à la surface biologique (Fabrega *et al.*, 2011).
- La prise en charge de l'argent dissous par les algues, en accord avec le BLM.

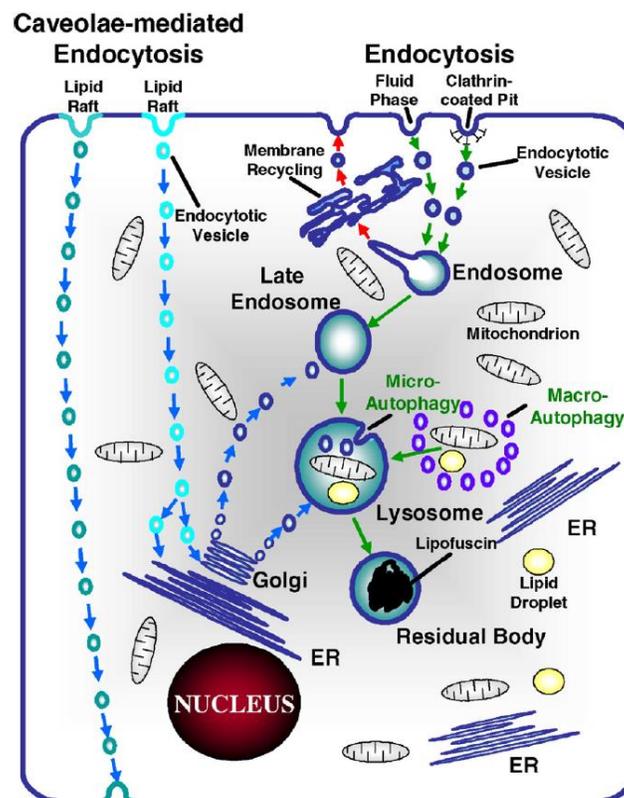


Figure 1-10: Voies endocytiques potentielles qui pourraient être empruntées par les nanoparticules d'argent (Moore, 2006).

Plusieurs études, visant à trouver des preuves de ces mécanismes, sont présentées.

Piccapietra *et al.* (2012a) ont étudié la bioaccumulation de l'argent chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (10^6 cellules/mL) en l'exposant pendant 1 h à des AgNPs-carbonates (0,5-10 μ M, 29 nm) et à AgNO₃. La conclusion était que, dans ces conditions, la biodisponibilité des nanoparticules d'argent était faible et donc que leur internalisation était négligeable. Ils ont, de plus, confirmé que l'argent inorganique était facilement pris en charge et que son internalisation était très rapide. Enfin, en appliquant l'étude à deux types de cellules de la même algue (une « sauvage » et une « mutante » sans paroi cellulaire), ils ont conclu que cette dernière servait de protection aux algues et permettait de minimiser l'accumulation de l'argent. La même équipe a étudié l'interaction entre des nanoparticules d'argent entouré de citrate (0-10 μ M) et une autre algue d'eau douce, *Euglena gracilis* ($1 \cdot 10^5$ cellules/mL), et n'ont observé aucune internalisation des AgNPs. Celles-ci s'adsorbaient seulement à la surface des algues, confirmant le rôle de la paroi cellulaire des algues comme barrière potentielle contre l'entrée des nanoparticules (Yue *et al.*, 2017).

Leclerc & Wilkinson (2014) ont fait l'hypothèse que les nanoparticules d'argent (5 nm, enrobées de polyacrylate, 0-0,9 μ M) ne s'internalisaient pas dans *Chlamydomonas reinhardtii* ($1,1$ à $5,6 \cdot 10^5$ cellules/mL). En observant les algues sous microscope optique équipé d'un système d'éclairage en champ sombre, ils ont déterminé que les nanoparticules retrouvées à l'intérieur des cellules provenaient très probablement de la réduction des ions d'argent accumulés plutôt que de l'internalisation des nanoparticules elles-mêmes. Leclerc & Wilkinson (2014) ont estimé que les nanoparticules d'argent contribuaient spécifiquement à l'augmentation de l'internalisation des ions d'argent dans les cellules en élevant localement les concentrations de l'argent dissous près de la surface des algues.

Miao *et al.* (2010) ont observé une accumulation intracellulaire des nanoparticules d'argent chez *Ochromonas danica*. Cette algue d'eau douce est connue pour sa capacité à se nourrir par phagocytose. Les algues ($9,1 \cdot 10^4$ à $1,4 \cdot 10^5$ cellules/mL) mises en présence de AgNPs avec un enrobage comprenant des fonctions carboxyliques (principalement 1-35 nm, 28 à 280 μ M) ont été observées sous microscope électronique (à transmission : TEM et à balayage par transmission : STEM). Des nanoparticules d'argent ont été découvertes à l'intérieur des algues, dans les vacuoles (V) (cf. Figure 1-11). Aucun dommage physique aux cellules n'a été observé chez les algues choisies pour l'observation sous microscope. L'hypothèse selon laquelle les nanoparticules d'argent seraient entrées à l'intérieur des algues grâce à une plus grande perméabilité de la membrane plasmique ou à une cassure dans celle-ci n'est donc pas à retenir.

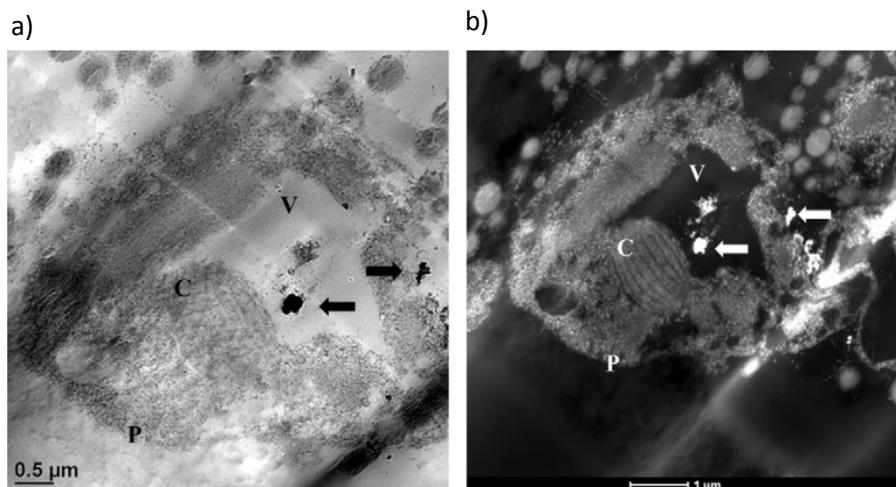


Figure 1-11: Images de l'algue *Ochromonas danica* en présence de nanoparticules d'argent (93 μM) sous TEM (a) et STEM en champ noir à contraste en nombre atomique z (b). V : vacuole ; C : chloroplaste ; P : membrane plasmique ; les flèches indiquent l'emplacement des AgNPs (Miao et al., 2010).

Wang *et al.* (2016b) et Kalman *et al.* (2015) ont étudié la bioaccumulation de nanoparticules d'argent dans, respectivement, *Chlamydomonas reinhardtii* (6 à $8 \cdot 10^5$ cellules/mL) et *Chlorella vulgaris* (10^4 cellules/mL), deux algues vertes ne se nourrissant pas par phagocytose. Ils ont conclu qu'à concentration élevée en AgNPs (18 μM), celles-ci pouvaient s'internaliser dans les cellules algales. Kalman *et al.* (2015) ont fait l'hypothèse que les concentrations importantes en AgNPs augmentaient la perméabilité des membranes algales et favorisaient l'internalisation des nanoparticules d'argent. Selon ces auteurs, les AgNPs de diamètre inférieur aux pores de la paroi cellulaire (< 20 nm environ) pourraient passer à travers ces derniers et induire la formation de pores de taille plus élevée, permettant aux nanoparticules plus grosses de passer à leur tour. En outre, ils n'ont observé aucune internalisation après 72 h d'exposition des algues aux AgNPs (64-92 nM) alors qu'à 18 μM , l'internalisation pouvait être observée après seulement 2 h d'exposition.

Notons alors que le temps d'exposition est un paramètre important à prendre en compte dans l'étude de la bioaccumulation des nanoparticules d'argent. Afin d'exclure la possibilité d'une réduction intracellulaire de l'Ag dissous, tel que proposé par Leclerc & Wilkinson (2014), Wang *et al.* (2016b) ont analysé la structure cristalline des particules retrouvées dans l'espace périplasmique des cellules exposées aux AgNPs par diffraction des électrons sur microscope électronique à transmission. Ils ont déterminé que celle-ci était différente de celle des particules retrouvées dans les cellules exposées à l'argent dissous seul, pouvant suggérer une internalisation des nanoparticules d'argent à travers la membrane cellulaire. Néanmoins, après analyse des images obtenues par TEM, les nanoparticules

d'argent supposément internalisées sembleraient plutôt se trouver dans la paroi cellulaire donc non assimilés par celles-ci. Des particules d'Ag ont également été détectées dans le cytoplasme des algues mais il n'y avait pas de différence essentielle entre les algues exposées aux AgNPs et celles exposées à Ag^+ . Il est donc très probable que les particules d' Ag_2S dans le cytoplasme soient formées à partir de l'ion Ag^+ libéré par les AgNPs.

Il est cependant important de noter que les concentrations en AgNPs utilisées dans ces expériences d'accumulation sont très supérieures aux concentrations environnementales actuelles estimées par Gottschalk *et al.* (2009) (de l'ordre du nM).

1.5.6. Effets observés sur les algues

La toxicité des nanoparticules d'argent sur les algues a été largement étudiée mais il n'est pas encore clair si celle-ci provient des nanoparticules en elles-mêmes et/ou des ions argent qui s'en libèrent. Le principal effet toxique passe par l'augmentation de la concentration en radicaux libres (ROS) via des réactions de type Fenton ($\text{Ag}^+(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Ag}^{2+}(\text{aq}) + \text{OH}^-(\text{aq}) + \bullet\text{OH}$) ou via l'inhibition de certaines enzymes antioxydantes (ex. : catalase, superoxyde dismutase, glutathion reductase). Les ions argent se lient en effet aux fonctions thiols de ces enzymes, à la place d'éléments essentiels tels que le cuivre, rendant l'enzyme non fonctionnelle. L'accumulation de ces ROS créent alors un stress oxydant chez la cellule pouvant conduire à sa mort par peroxydation lipidique (Fu *et al.*, 2014). Les ions argent peuvent également se lier à d'autres enzymes, inhibant leur activité : l'oxydoréductase Photosystem II, catalysant les réactions d'oxydoréduction intervenant dans la photosynthèse ; la β -Glucosidase, hydrolysant les glucides afin de fournir une source de carbone organique aux cellules ; la leucyl-aminopeptidase, fournissant une source d'azote aux cellules en sectionnant les peptides (Gil-Allue *et al.*, 2015), l'acétylcholinestérase, catalysant les réactions convertissant l'acétylcholine en choline et acétate permettant aux neurones de revenir à leur état de repos (Ulm *et al.*, 2015) ou encore la pompe à sodium Na^+/K^+ ATPase, permettant l'ionorégulation des cellules (Fabrega *et al.*, 2011). Il a également été démontré par Georgantzopoulou *et al.* (2016) que les nanoparticules d'argent et l'argent dissous inhibaient des transporteurs (glycoprotéine P et protéine 1 associée à la résistance multi-drogues) responsables de la protection des cellules et des organismes via l'efflux de molécules toxiques. En outre, Taylor *et al.* (2016) a rappelé qu'à l'instar des bactéries, les algues pouvaient sécréter des substances polymériques extracellulaires (EPS) en réponse à un stress toxique. Ils ont démontré que leur composition pouvait être modifiée en présence d'argent dissous ou nanoparticulaire (substances à faible poids moléculaire favorisées).

Voici quelques exemples des effets des nanoparticules d'argent sur les algues qui ont été recensés jusqu'à aujourd'hui.

- **Réduction de la croissance cellulaire** (Griffitt *et al.* (2008), Miao *et al.* (2010), Kennedy *et al.* (2010), Burchardt *et al.* (2012), Angel *et al.* (2013), Tuominen *et al.* (2013), Ribeiro *et al.* (2014), Yoo-iam *et al.* (2014), Sorensen & Baun (2014), Das *et al.* (2014), Schiavo *et al.* (2017));
- **Inhibition de la photosynthèse** (Navarro *et al.* (2008b), Navarro *et al.* (2012), Navarro *et al.* (2015), Gil-Allue *et al.* (2015), Yue *et al.* (2017));
- **Mort de l'organisme** (McLaughlin & Bonzongo (2012), Pletikapic *et al.* (2012), Oukarroum *et al.* (2012), Hazani *et al.* (2013); Stevenson *et al.* (2013));
- **Réduction de la production de chlorophylle** (Miao *et al.* (2009), Navarro *et al.* (2015));
- **Augmentation du stress oxydant** (Oukarroum *et al.* (2012), He *et al.* (2012), Hazani *et al.* (2013));
- **Inhibition de l'activité enzymatique** (Gil-Allue *et al.*, 2015);
- **Inhibition de la respiration** (Gil-Allue *et al.*, 2015).

Un tableau récapitulant les différents effets observés, les conditions d'expositions ainsi que les caractéristiques des nanoparticules utilisées dans ces expériences est présenté dans l'Annexe 2 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les algues.

Navarro *et al.* (2008b) ont étudié les effets des nanoparticules d'argent sur le rendement photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Sur la Figure 1-12, on observe que la diminution de ce rendement dépend de la forme d'argent utilisée (AgNO_3 ou AgNPs) et du temps d'exposition. En traçant le rendement photosynthétique (% par rapport au témoin) en fonction de la concentration en Ag^+ (mesurée à l'aide d'une électrode spécifique), ce sont les nanoparticules qui apparaissent comme étant les plus toxiques (CE_{50}^4 après 1 h : 33 nM pour AgNPs, 188 nM pour Ag^+). Cela suggère une contribution des AgNPs à la toxicité de l'argent.

⁴ CE_{50} (concentration efficace moyenne) d'une courbe dose-effet: concentration d'un composé où 50% de l'effet maximal est observé.

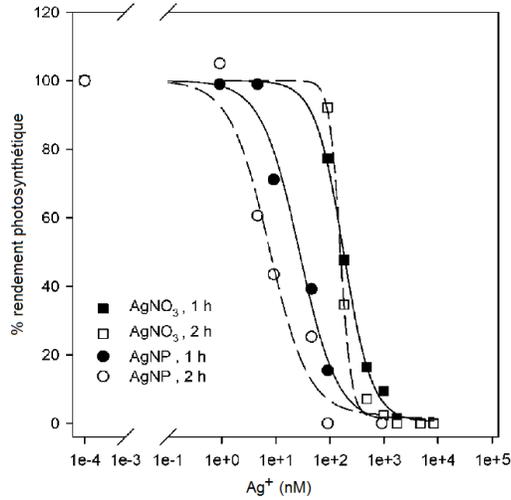


Figure 1-12: Rendement photosynthétique : courbe dose réponse pour *Chlamydomonas reinhardtii* (AgNPs) (adapté de Navarro *et al.* (2008b))

Afin de supprimer la contribution des ions Ag^+ de la toxicité globale des nanoparticules, Navarro *et al.* (2008b) ont introduit de la cystéine et ont étudié l'effet sur le rendement photosynthétique. Les résultats sont présentés à la Figure 1-13a. On peut observer que quand la concentration en cystéine augmente, les ions d'argent se complexent, leur concentration et donc l'effet sur le rendement photosynthétique diminuent. Néanmoins, il faut atteindre une concentration de 500 nM de cystéine pour voir disparaître totalement l'effet de 5 μM de nanoparticules sur le rendement photosynthétique. Cette observation suggère, en comparant ces résultats à ceux de la Figure 1-13b (pour AgNO_3), que les nanoparticules s'associent aux algues et qu'elles libèrent dans la 'phycosphère' (microenvironnement autour de l'algue) des ions Ag^+ tout près de la surface algale, ce qui entraîne une plus forte toxicité que dans le milieu avec Ag^+ mais sans nanoparticules (« effet cheval de Troie⁵ »). L'effet propre des nanoparticules viendrait donc de cette interaction avec les algues et leur dissolution subséquente. En outre, il est possible que les conditions physicochimiques à la surface algale favorisent la dissolution des AgNPs.

⁵ Mécanisme type « cheval de Troie » : Mécanisme au cours duquel les nanoparticules, en entrant dans la phycosphère, libèrent de l'argent dissous en grande quantité dans ce microenvironnement, favorisant ainsi l'exposition des algues à l'argent ionique.

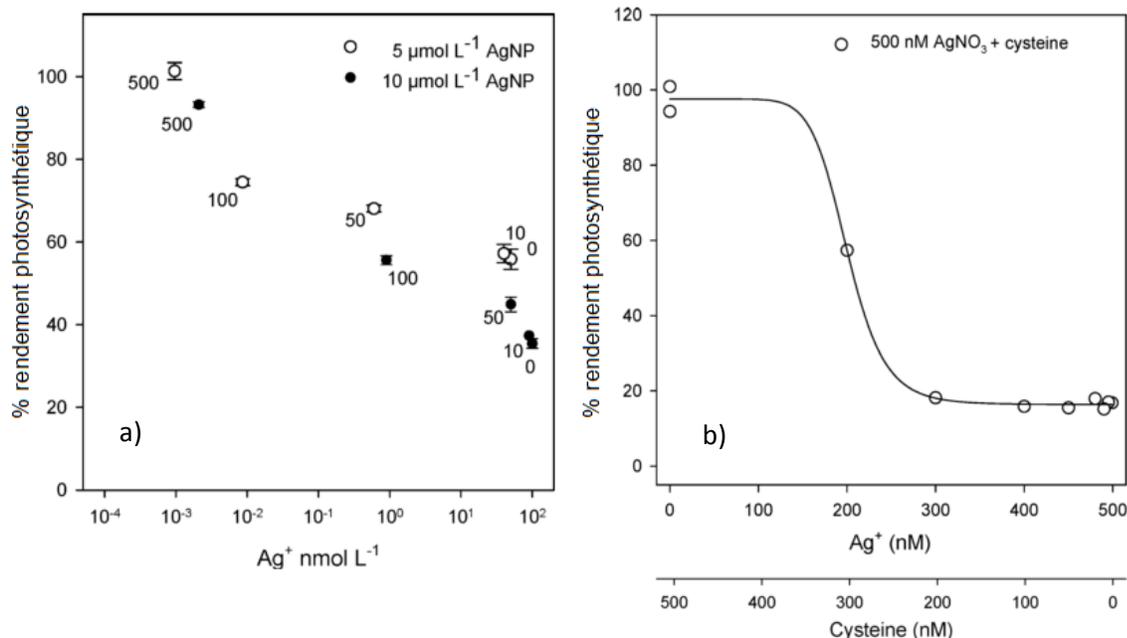


Figure 1-13 : Rendement photosynthétique : courbe dose-réponse de *Chlamydomonas reinhardtii* exposée a) aux AgNPs ; Concentrations de cystéine (nM) à côté de chaque point (adaptée de Navarro *et al.* (2008b)) et b) à $AgNO_3$ (adaptée de Navarro *et al.* (2008b)).

1.5.7. Assimilation par les daphnies

Peu de données existent sur la prise en charge des nanoparticules d'argent par les daphnies. Les contributions relatives des nanoparticules d'argent et de l'argent dissous ainsi que celles de l'eau et de la nourriture restent encore mal définies. La bioaccumulation de l'argent peut en outre varier en fonction des conditions expérimentales.

Zhao & Wang (2012b) ont étudié les interactions entre des nanoparticules d'argent de différentes tailles (20, 50 et 100 nm) et possédant différents enrobages (citrate et acide tannique) et *Daphnia magna*. Les résultats sont présentés sur la Figure 1-14.

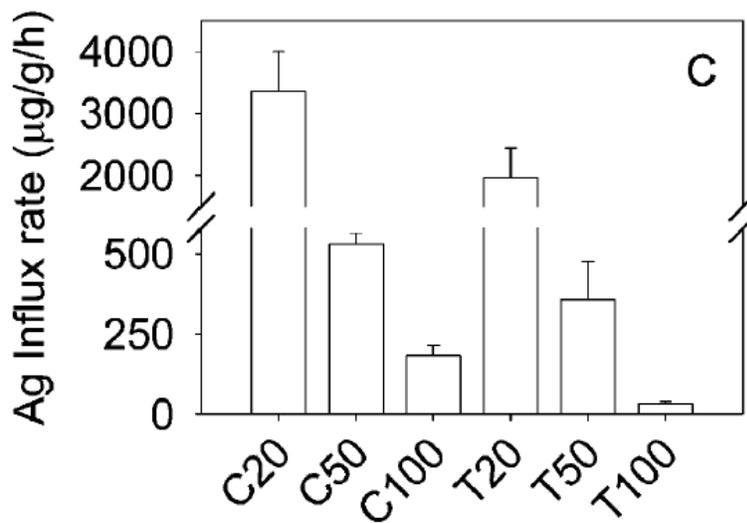


Figure 1-14: Vitesse d’internalisation des AgNPs (4,6 µM) chez *Daphnia magna* (Zhao & Wang, 2012b). C = enrobage en citrate; T = enrobage en acide tannique. Les nombres 20, 50 et 100 correspondent aux diamètres.

On peut voir clairement que, quand la taille des nanoparticules augmente, la vitesse d’internalisation diminue, et cela pour les deux enrobages, les vitesses étant plus faibles dans le cas de l’acide tannique. On peut en déduire que la bioaccumulation des nanoparticules d’argent est relativement importante chez les daphnies et que celle-ci dépend de la taille des nanoparticules et de leur enrobage. De plus, Zhao & Wang (2012b) ont étudié la distribution des nanoparticules d’argent dans les daphnies en procédant à une dissection sous microscope suivie d’une digestion et une analyse des différentes parties récupérées. Environ 60% de l’argent a été retrouvé dans les intestins, ce qui suggère que, dans ces conditions, la bioaccumulation se ferait principalement par ingestion.

Cela a été confirmé par l’étude d’Asghari et al. (2012). En observant au microscope optique des daphnies exposées pendant 24 h à une suspension de nanoparticules d’argent (20 nm, préparées à partir d’une poudre commerciale; 1,4 µM), ils ont pu remarquer la présence de AgNPs dans le tractus digestif des organismes (en noir sur la Figure 1-15a), indiquant une ingestion des nanoparticules d’argent par les daphnies. De plus, comme présenté à la Figure 1-15b, les nanoparticules s’adsorbent sur certaines parties internes (comme la chambre à couvain) et externes des daphnies (telles que les antennes). Bien que les concentrations en nanoparticules d’argent utilisées dans cette expérience soient très supérieures à celles que l’on pourrait potentiellement retrouver dans l’environnement (concentrations estimées de

l'ordre du pM au nM, cf. 1.1. Mise en contexte), cette étude montre que les daphnies peuvent ingérer des AgNPs de petite taille.

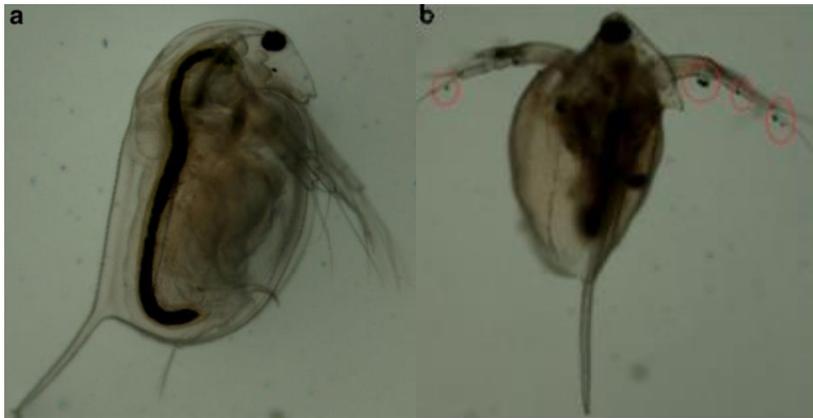


Figure 1-15: *Daphnia magna* observée au microscope optique après 24 h d'exposition à une suspension d'AgNPs (20 nm ; 1,4 μ M), agglomérats de nanoparticules adsorbés aux antennes entourés en rouge (Zhao & Wang, 2012b)

En travaillant à différentes concentrations en argent (9-190 nM), Zhao & Wang (2012b) ont ensuite déterminé que la vitesse d'internalisation augmentait linéairement avec la concentration. Enfin, ils ont découvert que l'ajout de cystéine (1 μ M) avait une influence sur la bioaccumulation des nanoparticules d'argent. En effet, celle-ci se lie aux nanoparticules et augmente leur taille (d'un facteur 30 pour les nanoparticules de 20 nm après 6 h d'exposition). En comparant les vitesses d'internalisation des nanoparticules en présence ou non de cystéine, ils ont également pu déterminer que la cystéine diminuait significativement l'internalisation de l'argent en complexant l'argent libre et/ou en provoquant une agrégation des nanoparticules, tel que mentionné précédemment.

McTeer *et al.* (2014) ont étudié le transfert trophique des nanoparticules d'argent de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* aux daphnies. Ils ont démontré que l'accumulation des métaux dans les daphnies pouvait se faire par ingestion de nourriture et ont fait l'hypothèse que l'argent dissous des nanoparticules, accumulé par les algues, était transféré aux daphnies. L'augmentation de l'accumulation chez les algues pourrait donc avoir une influence sur son accumulation dans les daphnies. Zhao & Wang (2010), Kalman *et al.* (2015) et plus récemment Ribeiro *et al.* (2017) ont analysé l'implication respective du transfert trophique et de l'eau dans la bioaccumulation des nanoparticules d'argent chez *Daphnia magna*. Zhao & Wang (2010) ont, dans un premier temps, exposé les algues à des AgNPs-carbonates (20 nm, 0,2 à 4,6 μ M) puis les ont transférés dans la solution contenant les daphnies. Dans un second temps, ils ont directement exposé les daphnies à une solution contenant les nanoparticules d'argent. En outre,

leur solution d'exposition contenait de la cystéine à 1 μM de manière à complexer l'Ag dissous et le rendre non biodisponible. Ils ont déduit, grâce à l'application d'un modèle biocinétique, que le transfert trophique était la principale voie d'accumulation des AgNPs chez *D. magna*, avec plus de 70% des nanoparticules d'argent accumulées dans les daphnies via l'ingestion d'algues. De plus, ils ont déterminé que l'efficacité d'assimilation de l'argent par les daphnies était plus importante quand celles-ci étaient nourries avec les algues préalablement exposées aux AgNPs, plutôt qu'avec celles qui avaient été exposées à l'argent dissous. Kalman *et al.* (2015) ont travaillé avec des AgNPs-PVP, -PEG et -citrate (10 nm, 18,3 μM) et ont abouti aux mêmes conclusions. Ribeiro *et al.* (2017) ont analysé la bioaccumulation de l'argent dans les daphnies, exposées à des AgNPs (revêtement : alcane inconnu, 3-8 nm) via l'eau et/ou la nourriture. Ils ont déterminé que, lors d'une exposition à l'eau, l'absorption de l'argent dissous par les daphnies était plus importante que l'absorption des nanoparticules alors qu'aucune différence n'a été relevée dans le cas de l'exposition à la nourriture. De plus, dans le cas d'une exposition simultanée (eau et nourriture), les daphnies exposées aux AgNPs assimilaient de manière plus importante l'argent que celles exposées à AgNO_3 . Ribeiro *et al.* (2017) ont donc conclu que la voie principale d'accumulation des AgNPs était l'eau, contrairement aux conclusions de Zhao & Wang (2010) et Kalman *et al.* (2015).

La dépuración de l'argent par les daphnies, décrite comme biphasique par Khan *et al.* (2015) car comprenant une phase d'élimination rapide suivie par une phase d'élimination lente, doit être également prise en compte dans une étude de la bioaccumulation des AgNPs par *D. magna*. Celle-ci s'effectue principalement par excrétion (~ 60%) mais également par les matières fécales (~ 30%) et par la mue (~ 10%) (Zhao & Wang, 2010). Tel que démontré par Zhao & Wang (2010), Kalman *et al.* (2015) et Ribeiro *et al.* (2017), la vitesse de dépuración de l'argent après une exposition aux nanoparticules d'argent est plus faible qu'après une exposition à l'argent dissous, indiquant la difficulté qu'ont les daphnies à éliminer les AgNPs. Cela signifie que les nanoparticules d'argent pourront être potentiellement transférées dans la chaîne alimentaire vers les consommateurs de daphnies.

1.5.8. Effets observés sur les daphnies

La toxicité apparente des nanoparticules d'argent dépend largement des conditions expérimentales. Voici quelques exemples d'effets toxiques des AgNPs sur les daphnies, tirés de la littérature.

- **Mort de l'organisme** (Griffitt *et al.* (2008), Allen *et al.* (2010), Zhao & Wang (2011), Zhao & Wang (2012a), Lee *et al.* (2012), McLaughlin & Bonzongo (2012), Hoheisel *et al.* (2012), Angel *et al.* (2013), Das *et al.* (2013), Romer *et al.* (2013), Newton *et al.* (2013), McTeer *et al.* (2014), Ribeiro

et al. (2014), Stensberg *et al.* (2014), Mackevica *et al.* (2015), Khan *et al.* (2015), Ulm *et al.* (2015), Zhang *et al.* (2015), Sakka *et al.* (2016), Conine & Frost (2017));

- **Réduction de la croissance** (Zhao & Wang (2011), Mackevica *et al.* (2015), Conine & Frost (2017));
- **Perturbation du comportement natatoire jusqu'à l'immobilité**⁶ (Asghari *et al.* (2012), Jo *et al.* (2012), Park *et al.* (2014), Seo *et al.* (2014));
- **Réduction du potentiel de reproduction** (Zhao & Wang (2011), Blinova *et al.* (2013), Ribeiro *et al.* (2014), Mackevica *et al.* (2015), Sakka *et al.* (2016));
- **Perturbation de l'osmorégulation** (Zhao & Wang (2013), Stensberg *et al.* (2014));
- **Augmentation du stress oxydant** (Ulm *et al.*, 2015);

Perturbation de l'activité enzymatique (Ulm *et al.*, 2015). Un tableau récapitulant les différents effets observés, les conditions d'expositions ainsi que les caractéristiques des nanoparticules utilisées dans ces expériences est présenté dans l'Annexe 3 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les daphnies.

Les expériences visant à déterminer les concentrations létales médianes (CL₅₀ : concentration causant la mort de 50% des organismes) des nanoparticules d'argent sont celles que l'on retrouve le plus dans la littérature. La CL₅₀ pour *D. magna* varie fortement en fonction du type de nanoparticules auxquelles on expose les organismes (forme, taille, concentration) et de la composition du milieu environnant. Newton *et al.* (2013) ont déterminé la CL₅₀ (48 h) de différents types de nanoparticules et de AgNO₃ pour *D. magna* et ont pu observer l'importance de l'enrobage des AgNPs sur leur toxicité. En effet, en se basant sur les valeurs de CL₅₀ (48 h), ils ont déduit l'ordre de toxicité suivant : AgNO₃ >> AgNP-GA >> AgNP-PEG >> AgNP-PVP (GA : gomme arabique, PEG : polyéthylène glycol, PVP : polyvinylpyrrolidone). De plus, ils ont noté que la toxicité de AgNO₃, de AgNP-GA et de AgNP-PEG diminuait en présence de carbone organique dissous (provenant de la rivière Suwannee) alors que celle de AgNP-PVP restait inchangée. La conclusion de leur étude fut que la toxicité des AgNPs était fonction de la concentration en argent dissous. Seitz *et al.* (2015) ont mené des recherches approfondies afin de déterminer l'impact des conditions expérimentales (type de nanoparticule, pH, présence de matière organique dissoute) sur la

⁶ **Immobilité** : Inaptitude à la nage pendant les 15 secondes suivant une légère agitation de la solution d'essai, même si les daphnies peuvent encore bouger leurs antennes, Environnement Canada (2000) SPE 1/RM/14 Deuxième édition - Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*. Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Centre de technologie environnementale, Ottawa, Canada:1-36.

toxicité des AgNPs pour *Daphnia magna*. Ils ont pu confirmer que la toxicité (aigue et chronique) diminuait en présence de matière organique dissoute, mais également dans une solution présentant un pH plus élevé. Tel qu'indiqué dans la partie 1.5.4. Transformations dans l'eau douce, et suggéré par Seitz *et al.* (2015), la matière organique dissoute réduirait l'interaction de l'argent libre avec les organismes, en formant par exemple des complexes avec Ag^+ ou en s'adsorbant à la surface des nanoparticules, bloquant ainsi leurs sites d'oxydation. De la même façon, l'augmentation de la taille des nanoparticules d'argent enrobées de citrate, utilisées dans ces expériences, de 20 à 100 nm, a permis de diminuer la toxicité d'un facteur 7,5. Or, la taille initiale des nanoparticules est inversement proportionnelle à leur capacité à libérer de l'argent libre. Seitz *et al.* (2015) ont donc conclu que, dans ces conditions, la majorité des effets liés aux nanoparticules d'argent semblent être attribuées à la fraction $nAg < 2$ nm, incluant l'argent libre.

Les CL_{50} peuvent alors être reliées aux concentrations estimées dans l'environnement via l'élaboration d'une distribution de sensibilité des espèces (ou SSD ; *species sensitivity distribution*) qui est un modèle statistique ou empirique permettant d'évaluer les variations de sensibilité entre différentes espèces représentatives d'un environnement donné exposées à un facteur de stress particulier. En connaissant la concentration du contaminant dans l'eau, la proportion d'espèces pouvant être affectées (PAF en %) ainsi que la concentration au-dessus de laquelle plus de 5% des espèces sont exposées à une concentration dépassant leur CL_{50}/CE_{50} (HC_5) peuvent être déterminées. En se basant sur les résultats de tests de toxicité chronique effectués sur des espèces appartenant à plusieurs groupes taxonomiques différents (algues, flagellés, crustacés et poissons) et exposées à des nanoparticules d'argent entourées de PVP d'environ 120 nm de diamètre (hydrodynamique), Kwak *et al.* (2016) ont déterminé un HC_5 de 0,6 $\mu g/L$ pour la protection des écosystèmes aquatiques en utilisant pour la première fois une méthode SSD (Figure 1-16). Néanmoins, cette donnée n'est valable que pour les nanoparticules d'argent utilisés dans cette étude. De plus, dans ces conditions (exposition chronique), *Daphnia magna* semble être l'organisme le plus sensible aux nanoparticules d'argent. C'est ce que confirment Kahru & Dubourguier (2010) et Jemec *et al.* (2016) qui ont regroupé les CL_{50} s ou CE_{50} s de plusieurs espèces de bactéries, d'algues, de crustacés et de poissons. En utilisant l'échelle de toxicité définie par Kahru & Dubourguier (2010) allant d'extrêmement toxique ($C(E)L50 < 0,1$ mg/L) à dangereux ($C(E)50 = 10-100$ mg/L) en passant par très toxique ($C(E)50 = 0,1-1$ mg/L) et toxique ($C(E)50 = 1-10$ mg/L) dans les tableaux des Annexe 2 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les algues et Annexe 3 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les daphnies, nous avons constaté que les nanoparticules d'argent semblaient être effectivement plus toxiques pour les daphnies que pour

les algues, avec 88,3% d'études démontrant une toxicité « extrême » contre 50% pour les algues. La revue de littérature effectuée n'est cependant pas exhaustive.

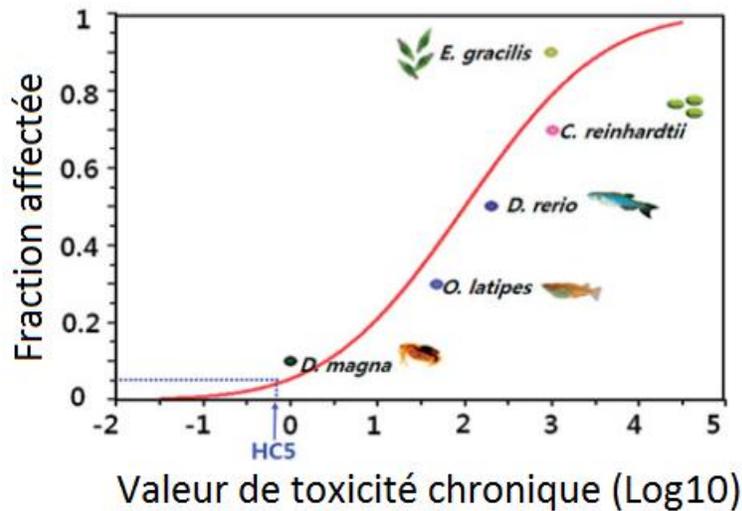


Figure 1-16: Distribution de sensibilité chronique des espèces (SSD) exposées à des AgNPs-PVP, élaborée en utilisant cinq espèces (*C. reinhardtii*, *E. gracilis*, *D. magna*, *D. rerio* et *O. latipes*) provenant de quatre groupes taxonomiques différents (algues, flagellés, crustacés et poissons). HC₅ chronique = 0,614 µg/L AgNP. Adaptée de Kwak *et al.* (2016).

Après 21 j d'exposition à des nanoparticules d'argent entourées d'un enrobage d'alcane (3-8 nm), Ribeiro *et al.* (2014) ont compté, pour différentes concentrations en argent, le nombre de néonates formés afin de déterminer l'effet des AgNPs sur la reproduction des daphnies. Les résultats sont donnés ci-dessous :

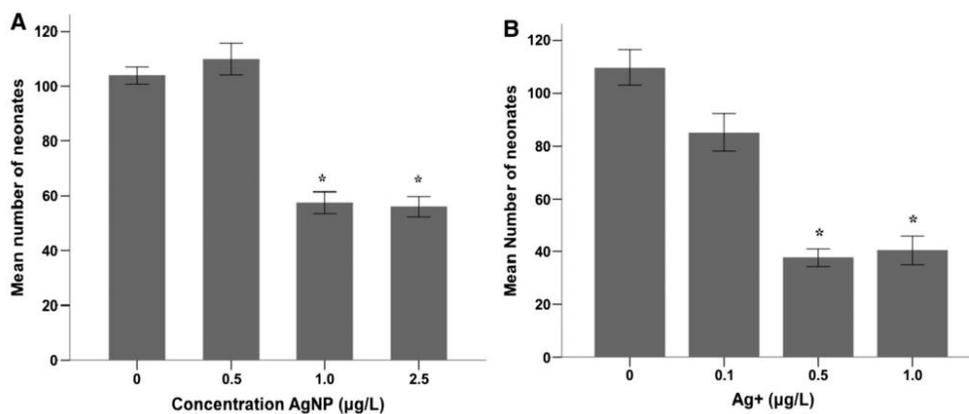


Figure 1-17: Effet de A) AgNPs-alcane (3-8 nm) et de B) AgNO₃ sur la reproduction de *Daphnia magna* (Ribeiro *et al.*, 2013)

Les CE₅₀ (21 j) calculées (AgNPs : 9,2 nM, AgNO₃ : 3,6 nM) suggèrent que la toxicité des nanoparticules serait plus faible que celle de l'argent dissous, AgNO₃ apparaissant encore une fois plus toxique que les AgNPs. Ribeiro *et al.* (2014) ont fait l'hypothèse que l'effet des AgNPs sur les daphnies ne serait pas dû à un transfert mère-œufs, mais plutôt à un effet des nanoparticules sur l'état physiologique des daphnies, entraînant indirectement un effet sur leur reproduction.

Kim *et al.* (2016) ont déterminé l'accumulation et la toxicité de métaux (arsenic, cadmium et cuivre) chez *Daphnia magna* en présence de nanoparticules d'argent enrobées de citrate. Ils ont observé que la bioaccumulation de l'As(V) et du Cu diminuait en présence de AgNPs, l'arsenic chargé négativement entrant en compétition avec les nanoparticules d'argent et le cuivre s'adsorbant à la surface des NPs. En revanche la bioaccumulation et la toxicité du Cd augmentaient en présence des nanoparticules enrobées de citrate. Selon les auteurs, le citrate (libéré des nanoparticules) aurait complexé les cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ dans la solution, réduisant ainsi leur compétition avec le Cd pour le ligand biotique et favorisant donc sa bioaccumulation. Cependant, le citrate aurait également complexé le Cd²⁺ en solution; en absence de calculs détaillés de spéciation, leur explication nous semble peu plausible.

1.6. Travaux en mésocosmes

Toutes les études écotoxicologiques présentées jusqu'à maintenant ont été réalisées en laboratoire, très souvent en monocultures, dans des milieux plus ou moins synthétiques aux conditions très contrôlées. Néanmoins, afin de prendre en compte toute la complexité des milieux naturels et ainsi de rendre plus réalistes les résultats obtenus, le devenir, la bioaccumulation et les effets des nanoparticules sur les organismes peuvent être évalués en mésocosmes. Ces systèmes expérimentaux simulent, aussi étroitement que possible, les conditions de vie réelles des organismes, tout en permettant la manipulation de certains facteurs environnementaux (Buffet *et al.*, 2013). Quelques études de ce type ont été appliquées aux nanoparticules d'argent, dans différents milieux : en eaux douces (Bone *et al.* (2012), Lowry *et al.* (2012a) et Unrine *et al.* (2012)), en marais salants (Buffet *et al.*, 2014), en estuaire (Cleveland *et al.*, 2012) et dans les sédiments estuariens (Bradford *et al.* (2009) et Mühlhing *et al.* (2009)). Les études de Cleveland *et al.* (2012) et de Lowry *et al.* (2012a) ont été pris en exemple et vont être développées ci-dessous.

Cleveland *et al.* (2012) ont étudié en mésocosmes le relargage de nanoparticules d'argent contenues dans trois produits de consommation (pansements, chaussette, ours en peluche) ainsi que l'accumulation de ces nanoparticules par différents organismes estuariens. Ils ont déterminé que de 82 à 99% de l'argent contenu dans les produits était libéré dans la colonne d'eau sous 60 j et qu'il

s'accumulait dans la plupart des compartiments environnementaux : palourdes (*Mercenaria mercenaria*), crevettes (*Palaemonetes pugio*), escargots (*Ilyanassa obsoleta*), tiges et feuilles de spartine (*Spartina alterniflora*), biofilms, sédiments intertidaux et sable. Une quantité importante d'argent a été absorbée par les organismes par transfert trophique, comme les calculs de TTFs (*trophic transfer factors* : facteur défini ici comme le ratio entre la quantité d'argent présente dans un organisme et celle présente dans sa source de nourriture) ont pu le démontrer. Des calculs similaires leur ont également permis de déterminer que l'argent présent dans l'eau de mer a été adsorbé sur les biofilms, les sédiments et le sable. De la même façon, l'argent adsorbé sur le sable a été transféré aux palourdes.

Lowry *et al.* (2012a) ont fait un suivi du devenir à long terme de nanoparticules d'argent revêtues de PVP dans des mésocosmes simulant un marais colonisé par des plantes aquatiques émergentes. La distribution, la spéciation et la biodisponibilité de l'argent ont été déterminées 18 mois après son introduction dans les mésocosmes par pulvérisation uniforme d'une solution pressurisée à 700 mg/L en AgNPs au-dessus de l'eau ou des plantes. Plus de 70% de l'argent a été retrouvé dans les sols et les sédiments. Un transport de l'argent des sols vers les sédiments a été détecté, indiquant que l'érosion et le ruissellement peuvent être des voies potentielles d'entrée des nanoparticules d'argent dans les cours d'eau. Entre 0,2 et 3% de l'argent a été retrouvé dans la biomasse végétale et des charges corporelles relativement élevées d'argent (jusqu'à 3,5 µg/g de poids humide) ont été mesurées chez les poissons (*Gambusia holbrooki*) et les insectes (libellules et chironomes). De plus, un transfert de l'argent des poissons vers leurs embryons a été observé. Les AgNPs dans les sols terrestres étaient à 52% sous la forme Ag₂S. Dans les sédiments subaquatiques, plus anoxiques, ils étaient présents sous la forme Ag₂S (55%) et Ag-SH (27%). Les AgNPs sont donc demeurées biodisponibles, même après sulfuration partielle et bien que les concentrations en Ag total dans la colonne d'eau soient faibles (< 18,3 nM).

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Ce doctorat a pour but de tester la validité des liposomes en tant que modèle membranaire et d'apporter, à l'aide d'expériences originales, des éléments nouveaux sur la biodisponibilité de l'argent dissous et des nanoparticules d'argent.

① Expériences en mésocosmes

L'expérience en mésocosmes a été menée à la station aquicole de l'ISMER (Institut des sciences de la mer – Université de Québec à Rimouski) à Pointe-au-Père durant l'été 2013 en collaboration avec des collègues de l'ISMER. Ce projet avait pour objectif général de reproduire le processus de mélange entre l'eau douce et l'eau estuarienne du fleuve Saint-Laurent, afin d'obtenir des informations sur le devenir

biogéochimique des nanoparticules d'argent enrobées de citrate. Nous avons contribué au projet en nous focalisant sur la partie eau douce. Nous avons étudié l'oxydation des AgNPs à la surface des mésocosmes par dialyse et déterminé la bioaccumulation de l'argent par l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* et la puce d'eau *Daphnia magna*. J'ai effectué ce travail en binôme avec le Dr Zhongzhi Chen, à l'époque chercheur postdoctoral à l'INRS-ETE.

Hypothèse 1 : En se basant sur la littérature, aucune assimilation des nanoparticules d'argent par les algues ne devrait être observée. De plus, l'assimilation des nanoparticules d'argent par les daphnies devrait pouvoir se faire, principalement par ingestion directe d'eau contenant des AgNPs ou par adsorption des nanoparticules à la surface des organismes, suivie de leur dissolution.

② Évaluation de l'interaction entre argent dissous et liposomes

Lors des expériences de bioaccumulation des nanoparticules d'argent, les cellules sont à la fois exposées aux nanoparticules mais également à l'argent dissous qu'elles libèrent. Le **deuxième objectif** de cette thèse est de vérifier si l'argent dissous peut traverser les membranes bilipidiques. Les liposomes, de par leur composition (le zwitterion phosphatidylcholine), ne permettent en effet essentiellement que la diffusion passive des composés. L'influence de la présence de ligands inorganiques (thiosulfate, chlorure) sur la prise en charge de l'argent a été évaluée. Le passage de l'eau tritiée et des complexes HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à travers la membrane a été étudiée et a permis d'estimer le potentiel de diffusion des liposomes.

Hypothèse 2 :

L'argent (I) non complexé (Ag^+), étant une espèce ionique et hydrophile, ne devrait pas diffuser à travers la membrane bilipidique. La présence de ligands inorganiques ne devrait pas avoir d'influence sur la prise en charge de l'argent par les liposomes, sauf si ces ligands menaient à la formation d'un complexe neutre et raisonnablement lipophile. L'eau, étant une petite molécule neutre et polaire, et les complexes de mercure et de cadmium, espèces lipophiles, devraient pouvoir diffuser à travers la membrane.

③ Évaluation de l'interaction entre nanoparticules d'argent et liposomes

Le **troisième objectif** de cette thèse est de vérifier si les nanoparticules d'argent peuvent traverser les membranes bilipidiques. Tel que mentionné dans l'introduction, cette hypothèse a souvent été suggérée mais n'a jamais été vérifiée. En outre, aucune bioaccumulation des AgNPs-citrate dans *C. reinhardtii* n'a été observée pendant l'expérience en mésocosmes. Nous avons donc choisi de travailler avec des AgNPs

possédant un revêtement le plus lipophile possible et un diamètre le plus petit possible pour nos expériences avec les liposomes afin de se placer dans des conditions favorisant l'internalisation.

Pour répondre à cet objectif, les interactions entre des nanoparticules d'argent de 5 nm de diamètre enrobées de PVP et les liposomes ont donc été étudiées. L'oxydation des nanoparticules d'argent dans le milieu d'exposition a été évaluée de manière à prendre en compte les transformations des AgNPs dans l'interprétation des résultats des expériences d'assimilation.

Hypothèse 3 : Les nanoparticules d'argent sont trop volumineuses pour traverser la membrane bilipidique par diffusion passive. Nous ne devrions donc pas observer d'accumulation des nanoparticules dans les liposomes. Les nanoparticules d'argent, de par leur composition et concentration, devraient s'oxyder de manière non négligeable et se transformer en Ag(I) dissous.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1. Expériences en laboratoire

3.1.1. Conditions d'exposition

3.1.1.1. Tampons interne et externe

La composition du tampon à pH 6,0, appelée solution tampon interne, est présentée dans le Tableau 3-1 ci-dessous. Ce tampon a été utilisé lors de la synthèse des liposomes (cf. partie 3.1.2. Synthèse des liposomes.). La solution a été tamponnée avec 5,0 mM de MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) et 6,0 mM de rouge de phénol (sel de sodium) y a été intégré afin de servir d'indicateur coloré. Après le changement de milieu, la solution tampon interne des liposomes était à pH 6,0 et la solution tampon externe à pH 7,4. La zone de virage du rouge de phénol se trouve entre pH 6,6 et pH 8,4 (jaune à pH 6 et orange/rouge à pH 7,4). Les fuites éventuelles du rouge de phénol, causées par une rupture dans la membrane phospholipidique, pouvaient donc être facilement détectées visuellement, grâce au changement de couleur de la solution, passant de jaune à orange/rouge. Un ligand ayant une forte affinité avec les métaux étudiés a également été intégré à la solution afin de piéger, durant l'exposition, les métaux potentiellement internalisés à l'intérieur des liposomes. Le thiosulfate a été choisi pour les expériences avec l'argent et le mercure car celui-ci forme des complexes hydrophiles stables avec ces métaux (AgS_2O_3^- , $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$: $\log K_1 = 8,82$, $\log \beta_2 = 13,50$, Martell *et al.* (2004) ; $\text{Hg}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{2-}$, $\text{Hg}(\text{S}_2\text{O}_3)_3^{4-}$: $\log K_1 = 29,27$, $\log \beta_2 = 30,8$, Nyman & Salazar (1961)). L'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) a été sélectionné comme ligand interne pour les expériences avec le cadmium pour les mêmes raisons ($\text{Cd}(\text{EDTA})^{2-}$, $\log K = 18,1$, Martell *et al.* (2004)). Le tampon à pH 7,4, solution tampon externe aux liposomes après le changement de milieu, a été tamponné avec 7,5 mM de MOPS (acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique). Les solutions tampons étaient conservées au maximum 1 mois au frigo pour prévenir l'oxydation des tampons MOPS et MES ainsi que celles des ligands thiosulfate et EDTA. Toutes les solutions stocks (0,1 M) utilisées pour la préparation des tampons ont été filtrées à travers des membranes en polycarbonate de 0,2 μm de largeur de pore.

La composition des solutions d'exposition, utilisées dans les expériences d'assimilation des métaux par les liposomes, est présentée dans le Tableau 3-2. Toutes les solutions ont été tamponnées avec entre 6,0 et 7,5 mM de MOPS. Les solutions d'exposition 1 à 3 correspondent aux expériences avec l'argent dissous. Elles se différencient par la présence ou l'absence de ligands ayant une forte affinité avec l'argent (1 : aucun ligand, 2 : thiosulfate, 3 : chlorures). Tout comme le thiosulfate présenté plus haut, les

chlorures forment des complexes stables avec l'argent (AgCl^0 , AgCl_2^- : $\log K = 3,31$, $\log \beta_2 = 5,25$, Martell *et al.* (2004)). La solution d'exposition 4 correspond aux expériences avec le mercure, la 5 aux expériences avec le cadmium et la 6 avec les nanoparticules d'argent. Toutes les concentrations indiquées sont des concentrations nominales. Les concentrations initiales en métaux ont été déterminées expérimentalement avant chaque expérience.

Le pH de toutes les solutions a été ajusté avec une solution à 1,0 M d'NaOH et mesuré grâce à une électrode à pH (électrode combinée, cat 13-620-299A, Fisher Scientific accumet). Le pH-mètre (PHM240, Radiometer Analytical) a été étalonné avec des solutions tampon à pH 4 et 7 ou 7 et 10, dépendamment de la valeur de pH de la solution mesurée. Les pHs interne et externe aux liposomes ont été choisis de manière à être représentatifs : pH 6,0 basé sur le pH moyen du milieu interne des cellules biologiques (5,5-7,5; Carrozzino & Khaledi (2005)) et pH 7,4 basé sur le pH moyen des eaux douces du Québec (6,3-8,3; MDDELCC (2016)). La force ionique a été fixée à 25,0 méq/L grâce à une solution de KNO_3 0,10 M. Pour chaque expérience réalisée, la force ionique était la même à l'intérieur comme à l'extérieur des liposomes afin d'éviter tout gradient transmembranaire qui aurait favorisé le passage de certaines espèces, entre autres métalliques, à travers la bicouche lipidique.

Après utilisation, le matériel était placé dans un bain d'acide nitrique (ACS) à 10% v/v pendant 24 h puis rincé trois fois avec de l'eau déminéralisée et trois fois avec de l'eau MilliQ (eau ultra pure, ~18 Mohms-cm) afin d'éviter toute contamination métallique.

3.1.1.2. Modélisation thermodynamique

La spéciation des métaux a été modélisée dans chaque solution grâce au logiciel de calculs thermodynamiques MINEQL+ version 4.6 et est présentée dans le Tableau 3-1 et le Tableau 3-2. Les constantes de formation des complexes métalliques d'Ag, de Hg et de Cd, utilisées par le logiciel, proviennent de la base de données thermodynamiques NIST (National Institute of Standards and Technology) version 8.0 (Martell *et al.*, 2004). Notons que les concentrations en ligands ont été choisies de manière à ce que les espèces métalliques d'intérêt, soulignées dans les tableaux (AgS_2O_3^- , AgCl^0 , HgCl_2^0 , $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, etc...) soient présentes dans des proportions élevées.

En outre, étant donné que l'argent est peu soluble en présence de chlorures, MINEQL+ nous a permis de contrôler qu'aucun précipité ne se formait aux concentrations utilisées. La force ionique a également pu être contrôlée grâce au logiciel.

Tableau 3-1 : Composition des solutions tampons (force ionique et spéciation calculées avec MINEQL+ v.4.6)

Solutions tampon	Composition	pH	I (meq/L)	Spéciation
Solution tampon interne (avec piège : $S_2O_3^{2-}$)	Rouge de phénol (sel de sodium) 6,0 mM ; Tampon MES 5,0 mM ; Na ₂ S ₂ O ₃ 1,33 mM ; NaOH 2,4 mM ; KNO ₃ 15,9 mM.	6,0	25,0	<u>99,2% Ag(S₂O₃)₂³⁻</u> <u>65,4% Hg(S₂O₃)₂²⁻</u> ; 34,6% Hg(S ₂ O ₃) ₃ ⁴⁻
Solution tampon interne (sans piège)	Rouge de phénol (sel de sodium) 6,0 mM ; Tampon MES 5,0 mM ; NaOH 2,4 mM ; KNO ₃ 23,1 mM.	6,0	25,0	<u>98,7% Ag⁺</u> <u>99,9% Hg²⁺</u> <u>97% Cd²⁺</u>
Solution tampon interne (avec piège : EDTA)	Rouge de phénol (sel de sodium) 6,0 mM ; Tampon MES 5,0 mM ; EDTA 2 mM ; NaOH 2,4 mM ; KNO ₃ 13,3 mM.	6,0	25,0	<u>99,9% Cd(EDTA)²⁻</u>
Solution tampon externe	Tampon MOPS 7,5 mM; NaOH 5,6 mM; KNO ₃ 19,9 mM	7,4	25,0	/

Tableau 3-2 : Composition des solutions d'exposition, après dilution avec la dispersion de liposomes (force ionique et spéciation calculées avec MINEQL+ v.4.6)

	Composition	pH	I (mM)	Spéciation
Solution d'exposition 1	Tampon MOPS 7,2 mM; NaOH 14,7 mM; AgNO ₃ 30 nM; KNO ₃ 15,4 mM	7,4	25,0	<u>Ag⁺ 99,1%</u>
Solution d'exposition 2	Tampon MOPS 7,0 mM; NaOH 14,7 mM; AgNO ₃ 30 nM; Na ₂ S ₂ O ₃ 173 nM; KNO ₃ 15,5 mM	7,4	25,0	<u>AgS₂O₃⁻ 96,9%</u> ; Ag(S ₂ O ₃) ₂ ³⁻ 1,2% ; Ag ⁺ 1,9%
Solution d'exposition 3	Tampon MOPS 7,0 mM; NaOH 14,8 mM; NaCl 2,47 mM; AgNO ₃ 30 nM; KNO ₃ 12,9 mM	7,4	25,0	<u>AgCl⁰ 67,2%</u> ; AgCl ₂ ⁻ 14,5% ; Ag ⁺ 18,1%
Solution d'exposition 4	Tampon MOPS 6,8 mM; NaCl 4,9 mM; NaOH 5,2 mM; HgCl ₂ 147 nM; KNO ₃ 15,4 mM	7,4	25,0	<u>HgCl₂⁰ 42,7%</u> ; HgClOH 45,4% ; HgCl ₃ ⁻ 2,1% ; Hg(OH) ₂ 9,8%
Solution d'exposition 5	Tampon MOPS 6,0 mM; Na-DDC 700 nM; NaOH 4,77 mM; Cd(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O 150 nM; KNO ₃ 20,8 mM	7,4	25,0	<u>Cd(DDC)₂⁰ 99,9%</u>
Solution d'exposition 6	Tampon MOPS 7,5 mM; NaOH 5,6 mM; AgNPs-PVP 72,5 nM; KNO ₃ 19,8 mM	7,4	25,0	<u>Ag⁺ 98,9%</u> (pour l'argent dissous, en faisant abstraction de la présence d'AgNPs)

3.1.2. Synthèse des liposomes

3.1.2.1. Choix du modèle

L'étude a été réalisée avec des liposomes, vésicules unilamellaires (LUVs) d'environ 180 nm de diamètre et composées de phosphatidylcholine (PC), qui ont été synthétisés en laboratoire et utilisés comme modèle de membrane biologique. Les liposomes ont été préférés aux films lipidiques, également utilisés comme modèles, car les liposomes sont plus représentatifs des cellules biologiques de par leur forme sphérique. Le choix de leur composition s'est porté sur la phosphatidylcholine, l'un des principaux phospholipides retrouvés dans les membranes naturelles (Dembitsky & Rozentsvet, 1996). En outre, la température de transition de phase de PC, de son état gel à sa forme liquide cristallin, est très basse (-2,5°C). Étant donné que les liposomes ne peuvent se former qu'à une température supérieure à celle de la transition de phase (Lorin *et al.*, 2004), cette importante caractéristique de PC nous a permis de travailler à la température ambiante. Notons que la composition de la membrane se devait d'être simple de manière à ce que seule la diffusion passive des espèces à travers la bicouche puisse être possible. Une étude antérieure (L. Girault, non publiée) sur l'interaction entre argent dissous et vésicules unilamellaires de 180 nm de diamètre a été effectuée dans notre laboratoire. Afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de cette étude, des liposomes de même diamètre ont été synthétisés.

3.1.2.2. Protocole de synthèse

Une revue de littérature non exhaustive sur la synthèse de LUVs par extrusion a été effectuée au moment de l'établissement du protocole et a permis de déterminer les paramètres expérimentaux propres à notre étude (cf. Annexe 1 : Différents protocoles expérimentaux pour la préparation de LUVs).

Les phospholipides, phosphatidylcholine provenant de jaunes d'œuf (Avanti Polar Lipids), ont été reçus sous forme de poudre. Ils ont été dissous dans un mélange de solvants organiques (9 : 1 ; chloroforme : méthanol) et conservés au congélateur à -20°C. Les solvants organiques ont ensuite été évaporés pendant 1 h à 35°C sous un flux modéré d'azote. Un film lipidique se formait alors au fond du flacon cryogénique, utilisé comme contenant. Afin de s'assurer qu'aucun résidu de solvant ne restait piégé dans le film, le flacon a été laissé pendant 2 h dans un dessiccateur sous vide. Les lipides ont ensuite été resuspendus dans la solution tampon interne à pH 6,0 (Tableau 3-1) par agitation par vortex pendant 3 min. Dans ces conditions, des vésicules multilamellaires, composées de plusieurs bicouches phospholipidiques, se forment spontanément (Berger *et al.*, 2001). Huit cycles gel/dégel ont ensuite été appliqués afin de briser les membranes des vésicules multilamellaires grâce à la formation de cristaux de

glace pendant l'étape de gel (Castile & Taylor, 1999) et de former des vésicules unilamellaires. Pour cela, le flacon a été placé dans un bain d'azote liquide pendant 1 min (gel), puis dans un bain d'eau chaude à 45°C pendant 5 min (dégel) et enfin la suspension a été mélangée par vortex pendant 1 min. Afin d'obtenir la taille de vésicules souhaitée, ces derniers ont été filtrés six fois à travers un système d'extrusion muni de deux filtres superposés de 0,2 µm de largeur de pore en polycarbonate placés dans un porte filtre (Figure 3-1). Sans changer l'orientation des filtres de manière à limiter les pertes, deux seringues ont été utilisées alternativement afin de faire passer les liposomes à travers le système.



Figure 3-1 : Montage utilisé pour l'extrusion des liposomes

3.1.2.3. Détermination de la taille des liposomes

La taille des LUVs a été déterminée à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), grâce au principe de diffusion dynamique de la lumière : technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant d'accéder à la taille de particules en suspension soumises au mouvement brownien grâce à la diffusion d'une lumière laser et l'analyse des fluctuations d'intensité obtenues. Une aliquote de la suspension de liposomes (750 µL, ce qui correspond à environ 10% de la suspension totale synthétisée) a été introduite dans une cellule à capillaire replié (Malvern) et placée dans l'appareil. Cette cellule, habituellement utilisée pour les mesures de potentiel zêta a été préférée aux cellules standards à quatre faces optiques, car elle nécessite un plus faible volume d'échantillon (750 µL). Six mesures de l'échantillon, une mesure correspondant à six balayages de 15 s chacun, ont été faites à une température de 25°C (temps d'équilibre pour la température : 120 s). L'angle d'analyse appliqué était de 173°.

L'observation des liposomes au microscope optique a été testée mais la limite optique étant de 0,2 µm, les vésicules d'environ 180 nm synthétisées étaient trop petites pour pouvoir être détectées. La microscopie électronique à transmission ou la cryo-microscopie électronique sont des techniques efficaces pour l'observation de liposomes de cette taille (Bibi *et al.*, 2011), mais l'INRS ne possédait pas de tels appareils. Le passage dans la colonne de chromatographie d'exclusion stérique permettant de

vérifier l'intégrité des membranes grâce à la présence de l'indicateur coloré (cf. 3.1.1.1. Tampons interne et externe), nous n'avons pas estimé nécessaire d'obtenir d'images de nos liposomes.

3.1.2.4. Changement de milieu

Le changement de milieu a été effectué sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Cette étape avait pour but de transférer les liposomes dans un milieu à pH 7,4 de manière à pouvoir vérifier l'intégrité de la membrane grâce au rouge de phénol, présent dans la solution tampon interne, tel que présenté dans la partie 3.1.1.1 Tampons interne et externe.

3.1.2.4.1. Résine Sephadex G50 : description et préparation

Les gels Sephadex sont préparés par réticulation du dextran et de l'épichlorohydrine et sont utilisés principalement pour séparer les molécules en fonction de leur taille. En faisant varier le degré de réticulation, les propriétés du gel changent. Le Sephadex G50 Fine était le gel le plus adéquat dans le cadre de cette étude, ses particules fines assurant une séparation efficace avec des distances de diffusion adaptées aux expériences en laboratoire. Le domaine de fractionnement de la résine était compris entre 1500 et 30 000 Da. Le diamètre à sec des billes de résine était d'environ 20 à 80 μm . Le gonflement de la résine, après ajout d'un volume adapté de solution tampon externe (9 mL/g résine + 30% V_{colonne}), durait 3 h à 20°C. Après dégazage dans un bain à ultrasons pendant 1 h du gel formé ainsi que de la solution tampon externe, la colonne pouvait être remplie.

3.1.2.4.2. Chromatographie d'exclusion stérique

Une colonne de 2,5 cm de diamètre et 50 cm de longueur a été remplie avec la résine Sephadex G50 Fine et équilibrée avec la solution tampon externe à pH 7,4. Les liposomes initialement présents dans la solution tampon interne ont été élués sur la colonne. La première fraction en sortie de colonne, de couleur jaune, correspondant aux liposomes dans la solution tampon externe, a été collectée et analysée sur un spectrophotomètre UV-visible (Varian Cary 50, Agilent Technologies) à une longueur d'onde de 432 nm (longueur d'onde d'absorption du rouge de phénol). La deuxième fraction, de couleur rouge, correspondait à la solution tampon interne et notamment au rouge de phénol dans le tampon pH 7,4, pH se trouvant dans la zone de virage de l'indicateur coloré. Les liposomes récupérés ont été conservés dans la glace jusqu'à leur utilisation (environ 4 h) afin d'éviter toute rupture des membranes. Le diamètre moyen des liposomes ainsi que leur distribution de taille ont été déterminés tel que présenté dans le paragraphe précédent.

Une colonne de 1 cm de diamètre et de 20 cm de longueur avait été utilisée en premier lieu. Cependant, la différence entre le volume d'élution des molécules les plus grosses (de taille supérieure à la limite d'exclusion) et celui des molécules les plus petites (totalement incluses dans les pores de la résine) n'était pas suffisante, comme en témoigne l'expérience effectuée avec deux solutions étalons, le Blue dextran (2 000 kDa) et l'acétone (58 Da) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Nous avons donc opté pour une colonne plus longue de manière à améliorer la séparation.

3.1.2.5. Détermination de la concentration en LUVs

Afin de déterminer la concentration en LUVs ainsi que le nombre total de liposomes, le phosphore total a été analysé dans chaque échantillon par spectroscopie UV-visible (American Public Health Association (APHA) *et al.*, 2005). Du molybdate d'ammonium et du tartrate de potassium et d'antimoine ont été ajoutés en milieu acide à une aliquote de chacun des échantillons afin de former, après digestion à l'autoclave, un complexe phospho-molybdate d'antimoine. Celui-ci a alors été mis en présence d'acide ascorbique pour former un nouveau complexe de couleur bleue, détectable par le spectrophotomètre (885 nm). Une solution étalon de KH_2PO_4 a été utilisée pour établir une courbe d'étalonnage (comprenant un blanc) et un contrôle contenant initialement 3,54 mg/L de phosphore a été utilisé pour vérifier l'efficacité de la méthode.

Le nombre total de molécules de phosphatidylcholine (N_{PC}) par fraction peut alors être calculé comme suit :

$$n = C \times V = \frac{N_{PC}}{N_a} \Rightarrow N_{PC} = C \times V \times N_a \quad \text{éq. (3-1)}$$

Avec n = quantité de matière de PC (mol), C = concentration (mol PC/L), V = volume de la fraction (L), et N_a = nombre d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

L'analyse du phosphore total donne une concentration x exprimée en g P/L. Sachant que la masse molaire du phosphore est de 31 g/mol et celle de la phosphatidylcholine 770,123 g/mol, on peut convertir x en g PC/L :

$$x(\text{g P/L}) \equiv \frac{x \times 770,123}{31} (\text{g PC/L}) \quad \text{éq. (3-2)}$$

$$\text{D'où : } C(\text{mol PC/L}) = \frac{x \times 770,123}{31} (\text{g PC/L}) \times \frac{1}{M_{PC}} = \frac{x}{31} \quad \text{éq. (3-3)}$$

De plus, Enoch & Strittmatter (1979) donnent le nombre total de molécules de phosphatidylcholine par liposome en fonction du diamètre d des vésicules.

$$N_{tot} = 17,69 \times \left(\left(\frac{d}{2} \right)^2 + \left(\frac{d}{2} - 5 \right)^2 \right)$$

Cette information nous permet alors de déterminer le nombre total de liposomes (N_{lip}) par fraction à partir du nombre total de molécules de PC (N_{PC}) calculé précédemment :

$$N_{lip} = \frac{N_{PC}}{N_{tot}} = \frac{\frac{x}{31} \times V \times N_a}{17,69 \times \left(\left(\frac{d}{2} \right)^2 + \left(\frac{d}{2} - 5 \right)^2 \right)} \quad \text{éq. (3-4)}$$

Avec x = concentration massique en phosphore (g P/L) dans la fraction de volume V (L), N_a nombre d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), d diamètre des vésicules (nm).

Afin d'établir plus rapidement la concentration en phosphore total dans une suspension de liposomes, une courbe d'étalonnage donnant l'absorbance à 432 nm (longueur d'onde d'absorption du rouge de phénol) de 300 μL d'échantillon en fonction de la concentration en phosphore total a été réalisée. Pour cela, une suspension de liposomes a été diluée 2, 4, 8 et 16 fois et analysée à l'aide du protocole ci-dessus ainsi que directement sur spectrophotomètre UV-visible à 432 nm.

3.1.2.6. Efficacité du piège à métaux : évolution de la concentration en thiosulfate dans la solution tampon interne

Afin que le piège à métaux soit efficace, le thiosulfate $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, présent dans la solution tampon interne à pH 6,0, devait rester à l'intérieur des vésicules. Pour le vérifier, des liposomes ont été synthétisés puis élués sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique. La fraction jaune, contenant les vésicules dans la solution tampon externe à pH 7,4, a été récupérée et analysée sur spectrophotomètre UV-visible à 432 nm afin de déterminer la quantité de liposomes présents. Une partie de ces vésicules a été solubilisée par ajout de dodécylsulfate de sodium (SDS), un détergent efficace connu (Deo & Somasundaran, 2003), et le thiosulfate total a été analysé par chromatographie ionique (Dionex Integrion HPIC, ThermoFisher). Le thiosulfate a été élué sur une colonne Ion Pac AS16 2 x 250 mm grâce à une solution à 30 mM d'hydroxyde de potassium et détecté en sortie de colonne par un détecteur de conductivité à suppression. Son temps de rétention était de 7,2 min (débit : isocratique, 0,3 mL/min). L'autre partie des vésicules a été éluee une seconde fois sur la colonne après un temps d'attente de 100

min, correspondant à la durée totale des expériences d'assimilation. Les liposomes ont été récupérés en sortie de colonne, analysés sur spectrophotomètre UV-visible et traités avec le SDS avant analyse en chromatographie ionique. Un bilan de masse a été effectué afin de déterminer si les liposomes avaient perdu du thiosulfate pendant la période d'attente.

3.1.3. Exposition des liposomes

3.1.3.1. À l'eau tritiée

Afin de déterminer le potentiel de diffusion des liposomes synthétisés, la perméabilité des liposomes à l'eau a été examinée. Pour ce faire, les liposomes ont été préparés dans une solution tampon interne contenant de l'eau tritiée (activité spécifique initiale : 10 mCi/mL) de manière à encapsuler $^3\text{H}_2\text{O}$ à l'intérieur des vésicules. Les liposomes ont ensuite été transférés dans la solution tampon externe à pH 7,4 tel que décrit dans la partie 3.1.2.4 Changement de milieu. Les fractions ont été collectées tous les 10 ou 20 mL. Le signal de l'eau tritiée a été mesuré dans chaque fraction sur un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2910TR, PerkinElmer). Les analyses ont été faites entre 0 et 18,6 keV avec un temps de comptage de 10 minutes après ajout d'un cocktail à scintillation (Ecolite). L'absorbance de chaque fraction a également été analysée sur un spectrophotomètre UV-Visible à 432 nm. Une expérience contrôle consistant à faire passer la solution d'eau tritiée seule à travers la colonne de chromatographie d'exclusion stérique avait été préalablement effectuée de manière à s'assurer que le volume d'élution de l'eau était bien significativement supérieur à celui des liposomes. Étant donné la propension de l'eau tritiée à s'évaporer, des mesures de sécurité supplémentaires (manipulations sous hotte, réduction du contact des solutions avec l'air) ont été mises en œuvre afin de limiter notre exposition.

3.1.3.2. Résine Ambersep GT 74 : description et efficacité

La résine Ambersep GT 74 (Sigma Aldrich) est une résine échangeuse de cation faiblement acide, utilisée ici sous sa forme sodium afin de minimiser les changements de pH pendant les expériences d'exposition. Pour passer la résine sous cette forme, celle-ci a été placée dans la solution tampon externe et une solution de NaOH 1,0 M a été utilisée pour ajuster le pH de la solution à 7,4.

Les groupements thiols sont les principaux groupements de la résine, la rendant très sélective pour l'argent, le mercure et le cadmium. C'est la raison pour laquelle elle a été choisie afin de traiter les liposomes après leur exposition en captant les métaux non internalisés, présents soit dans la solution d'exposition (A, Figure 3-1a), soit adsorbé à la surface des vésicules et facilement désorbable (B, Figure

3-1a). De plus, contrairement à un ligand qui formerait des complexes solubles avec les métaux, la résine décante très rapidement à la fin du traitement et la solution traitée peut alors être facilement isolée.

Des tests préliminaires ont été effectués avec l'argent dissous afin de déterminer la masse de résine (0,3 à 0,9 g) ainsi que le temps de traitement nécessaire (5, 10 et 15 min) afin d'obtenir une bonne efficacité de captage des métaux. La capacité d'échange totale de la résine étant très élevée (1,30 éq/L), la quantité nécessaire pour capter l'Ag aux concentrations d'exposition est donc très faible. Néanmoins, les masses tests ont été choisies de manière à ce que la pesée soit facilitée et reproductible. Par principe de précaution, les concentrations pour le Hg et le Cd étant plus élevées que pour l'Ag, nous avons choisi d'augmenter la masse de résine utilisée pour ces expériences. L'efficacité de la résine (500 mg) à adsorber les nanoparticules d'argent contenues dans la solution d'exposition 6 a été évaluée pour différents temps de traitement (2, 5 et 10 min). De plus, afin de comprendre le mécanisme d'interaction entre les nanoparticules d'argent et la résine Ambersep, l'efficacité d'une autre résine, la Dowex Optipore L493, a été évaluée. Celle-ci possède une structure polymérique macroporeuse sans aucun groupement fonctionnel et ne peut donc adsorber les nanoparticules que par liaisons hydrophobes. L'efficacité des bouteilles en HDPE de 15 mL seules, sans résine, a également été déterminée. Les parois de ces bouteilles ont en effet tendance à adsorber les métaux (cf. 3.1.3.6. Adsorption des métaux sur les parois des bouteilles).

Pour chaque expérience d'exposition, trois bouteilles en HDPE de 125 mL contenant les mêmes solutions que les bouteilles exposées mais exemptes de liposomes ont été utilisées pour contrôler l'efficacité de la résine. Les résultats ont permis de déterminer la quantité résiduelle de métal ($\mu\text{mol métal / g P}$), c'est-à-dire le métal qui n'a pas été assimilé par les liposomes ni capté par la résine.

3.1.3.3. Aux métaux dissous (Ag, Cd et Hg)

Une solution d'argent radioactive $^{110\text{m}}\text{Ag}$ (AgNO_3 dans 0,1 M HNO_3 , activité spécifique initiale = 5,15 mCi/mL, $[\text{Ag}]_{\text{total}} = 5,0$ mM, Polatom) a été utilisée pour préparer les solutions d'exposition 1 à 3 (Tableau 3-2). Les liposomes ont été exposés pendant 100 min, à pH $7,40 \pm 0,02$, à une concentration nominale en $^{110\text{m}}\text{Ag}$ de 30 nM. La concentration en argent a été choisie de manière à être assez faible pour se rapprocher des concentrations réelles présentes dans l'environnement mais aussi assez élevée pour pouvoir être détectée et quantifiée adéquatement.

Les solutions d'exposition (50 mL) ont été placées dans les bouteilles en polyéthylène haute densité (HDPE) de 125 mL. Une aliquote de chaque solution a été prélevée et analysée sur compteur gamma afin de déterminer la concentration initiale en argent total. La suspension de liposomes (50 mL) a ensuite été

ajoutée à la solution et les bouteilles ont été placées sur un agitateur mécanique (Wrist Action Shaker, Burrell) pour toute la durée de l'expérience. La quantité de liposomes à ajouter a été calculée de manière à ce que la concentration d'exposition en argent ne diminue pas plus de 10% pendant l'expérience. De plus, la concentration en thiosulfate dans la solution tampon interne (1,33 mM) devait rester supérieure à la concentration en argent potentiellement internalisé afin de conserver un gradient de concentration en Ag^+ entre la solution tampon interne et la solution d'exposition. Toutes les 10 min, une aliquote de chaque solution était prélevée et placée dans des bouteilles en HDPE de 15 mL contenant 300 mg de résine Ambersep GT 74. Après 5 min d'agitation sur le Wrist Action shaker, le surnageant, obtenu après décantation de la résine (5 s), a été échantillonné et analysé sur compteur gamma. Chaque analyse a été effectuée sur un compteur gamma automatique (2480 Wizard 2, PerkinElmer) entre 580 et 1020 keV car l'argent radioactif émet des rayonnements à 657,76 keV. Le temps de comptage était de 300 s et le nombre maximum de comptage était de 10^5 évènements.

Des expériences similaires ont été réalisées avec des liposomes préparés dans la solution tampon interne (sans piège) (Tableau 3-1), ne contenant pas de thiosulfate. En absence de piège dans la solution tampon interne, l'argent peut s'adsorber à la surface des liposomes mais également théoriquement diffuser à travers la membrane jusqu'à ce que l'équilibre entre la solution interne et externe aux liposomes soit atteint. Cela a permis, encore une fois, de vérifier l'efficacité du piège à métaux mais également, tel que développé dans la partie 4.6.1 et après comparaison avec les résultats de l'expérience précédente, de différencier l'internalisation de l'argent (positions C, D et E, Figure 3-1b) de son adsorption (B, Figure 3-1b).

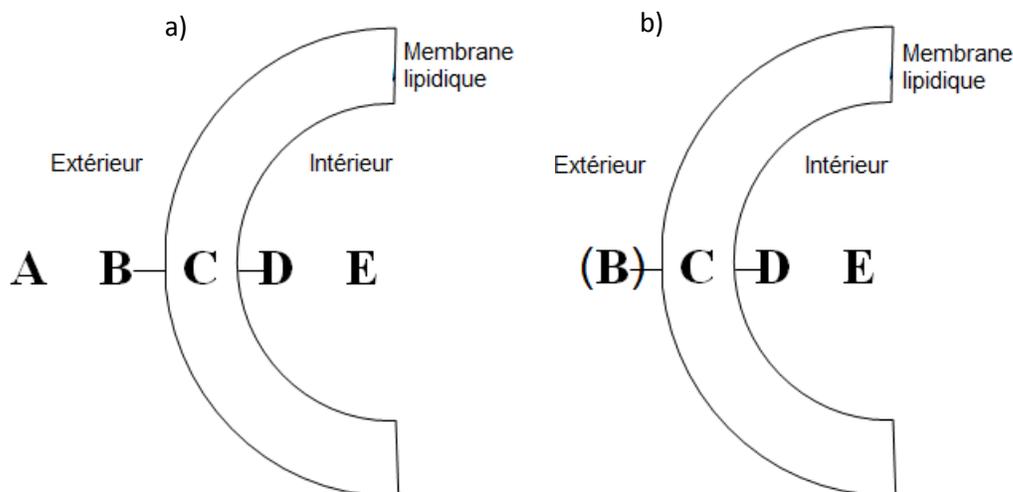


Figure 3-1 : Positions potentielles des métaux après interaction avec les liposomes : A. dans la solution d'exposition, B. et (B) adsorbés à la surface des liposomes, C. à l'intérieur de la bicouche lipidique, D. adsorbés à la surface des liposomes dans la solution tampon interne, E. dans la solution tampon interne avant a) et après b) le traitement avec la résine Ambersep GT 74, (B) théoriquement présents en moins grande quantité qu'avant traitement.

Des expériences similaires ont été effectuées dans un milieu où $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ était l'espèce dominante. La solution d'exposition 5 (Tableau 3-2) a été préparée à partir d'une solution de cadmium radioactif ^{109}Cd (CdCl_2 dans 0,5 M HCl, activité spécifique initiale = 37,1 $\mu\text{Ci/mL}$, $[\text{Cd}]_{\text{total}} = 1,0 \mu\text{M}$, Eckert & Ziegler). Les liposomes, préparés dans la solution tampon interne (EDTA), ont été exposés pendant 100 min à une concentration nominale en ^{109}Cd de 150 nM, tel que décrit précédemment. La résine Ambersep GT 74 (500 mg) a été de nouveau utilisée pour traiter les liposomes exposés au cadmium. Les analyses ont été effectuées sur compteur gamma entre 16 et 32 keV, le cadmium émettant à 22 keV. Le temps de comptage était de 600 s et le nombre maximum de comptage de 10^7 évènements.

Les liposomes ont été également exposés à un milieu où HgCl_2^0 était l'espèce principale (solution d'exposition 4, Tableau 3-2), tel que décrit précédemment. La résine Ambersep GT 74 (500 mg) a été de nouveau utilisée pour traiter les liposomes exposés au mercure. Les analyses ont été effectuées par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS, Model XSeries 2, ThermoScientific). Les échantillons ont été dilués dans 10% HCl et 3% H_2O_2 . Une solution d'or a été ajoutée afin d'atteindre une concentration de 10 mg/L dans la solution, permettant de prévenir l'adsorption du mercure à la surface des tubes. La réponse de l'instrument a été étalonnée entre 0 et 150 nM avec des solutions étalons (PlasmaCAL SCP Science). Le ^{103}Rh (58 nM) a été utilisé comme étalon interne afin de corriger les

fluctuations du signal analytique potentiellement dus aux effets de matrices. Les étalons ICP multiéléments (Custom ICP Standards, SCP Science) ont été utilisés comme contrôles afin de vérifier la précision et l'exactitude de la méthode. Le diamètre moyen des liposomes exposés au mercure pendant 100 min a été analysé à l'aide du Zetasizer Nano-ZS afin de détecter tout changement.

3.1.3.4. Aux nanoparticules d'argent

Une solution de nanoparticules d'argent (Nanocomposix) de concentration initiale égale à 1000 mg/L, d'une taille moyenne de 5 nm et enrobées de polyvinylpyrrolidone (PVP) a été utilisée dans ces expériences.

3.1.3.4.1. Digestion des AgNPs

Les nanoparticules d'argent ont été digérées suivant plusieurs protocoles afin de déterminer les conditions maximales de dissolution. De l'acide nitrique concentrée et de l'eau oxygénée à 30% ont été ajoutés à la solution d'AgNPs à 1000 mg/L dans un tube de 50 mL et celui-ci a été laissé à 90°C pendant 2 h sur un bloc digesteur. À la fin de la digestion, le volume de solution a été complété à 50 mL avec de l'eau MilliQ. Le deuxième protocole consistait à tester l'efficacité de digestion du mélange acide sur une solution diluée d'AgNPs. Pour cela, la solution d'AgNPs à 1000 mg/L a été diluée 100 fois avec de l'eau MilliQ et le protocole explicité précédemment a été appliqué. Dans le troisième protocole, le plus simple, les nanoparticules d'argent ont été seulement digérées avec de l'acide nitrique concentré. Le volume de solution a été complété à 50 mL après ajout de l'acide et sans chauffage sur bloc digesteur. Les analyses ont été effectuées par spectrométrie d'émission atomique avec plasma à couplage inductif (ICP-AES). La réponse de l'instrument a été étalonnée entre 0 et 5 mg/L avec des solutions étalons (PlasmaCAL SCP Science). Les étalons ICP multiéléments (Custom ICP Standards, SCP Science) ont été utilisés comme contrôles afin de vérifier la précision et l'exactitude de la méthode.

3.1.3.4.2. Détermination de la concentration d'exposition en AgNPs

Afin de pouvoir comparer les résultats des expériences d'assimilation des nanoparticules d'argent par les liposomes à ceux des expériences avec l'argent dissous, la concentration en argent libre dans la solution d'exposition 6 devait être égale à celle dans la solution d'exposition 1 (Tableau 3-2). L'ultracentrifugation a donc été utilisée pour déterminer la teneur en argent libre dans des solutions d'AgNPs de différentes concentrations, entre 4,5 et 50 µg/L, préparées à partir de la solution à 1000 mg/L. Les nanoparticules d'argent ont été diluées dans une solution à pH 7,4 tel que présenté dans le 0. Des tubes à ultracentrifugation (Amicon Ultra-15, Millipore), munis de filtres laissant passer les molécules de poids

moléculaire inférieur à 3 kDa, ont été préalablement rincés avec la solution tampon externe afin d'éliminer toute trace de glycérine présente sur les membranes. Les filtres ont ensuite été équilibrés avec les solutions d'AgNPs par centrifugations successives à 3700 x g pendant 20 min, l'argent dissous s'adsorbant de manière non négligeable à la surface des membranes. Après chaque centrifugation, les concentrations en Ag total (dans les fioles en PC contenant les solutions d'AgNPs) et en Ag ultrafiltré étaient analysées par ICP-MS (2% HNO₃). La réponse de l'instrument a été étalonnée entre 0 et 10 µg/L. Le ¹⁰³Rh (58 nM) a été utilisé comme étalon interne afin de corriger les fluctuations du signal analytique potentiellement dus aux effets de matrices. Les étalons ICP multiéléments (Custom ICP Standards, SCP Science) ont été employés comme contrôles afin de vérifier la précision et l'exactitude de la méthode. Le Zr (⁹¹Zr¹⁶O⁺ ou ⁹²Zr¹⁶O¹H⁺) et le Nb (⁹³Nb¹⁶O⁺) pouvant interférer avec, respectivement, ¹⁰⁷Ag et ¹⁰⁹Ag, ont été analysés (10 µg/L) et une correction a été appliquée sur le signal de l'argent. Par exemple, pour le Zr, qui interfère sur le signal du ¹⁰⁷Ag : l'équation de correction (¹⁰⁷Ag = ¹⁰⁷Ag - 0,00321 × ⁹⁰Zr) a été directement appliquée dans le logiciel Thermo Plasmalab de l'ICP-MS. Les termes de l'équation ont été calculés à partir de la valeur du signal d'une solution de Zr (10 ppb) par rapport au signal du blanc :

$$\text{Facteur de correction} = \frac{107\text{Ag} (\text{Zr } 10 \text{ ppb}) - 107\text{Ag} (\text{blanc})}{90\text{Zr} (\text{Zr } 10 \text{ ppb}) - 90\text{Zr} (\text{blanc})}$$

L'équilibre était estimé comme étant atteint après 10 centrifugations successives. La concentration en AgNPs choisie a été celle pour laquelle la concentration en Ag dissous à l'équilibre atteignait environ 2,2 µg/L.

3.1.3.4.3. Étude de l'oxydation des AgNPs en fonction du temps

Le comportement des AgNPs en présence de liposomes a été étudié en fonction du temps. La solution d'exposition 6 a été placée dans les bouteilles en HDPE de 125 mL et les liposomes ont été exposés pendant 100 min, sous agitation. À 0, 32, 58 et 100 min, deux aliquotes de la solution ont été prélevées, l'une analysée pour la concentration en Ag total et l'autre ultrafiltré à 3700 x g pendant 20 min afin de déterminer la concentration en Ag dissous. Les analyses ont été effectuées sur ICP-MS tel que présenté dans le paragraphe précédent. La taille des AgNPs n'a pas pu être caractérisée car la concentration dans la solution était trop faible.

3.1.3.4.4. Intégrité des liposomes en présence de AgNPs

Les fuites potentielles du colorant rouge de phénol lors de l'exposition des liposomes aux nanoparticules d'argent ont été analysées sur spectrophotomètre UV-visible afin de s'assurer que les liposomes restaient intègres lors des expériences. Pour cela, un volume de 3,6 mL de liposomes préparés dans la

solution tampon interne a été placée dans des tubes en HDPE de 15 mL afin d'atteindre une concentration d'environ 30 mg P/L. À cela a été rajouté 400 µL de solution tampon externe (contrôle) ou de suspension d'AgNPs à 19,4 µM. Les solutions ont été agitées pendant 100 min sur l'agitateur mécanique, à vitesse maximale. Toutes les 10 min, 300 µL ont été prélevés dans chacune des solutions et analysés sur spectrophotomètre UV-visible à 432 nm.

3.1.3.4.5. Protocole d'exposition

Le protocole d'exposition des liposomes aux nanoparticules d'argent était similaire à celui présenté dans la partie 3.1.3.3 Aux métaux dissous. La solution d'exposition 6 (Tableau 3-2) a été préparée à partir de la solution d'AgNPs de 1000 mg/L. Les liposomes, préparés dans la solution tampon interne (contenant du thiosulfate), ont été exposés pendant 100 min. Toutes les 10 min, un traitement de 5 min avec la résine Ambersep GT 74 (500 mg) a été appliqué aux liposomes exposés aux nanoparticules. Les analyses ont été effectuées par ICP-MS tel qu'explicité dans la partie 3.1.3.4.2 Détermination de la concentration d'exposition en AgNPs.

3.1.3.5. Intégrité des liposomes pendant les expériences d'assimilation

Afin de vérifier que les liposomes ne se brisaient pas lors des expériences présentées précédemment, deux aliquotes d'une suspension de LUVs à 24 mg P/L dans la solution tampon externe ont été respectivement soumis à une agitation mécanique pendant 30 min puis à un traitement avec la résine Ambersep GT74 pendant 2 min (agitation + résine) et à l'agitation mécanique seule (agitation). Ils ont ensuite été élués sur la colonne de chromatographie stérique et les fractions collectées ont été analysées sur spectrophotomètre UV-visible à 432 nm. Le phosphore total contenu dans chaque fraction a été calculé grâce à la courbe d'étalonnage, présentée précédemment. Une troisième aliquote de la suspension a été directement élue sur la colonne afin de servir de contrôle (sans traitement). En comparant les trois traitements (agitation + résine, agitation et sans traitement), les contributions respectives de l'agitation et du traitement avec la résine ont pu être déterminées.

3.1.3.6. Adsorption des métaux sur les parois des bouteilles

Les parois des bouteilles en HDPE 125 mL, utilisées pour les expériences d'exposition, avaient tendance à adsorber les métaux. Des expériences préliminaires ont donc été effectuées afin de caractériser les pertes par adsorption. Les solutions d'exposition (Tableau 3-2) ont été placées dans les bouteilles et la concentration en métal dissous a été suivie au cours du temps. Pour cela, des aliquotes de la solution ont été prélevées à 2, 18 et 24 h, analysées sur compteur gamma pour l'Ag et le Cd dissous ou par ICP-MS

pour le Hg et l'Ag nanoparticulaire et les résultats ont été comparés à la concentration en métal au temps 0. Si cela était nécessaire et si l'équilibre entre la solution et les parois était rapidement atteinte, les bouteilles étaient prééquilibrées avec les solutions d'exposition.

Pour chaque expérience d'exposition, les trois bouteilles en HDPE de 125 mL contenant les mêmes solutions que les bouteilles exposées mais exemptes de liposomes, mentionnées plus haut, ont été soumises au même traitement et ont été utilisées pour contrôler l'adsorption durant l'expérience.

3.1.3.7. Traitement statistique des données

Toutes les expériences ont été effectuées au moins deux fois avec un minimum de deux répétitions pour chaque expérience ($n \geq 2$). La normalité des données a été analysée grâce au test Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances a été vérifiée avec le test de Levene. Le test de Student a été utilisé pour comparer des distributions de taille $n = 2$. Le test ANOVA à un facteur a été appliqué pour comparer des distributions de taille $n > 2$. L'effet du temps d'exposition sur l'accumulation des métaux par les liposomes a été évalué en utilisant des régressions linéaires. Des régressions non-linéaires (fonction exponentielle, Boullemant *et al.* (2009)) ont été appliquées lorsque les résultats suggéraient une diffusion passive des métaux. Les analyses statistiques ont été faites à un intervalle de confiance de 95% ($\alpha = 0,05$) grâce au logiciel SigmaPlot 12.5 et les graphiques ont été réalisés grâce au même logiciel.

La mise au point et la mise en place du protocole expérimental (présenté ci-dessus), et plus spécifiquement le changement de milieu (3.1.2.4) et l'exposition des liposomes aux métaux dissous (3.1.3.3), constituent les étapes qui ont demandé le plus de temps à développer. Deux colonnes de différentes dimensions ont été testées avant de parvenir à une séparation acceptable de la fraction liposomes et de la fraction solutions tampon externe. De plus, plusieurs méthodes ont été expérimentées afin d'isoler les liposomes du reste de la solution d'exposition. La mise au point du protocole n'a pu être initiée que suite à la première utilisation de la résine Ambersep GT 74, l'idée nous ayant été donnée par des chercheurs australiens.

3.2. Expériences en mésocosmes

Un schéma de l'installation est présenté sur la Figure 3-2. Les mésocosmes étaient stockés à l'intérieur de la station aquicole de l'ISMER (Pointe-au-père). L'eau douce injectée dans les mésocosmes provenait de l'aqueduc de Rimouski. Toute trace de chlore dissous a été retirée grâce à un déchlorinateur avant emploi dans les mésocosmes. Une analyse par ICP-MS a démontré que la concentration naturelle en argent dans cette eau était de 0,003 $\mu\text{g/L}$ (cf. Annexe 7 : Analyse ICP-MS des eaux de Rimouski, utilisées

dans l'expérience en mésocosmes). Ce « bruit de fond » a été pris en compte dans l'interprétation des résultats. Afin de s'approcher de la composition naturelle du Saint-Laurent, de l'argile (10 mg/L, SWy-2, The Clay Minerals Society) et de la matière organique dissoute (MOD) ont été ajoutés en continu dans les mésocosmes 1 à 3. Une équipe travaillant sur la biogéochimie de la matière organique (Jean-Pierre Gagné et Mathieu Millour de l'Institut des sciences de la mer (ISMER)), s'occupait de l'ajout de la MOD dans les mésocosmes. Tous les 10 jours, 2 200 L d'eau de la rivière Sainte-Anne à Pointe-au-Père était échantillonnée. Cette eau riche en matière organique dissoute, 75-85 mg C/L, a été ajoutée dans les mésocosmes à un débit de 50 mL/min afin d'obtenir une concentration de 5-6 mg C/L dans la couche d'eau douce. La température était mesurée quotidiennement à la surface des mésocosmes (en moyenne entre 13,8 et 16,5 °C), à l'interface et au fond des mésocosmes (en moyenne entre 9,7 et 13,1 °C). Des tubes fluorescents ont été placés au-dessus des mésocosmes, créant une photopériode jour/nuit suivie pendant toute la durée de l'expérience. L'eau douce, stockée dans le mésocosme 5, a été saturé en oxygène par bullage.

Des nanoparticules d'argent enrobées de citrate d'environ 20 nm de diamètre ($21,4 \pm 4,1$ nm) ont été utilisées pour cette étude et injectées en continu en haut des mésocosmes 2 et 3, le mésocosme 1 servant de témoin. La concentration finale dans les mésocosmes a été fixée à 10 µg/L. Celle-ci excède les concentrations qu'on estime retrouver dans l'environnement mais il était essentiel de pouvoir détecter les nanoparticules d'argent une fois introduites dans les mésocosmes. Après la synthèse des AgNPs, la suspension a été nettoyée par ultracentrifugation afin d'éliminer plus de 99% de l'argent dissous. La suspension a été gardée au frigo et en absence de lumière (3 semaines au maximum avant utilisation).

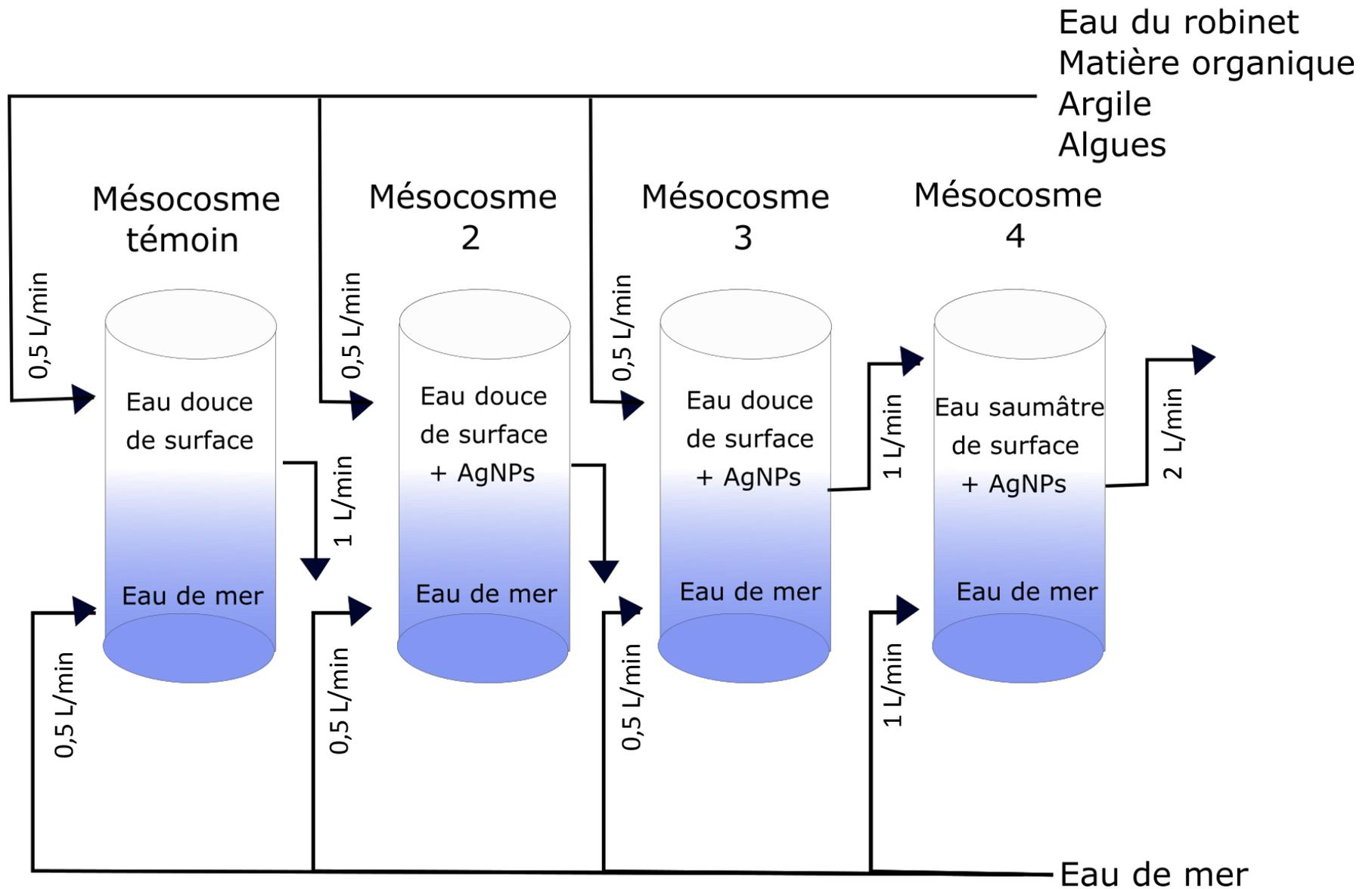


Figure 3-2: Schéma expérimental pour les travaux en mésocosmes

3.2.1. Modèles biologiques

Pour l'étude en mésocosmes effectuée durant ce doctorat, deux modèles biologiques ont été choisis, l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* et l'invertébré aquatique *Daphnia magna*. Les raisons de ces choix sont présentées ci-dessous.

3.2.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii est une algue unicellulaire d'eau douce, de forme ellipsoïdale et d'environ 5 μm de diamètre (Figure 3-3). Sa motilité dans l'eau est assurée par deux flagelles. Sa paroi cellulaire est majoritairement composée de glycoprotéines.

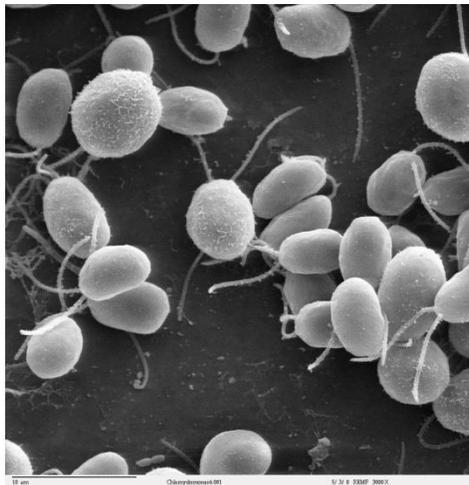


Figure 3-3 : Observation au microscope électronique à balayage de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (Dartmouth Electron Microscope Facility, 2007)

Cette algue est largement utilisée dans les études écotoxicologiques, car au niveau génétique et biochimique, c'est l'un des organismes photosynthétiques unicellulaires le mieux connu à ce jour. Elle est relativement facile à cultiver en milieu simple et est tolérante aux changements de pH (Harris, 2009) et de salinité (Fortin & Campbell, 2001). *Chlamydomonas reinhardtii* a été utilisée à plusieurs reprises comme organisme modèle dans l'étude des interactions avec les nanoparticules d'argent et l'argent ionique (Chen *et al.* (2013); Piccapietra *et al.* (2012a) ; Miao *et al.* (2009) ; Navarro *et al.* (2008b) ; Hiriart-Baer *et al.* (2006) ; Lee *et al.* (2005) ; Fortin & Campbell (2001) ; Fortin & Campbell (2000)), notamment dans notre laboratoire.

3.2.1.2. *Daphnia magna*

Daphnia magna est un microcrustacé d'eau douce, appartenant à l'ordre des Cladocères, mesurant d'un à cinq millimètres de long (Figure 3-4) et s'alimentant majoritairement d'algues, récupérées par filtration.



Figure 3-4 : *Daphnia magna* : femelle adulte (Watanabe, 2011)

C'est un organisme de référence (USEPA : United States Environmental Protection Agency ; OECD : Organization for Economic Cooperation and Development ; ISO : International Standards Organization), très utilisé en écotoxicologie (Asghari *et al.*, 2012). Il est très sensible aux métaux, ce qui permet d'avoir une bonne estimation de leur impact sur le zooplancton d'eau douce (Lam & Wang, 2006). Il est recouvert d'une carapace transparente, ce qui permet d'observer ses organes internes au microscope. Il a été récemment démontré que les nanoparticules d'argent en solution et liées aux algues (notamment à *Chlamydomonas reinhardtii*) pouvaient se retrouver dans *D. magna* (Asghari *et al.* (2012), McTeer *et al.* (2014)). Enfin, c'est un organisme utilisé régulièrement par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, qui travaille en partenariat avec notre laboratoire.

3.2.2. Détermination de l'argent dialysable à la surface des mésocosmes

La concentration en argent dissous (ou dialysable) a été déterminée dans chacun des trois mésocosmes par dialyse. La dialyse est basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable. Les molécules diffusibles, c'est-à-dire ayant une masse inférieure à la limite d'exclusion, vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. À l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible seront égales de part et d'autre de la membrane.

Des sacs à dialyse avec une limite d'exclusion (MWCO) de 100 à 500 Da (Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2, 10 mL, Spectrumlabs) ont été remplis d'eau MilliQ et installés dans chacun des trois mésocosmes (en triplicate). Ils avaient été préalablement trempés dans une solution à 10% d'isopropanol pendant 10 min, puis rincés et immergés dans de l'eau déionisée pendant 15 à 20 min. Cette étape de pré-rinçage permet

d'humidifier la membrane et de retirer la couche protectrice de glycérine. Les sacs ont été alors placés sur un anneau de flottaison et laissés dériver à la surface des mésocosmes.

Des aliquotes (1 ou 1,8 mL) ont été prélevés à l'intérieur et à l'extérieur des sacs à chaque 3 à 10 j afin d'être analysées par ICP-MS. Des tests menés précédemment dans notre laboratoire (Chen *et al.*, 2012) avaient en effet démontré que l'équilibre entre la concentration en argent dissous à l'intérieur et à l'extérieur des sacs était atteint au bout de 2 j. Les sacs étaient remplacés après trois prélèvements.

La concentration en argent dissous ou dialysable a été définie comme étant la concentration à l'intérieur des sacs à dialyse. Afin de déterminer la concentration en argent total, à l'extérieur des sacs à dialyse, l'eau douce a été échantillonnée à 10 cm en dessous de la surface des trois mésocosmes, grâce à une pompe. Tous les échantillonnages de l'eau douce ont été effectués de cette façon, afin d'éviter d'agiter la surface et de perturber le biofilm s'étant formé à l'interface entre l'eau des mésocosmes et l'air et afin de permettre in fine de comparer nos résultats. Les échantillons ont été conservés dans des tubes en polypropylène à l'obscurité et à 4°C.

La concentration en carbone inorganique a été mesurée à l'aide d'un analyseur de carbone organique total (TOC-VCPH, Shimadzu). Les concentrations en ions chlorure et sulfate ont été déterminées par chromatographie ionique dans les trois mésocosmes (résine échangeuse d'ion : Ion PAC AS18 4mm, Dionex ICS-2000).

3.2.3. Culture d'algue et densité cellulaire dans les mésocosmes

Afin d'éviter toute contamination bactérienne, tout le matériel utilisé pour la culture des algues ou leur transfert a été stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 min (Sanyo Labo Autoclave). L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC 11, souche sauvage avec paroi cellulaire, Canadian Phycological Culture Centre, Université de Waterloo) a été cultivée dans un chémostat placé initialement dans une chambre environnementale (Conviron CMP4030) à 22°C sous éclairage ($100 \pm 10 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) et agitation rotative ($\sim 50 \text{ tr}/\text{min}$). Un chémostat est un bioréacteur dans lequel sont mis en culture continue des organismes dont on veut contrôler la croissance. Un schéma de son fonctionnement est présenté sur la Figure 3-5.

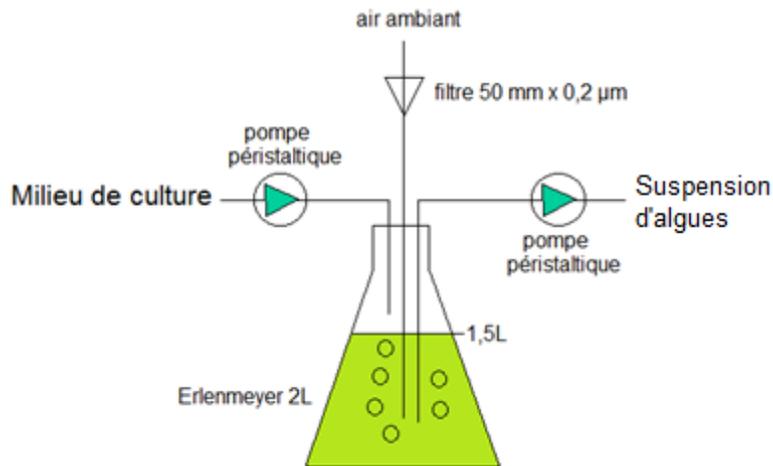


Figure 3-5 : Schéma de fonctionnement du chémostat

Du milieu de culture frais (MHSM-1), dont la composition est présentée dans le Tableau 3-3, est ajouté en continu dans le chémostat, les algues étant retirées en même temps et à la même vitesse de manière à garder un volume constant. Le milieu de culture est préparé à partir de six solutions stock conservées à l'obscurité à 4°C. Ces solutions ont été préalablement filtrées sur une membrane filtrante de 0,2 µm de porosité afin d'éliminer les bactéries ainsi que toutes les particules pouvant créer un biais lors du comptage des algues ou adsorber les métaux en solution.

La solution de culture, avant ajout des éléments traces (AAP : algal assay procedure), a été stérilisée par autoclave. La concentration en tampon à pH (MOPS), initialement à 10 mM a été réduite à 1 mM de manière à diminuer l'apport en carbone organique, paramètre devant faire l'objet d'un suivi dans les mésocosmes.

À la fin du cycle de croissance des algues (phase stationnaire, $\sim 1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL), la vitesse du système a été optimisée de manière à ce que la densité cellulaire reste constante (~ 1 mL/min). Un bullage d'air ambient filtré (unité de filtration Millex, stérile, 50 mm x 0,2 µm PTFE hydrophobe, Millipore) a été maintenu pendant toute la durée de l'expérience.

Trois de ces chémostats ont été transférés à la station aquicole de l'ISMER afin d'y être utilisés. Au début de l'expérience, une quantité appropriée d'algues a été directement introduite dans les trois mésocosmes afin d'atteindre une densité cellulaire comprise entre 1000 et 2000 cellules/mL. Par la suite, les algues, récupérées à chaque jour en sortie des chémostats, ont été ajoutées en continu à l'aide d'une pompe péristaltique dans les mésocosmes afin d'y maintenir une densité relativement stable.

La densité cellulaire dans les chémostats a été mesurée au compteur à particules (Multisizer 3, Beckman Coulter, ouverture 70 μm). Pour cela, une aliquote de la culture a été prélevée et diluée dans une solution isotonique (Isoton[®] II Diluent, Beckman Coulter) avec un facteur de dilution dépendant de la densité cellulaire à analyser. La densité cellulaire dans le chémostat, en nombre de cellules/mL, a été déduite du nombre de cellules données par le compteur, en prenant en compte le facteur de dilution ainsi que le volume analysé.

Afin de déterminer la densité cellulaire dans les mésocosmes, inférieure à la limite de détection du compteur de particules, un dosage fluorométrique de la chlorophylle-a a été mis en œuvre. L'eau douce récupérée des trois mésocosmes et conservée dans des récipients ambrés en verre borosilicate (250 ou 500 mL) à l'obscurité et à 4°C, a été filtrée sur un filtre en nitrocellulose de 3 μm de largeur de pores. La chlorophylle-a a ensuite été extraite des filtres par 10 mL d'une solution d'acétone à 90% (Reagent Grade). Les échantillons ont été conservés au minimum 24 h à l'obscurité à -20°C avant de subir une agitation vortex pendant 2 min, servant à maximiser l'extraction. Ils ont enfin été centrifugés à une vitesse de 1500 à 2000 tours/min pendant 10 min avant d'être analysés (longueur d'onde d'excitation et d'émission : respectivement 436 nm et 680 nm) sur un fluoromètre (modèle 10, Turner Designs).

Tableau 3-3 : Composition de la solution de culture MHSM-1

Traitement	Solution stock (filtrée sur 0,2 µm)	Produit	Concentration dans MHSM-1 (M)	Fournisseur, grade
Stérilisation par autoclavage	MOPS (100 mM)	MOPS	$1,00 \cdot 10^{-3}$	Sigma Aldrich, pour ICP
	Ammonium #2	NH ₄ NO ₃	$9,37 \cdot 10^{-4}$	Fisher, ACS
		MgSO ₄ , 7 H ₂ O	$8,12 \cdot 10^{-5}$	Caledon, ACS
		Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	$6,80 \cdot 10^{-5}$	Sigma Aldrich, min 99,0%
	Phosphate #2	KH ₂ PO ₄	$5,44 \cdot 10^{-5}$	EMD, ACS
		K ₂ HPO ₄	$8,27 \cdot 10^{-5}$	EMD, ACS
	KNO ₃ (1 M)	KNO ₃	$4,00 \cdot 10^{-3}$	EMD, ACS
	NaOH (1 M)	NaOH	$4,25 \cdot 10^{-3}$	Fisher, ACS
Ajouté 24 h après autoclavage	AAP	H ₃ BO ₃	$3,01 \cdot 10^{-6}$	Sigma Aldrich, Ultra
		MnCl ₂ , 4 H ₂ O	$2,10 \cdot 10^{-6}$	Fisher, ACS
		FeCl ₃ , 6 H ₂ O	$5,92 \cdot 10^{-7}$	Sigma, min 98,0%
		Na ₂ EDTA, 2 H ₂ O	$8,02 \cdot 10^{-7}$	Sigma Aldrich, Reagent
		Zn (1 g/L)	$2,43 \cdot 10^{-8}$	SCP Science, pour ICP
		Co (1 g/L)	$1,09 \cdot 10^{-8}$	SCP Science, pour ICP
		Mo (1 g/L)	$3,00 \cdot 10^{-8}$	SCP Science, pour ICP
		Cu (1 g/L)	$7,03 \cdot 10^{-11}$	SCP Science, pour ICP

Une courbe d'étalonnage donnant la densité cellulaire en fonction de la concentration en chlorophylle-a a été élaborée en diluant plusieurs fois la culture d'algues initiale, de densité connue, dans l'eau douce

du mésocosme 1 (contrôle) récupérée avant ajout des algues et en dosant la chlorophylle-a dans chacune des solutions comme indiqué plus haut.

3.2.4. Bioaccumulation de l'argent par les algues

L'objectif de cette partie de l'étude était de déterminer l'accumulation d'argent dans les algues dans les conditions expérimentales des mésocosmes.

L'argile et les algues, présentes dans les mésocosmes, sont récupérées simultanément par filtration. Il a en effet été observé que seul un faible volume d'eau des mésocosmes arrivait à passer à travers le filtre, et que celui-ci était nettement inférieur au volume pouvant être filtré d'une solution sans argile. Il s'est avéré qu'il n'était pas possible de les séparer. Or, les nanoparticules d'argent sont connues pour s'adsorber fortement à la surface des argiles (Zhou *et al.*, 2012). Cela entraînerait donc un biais possible au moment de la détermination de l'argent internalisé ou adsorbé à la surface des algues si les particules d'argile et les algues sont retenues par les filtres.

L'eau douce récupérée des trois mésocosmes a donc d'abord été centrifugée afin de réduire le biais potentiel relié à la coexistence d'argiles et d'algues sur les filtres. Les algues, possédant une densité proche de celle des argiles, ont été majoritairement éliminées par centrifugation en même temps que celles-ci. La vitesse de centrifugation efficace a été déterminée en comparant la turbidité du surnageant avec celle obtenue après filtration sur un filtre en polycarbonate de 0,2 μm de largeur de pore, à l'aide d'un turbidimètre (modèle 2100A, Hach). La concentration en argent total et la concentration en carbone organique total ont été également déterminés avant et après centrifugation à l'aide, respectivement, d'un ICP-MS (XSeries 2, Thermo Scientific) et d'un analyseur de carbone organique total (TOC-VCPH, Shimadzu). Ces mesures ont été faites afin d'évaluer la perte en argent et en carbone organique due à la centrifugation.

Des cellules algales ont ensuite été ajoutées à 100 mL de chaque surnageant, afin d'atteindre une densité d'environ 40 000 cellules/mL, et exposées pendant 1 h. Trois répétitions par mésocosme ont été réalisées. Afin de prendre en compte l'effet possible des particules pouvant ne pas avoir été éliminées par l'étape de centrifugation, les surnageants des eaux des trois mésocosmes, échantillonnés avant le début de l'ajout des algues, ont été utilisés comme témoins.

À la fin de l'exposition, les algues ont été récupérées par filtration sur deux filtres en polycarbonate superposés de porosité de 2 μm . Les cellules ont été lavées avec 4 x 10 mL d'une solution de thiosulfate de sodium à 200 μM afin de désorber l'argent de la surface des algues. À chaque passage à travers les

filtres, le filtrat était récupéré afin de calculer un bilan de masse. Le filtre supérieur, servant à récupérer les algues, et le filtre inférieur, permettant de contrôler l'adsorption de l'argent sur la membrane filtrante, ont été récupérés, séchés à 70°C pendant 24 h et digérés par une solution d'acide nitrique concentré à 90°C pendant 1 h. Les échantillons ont ensuite été analysés par ICP-MS après une dilution appropriée.

L'argent dissous avant et après exposition a été déterminée grâce à une technique d'ultrafiltration par centrifugation. Le tube à centrifuger en polypropylène (Amicon ultra, 3 kDa MWCO, Millipore) est muni d'une membrane filtrante en cellulose régénérée laissant passer les composés de poids moléculaire inférieur à 3 kDa. Un volume de 4,5 mL d'échantillon a été injecté dans le tube et centrifugé à 3 700 × g pendant 20 min. La concentration en argent dissous a été définie comme étant la concentration en argent dans le filtrat. Afin d'évaluer le niveau d'adsorption de l'argent sur la membrane, une concentration connue d'argent radioactif (0,10 et 0,15 µg/L, ^{110m}Ag) a été ajoutée dans le surnageant du mésocosme 1 (témoin). Les pertes en argent après un à quatre cycles d'ultrafiltration par centrifugation ont alors été déterminées. La membrane avait été préalablement équilibrée avec 4,5 mL de ce même surnageant sans ajout d'argent.

3.2.5. Bioaccumulation de l'argent par *Daphnia magna*

3.2.5.1. Élevage de *Daphnia magna*

Les élevages de daphnies ont été réalisés par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Les daphnies femelles, se reproduisant par parthénogenèse, ont été élevées dans des aquariums de 16 L contenant 10 L d'eau, placées dans une chambre environnementale ou une enceinte d'élevage appropriée. L'eau utilisée était une eau municipale déchlorée, à une température de 20 ± 2°C et un pH compris entre 6,5 et 8,5. L'eau a été préalablement saturée en oxygène filtré et le barbotage maintenu en tout temps. La dureté de l'eau devait être comprise entre 160 et 180 mg/L et doit être ajustée au besoin. Des daphnies adultes (entre 12 et 37 j) ont été utilisées pour les expériences de bioaccumulation.

Une photopériode de 16 h de jour et 8 h d'obscurité a été appliquée. Pendant la période de jour, l'éclairage a été obtenu grâce à des tubes fluorescents Cool White placés au-dessus des aquariums. L'intensité lumineuse devait être en tout temps maintenue entre 6,2 et 13,7 µE/m²/s à la surface de l'eau. Les daphnies ont été nourries 7 jours sur 7 à l'aide de culture concentrée d'algues vertes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) et d'une solution d'extrait de bœuf et de dextrose.

Afin d'assurer une production stable de daphnies, des contrôles physico-chimiques de l'eau d'élevage (température, oxygène dissous, pH, dureté) et des contrôles de la santé des daphnies (absence d'éphippie, mortalité, nombre moyen de néonates) ont été régulièrement effectués (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec - Ministère du Développement durable, 2011).

3.2.5.2. Exposition des daphnies en laboratoire

Afin d'estimer la bioaccumulation de l'argent dans les daphnies, cinq organismes ont été transférés dans 500 mL d'eau provenant des mésocosmes 1 à 3. Cinq répétitions par mésocosme ont été réalisées. Les daphnies ont été récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur après 22 h d'exposition à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et $9,9 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ et transférées dans 500 mL d'eau déchlorée afin de s'épurer pendant 6 h. Cette dernière étape a permis de ne récupérer que l'argent réellement bioaccumulé dans les daphnies ou adsorbé à leur surface. Les daphnies ont ensuite été placées toute une nuit dans un four à 80°C pour y être séchées.

Elles ont ensuite été digérées par 1 mL d'acide nitrique concentré à l'autoclave à 121°C pendant 45 min. Le DOLT-4, un matériau de référence certifié, de concentration en argent connue, a été utilisé pour contrôler la qualité de la digestion. Deux blancs (eau MilliQ) ainsi que cinq daphnies non exposées ont également été digérés de manière à prendre en compte la contamination potentielle. Les échantillons ont ensuite été dilués et analysés sur ICP-MS.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Synthèse des liposomes

4.1.1. Taille des liposomes

Le Tableau 4-1 présente les diamètres moyens des liposomes déterminés immédiatement après leur synthèse, après leur transfert vers la solution tampon externe et à la fin de l'expérience d'exposition au mercure. Ceux-ci sont donnés en intensité (*Z-average*) et en volume (*Volume mean*). La distribution en intensité, calculée à partir de l'intensité du signal de l'instrument est le type de distribution le plus utilisé dans la littérature pour présenter des résultats de taille de particules. Néanmoins, cette distribution est fortement affectée par la présence de grosses particules et n'est valable que pour des échantillons monodispersés, c'est-à-dire possédant un indice de polydispersité (PDI) inférieur à 0,1. Elle peut être convertie en une distribution en volume qui prend en compte le volume des particules. L'autre distribution existante, en nombre, est déduite de la distribution en intensité et est moins employée car plus tributaire des erreurs dues à l'appareil (Malvern, 2004).

Tableau 4-1 : Distributions de taille des liposomes, déterminées par diffusion dynamique de la lumière, après leur synthèse, après leur changement de milieu et après leur exposition au mercure. Moyenne \pm écart type. Des différences significatives ont été observées entre les deux distributions après synthèse et entre les distributions après synthèse et les distributions après changement de milieu (test de Student, $p < 0,05$).

	Après synthèse (n=4) Pdl* = 0,13 \pm 0,02	Après changement de milieu (n=6) Pdl* = 0,112 \pm 0,005	Après exposition au mercure (n=1) Pdl* = 0,160
Z-average size	161,8 \pm 1,6 nm	151,2 \pm 5,6 nm	142,5 nm
Volume mean	173,0 \pm 2,0 nm	152,0 \pm 6,0 nm	144,1 nm

*Pdl : Indice de polydispersité

Les distributions en intensité et en volume après synthèse étaient significativement différentes (test de Student, $p < 0,05$). L'indice de polydispersité étant supérieur à 0,1, la distribution en volume (volume mean) a été choisie comme valeur de référence. De plus, les diamètres des liposomes après la synthèse et après le transfert vers la solution tampon externe étaient également significativement différents (test de Student, $p < 0,05$). La taille des liposomes diminuait donc légèrement (de 173 à 152 nm) après leur changement de milieu. Cela pourrait être dû au gradient de pH transmembranaire qui se forme après passage dans la colonne entre la solution interne et la solution externe des liposomes. Une autre hypothèse serait que la totalité des liposomes n'a pas été récupérée en sortie de colonne et qu'étant donné la largeur du pic (Figure 4-1), ce sont des vésicules de plus petit diamètre qui ont été collectées. Notons tout de même que la diffusion dynamique de la lumière a tendance à surestimer la largeur des pics et que cet effet est amplifié lors de la transformation des distributions en intensité en distribution en volume (Tay *et al.*, 2015).

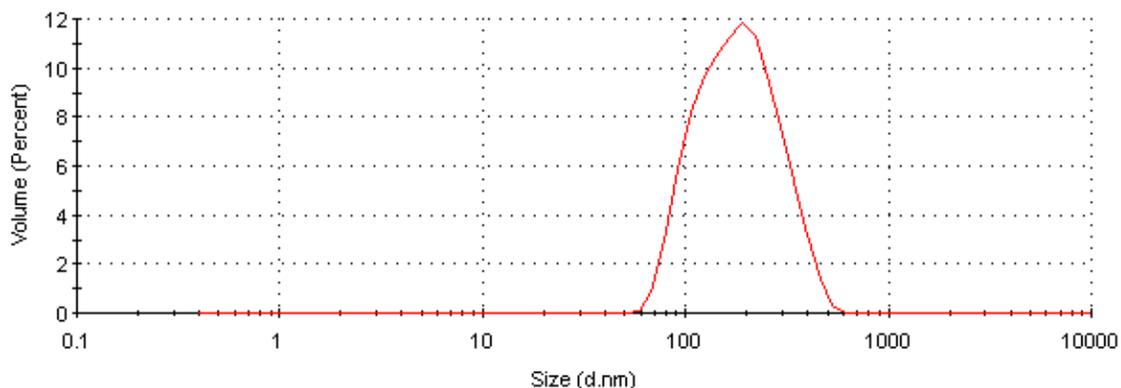


Figure 4-1 : Distribution de taille en volume d’une suspension de liposomes après synthèse, rapportée par le Zetasizer Nano ZS.

4.1.2. Changement de milieu

Les liposomes (fraction de couleur jaune) éluait sur la colonne de chromatographie d’exclusion stérique après environ 70 mL (Figure 4-2). La deuxième fraction, en rouge, correspondant à la solution tampon interne (plus spécifiquement au rouge de phénol) initialement présente à l’extérieur des vésicules, éluait beaucoup plus tard, à un volume aux alentours de 265 mL. Le choix d’une colonne de 20 cm de longueur était donc approprié, celle-ci permettant une bonne séparation entre les deux fractions. Le bruit de fond à 432 nm était relativement bas (absorbance $\sim 0,06$) et les résultats étaient reproductibles : le volume d’élution de la fraction LUVs ainsi que la différence de volume entre les deux fractions étaient similaires pour les trois répétitions.

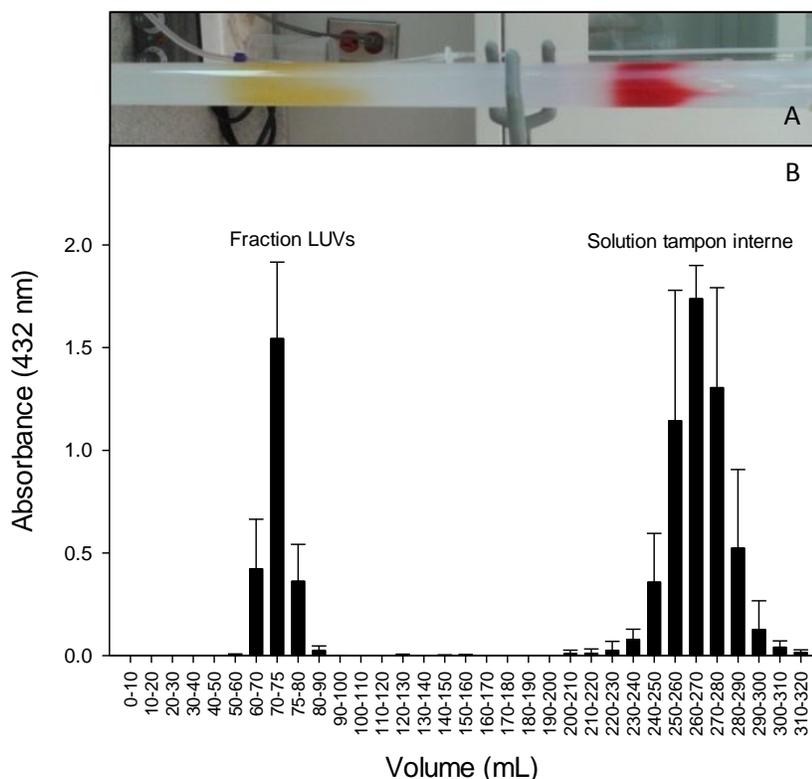


Figure 4-2 : Éluion des liposomes sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique en vue de leur transfert de la solution tampon interne vers la solution tampon externe : (A) photo retournée de la colonne et (B) absorbance à 432 nm des fractions collectées. Moyenne \pm écart type (n=3). Vitesse moyenne d'éluion: 3 mL/min.

4.1.3. Concentration en LUVs

La courbe d'étalonnage permettant de déterminer la concentration en phosphore total à partir de l'absorbance à 432 nm de 300 μ L d'une suspension de liposomes est présentée sur la Figure 4-3. Une régression linéaire a été réalisée sur l'ensemble des données, nous permettant d'obtenir la relation entre concentration en phosphore total et absorbance :

$$[P_{total}] (g / L) = \frac{Absorbance (432nm) + 0,0226}{30,6} \quad \text{éq. (4-1)}$$

Pour des liposomes de 150 nm de diamètre (Tableau 4-1), l'équation (3-4) nous permettait de déterminer le nombre de liposomes par mL de solution N_{lip} .

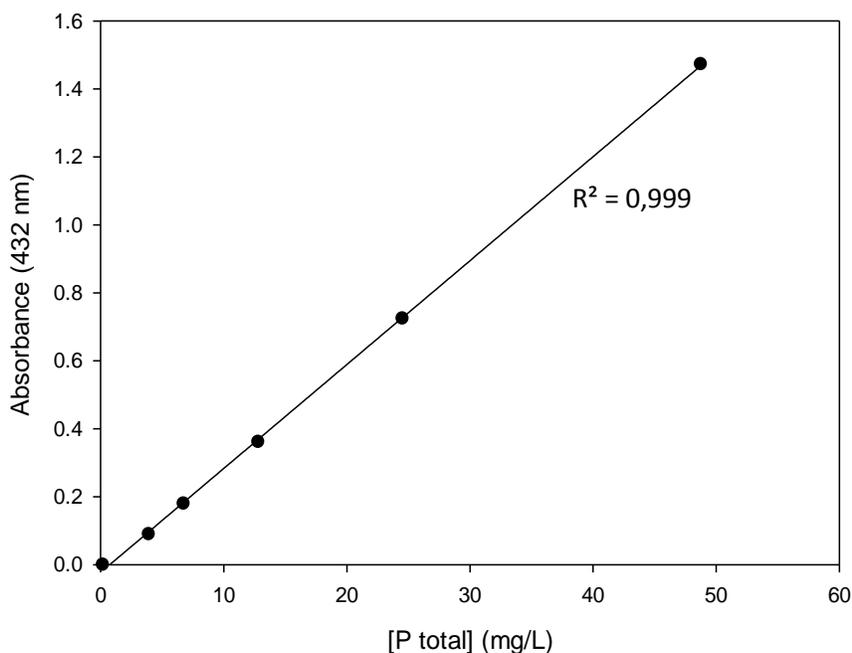


Figure 4-3 : Courbe d'étalonnage donnant la concentration en phosphore total en fonction de l'absorbance à 432 nm d'un volume de 300 μ L de LUVs analysé sur microplaques.

4.1.4. Efficacité du piège à métaux

Les concentrations en thiosulfate ont été déterminées dans des liposomes qui ont été élués deux fois sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique, les éluions étant séparées par un temps de 100 min correspondant à la durée totale des expériences d'assimilation. Après la première élution, la fraction jaune (10 mL) récupérée contenait une concentration de $30,9 \pm 6,0$ mg P/L, soit environ $2,2 \cdot 10^{12}$ LUVs/mL. En se basant sur la concentration nominale de la solution mère de phospholipides (100 g PC/L), la concentration que l'on aurait théoriquement dû obtenir était de 44,7 mg P/L, soit un écart d'environ 30% avec la valeur expérimentale. Cette différence pourrait être due à la dégradation partielle des liposomes lors de leur passage dans la colonne. Dans certains cas, l'absorbance cumulée autour du pic principal n'était, en effet, pas négligeable. Les pertes en phosphore ont également pu se faire lors de l'étape de synthèse des liposomes. Nous n'avons cependant pas jugé nécessaire de déterminer ces pertes, étant donné que, pour nos expériences, nous nous basions directement sur la concentration en phosphore total retrouvée dans les fractions collectées. La concentration en thiosulfate dans la même fraction était de $0,19 \pm 0,03$ mg/L. Sachant que le volume interne d'un liposome de 150 nm est de $1,4 \cdot 10^{-18}$ L, cela correspond à une concentration de $0,50 \pm 0,08$ mM S_2O_3 dans le volume interne d'un LUV. La

valeur théorique est de 1,33 mM, soit un écart d'environ 59% avec la valeur expérimentale. Pendant les manipulations expérimentales, les ions thiosulfate $S_2O_3^{2-}$ semblent donc graduellement sortir des vésicules en diffusant à travers la membrane. Néanmoins, cette fuite n'altère que peu l'efficacité du piège à métaux. En effet, le complexe $Ag(S_2O_3)_2^{3-}$ est majoritaire quand l'argent se trouve en présence d'une concentration de 1,33 mM en thiosulfate (99,2%), mais également quand cette concentration est réduite à 0,5 mM (97,9%). De la même façon, après un temps d'attente de 100 min et une deuxième élution sur la colonne, la fraction jaune collectée (10 mL) contenait environ $1,5 \cdot 10^{11}$ LUVs/mL et une concentration en thiosulfate de $7,5 \pm 4,3$ μ g/L, ce qui correspond à $0,3 \pm 0,2$ mM S_2O_3 dans le volume interne LUV. La perte en thiosulfate après 100 min d'attente s'élève donc à 42%. Néanmoins, même à 0,3 mM en thiosulfate, la spéciation d'argent reste majoritaire en $Ag(S_2O_3)_2^{3-}$ (96,5%). En résumé, la solution passe de 99,2 à 97,9 à 96,5% en $Ag(S_2O_3)_2^{3-}$. Le piège est moins efficace mais la spéciation reste majoritaire en l'espèce d'intérêt, et le piège est donc toujours fonctionnel. Notons cependant que la fuite du thiosulfate vers l'extérieur des liposomes pourrait avoir un effet sur la spéciation de l'argent situé dans la solution d'exposition. Néanmoins, en comparant statistiquement les deux valeurs obtenues, avant ($0,50 \pm 0,08$ mM S_2O_3) et après la deuxième élution ($0,3 \pm 0,2$ mM S_2O_3), nous n'avons pas observé de différence significative (test de Student, $p > 0,05$, $n = 3$). La fuite du thiosulfate pourrait donc être négligée.

4.2. Perméabilité des liposomes à l'eau

Les liposomes, contenant l'eau tritiée, ont été élués sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique. La Figure 4-4 présente les résultats en absorbance et en radioactivité obtenus après analyse des fractions collectées. Les liposomes ont émergé après environ 70 mL, tel que déterminé précédemment alors qu'une radioactivité de seulement 6 cpm/mL (0,25 Bq/mL), reliée à la concentration en eau tritiée, a été détectée dans la principale fraction des liposomes (70-80 mL).

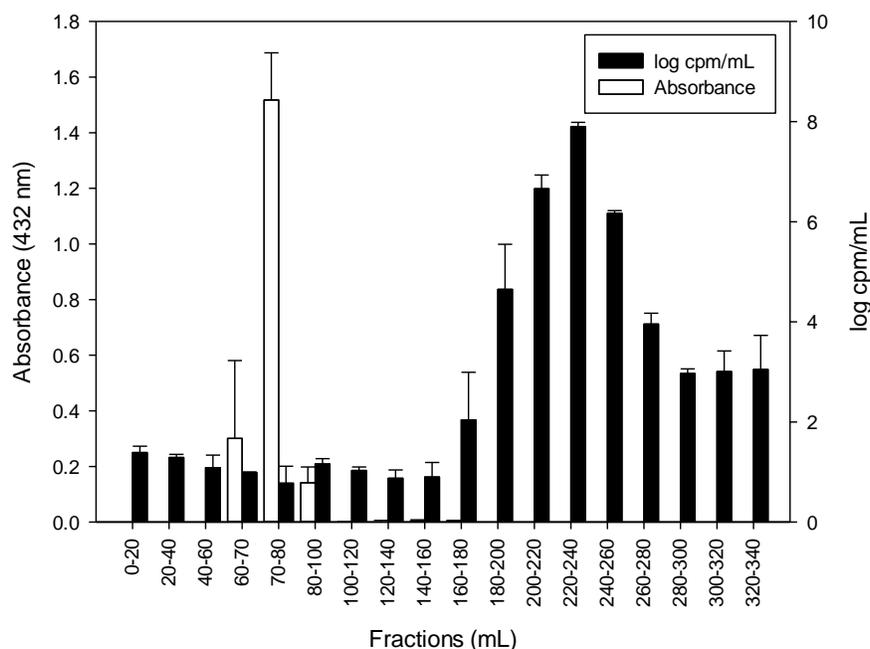


Figure 4-4 : Analyse sur spectrophotomètre UV-visible et compteur bêta des fractions collectées après élution des liposomes contenant de l'eau tritiée sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Moyenne \pm écart type (n=2).

Afin de déterminer dans quelles proportions les molécules d'eau ont diffusé à travers la bicouche lipidique des liposomes, nous avons comparé les activités « finale attendue » et « finale réelle » (après séparation des liposomes de la solution tritiée) du ^3H . L'activité finale attendue du ^3H a été calculée comme suit. La solution initiale de tritium avait une activité de 10 000 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Pendant la synthèse des liposomes, cette solution a été diluée 45 fois, menant à une activité de 222 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ou 8 214 000 Bq/mL . Le volume interne d'un liposome de 150 nm de diamètre est d'environ $1,8 \cdot 10^{-15}$ mL et le nombre de liposomes par mL dans la fraction 70-80 mL de $3,8 \cdot 10^{12}$ LUVs/mL (cf. 4.1.3. Concentration en LUVs). L'activité finale attendue du ^3H dans les liposomes a donc été estimée à $5,6 \cdot 10^4$ Bq/mL de la suspension de liposomes. Expérimentalement, seulement 0,25 Bq/mL de la suspension de liposomes a été détecté dans la fraction 70-80 mL, tel que mentionné plus haut. La proportion d'eau tritiée retenue par les liposomes représentait donc 0,0004% de l'activité initiale. L'eau tritiée, initialement utilisée dans la synthèse des liposomes éluait après environ 220 mL. Le temps d'élution des liposomes (environ 1 h, dépendamment de la vitesse d'élution) a donc été suffisant pour permettre à l'eau tritiée encapsulée de quitter les LUVs, ce qui indique que les liposomes sont très perméables à l'eau, comme l'a démontré Bangham *et al.* (1965).

4.3. Efficacité de la résine Ambersep GT 74

Différents temps de traitement ont tout d'abord été appliqués lors des tests préliminaires effectués avec l'argent dissous. Les résultats de ces tests sont présentés sur les Figure 4-5 (A), (B) et (C). Nous pouvons constater que 5 min de traitement sont suffisantes pour capter la majorité de l'argent en solution (> 95%) et que la présence de ligands n'a pas d'influence sur l'efficacité de la résine. Différentes masses de résine ont ensuite été utilisées (de 0,3 à 0,9 g). La Figure 4-6 montre qu'aux valeurs choisies, ce paramètre n'a statistiquement pas d'influence sur l'efficacité de la résine (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$). Étant donné l'importante capacité d'échange de la résine ($\geq 1,30$ éq/L) ainsi que les faibles concentrations en argent traitées, ce paramètre aurait donc pu être choisi arbitrairement, les sites d'échanges cationiques se trouvant fortement en excès par rapport au nombre d'ions argent en solution. En effet, nous avons calculé que pour traiter une solution de 4,9 mL d' Ag^+ à 40 nM, comme c'était le cas dans l'expérience de la Figure 4-6, seule une masse de 79 ng de résine aurait été suffisante. Une masse de 0,3 g, assez élevée pour pouvoir être facilement pesée, a été utilisée dans nos expériences d'exposition des liposomes à l'argent dissous. Une masse de 0,5 g et un temps de traitement de 5 min ont été utilisés dans nos expériences avec le mercure et le cadmium. La masse de résine a été augmentée par précaution, car les concentrations d'exposition étaient plus élevées avec ces métaux que pour l'argent.

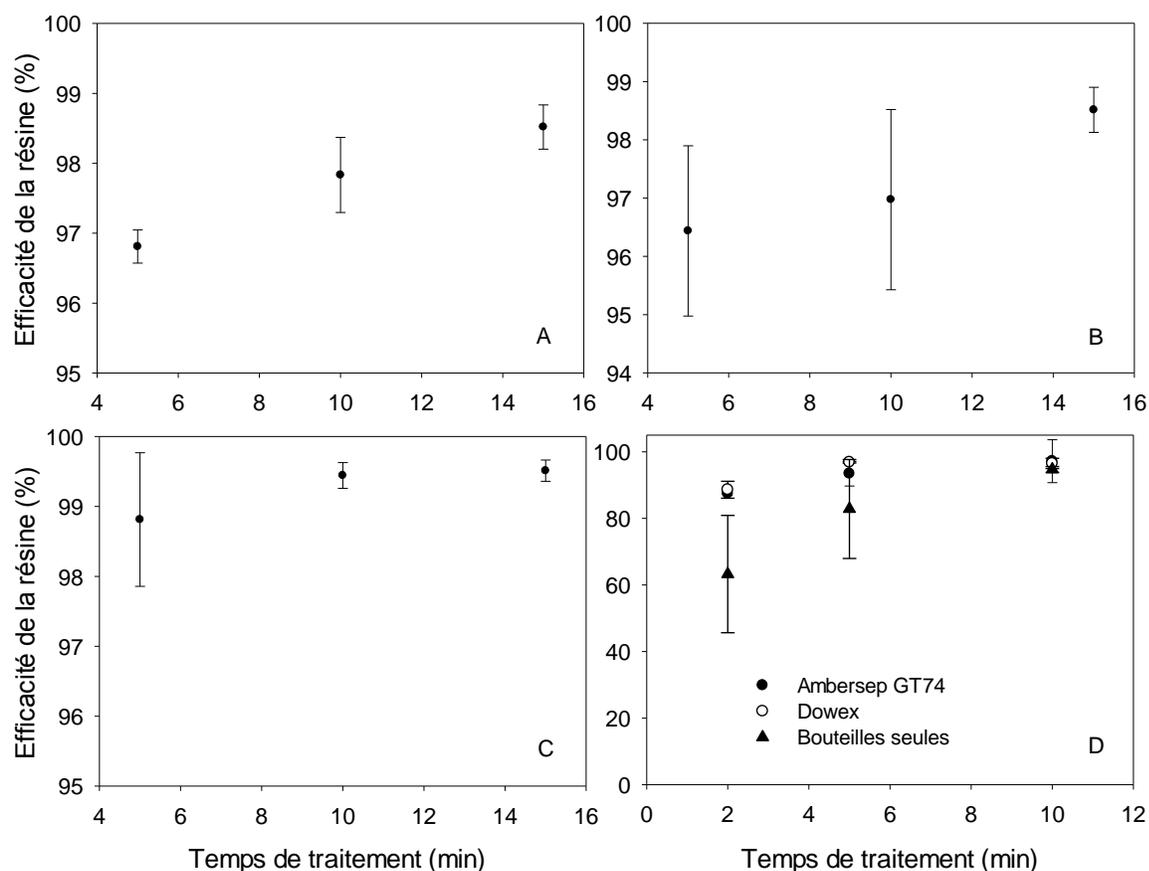


Figure 4-5 : Efficacité de la résine Ambersep GT74 à capter (A) Ag⁺ (36 nM) (B) Ag₂O₃⁻ (31 nM) (C) AgCl⁰ (31 nM) et (D) AgNPs (50,5 nM) et comparaison avec l'efficacité de la résine Dowex Optipore L493 et l'adsorption seule sur les parois des bouteilles). Masse de résine utilisée : 0,3 g (Ag dissous) et 0,5 g (AgNPs). Moyenne ± écart type (n=3).

Les tests préliminaires ont également démontré que la résine Ambersep GT74 (0,5 g) était tout autant efficace pour capter les nanoparticules d'argent (Figure 4-5 (D)). En outre, nous avons pu constater que son efficacité n'était statistiquement pas différente de celle de la résine Dowex Optipore L493 (test de Student, $p > 0,05$), dont la structure sans groupement fonctionnel ne permettait que la formation de liaisons hydrophobes avec les nanoparticules d'argent. Nous avons donc pu en conclure que l'interaction entre la résine Ambersep GT74 et les nanoparticules reposait également sur des liaisons hydrophobes. Notons que les bouteilles seules (HDPE, 15 mL) avaient une capacité non négligeable à adsorber les nanoparticules d'argent (et par extrapolation l'argent dissous) et ont fortement contribué à les retirer de la solution.

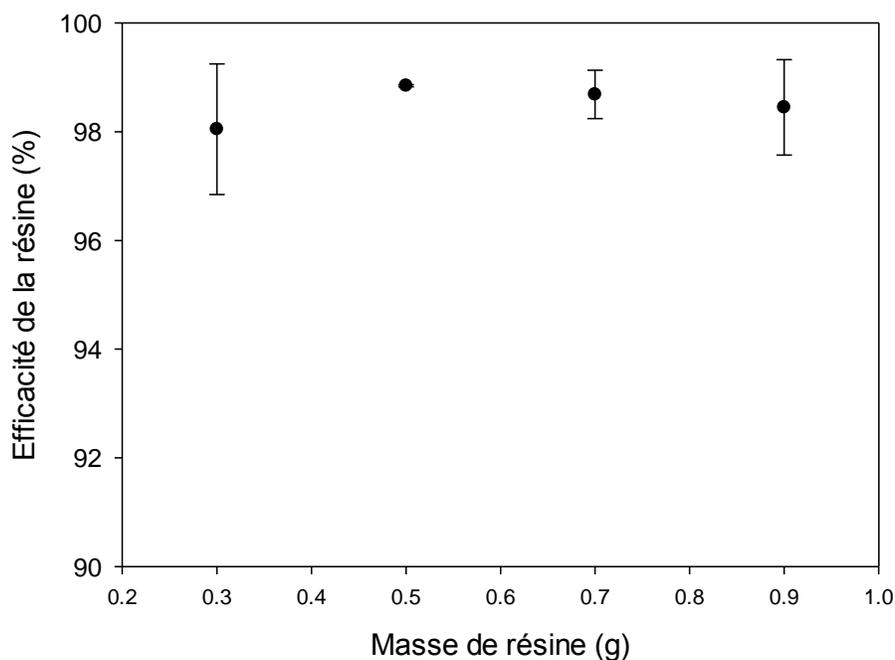


Figure 4-6 : Influence de la masse de résine Ambersep GT74 sur son efficacité à capturer Ag^+ . $[\text{Ag}] = 40,4 \pm 2,2$ nM. Temps de traitement de 5 min. Volume traité = 4,9 mL. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les points (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$).

4.4. Intégrité des liposomes pendant les expériences d'exposition

Afin de déterminer leur résistance, une suspension de liposomes à 24 mg P/L a été soumise à différents traitements et éluée sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Les concentrations en mg P dans les différentes fractions collectées en sortie de colonne sont présentées sur la Figure 4-7. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée après comparaison des différents traitements entre eux (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$). L'agitation mécanique des liposomes ainsi que leur traitement avec la résine Ambersep GT74 n'ont donc aucun effet sur la structure des LUVs. Nous avons fait l'hypothèse que, par extrapolation, les liposomes restaient intègres pendant les expériences d'exposition aux métaux.

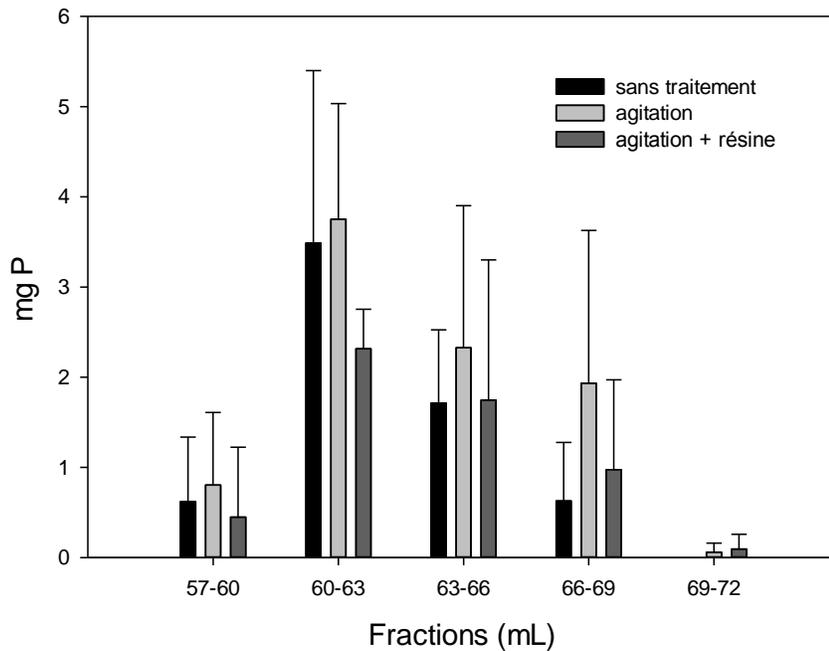


Figure 4-7 : Concentrations en phosphore total dans les fractions LUVs collectées en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion stérique après élution de liposomes soumis à différents traitements. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les traitements (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$).

4.5. Adsorption des métaux sur les parois des bouteilles

Les parois des bouteilles en HDPE utilisées pour les expériences d'exposition ont tendance à adsorber l'argent, comme le montre la Figure 4-8. Néanmoins, jusqu'à 48 h après la préparation des solutions, la part d' Ag^+ et de AgCl^0 adsorbé aux parois n'est pas significative ($< 10\%$) et elle ne devient significative pour Ag_2O_3^- qu'après 11 h, temps largement suffisant pour réaliser nos expériences. En revanche, l'adsorption a considérablement augmenté après lavage à l'acide (HNO_3 10%) des bouteilles en HDPE. Celles-ci ont donc été prééquilibrées avec les solutions d'exposition avant utilisation (cf. Annexe 5 : Prééquilibre des bouteilles en HDPE avant les expériences d'exposition des liposomes aux métaux dissous). Aucune perte par adsorption de HgCl_2^0 et de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ n'a été observée, ceci étant probablement dû à leur concentration élevée en solution ainsi qu'à une plus faible affinité pour les sites d'adsorption que dans le cas de l'argent.

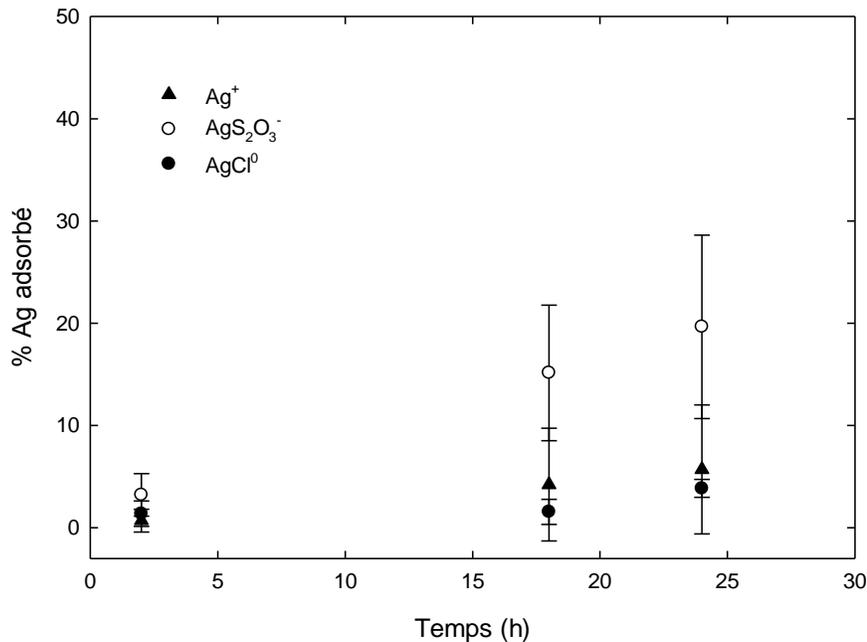


Figure 4-8 : Adsorption en fonction du temps des complexes d'argent sur les parois des bouteilles de 125 mL en HDPE. Moyenne \pm écart type (n=3).

Un test similaire a été effectué avec les nanoparticules d'argent, placées dans les bouteilles en HDPE de 125 mL et dans les fioles en PC de 250 mL, ceci ayant pour but d'étudier l'influence de la composition des bouteilles sur l'adsorption des AgNPs. Les résultats sont présentés sur la Figure 4-9 (A) et (B). L'équilibre d'adsorption a été atteint après 2 h pour les bouteilles en PC et après 18 h pour les bouteilles en HDPE (Figure 4-9 (A), ANOVA à un facteur, $p < 0,05$). Environ 80% d'adsorption a été observé dans les deux cas, menant d'une concentration de 5 mg Ag/L à une concentration de 1 mg Ag/L. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les résultats pour les bouteilles en HDPE et ceux pour les fioles en PC (Figure 4-9 (B), test de Student, $p > 0,05$). Un prééquilibre des bouteilles étant exclu, les nanoparticules étant instables en solution, les bouteilles en HDPE ont été utilisées pour les expériences d'exposition aux AgNPs et l'adsorption a été prise en compte dans l'interprétation des résultats, en supposant que l'équilibre entre l'argent dissous et l'argent adsorbé demeure pendant la durée de l'expérience. Des résultats similaires avaient été observés par Odzak *et al.* (2014). Après 19 jours sous agitation d'une solution à 200 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs-PVP dans des bouteilles de 2 L en HDPE, 80% de l'argent total avait été perdu par adsorption. Malysheva *et al.* (2016) ont également observé qu'après 48 h, les nanoparticules d'argent enrobées de PEG, bPEI (polyéthylèneimine branché) et citrate s'adsorbaient sur les parois de leurs contenants à hauteur d'environ 50% pour les AgNPs-PEG, 20% pour les AgNPs-citrate

et 70% pour les AgNPs-bPEI. Le revêtement des AgNPs a donc un effet sur leur adsorption. Néanmoins, les concentrations utilisées pour ces tests étaient différentes pour chaque type de nanoparticule. Afin de juger de l'influence des différents paramètres (concentration et revêtement des AgNPs, nature du contenant), un plan d'expérience devrait être mise en place.

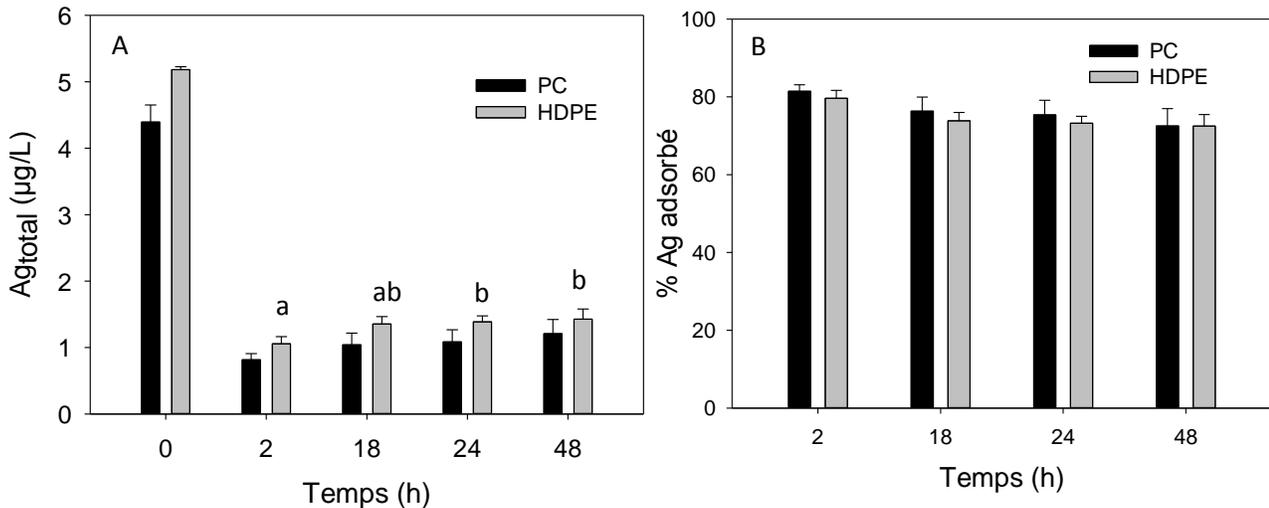


Figure 4-9 : (A) Concentrations en Ag total en fonction du temps dans des bouteilles de 125 mL en HDPE et 250 mL en PC et (B) proportion de l'argent adsorbé sur les parois en fonction du temps. Moyenne \pm écart type (n=3). (A) Les lettres minuscules représentent les différences significatives entre les concentrations en Ag total après 2 h pour les bouteilles en HDPE (aucune différence significative n'a été observée pour les bouteilles en PC) (ANOVA à un facteur, $p < 0,05$). (B) Pour chaque temps, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les taux d'adsorption pour PC et HDPE (test de Student, $p > 0,05$).

L'adsorption des liposomes sur les parois aurait également été intéressante à étudier, en dosant par exemple par colorimétrie les pertes en P total dans une suspension de LUVs placée dans les bouteilles en HDPE. Keller & Kasemo (1998) ont étudié l'adsorption de SUVs sur des parois de différentes compositions (« SiO₂, oxidized gold, and a self-assembled monolayer of methyl-terminated thiols »). Ils ont observé différents phénomènes : la formation de monocouche, de bicouche de phospholipides ou de couche de vésicules intactes, dépendamment de la composition de la paroi. Nous avons néanmoins supposé que les liposomes utilisés dans nos expériences ne s'adsorbaient pas à la surface des bouteilles en HDPE.

4.6. Perméabilité des liposomes aux métaux dissous

4.6.1. Perméabilité à l'argent

Le modèle du ligand biotique (BLM) est utilisé afin de prédire la biodisponibilité (et la potentielle toxicité) des métaux pour les organismes aquatiques. Ce modèle explique qu'une fois qu'un métal est entré en contact avec la surface d'une cellule, il doit se lier aux sites de surface avant d'être transporté à travers la membrane. Typiquement, l'adsorption du métal à la surface de la cellule se fait très rapidement alors que l'accumulation du métal dans la cellule augmente doucement avec le temps (Campbell *et al.*, 2002). Dans le contexte de notre étude, si seule l'adsorption du métal à la surface des liposomes se produit, alors l'équilibre est rapidement atteint. C'est le cas pour Ag^+ (Figure 4-10 (A)). L'accumulation d' Ag^+ par les liposomes atteint un plateau après seulement 10 min. Aucun effet significatif du temps sur l'accumulation d'Ag n'a été observé (régression linéaire, $p > 0,05$). Cela nous a permis de conclure que l'argent ionique n'était pas transporté par diffusion passive à travers la membrane des liposomes, mais qu'il s'adsorbait seulement à leur surface.

À l'inverse, AgCl^0 et AgS_2O_3^- diffusent lentement à travers la membrane des liposomes, comme le montrent la Figure 4-10 (B) et la Figure 4-10 (C), avec un état stationnaire apparent atteint après 60 min d'exposition. En revanche, aucune tendance statistiquement significative n'a été observée pour les expériences menées avec les liposomes préparés dans la solution tampon interne (sans piège) (exemple pour AgS_2O_3^- présenté sur la Figure 4-10 (D)). Tel qu'indiqué dans la partie 3.1.3.3, en absence de piège dans la solution tampon interne, l'argent peut s'adsorber à la surface des liposomes mais également diffuser à travers la membrane jusqu'à atteindre l'équilibre. Nous avons déterminé la quantité d'argent qui serait associée aux liposomes si cet équilibre était atteint afin d'expliquer nos résultats. Dans le cas d'un équilibre, la concentration interne serait la même que la concentration externe à savoir 23,8 nM ($23,8 \cdot 10^{-12}$ mol/mL) dans le cas des expériences où le complexe AgS_2O_3^- était majoritaire. Sachant qu'il y a un atome de phosphore par molécule de phosphatidylcholine (PC) et $2,2 \cdot 10^5$ PC/LUV (150 nm), nous avons calculé, en nous basant sur la concentration expérimentale de liposomes utilisée ($1,8 \cdot 10^{-8}$ LUVs/mL), que $2,1 \cdot 10^{-8}$ g P/mL se trouvait en solution. Nous en avons donc conclu que dans le cas d'un équilibre, nous aurions observé une valeur de 1,1 mmol Ag / g P sur la Figure 4-10 (D). Or les valeurs observées sont proches de 0. Nous avons donc fait l'hypothèse que seule l'adsorption pouvait être observée à aussi court terme ; que l'équilibre ne pouvait être atteint ou que le temps de traitement avec la résine Ambersep était suffisamment élevé pour que l'argent potentiellement internalisé dans les liposomes ait le temps de diffuser vers l'extérieur et soit capté par la résine.

L'accumulation des complexes d'argent en fonction du temps (Figure 4-10 (C)) peut être modélisée par une régression non linéaire (exponentielle à plafonnement). Ce modèle (éq. 4-2) a été utilisé par Boullemant *et al.* (2009) afin de décrire l'assimilation par diffusion passive des complexes lipophiles Cd(L)₂ par *Chlamydomonas reinhardtii*. Il a été appliqué ici, car la tendance de nos graphes ainsi que le contexte général de nos expériences (diffusion passive de complexes métalliques à travers la membrane phospholipidique) étaient similaires à ceux de Boullemant *et al.* (2009).

$$f = a(1 - e^{-bt}) \quad \text{éq. (4-2)}$$

$$[Ag]_L = [AgL]^0 \cdot \frac{k_i}{k_e \cdot f_L} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot f_L \cdot t}) \quad \text{éq. (4-3)}$$

Avec $[Ag]_L$ représentant la concentration totale en argent dans les liposomes ($\mu\text{mol Ag/g P}$), $[AgL]^0$ la concentration du complexe dans la solution d'exposition ($\mu\text{mol/L}$), k_i la constante d'internalisation (L/g P/min), k_e la constante d'élimination (min^{-1}) et f_L la fraction métallique labile intracellulaire (éq. 4-3, dérivée de Boullemant *et al.* (2009)).

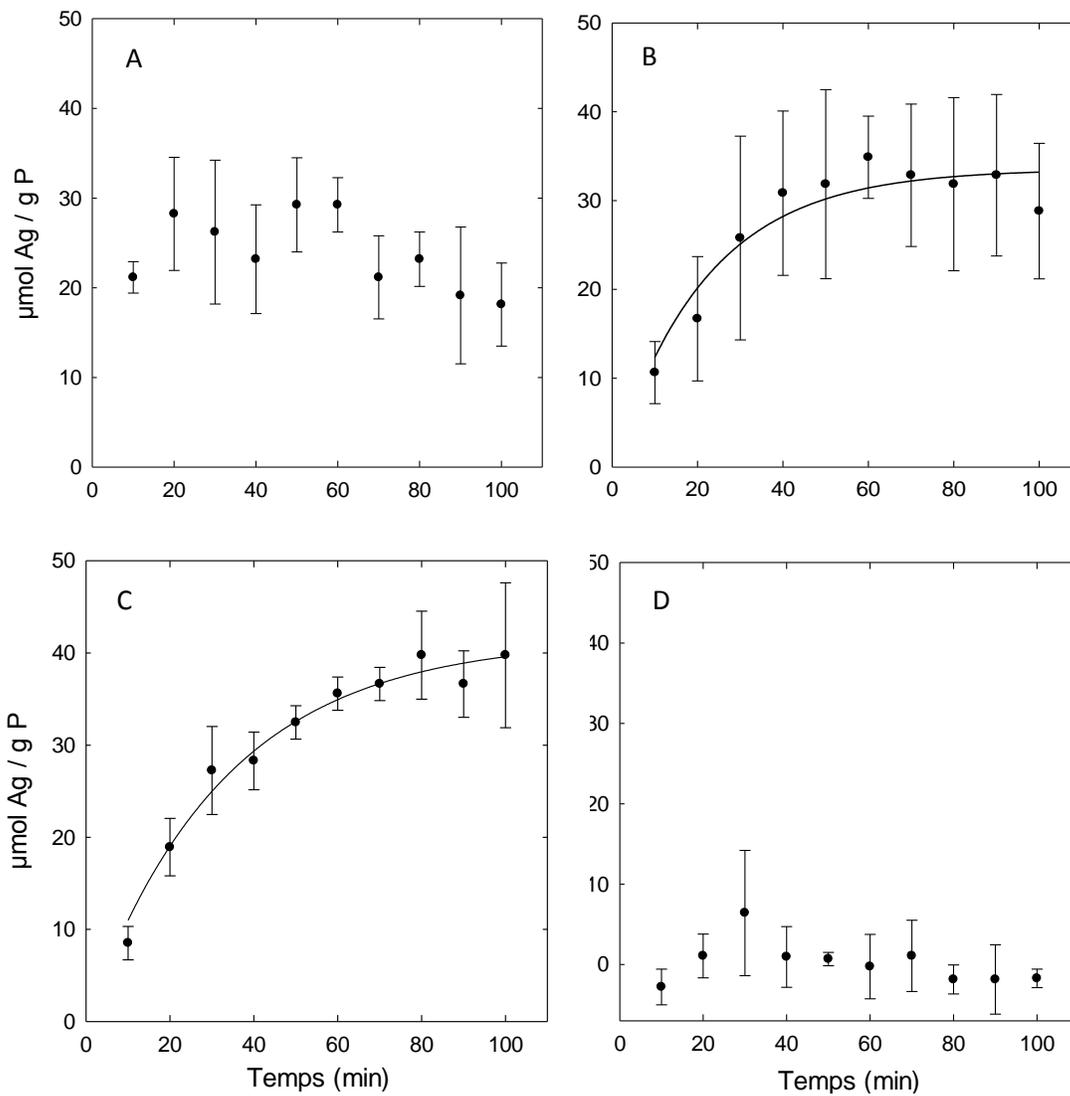


Figure 4-10 : Accumulation de (A) Ag^+ ; (B) AgCl^0 ; (C) AgS_2O_3^- (LUVs préparés dans solution tampon interne avec piège) ; (D) AgS_2O_3^- (LUVs préparés dans solution tampon interne sans piège) par les liposomes en fonction du temps, corrigée pour la quantité résiduelle de métal dissous. Moyenne \pm écart type ($n=3$). Aucune augmentation statistiquement significative observée pour (A) et (D). Augmentation significative observée pour b) et c) (régression non linéaire : exponentielle à plafonnement, Boulemant *et al.* (2009)).

Des coefficients de détermination significatifs ont été obtenus : ($R^2=0,98$, $p<0,0001$, $n=10$) pour l'expérience en présence de AgS_2O_3^- et ($R^2=0,90$, $p<0,0001$, $n=10$) pour celle en présence de AgCl^0 , indiquant un effet important du temps sur l'accumulation des complexes. L'expression du modèle (éq. 4-2 et 4-3) nous a permis de déterminer les valeurs des coefficients ($a ; b$) = (41,5 ; 0,03) et (33,5 ; 0,05),

respectivement pour AgS_2O_3^- et AgCl^0 . Ainsi, les constantes d'internalisation ont pu être calculées $k_i = 52,2 \pm 4,4$ mL/g P/min pour AgS_2O_3^- (24,2 nM) et $62,5 \pm 19,2$ mL/g P/min pour AgCl^0 (24,5 nM). Bien que les liposomes semblent être plus perméables à AgCl^0 qu'à AgS_2O_3^- , il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux constantes d'internalisation ($p > 0,05$).

Étant donné la nature ionique du complexe AgS_2O_3^- , son internalisation n'était pas attendue. Fortin & Campbell (2001) ont en effet suggéré que le complexe était transporté à l'intérieur des cellules algales via le système de transport du sulfate/thiosulfate. Néanmoins, l'étude de l'assimilation de AgS_2O_3^- par des membranes artificielles n'avait jamais été effectuée jusqu'à maintenant. Tel que présenté dans l'introduction, certains articles traitant des bicouches lipidiques suggèrent que les liposomes sont plus perméables aux anions qu'aux cations (ex : 10^3 fois plus élevée pour Cl^- que pour Na^+ ou K^+ , Deamer & Bramhall (1986)). Cette propriété des bicouches phospholipidiques pourrait expliquer nos résultats : le complexe anionique AgS_2O_3^- peut passer à travers la membrane, contrairement à Ag^+ .

En outre, si l'on suit cette logique, AgCl_2^- , présent dans la solution d'exposition 3 (à 14,5%, 0) aurait également pu traverser la membrane, expliquant les résultats présentés sur la Figure 4-10 (B). Néanmoins, étant donné la faible masse moléculaire de AgCl^0 (143 g/mol) présent à 67,2% dans la solution d'exposition 3 ainsi que ses importantes charges résiduelles, rendant le complexe très polaire, nous avons fait l'hypothèse qu'il pouvait effectivement diffuser à travers la membrane des liposomes, de la même manière que les anions.

4.6.2. Perméabilité au mercure et au cadmium

Contrairement à nos prévisions, nos résultats suggèrent que seule l'adsorption de HgCl_2^0 et de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ a eu lieu à la surface des liposomes. En effet, comme le montrent la Figure 4-11, aucune augmentation statistiquement significative de l'accumulation de ces complexes par les liposomes n'a été observée (régression linéaire, $p > 0,05$). En outre, l'isotope non radioactif du Hg (^{202}Hg) et l'isotope radioactif du Cd (^{109}Cd) ont été utilisés respectivement pour les expériences d'accumulation de HgCl_2^0 et de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par les liposomes. Les solutions ont donc été analysées par ICP-MS et compteur gamma. À cause des erreurs dues au traitement de l'échantillon avant analyse, de l'instrument ou de pipetage, l'ICP-MS est moins précis que le compteur gamma. Ceci explique l'importance des écarts-types pour les résultats obtenus avec le Hg et la différence de variabilité entre les résultats pour le Hg et le Cd. Comme mentionné dans l'introduction, HgCl_2^0 et de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ sont censées être suffisamment hydrophobes ($K_{ow} = 3,3$, Mason *et al.* (1996) et 270 ± 28 à pH 7, Boullemant *et al.* (2009), pour HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ respectivement) afin de pouvoir passer à travers la membrane phospholipidique. Mason *et al.* (1996) ont, par exemple,

démontré que la diatomée côtière *Thalassiosira weissflogii* assimilait HgCl_2^0 par diffusion passive. De plus, Bienvenue *et al.* (1984) et Gutknecht (1981) ont étudié la perméabilité des films lipidiques, exposés au complexe HgCl_2^0 et ont démontré que celui-ci traversait la membrane par diffusion passive. Enfin, Boullemant *et al.* (2009) ainsi que Phinney & Bruland (1994) ont observé la diffusion passive de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à travers la membrane cellulaire de, respectivement, trois algues d'eau douce et d'une diatomée côtière.

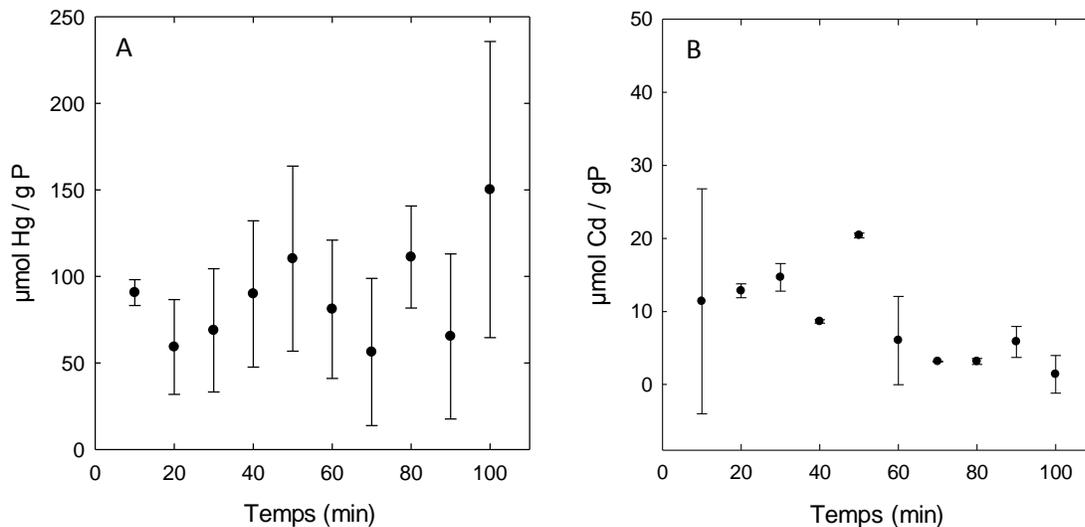


Figure 4-11: Accumulation de (A) HgCl_2^0 et (B) $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par les liposomes en fonction du temps, corrigée pour la quantité résiduelle de métal dissous. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune augmentation statistiquement significative observée (régression non linéaire : exponentielle à plafonnement, Boullemant *et al.* (2009)).

En se basant sur la théorie de « solubilité-diffusion », tel que décrite par Finkelstein & Cass (1968), la membrane phospholipidique devrait être perméable à l'eau ainsi qu'aux solutés neutres de petite taille tels que le glycérol et l'urée (Paula *et al.*, 1996), HgCl_2^0 ou $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ (Finkelstein & Cass, 1968). Il est donc surprenant que notre membrane modèle ne laisse pas passer ces derniers. Plusieurs facteurs ont pu influencer nos résultats tels que le poids moléculaire des espèces, qui est assez important pour HgCl_2^0 (272 g/mol) comme pour $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ (408 g/mol). Cohen & Bangham (1972) ont en effet démontré que la diffusion de non-électrolytes (estimée comme le ratio des valeurs mesurées de perméabilité sur le coefficient de partage huile/eau) dans des liposomes avait tendance à diminuer quand la masse moléculaire augmentait. Notons également que les valeurs de perméabilité à l'eau mesurées pour les films lipidiques sont plus élevées, en moyenne d'un ordre de grandeur, par rapport à celles des

liposomes (Deamer & Bramhall, 1986). Par exemple, le coefficient de perméabilité à l'eau de liposomes composés de phosphatidylcholine (PC) est de 2,0 $\mu\text{m/s}$ (Carruthers & Melchior, 1983) contre 40,2 $\mu\text{m/s}$ pour des films lipidiques de même composition (Finkelstein & Cass, 1967). Cela suggère que les liposomes seraient moins perméables que les films lipidiques et pourrait expliquer en partie pourquoi la diffusion d' HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ n'a été observée que chez ce dernier modèle. Shimanouchi *et al.* (2011) a remarqué que l'hydratation de la bicouche lipidique dépendait de son rayon de courbure. Ce paramètre, régulant la mobilité des têtes polaires des phospholipides, varie en fonction du diamètre des liposomes et pourrait être un des facteurs déterminant la perméabilité des membranes. Andreoli *et al.* (1967) le confirment en faisant l'hypothèse qu'en bombant la membrane bilipidique, celle-ci subît des changements dans son architecture moléculaire ou dans sa composition, altérant ainsi sa perméabilité ionique (cf. partie 1 Introduction).

Les résultats des expositions aux métaux dissous ainsi que la comparaison non exhaustive avec la littérature sont regroupés dans le tableau de l'Annexe 6 : Synthèse des résultats et comparaison avec la littérature.

4.7. Perméabilité des liposomes aux nanoparticules d'argent

4.7.1. Digestion des AgNPs

La digestion des échantillons contenant des AgNPs a été effectuée en suivant le troisième protocole décrit dans la partie 3.1.3.4.1: digestion avec de l'acide nitrique concentré. Les tests préliminaires ont en effet démontré que les trois protocoles de digestion testés étaient assez efficaces pour digérer la solution à 1000 mg/L de AgNPs (pourcentages de récupération compris entre 95 et 105%) (Tableau 4-2). Le choix s'est porté sur le protocole 3 car il était le plus simple à mettre en œuvre.

Tableau 4-2: Analyse par ICP-AES de solutions de AgNPs digérées suivant trois différents protocoles.
Moyenne \pm écart type (n=2).

	Digestion	[Ag] _{total} avant dilution (mg/L)	Pourcentage de récupération (%)
1	HNO ₃ concentré et H ₂ O ₂ 30%		
	Chauffage à 90°C pendant 2 h	1011 \pm 15	101,1 \pm 1,5
	Compléter à 50 mL avec de l'eau MilliQ		
2	<i>Effet de la dilution</i>		
	Solution dilué 2X avec de l'eau MilliQ	995 \pm 36	99,5 \pm 3,6
	Protocole 1 appliqué		
3	HNO ₃ concentré seul		
	Compléter à 50 mL avec de l'eau MilliQ	1020 \pm 29	102,0 \pm 2,9
	Concentration théorique (mg/L)		1000

4.7.2. Concentration d'exposition en AgNPs

Les résultats des ultrafiltrations successives des solutions de AgNPs à différentes concentrations sont présentés sur la Figure 4-12. Les concentrations données dans la légende sont des concentrations réelles, déterminées par ICP-MS, différentes des concentrations nominales (entre 4,5 et 50 μ g/L), calculées à partir de la concentration de la solution de AgNPs initiale (1000 mg/L). L'adsorption de l'argent sur les parois des fioles en PC pourrait expliquer cette différence.

En comparant les concentrations en Ag ultrafiltré (de 1 à 4 μ g/L) après cinq centrifugations successives de solutions de AgNPs à différentes concentrations, nous avons conclu que la solution à 4,5 μ g/L d'argent total était celle qui se rapprochait le plus des conditions des expériences avec l'argent dissous dont la concentration en Ag⁺ libre était de 2,2 μ g/L. En outre, à cette concentration, les filtres à ultracentrifugation atteignent très rapidement un équilibre apparent.

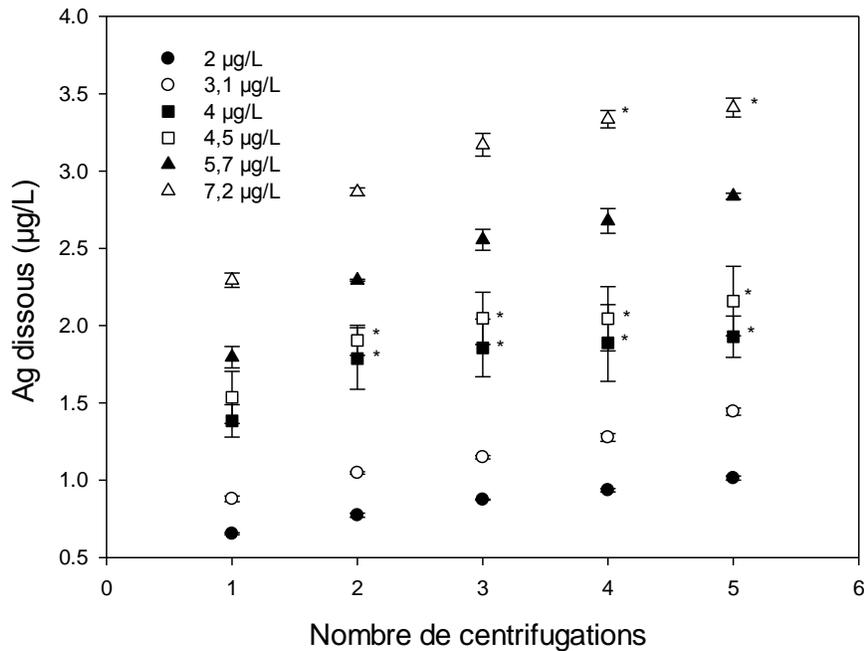


Figure 4-12 : Concentrations en Ag ultrafiltré (3 kDa) selon le nombre de centrifugations successives. Les différents symboles représentent les concentrations totales en Ag, incluant les AgNPs. Moyenne \pm écart type (n=3). L'astérisque indique qu'aucune différence significative n'a été observée entre les points (ANOVA à un facteur, $p > 0,05$).

4.7.3. Oxydation des AgNPs en fonction du temps

L'évolution de l'oxydation des AgNPs en fonction du temps est présentée sur la Figure 4-13 ci-dessous. Au temps 0, seul environ 40% de l'argent était sous forme dissoute. Après environ 20 min, on observe une diminution exponentielle de la concentration en Ag total dans la solution (d'environ 60%), vraisemblablement due à de l'adsorption sur les parois des bouteilles en HDPE. L'argent est alors presque totalement sous forme dissoute en solution (93%). La concentration en Ag dissous a en apparence subi peu de variation au cours du temps, bien qu'une faible augmentation statistiquement significative ait été observée (ANOVA à un facteur, $p < 0,05$) (ce qui est étonnant car il avait déjà été démontré que l'Ag dissous s'adsorbait aussi sur les parois des bouteilles). La tendance observée est donc la somme de deux phénomènes : l'oxydation des AgNPs, augmentant la proportion d'Ag dissous et l'adsorption de l'Ag sur les parois des bouteilles, diminuant la concentration en Ag total dans la solution. En outre, bien que la faible concentration en AgNPs ainsi que leur petite taille favorisent fortement leur

oxydation la forte concentration en oxygène dissous dans la solution pourrait également être un paramètre y contribuant (cf. 1.5.4. Transformations dans l'eau douce).

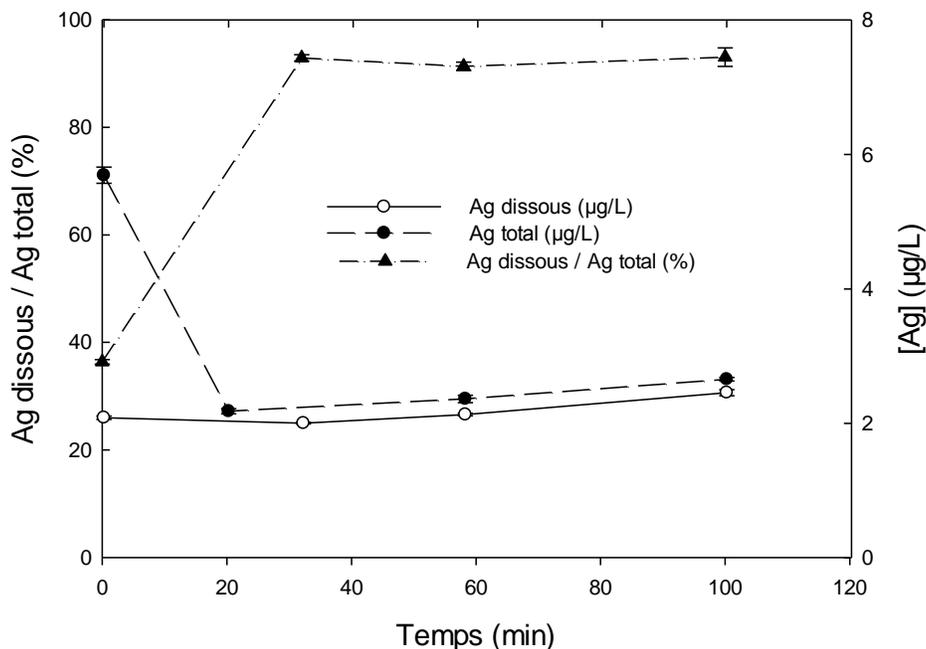


Figure 4-13 : Oxydation des AgNPs en fonction du temps, dans la solution d'exposition 6 (Tampon MOPS 7,5 mM; NaOH 5,6 mM; AgNPs-PVP 72,5 nM; KNO3 19,8 mM, Tableau 3-2) en présence de liposomes. Moyenne \pm écart type (n=3).

4.7.4. Intégrité des liposomes en présence de AgNPs

L'analyse sur spectrophotomètre UV-visible de liposomes (28,8 mg P/L) agités pendant 100 min nous a permis de constater que l'absorbance de la solution diminuait de façon significative en fonction du temps (régression linéaire, $p < 0,05$) (Figure 4-14). Néanmoins, il ne s'agit là que de l'oxydation/hydrolyse naturel des liposomes, l'agitation n'ayant aucun effet sur leur dégradation, tel que décrit dans le paragraphe 4.4. En outre, bien que significative, cette diminution est assez faible ($< 5\%$) pour pouvoir être négligée dans notre contexte expérimental. La présence de nanoparticules d'argent dans la solution (1,94 μM) n'a eu aucun impact sur la dégradation des liposomes, comme le montre la Figure 4-14, il n'y a en effet pas de différence statistiquement significative entre les deux distributions (test de Student, $p > 0,05$). Moghadam *et al.* (2012) et Leroueil *et al.* (2008) ont observé des altérations de la membrane phospholipidique causées par des nanoparticules d'or et de silice (cf. paragraphe 1.2.4). Dans notre étude, aucune altération de la membrane n'a été détectée.

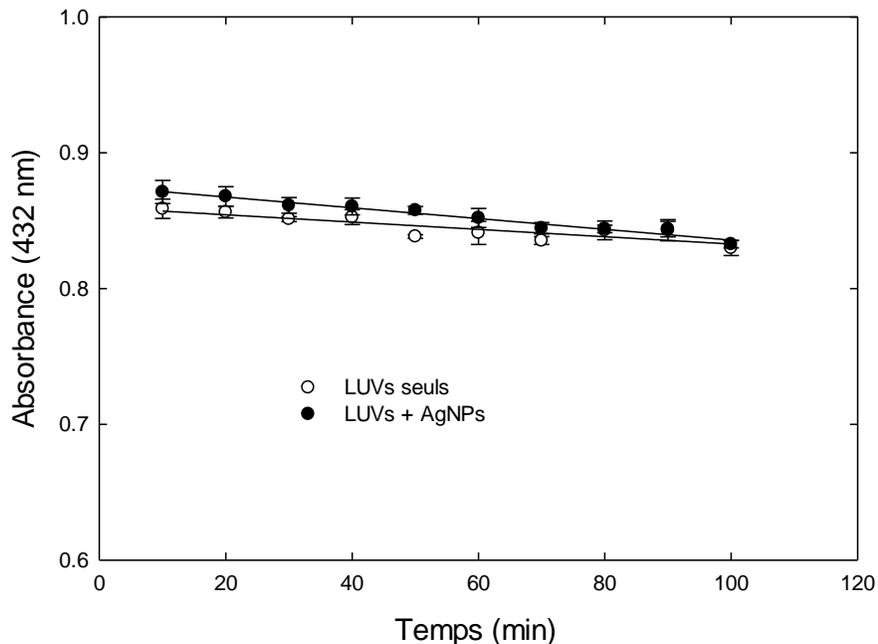


Figure 4-14 : Absorbance en fonction du temps d'une suspension de liposomes seule ou exposée à des nanoparticules d'argent. Moyenne \pm écart type (n=3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les deux distributions (test de Student, $p > 0,05$).

4.7.5. Résultats de l'exposition

L'expérience d'exposition des liposomes aux nanoparticules d'argent a été répétée trois fois sous les mêmes conditions expérimentales. Les résultats sont présentés sur la Figure 4-15 ci-dessous ((A), (B) et (C); (D) correspondant au regroupement sur un même graphe des résultats des trois expériences). Les paramètres relatifs aux trois expériences, calculés avant, pendant et après celles-ci, rassemblés dans le Tableau 4-3, sont très similaires. En revanche, comme nous pouvons le constater sur la Figure 4-15, une augmentation statistiquement significative a été observée pour l'expérience (B) ($p = 0,0001$), contrairement aux deux autres expériences. À partir de 20 min, l'argent est majoritairement sous forme dissoute en solution, comme nous l'avons démontré précédemment (Figure 4-13). Il est possible que la fuite du piège à métaux, considéré comme négligeable dans la partie 4.1.4, ait été suffisante pour permettre un changement de spéciation et le passage du complexe AgS_2O_3^- à travers la membrane. En effet, celui-ci prédomine dès qu'une concentration supérieure à 4 nM de thiosulfate se retrouve en solution. Si l'on se base sur les valeurs moyennes calculées dans la partie 4.1.4, à savoir 0,5 mM et 0,3 mM avant et après exposition, c'est environ 45 nM de thiosulfate que l'on pourrait retrouver dans la

solution d'exposition. Néanmoins, cette augmentation, bien que significative, n'est pas répétable. Nous n'en avons donc pas tenu compte dans nos interprétations. En outre, en regroupant les résultats des trois expériences sur le même graphe (Figure 4-15 (D)), l'absence d'augmentation statistiquement significative (après régression linéaire ou exponentielle, cf. équation 4-4, paragraphe 4.6.1) nous a donc permis de conclure que l'argent ne s'internalisait pas dans les liposomes. Notons seulement que dans le cas où les données brutes (et non les moyennes) sont rassemblées sur un même graphe, l'augmentation est faiblement significative ($p=0,0224 < 0,05$). Ceci est cohérent avec le fait qu'aucune étude n'a pu prouver que les nanoparticules d'argent pouvaient passer par diffusion passive à travers la membrane phospholipidique (cf. INTRODUCTION). Néanmoins, la quasi-totalité des nanoparticules d'argent s'étant transformées en Ag dissous après seulement 20 à 30 min (cf. paragraphe 4.7.3), il est donc difficile de déterminer si cette conclusion peut s'appliquer aux AgNPs utilisées dans notre étude. En outre, Le Bihan *et al.* (2009), cité dans l'introduction (Partie 1) pour avoir étudié l'invagination de nanoparticules de silice par des liposomes, ont indiqué que ce procédé était très rapide et qu'il aurait été difficile de pouvoir l'analyser sans avoir recours à une méthode permettant de le ralentir. Ainsi, ils ont recouvert les nanoparticules de silice de nanoparticules d'or à charge positive de 10 nm qui ont permis de freiner l'étalement des liposomes sur la surface de la silice et de pouvoir observer par cryo-TEM les étapes intermédiaires du processus d'engloutissement. Si une invagination des AgNPs-PVP par les liposomes s'était produite, son observation n'aurait donc pas été possible dans nos conditions expérimentales. Il serait envisageable d'appliquer un traitement similaire à celui mis en place par Le Bihan *et al.* (2009) afin de ralentir le procédé et de pouvoir observer ou non cette invagination, à l'intérieur des 20 à 30 min où les nanoparticules d'argent sont encore présentes et relativement intactes en solution. Néanmoins, en se basant sur Le Bihan *et al.* (2009), nos AgNPs ayant une taille inférieure ou égale à 5 nm ne possèderaient pas de force d'adhésion suffisante pour provoquer l'invagination et ne pourrait que s'adsorber à la surface des liposomes. De plus, au vue des faibles quantités d'argent retrouvées associées aux liposomes (en moyenne $38,3 \mu\text{mol Ag} / \text{g P}$, corrigée avec la quantité résiduelle d'Ag), nous pouvons faire l'hypothèse que l'invagination des nanoparticules d'argent est peu probable et que les AgNPs se sont seulement adsorbées à la surface des liposomes, comme cela a été démontré notamment par Wang *et al.* (2016a).

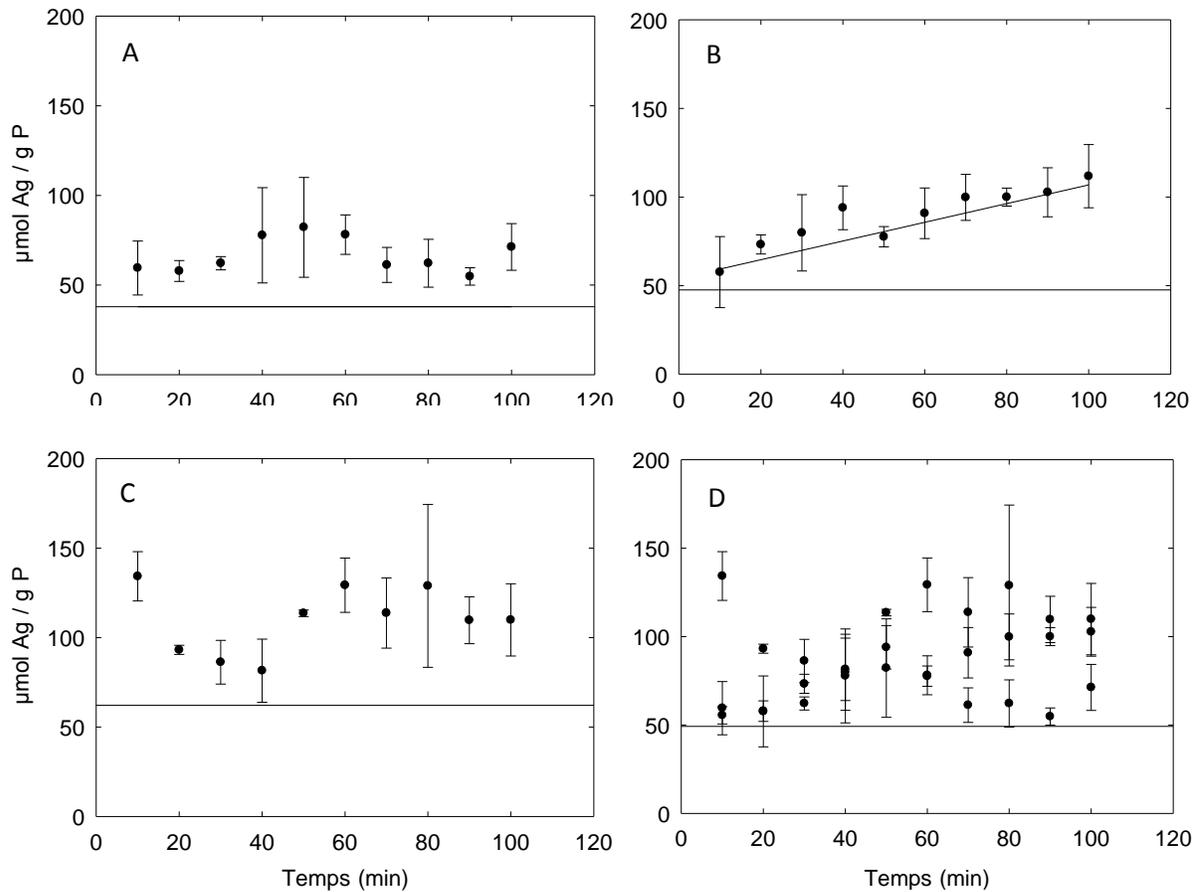


Figure 4-15: (A), (B) et (C) Accumulation des AgNPs par les liposomes en fonction du temps et (D) regroupement des résultats des trois expériences précédentes. Moyenne \pm écart type ($n=3$). La ligne horizontale correspond à la quantité résiduelle de métal dissous. Aucune augmentation statistiquement significative observée pour (A), (C) et (D). Augmentation statistiquement significative observée pour (B) (régressions linéaire et non linéaire : exponentielle à plafonnement, Boulemant *et al.* (2009)).

Tableau 4-3 : Valeurs des différents paramètres calculés lors des expériences (a, b et c) d'accumulation des AgNPs par les liposomes en fonction du temps. Moyenne \pm écart type (n=3) quand applicable. Ads : adsorption sur les parois des bouteilles; Eff. résine : efficacité de la résine Ambersep GT 74 à adsorber l'argent en solution; R² : coefficient de détermination appliqué aux régressions exp (exponentielle, selon l'équation 6-4) et lin (linéaire); Pente : 1 significative et 0 non significative; n.d. non déterminé.

	[Ag]tot, ini (ppb)	[Ag]tot, fin (ppb)	Ads. (%)	Eff. résine, ini (%)	Eff. résine, fin (%)	Quantité résiduelle ($\mu\text{mol Ag / g P}$)	[Ptot] (mg P/L)
Exp a)	5,8 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	44,6 \pm 0,9	96,5 \pm 0,9	n.d.	37,9	0,047
Exp b)	5,7 \pm 0,1	2,70 \pm 0,03	53,3 \pm 0,7	95,9 \pm 0,8	n.d.	47,6	0,044
Exp c)	6,2 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	52,3 \pm 1,7	94,8 \pm 0,2	89,8 \pm 2,7	62,1	0,047
	[Ag]dissous, ini (ppb)	[Ag]dissous, fin (ppb)	$\frac{[Ag]_{tot,ini}}{[Ag]_{dissous,ini}}$ (%)	$\frac{[Ag]_{tot,fin}}{[Ag]_{dissous,fin}}$ (%)	R ² (exp)	R ² (lin)	Pente
Exp a)	2,1 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	37,0 \pm 2,2	83,9 \pm 5,6	0,0985	0,0033	0
Exp b)	2,10 \pm 0,02	2,50 \pm 0,05	36,4 \pm 0,4	93,0 \pm 1,7	0,76	0,86	1
Exp c)	2,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	31,8 \pm 0,8	100,4 \pm 3,9	1,1 \cdot 10 ⁻¹⁶	0,0498	0

4.8. Expériences en mésocosmes

4.8.1. Évolution de l'argent dissous en fonction du temps

La concentration nominale en argent total a été maintenue à 10 µg/L par une addition continue de nanoparticules d'argent enrobées de citrate (20 nm) dans les mésocosmes 2 et 3. L'analyse de l'évolution de la concentration expérimentale en argent total en fonction du temps a démontré qu'une grande portion de l'argent (4-7 µg/L) était retrouvée dans la couche d'eau douce des mésocosmes (Figure 4-16). Les nanoparticules d'argent, injectées en continu en haut des mésocosmes 2 et 3, peuvent effectivement sédimenter jusqu'à l'halocline située à l'interface entre eau douce et eau salée, mais ne peuvent pas la franchir. Comme l'a démontré Millour *et al.* (2017) (en préparation), de très faibles concentrations en argent ont été retrouvées dans la couche d'eau salée (en moyenne 0,1 µg/L, fraction particulaire > 0,45 µm, très proche des concentrations retrouvées dans le mésocosme 1), indiquant que l'halocline agissait comme une barrière très dense (conductivité moyenne 20,2 mS/cm contre 1,2 pour l'eau douce), limitant la sédimentation des AgNPs.

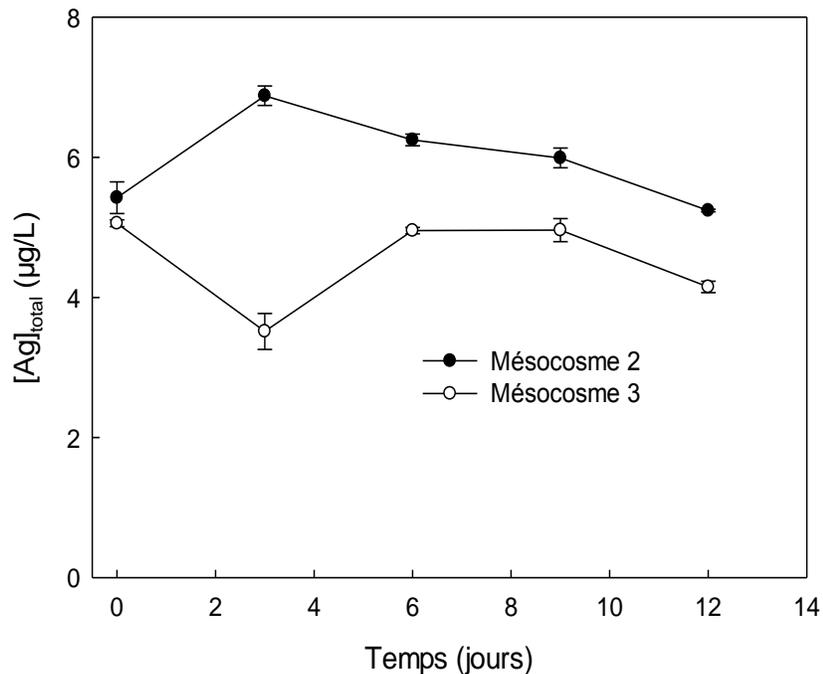


Figure 4-16 : Concentrations en argent total dans les eaux à la surface du mésocosme 2 (en noir) et 3 (en blanc) en fonction du temps (échantillons non filtrés, non centrifugés). Moyenne ± écart type (n = 3). Les concentrations en argent total dans le mésocosme 1 (témoin) étaient négligeables.

Les concentrations en argent dialysable, mesurées au cours du temps, étaient comprises entre 0,2 et 0,6 $\mu\text{g/L}$ (cf. Figure 4-17), ce qui correspond à 5-15% de la concentration en argent total (cf. Figure 4-18). La dissolution des nanoparticules d'argent dépendrait fortement des conditions expérimentales et notamment de la nature des nanoparticules et de la composition du milieu. La proportion d'argent dialysable est donc susceptible de varier dépendamment des conditions dans lesquelles les expériences sont menées.

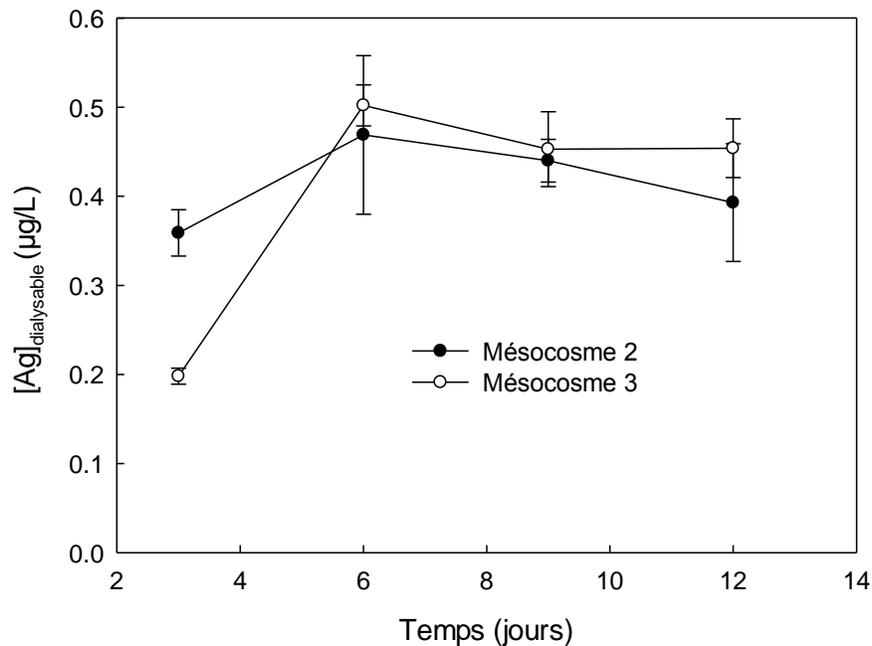


Figure 4-17: Concentrations en argent dialysable dans les eaux à la surface des mésocosmes 2 et 3, mesurées par dialyse *in situ*, en fonction du temps. Moyenne \pm écart type ($n = 3$). Les concentrations en argent dialysable dans le mésocosme 1 (témoin) étaient négligeables.

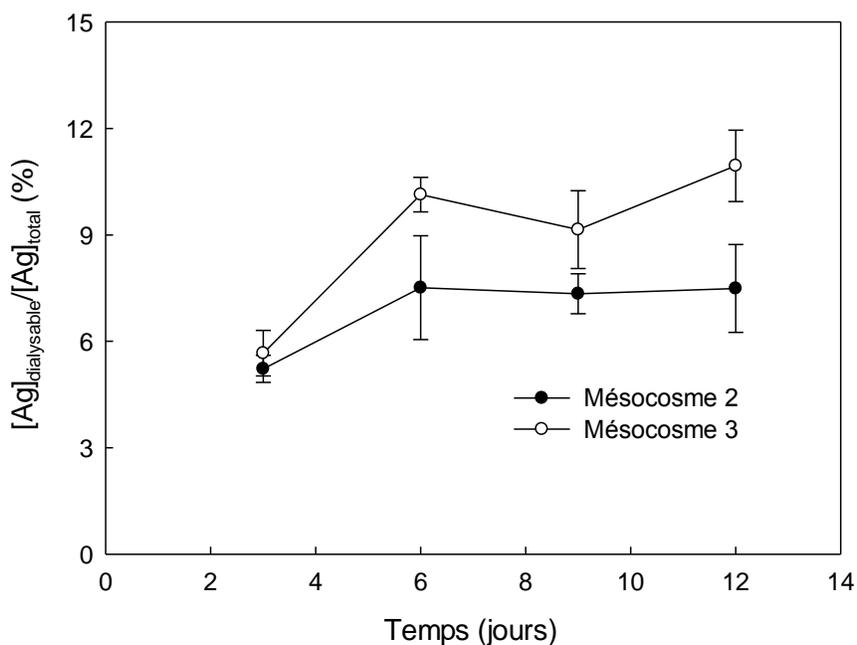


Figure 4-18: Pourcentage d'argent dialysable en fonction du temps. Moyenne \pm écart type (n = 3).

La concentration en argent dialysable représente la concentration en argent à l'intérieur du sac à dialyse. Les nanoparticules d'argent (~20 nm) ainsi que l'argent complexé à la matière organique (MWCO > 500 Da) ne devraient pas traverser la membrane des sacs (MWCO 100-500 Da), les pores de celles-ci ne mesurant pas plus de 1,5 nm de diamètre (www.spectrumlabs.com). Des sacs à dialyse avec un seuil de rétention de 3 kDa avaient déjà été utilisés par Lowry et al. (2012) afin de séparer l'argent dissous des nanoparticules dans une expérience en mésocosmes (concentrations en argent dissous inférieures à la limite de détection de l'ICP-MS ; Lowry et al. (2012)).

Les concentrations en argent total et en argent dialysable dans le mésocosme 1 (témoin) ont été considérées comme négligeables. Les concentrations en carbone inorganique, chlorure et sulfate étaient respectivement de $35,1 \pm 0,1$, 263 ± 85 et $29,9 \pm 9,9$ mg/L dans les trois mésocosmes en tout temps pendant l'expérience. La spéciation de l'argent a été simulée grâce à Visual Minteq 3.0 à 18°C et pH 8,0. Les concentrations maximales en carbone inorganique, chlorure et sulfate (c'est-à-dire 36,0, 392 et 45,4 mg/L) ont été utilisées comme paramètres d'entrée. Le carbone organique, ayant une concentration de $4,5 \pm 0,6$ mg/L dans les mésocosmes, a été considéré comme dissous. Étant donné la concentration élevée en chlorures, la spéciation de l'argent dissous était en tout temps dominée par les chloro-complexes (49,4% AgCl^0 , 47,2% AgCl_2^- , 2,79% Ag^+). Les calculs thermodynamiques ont indiqués une sous-

saturation par rapport à la cérargyrite (AgCl(s)) ou toutes autres phases minérales dans nos conditions. En outre, l'analyse par DLS de l'eau douce des mésocosmes a montré que les particules naturelles avaient une distribution multimodale avec deux populations de taille, l'une entre 0 et 190 nm et l'autre entre 220 et 5000 nm. En présence de nanoparticules d'argent, la population entre 0 et 190 nm augmentait : elle correspondait à 10% des particules totales avant ajout des nanoparticules et 36% après ajout. À l'intérieur de la gamme de taille 0-200 nm, deux populations de taille ont été retrouvées. La première (10-44 nm) correspondrait à la taille originelle des AgNPs, preuve qu'une proportion de nanoparticules a subsisté plusieurs heures après l'introduction des AgNPs dans le milieu. La deuxième (50-142 nm) correspondrait aux agrégats formés entre les nanoparticules d'argent et la matière organique. Après ajout des nanoparticules, des sous-populations à l'intérieur des 0-200 nm se sont formées ou enrichies, d'où l'augmentation générale de la population (Millour *et al.* (2017), en préparation).

4.8.2. Densité cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* dans les mésocosmes

Une relation linéaire entre la concentration en chlorophylle-a dans les solutions algales et la densité cellulaire a été établie et est présentée sur la Figure 4-19. Cette droite a servi de courbe d'étalonnage afin de déduire, à partir de la concentration en chlorophylle-a déterminée par fluorescence, la densité cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* dans les mésocosmes. Ces résultats sont présentés sur la Figure 4-20. La densité cellulaire dans les eaux de surface des mésocosmes apparaît être plus faible, entre 200 et 800 cellules/mL, que la densité nominale attendue, fixée entre 1000 et 2000 cellules/mL. Il est possible que cela soit dû à une sédimentation des algues vers l'interface entre l'eau douce et l'eau salée.

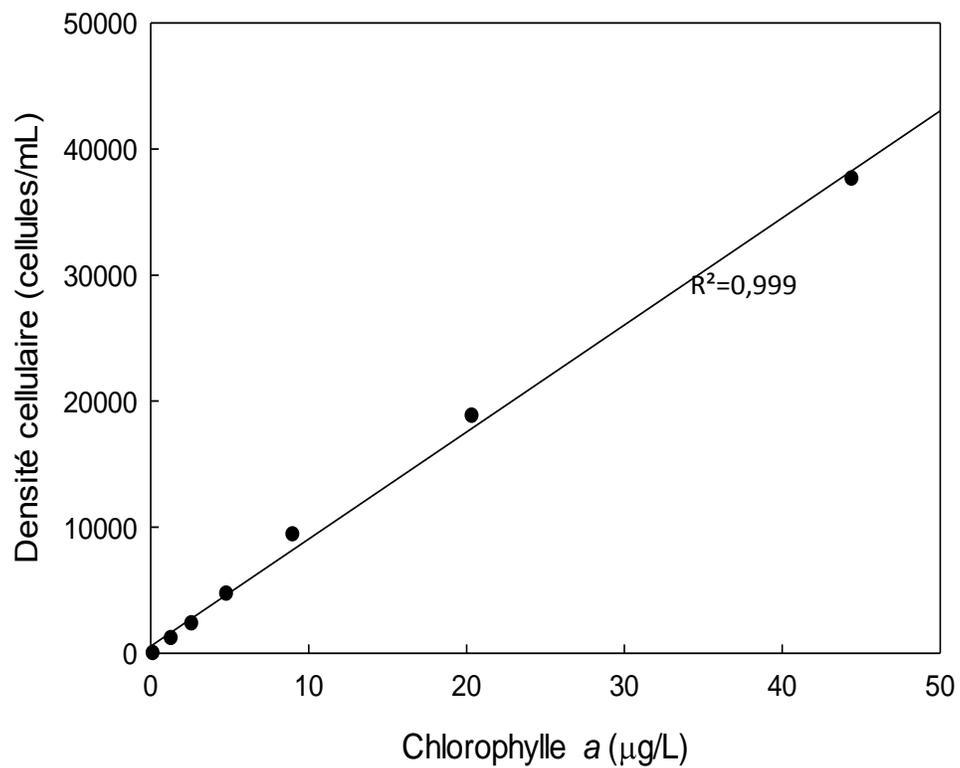


Figure 4-19: Relation entre la concentration en chlorophylle a et la densité cellulaire de *C. reinhardtii* dans l'eau du mésocosme 1 (témoin).

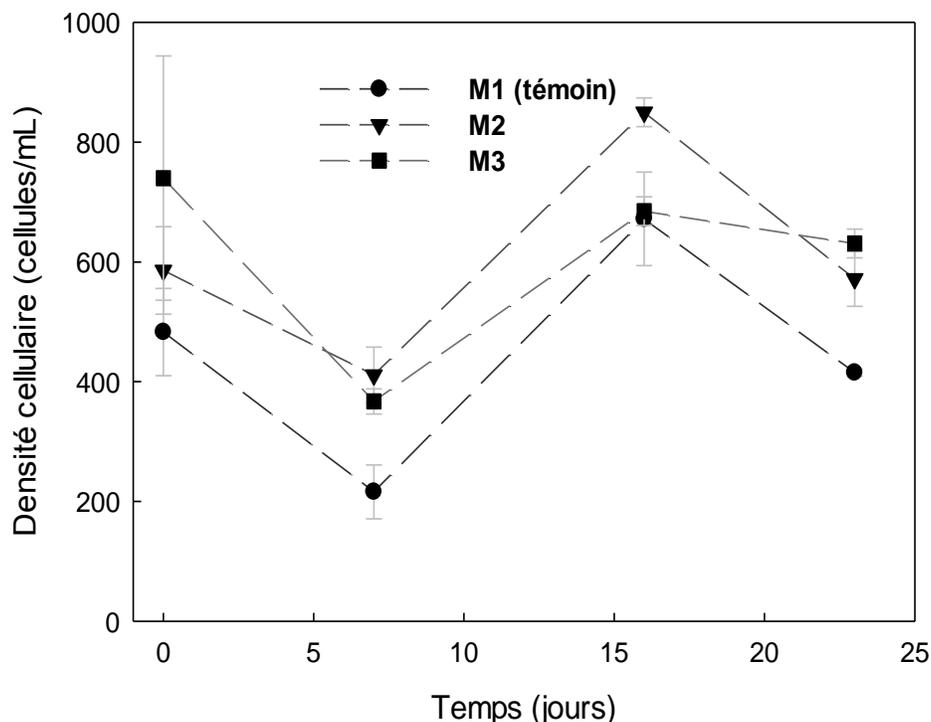


Figure 4-20: Densités cellulaires de *C. reinhardtii* en fonction du temps dans les mésocosmes 1 (témoïn) (●), 2 (▼) et 3 (■). Moyenne \pm écart type (n = 3). M1: Mésocosme 1 (témoïn); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2).

4.8.3. Accumulation de l'argent par *Chlamydomonas reinhardtii*

Afin de récupérer les algues présentes dans les mésocosmes et ayant été ou non exposées à l'argent, l'eau douce avait été filtrée une première fois sur un filtre en polycarbonate de 2 μm de largeur de pore. Il avait été observé que le filtre se bouchait après le passage de seulement 50 mL de solution. Ceci avait été attribué à la présence d'argile en quantité relativement importante dans l'eau (10 mg/L), de taille supérieure à 2 μm . La filtration avait alors été expérimentée de nouveau sur un filtre de 3 μm . Dans ce cas-là, une quantité d'eau plus importante avait pu être filtrée. Néanmoins, l'argile était toujours récupérée en quantité non négligeable sur le filtre en même temps que les algues. La distinction entre l'argent adsorbé à l'argile et l'argent accumulé dans les algues n'aurait donc pas pu être faite de cette façon.

Une approche par centrifugation a donc été choisie. La Figure 4-21 présente les résultats de turbidité pour les différents surnageants analysés. En comparant leur turbidité avec celle du filtrat récupéré après passage de l'eau douce des trois mésocosmes sur des filtres de 0,2 μm , les centrifugations les plus

efficaces se sont avérées être celles appliquant une vitesse de 5000 x g et 10 000 x g pendant 15 min (test de Student, $p > 0,05$). Afin de réduire davantage la présence de particules argileuses pouvant potentiellement passer à travers le filtre de 0,2 μm , nous avons choisi d'utiliser une vitesse de 10 000 x g.

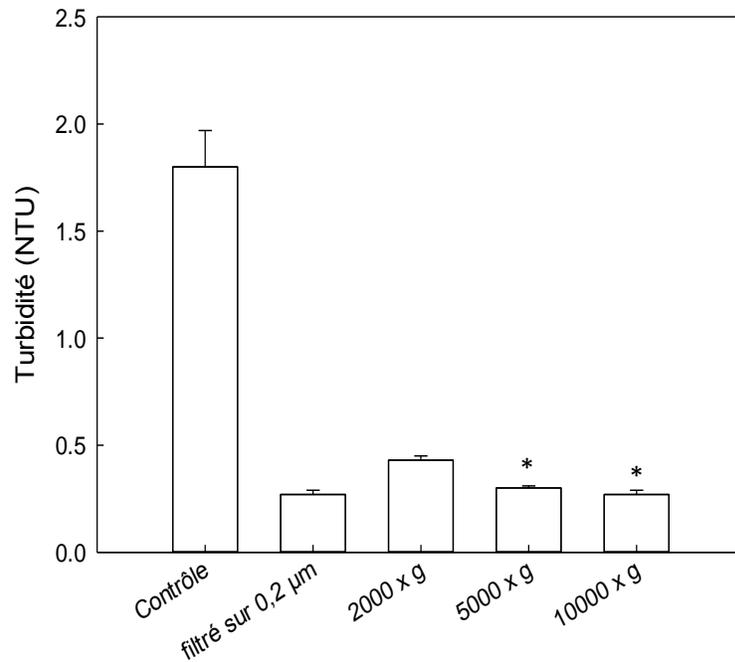


Figure 4-21: Turbidité du surnageant provenant de l'eau des mésocosmes 1, 2 et 3 après centrifugation (15 min) ou filtration (0,2 μm filtre en polycarbonate). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type sur les résultats de turbidité des trois mésocosmes (une répétition pour chaque mésocosme). Les astérisques indiquent qu'aucune différence significative n'a été observée avec la filtration sur une membrane de porosité de 0,2 μm (test de Student, $p > 0,05$).

Les pertes en argent après centrifugation sont présentées sur la Figure 4-22. La concentration en argent après centrifugation à 10 000 x g est largement inférieure à celle du contrôle. Néanmoins, celle-ci a été jugée suffisante et les algues ont pu être exposées aux surnageants récupérés après centrifugation à 10 000 x g pendant 15 min des eaux douces des trois mésocosmes. La concentration en carbone organique total a été analysée avant ($4,60 \pm 0,26$ mg/L) et après ($4,53 \pm 0,59$ mg/L) centrifugation et aucune différence significative n'a été observée (test de Student, $p > 0,05$, $n = 3$).

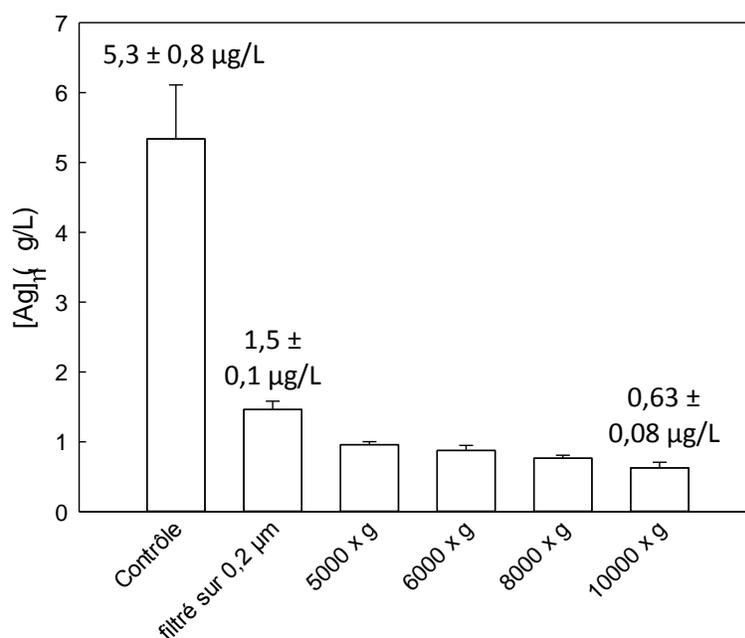


Figure 4-22: Concentrations initiales en argent dans les mésocosmes 2 et 3 (sans filtration, ni centrifugation : “contrôle”), comparées aux concentrations dans le filtrat après passage à travers un filtre en polycarbonate de 0,2 µm et aux concentrations dans le surnageant après 15 min de centrifugation à différentes vitesses (5 000 à 10 000 g). Les barres d’erreur correspondent à l’écart type sur les concentrations en argent dans les mésocosmes 2 et 3 (n = 2; une répétition pour chaque mésocosme).

Les concentrations en argent total, présentées sur la Figure 4-23 ont diminué de 25 à 30% entre le début et la fin de l’exposition, que ce soit en présence ou en absence d’algues. Rappelons que la concentration en argent après exposition a été définie comme la concentration en argent dans le filtrat. Cette diminution peut donc être due à l’adsorption de l’argent sur des particules, assez grosses pour pouvoir être retenues sur le filtre (argile résiduelle).

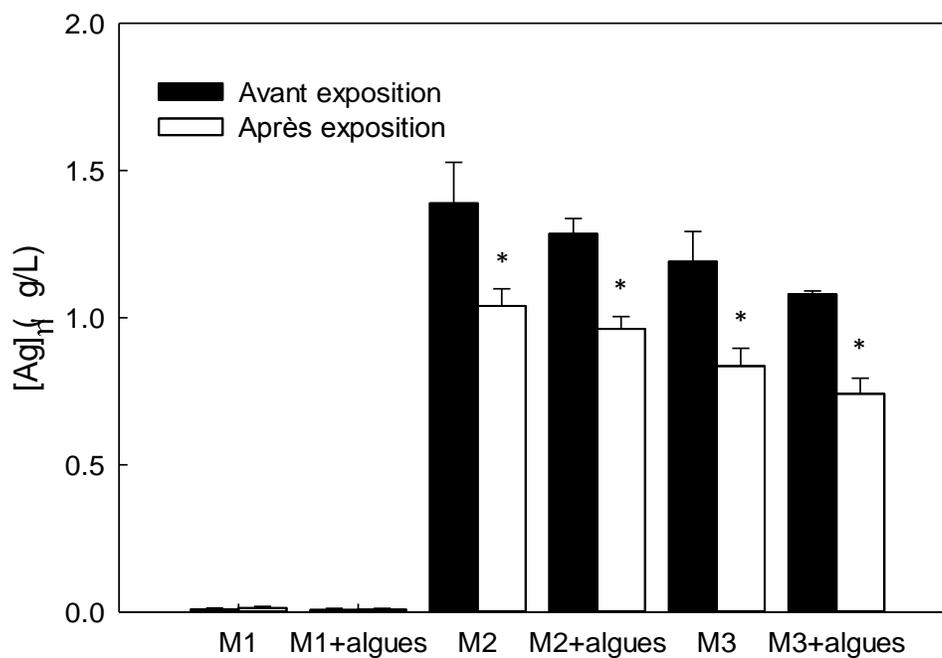


Figure 4-23: Concentrations en argent avant (en noir) et après 1 h d'exposition (en blanc) avec ou sans algues. Les surnageants de chaque mésocosme récupérés après 15 min de centrifugation à $10\,000 \times g$ ont servi de solutions d'exposition. La concentration en argent après exposition est définie comme la concentration en argent dans le filtrat (deux filtres en polycarbonate superposés, $2 \mu\text{m}$ porosité). Moyenne \pm écart type ($n = 3$). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Les astérisques correspondent à des différences significatives entre avant et après exposition pour chaque mésocosme, avec ou sans algues (test de Student, $p < 0,05$).

En outre, le bilan de masse effectué (Ag dans la solution d'exposition + Ag dans le filtrat + Ag dans la solution de lavage + Ag sur les filtres) a démontré qu'entre 85 et 95% de l'argent initialement présent dans la solution d'exposition était récupéré (Tableau 4-4).

Tableau 4-4 : Bilan de masse effectué avec les résultats obtenus après exposition de l'argent aux algues (résultats $\pm 1\sigma$).

		[Ag] total ($\mu\text{g/L}$)	[Ag] dans le filtrat ($\mu\text{g/L}$)	[Ag] dans la solution de lavage ($\mu\text{g/L}$)	[Ag] sur le filtre 1 ($\mu\text{g/L}$)*	[Ag] sur le filtre 2 ($\mu\text{g/L}$)*	Récupération (%)
Mésocosme 2	Avec algues	$1,4 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,004$	$89,8 \pm 2,2$
	Sans algues	$1,3 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,009$	$0,09 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,004$	$88,0 \pm 1,6$
Mésocosme 3	Avec algues	$1,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,003$	$84,5 \pm 1,9$
	Sans algues	$1,1 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,004$	$85,3 \pm 3,0$

* Les valeurs indiquées sont normalisées pour le volume filtré

Les concentrations en argent dissous avant exposition, présentées sur la Figure 4-24 et déterminées par ultrafiltration par centrifugation, correspondent à 7 à 11% de la concentration en argent total, ce qui concorde avec les résultats obtenus précédemment par dialyse (5-15%).

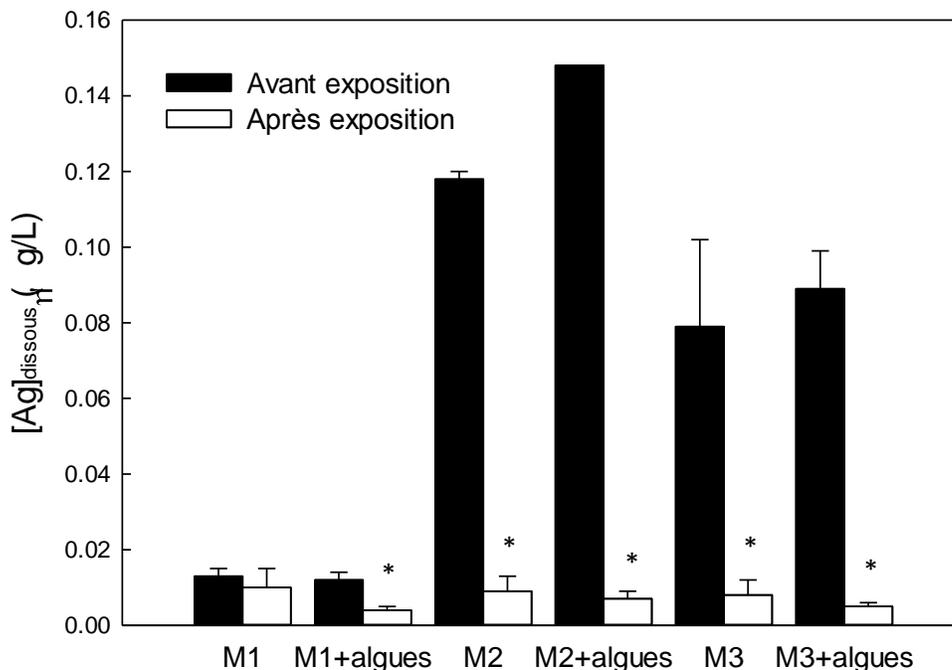


Figure 4-24: Concentrations en argent dissous dans l'eau des trois mésocosmes avant (en noir) et après 1 h d'exposition (en blanc) avec ou sans algues. La concentration en argent dissous est définie comme la concentration en argent dans le filtrat après ultrafiltration par centrifugation à $3\,700 \times g$ pendant 20 min. Moyenne \pm écart type ($n = 3$). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Les astérisques correspondent à des différences significatives entre avant et après exposition pour chaque mésocosme, avec ou sans algues (test de Student, $p < 0,05$).

Ces concentrations ont fortement diminué après exposition, même en absence d'algues. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ce phénomène. Premièrement, il est possible qu'en filtrant la solution d'exposition, l'argile résiduelle présente dans celle-ci s'agglomère sur le filtre en adsorbant une quantité plus importante d'argent. Cette hypothèse a été partiellement validée par l'analyse de l'argent adsorbé sur les filtres, dont les résultats sont présentés dans le Tableau 4-5. Rappelons que les deux filtres superposés de $3\ \mu\text{m}$ de largeur de pore ont été utilisés pour récolter les algues exposées aux nanoparticules d'argent.

Tableau 4-5 : Argent retenu sur deux filtres en nitrocellulose de 3 μm superposés après passage des eaux des mésocosmes avec (250 mL) et sans algues (400 mL) (résultats $\pm 1\sigma$)

Échantillons	[Ag] sur le filtre supérieur (ng)	[Ag] sur le filtre inférieur (ng)
Blanc (filtration d'eau déionisée)	0,21 \pm 0,06	<0,006
Mésocosme 1 (témoin)	0,84 \pm 0,18	0,06 \pm 0,09
Mésocosme 2	1118 \pm 441	53,2 \pm 3,0
Mésocosme 3	722 \pm 299	52,5 \pm 6,0
Mésocosme 1 + algues	0,64 \pm 0,20	0,003 \pm 0,001
Mésocosme 2 + algues	282 \pm 123	45,3 \pm 6,6
Mésocosme 3 + algues	133 \pm 24	31,8 \pm 4,8

Une quantité importante d'argent a été retrouvée sur les deux filtres, même en absence d'algues. Il est à noter qu'un volume plus important de solution d'exposition sans algue a été passé à travers les filtres (400 mL vs 250 mL) mais que cette différence n'est pas la seule explication au fait qu'une plus grande quantité d'argent a été retrouvée sur ceux-ci. Il a été supposé qu'en passant 400 mL de solution, le filtre s'obstruait davantage et retenait donc plus d'argent. La deuxième hypothèse est qu'en diminuant la concentration en argent dissous dans la solution, l'influence de l'adsorption par la membrane d'ultrafiltration est plus importante. Cette dernière hypothèse a été validée en utilisant une solution d'argent radioactif, d'activité et de concentration connues. Les résultats sont présentés sur la Figure 4-25. Quand la concentration en argent était plus faible, les pertes par adsorption sur le dispositif de centrifugation-ultrafiltration (exprimées en pourcentages) étaient en effet plus importantes.

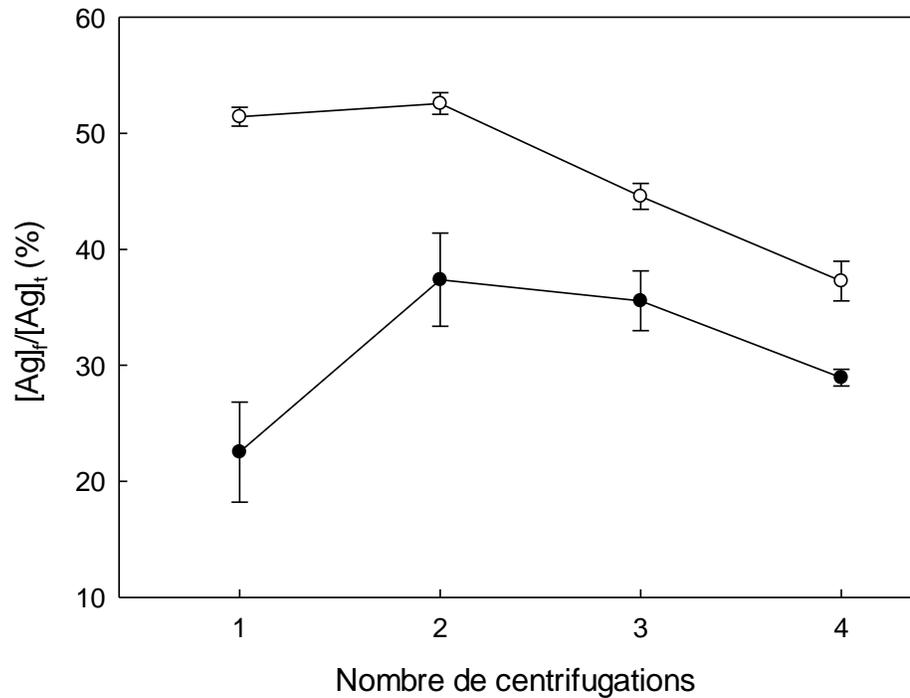


Figure 4-25: Proportion en argent dans le filtrat, mesuré après n centrifugations successives de 20 min à $3\ 700 \times g$ de 4,5 mL d'une solution de concentration en argent total de : 85,8 (●) et 144,6 ng/L (○). Moyenne \pm écart type (n = 3).

Comme cela peut être constaté sur la Figure 4-26, aucune différence entre la quantité d'argent récupérée sur les filtres avec et sans algues n'a été observée (test de Student, $p > 0,05$, $n=3$). De la même façon, sur la Figure 4-27, aucune différence entre les concentrations en argent adsorbé (analysées dans les solutions de lavage) avec et sans algues n'a été relevée (test de Student, $p > 0,05$, $n=3$). Cela indique que la concentration en argent associé aux algues (en surface ou internalisé) était trop faible pour pouvoir être quantifiée.

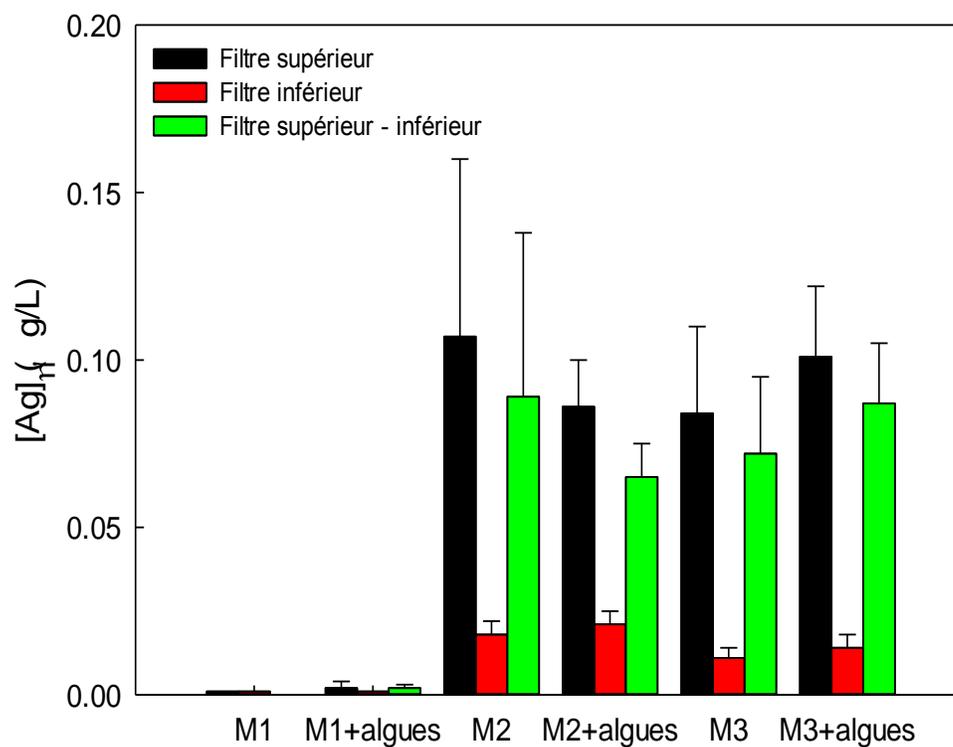


Figure 4-26: Argent retenu sur le filtre supérieur (en noir), inférieur (en rouge) et différence entre les deux filtres (en vert) après passage des solutions d'exposition de trois mésocosmes avec et sans algues. Deux filtres en polycarbonate superposés de 2 μm ont été utilisés. Moyenne \pm écart type (n = 3). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Aucune différence statistiquement significative entre la quantité d'argent récupérée sur les filtres avec et sans algues n'a été observée (test de Student, $p > 0,05$)

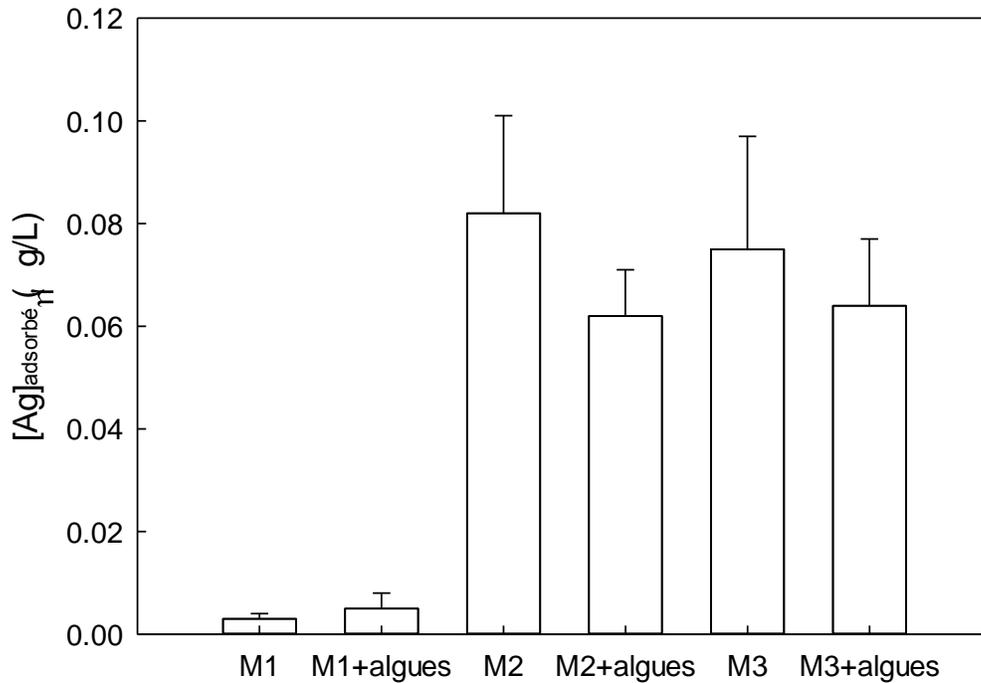


Figure 4-27: Concentrations en argent adsorbé récupéré des filtres utilisés pour filtrer les eaux d'exposition des mésocosmes avec ou sans algues. La concentration en argent adsorbé est définie comme la concentration en argent dans la solution de lavage (200 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 4×10 mL). Moyenne \pm écart type ($n = 3$). M1: Mésocosme 1 (témoin); M2: Mésocosme 2; M3: Mésocosme 3 (cf. Figure 3-2). Aucune différence statistiquement significative entre les concentrations en argent adsorbé avec et sans algues n'a été relevée (test de Student, $p > 0,05$)

4.8.4. Accumulation de l'argent par *Daphnia magna*

Les concentrations en argent total retrouvées dans la solution après exposition des daphnies (Figure 4-28) ne sont statistiquement pas différentes des concentrations en argent avant exposition (test de Student, $p > 0,05$, $n = 5$), et cela pour les deux mésocosmes.

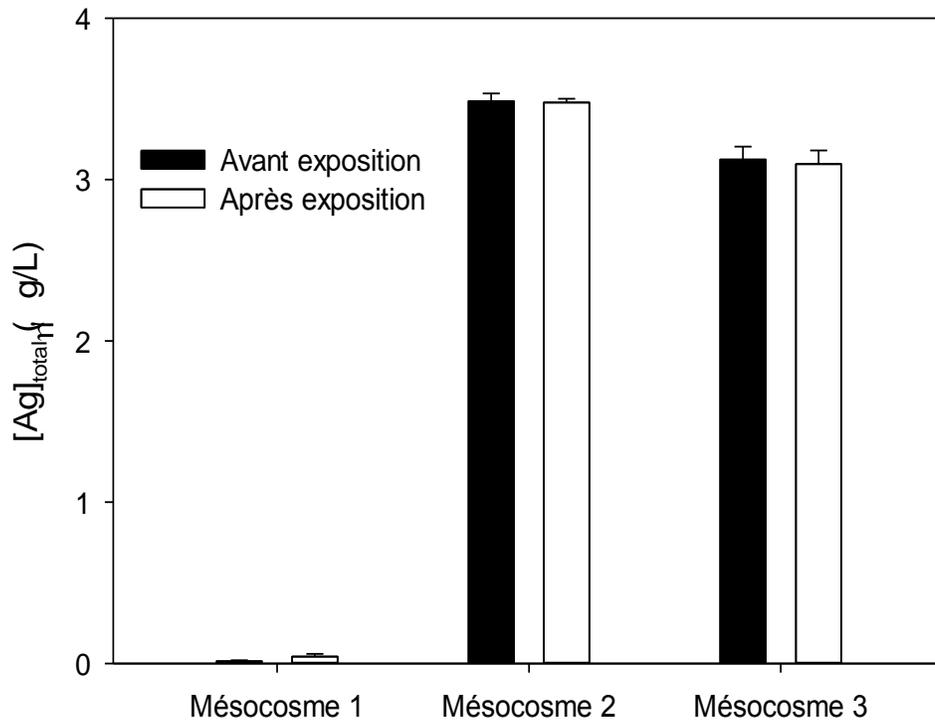


Figure 4-28: Concentrations en argent total dans la solution d'exposition des trois mésocosmes (sans filtration, ni centrifugation) avant (en noir) et après exposition de *Daphnia magna* (en blanc). Moyenne \pm écart type (n = 5). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les concentrations en Ag total retrouvées dans la solution avant et après exposition des daphnies (test de Student, $p > 0,05$).

La Figure 4-29 présente les résultats obtenus après analyse de l'argent dans les daphnies. Une concentration d'environ 0,5 ng/daphnie a été retrouvée dans les organismes exposés aux eaux des deux mésocosmes. Une faible concentration en argent ($\sim 0,01$ ng/daphnie) a été également retrouvée dans les organismes exposés à l'eau du mésocosme 1 (témoin), probablement due à la concentration naturelle en argent ($0,003 \mu\text{g/L}$) détectée dans l'eau douce utilisée.

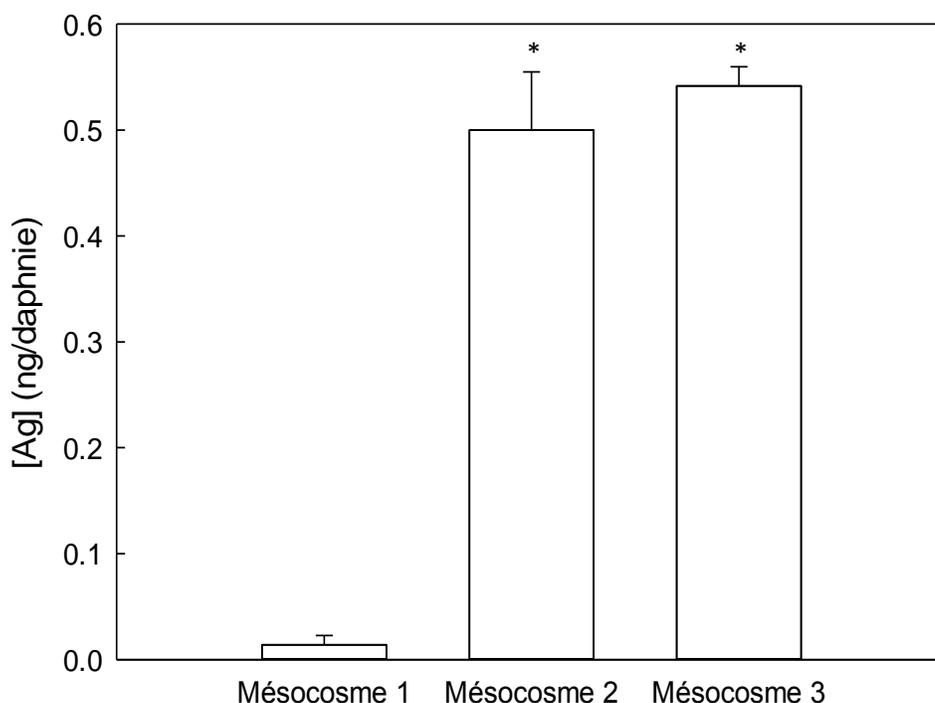


Figure 4-29: Accumulation de l'argent provenant des différents mésocosmes dans *Daphnia magna* après 24 h d'exposition. Moyenne \pm écart type (n = 5). Les astérisques indiquent qu'une différence statistiquement significative a été observée avec les résultats du mésocosme 1 (témoin) (test de Student, $p < 0,05$).

Il est difficile de pouvoir conclure en ne se basant que sur ces résultats. Étant donné que l'argent dans les mésocosmes n'était pas disponible pour les algues, comme cela a été indiqué dans la partie précédente, il est possible que les daphnies aient accumulé l'argent provenant seulement de la solution (par filtration des particules non algales comme l'argile par exemple) et/ou par adsorption à leur surface.

5. CONCLUSION

L'utilisation de nanoparticules d'argent augmente de manière exponentielle depuis les années 1990 principalement à cause de leur propriété d'antibactérien, intimement liée à leur taille. En effet, l'important rapport surface/volume des nanoparticules, beaucoup plus élevé que celui des particules de plus grande dimension, leur confère une importante réactivité, leur permettant notamment de libérer un grand nombre d'ions argent, responsables de l'effet bactéricide. Or, il a été démontré que les produits de consommation tels que les nanotextiles contenant des AgNPs peuvent rejeter des nanoparticules dans l'environnement à toutes les étapes de leur cycle de vie. En outre, une grande majorité de l'argent va se retrouver dans les boues d'épuration, utilisées comme agent fertilisant en sortie d'usines de traitement des eaux usées. Une portion de l'argent, lessivé par la pluie, pourrait alors se retrouver dans les eaux de surface. Dépendamment des transformations que les nanoparticules d'argent vont y subir, principalement oxydation, agrégation et dissolution selon les propriétés physico-chimiques des nanoparticules et du milieu récepteur, elles vont être plus ou moins biodisponibles aux organismes aquatiques. Les concentrations environnementales en nanoparticules d'argent ont été estimées, grâce à des modèles, être de l'ordre du ng/L, et donc trop faibles pour être quantifiables. En outre, encore peu de techniques analytiques ont été développées afin de détecter spécifiquement les nanoparticules d'origine synthétique. Des études visant à prédire le comportement des nanoparticules dans les eaux naturelles ont été effectuées, mais souvent à des concentrations trop élevées par rapport aux concentrations naturelles estimées. Elles ont néanmoins permis de déterminer certains mécanismes d'interaction des nanoparticules d'argent avec les cellules biologiques, ainsi que les différents effets toxiques en résultant. Cependant, l'effet propre des nanoparticules relativement à celui de l'argent dissous est encore à préciser. Les interactions des nanoparticules d'argent avec la membrane biologique restent encore floues.

Les objectifs principaux de cette recherche consistaient à étudier la prise en charge de (i) l'argent dissous, en absence ou en présence de ligands inorganiques et (ii) des nanoparticules d'argent enrobés de PVP, par des liposomes utilisés comme modèle membranaire. Pour cela, des études cinétiques à court terme (≤ 100 min) ont été effectuées. Une étude en mésocosmes a également été effectuée avec pour but l'analyse du comportement des AgNPs en eau douce et de leur biodisponibilité pour une chaîne trophique simple.

Des liposomes composés de phosphatidylcholine, d'environ 170 nm de diamètre, ont été synthétisés avec succès par extrusion dans un milieu à pH 6,0. Leur taille a été déterminée sur Zetasizer Nano-ZS et

ils ont été transférés par chromatographie d'exclusion stérique dans un milieu à pH 7,4. Le rouge de phénol, placé dans la solution interne aux liposomes, servait en effet d'indicateur coloré (jaune à pH 6 et rouge à pH 7,4) et permettait de détecter des fuites potentielles à travers la membrane des liposomes.

(i) L'argent dissous à 20 nM en absence de ligand inorganique, donc principalement sous forme Ag^+ en solution, ne s'est pas internalisé dans les liposomes mais s'est seulement adsorbé à leur surface (en moyenne 24 $\mu\text{mol Ag/g P}$). Ceci est cohérent avec le fait que Ag^+ est un cation donc une espèce hydrophile, n'ayant pas d'affinité avec la partie apolaire de la bicouche phospholipidique et ne pouvant donc pas la traverser. Cependant, la prise en charge de l'anion AgS_2O_3^- , obtenu par complexation de l'argent et du thiosulfate, s'est principalement faite par diffusion passive, dont la constante de vitesse est 51 L/g P/min. Les liposomes semblent donc être plus perméables aux anions qu'aux cations. Cela confirme les observations tirées de la littérature et pourrait constituer une des limites du modèle. En effet, les études effectuées sur les cellules vivantes démontrent que le complexe argent-thiosulfate ne passe à travers la membrane plasmique que par diffusion facilitée, en empruntant le transporteur du sulfate/thiosulfate. De la même façon, notre étude a établi que le complexe AgCl^0 s'internalisait également par diffusion passive à travers la membrane des liposomes, dont la constante de vitesse est 68 L/g P/min. Nous avons fait l'hypothèse que cette espèce, neutre mais polaire, se comportait comme les anions et satisfaisait au modèle de solubilité-diffusion, appliqué aux liposomes. Ceci entre également en contradiction avec les études effectuées sur les cellules vivantes, l'hypothèse de diffusion passive de AgCl^0 ayant été réfutée. La diffusion de l'eau ainsi que des complexes lipophiles HgCl_2^0 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à travers la membrane a été examinée afin d'approfondir l'étude. Les molécules d'eau, tel qu'indiqué plus haut, diffusaient très rapidement à travers la membrane, contrairement aux complexes de mercure et de cadmium. Leur diffusion passive à travers la membrane de films lipidiques et d'algues avait néanmoins été démontrée. Cependant, les films lipidiques semblent être plus perméables que les liposomes, comme l'attestent les valeurs de perméabilité à l'eau calculées pour les deux modèles (en moyenne 40,2 $\mu\text{m/s}$ pour les films lipidiques et 2,0 $\mu\text{m/s}$ pour les liposomes). Le rayon de courbure, modifiant l'architecture moléculaire, la tension membranaire et l'alignement des dipôles permanents des phospholipides, apparaît comme le paramètre principal influençant la perméabilité des membranes. Les différences entre les résultats obtenus avec le modèle membranaire et ceux obtenus avec des cellules biologiques nous incitent à penser que l'extrapolation des conclusions tirées des études réalisées avec des liposomes est à faire avec prudence. Il serait intéressant d'approfondir l'étude des causes de la perméabilité sélective des membranes aux ions afin de mieux comprendre les limites du

modèle et de pouvoir extrapoler de manière plus éclairée. L'utilisation de liposomes de tailles plus élevées (ex. : GUV, *giant unilamellar vesicles*) de diamètre de l'ordre du μm pourrait aider à rendre l'étude plus représentative, la taille des cellules biologiques étant généralement de cet ordre de grandeur. En outre, tel qu'indiqué plus tôt, le rayon de courbure, directement relié au diamètre des liposomes, pourrait influencer la perméabilité des membranes. Des transporteurs spécifiques pourraient également être intégrés à la membrane des liposomes de manière à complexifier le modèle et de se rapprocher de la composition des membranes naturelles. L'étude de la diffusion facilitée des ions pourrait alors être possible.

(ii) Les AgNPs-PVP d'environ 5 nm de diamètre, à une concentration initiale de 55 nM, n'ont à première vue pas passé la membrane des liposomes ni ne l'ont détérioré, comme cela avait été démontré pour d'autres nanoparticules. Néanmoins, une dissolution rapide des nanoparticules (après 20 à 30 min) a été observée. Celle-ci est probablement due à la faible concentration et au faible diamètre des nanoparticules ainsi qu'à une force ionique élevée et une forte concentration en oxygène dissous dans la solution d'exposition. Ces conditions représentaient un défi important, et ont rendu l'interprétation des résultats difficile. Il a été démontré que des nanoparticules de silice pouvaient entrer dans des liposomes par invagination de la membrane et que ce processus était très rapide. Si cela avait été le cas dans notre étude, les quantités d'argent associées aux liposomes, ne serait-ce qu'au début de l'expérience, auraient été beaucoup plus importantes. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'aucune invagination des AgNPs n'avait eu lieu, mais que celles-ci s'étaient seulement adsorbées à la surface des liposomes.

Afin d'étudier plus en détail les mécanismes d'interaction entre nanoparticules d'argent et liposomes, et étant donné les paramètres influençant la dissolution des AgNPs, la solution serait de travailler à une concentration plus élevée, quitte à s'éloigner des concentrations naturelles. Une augmentation de la taille des nanoparticules ou une réduction de la force ionique pourrait également permettre une diminution de leur vitesse de dissolution. Afin d'augmenter la représentativité de l'étude, il serait également possible de reproduire ces expériences avec des nanoparticules présentant des revêtements différents.

(iii) Des nanoparticules d'argent enrobées de citrate d'environ 20 nm de diamètre ont été injectées en continu dans les mésocosmes. La concentration en argent total, analysée tous les trois jours pendant douze jours consécutifs, variait entre 4 et 7 $\mu\text{g/L}$. Les concentrations en argent dialysable étaient comprises entre 0,1 et 0,6 $\mu\text{g/L}$, correspondant à 5-15% de la concentration en Ag total. Étant donné les

concentrations en chlorures (263 ± 85 mg/L), la spéciation de l'argent dissous était dominée par les chloro-complexes (> 95%). De plus, l'argent s'adsorbait fortement aux particules d'argile présentes dans la colonne d'eau.

Nos résultats ont démontré que les algues (*Chlamydomonas reinhardtii*), exposées aux nanoparticules d'argent dans l'eau douce des mésocosmes, n'ont pas pris suffisamment en charge l'argent pour que cela soit détectable par nos appareils d'analyse. La concentration moyenne retrouvée dans les daphnies était de 0,5 ng Ag/daphnie. Aucune accumulation significative n'a été observé dans les algues donc les daphnies n'ont pas pu l'assimiler via la nourriture. L'argent pourrait alors s'être associé aux daphnies par filtration de particules non algales comme l'argile et/ou par adsorption à leur surface.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Adams NWH & Kramer JR (1999) Silver speciation in wastewater effluent, surface waters, and pore waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(12):2667-2673.
- Akaighe N, Maccuspie RI, Navarro DA, Aga DS, Banerjee S, Sohn M & Sharma VK (2011) Humic acid-induced silver nanoparticle formation under environmentally relevant conditions. *Environmental Science & Technology* 45(9):3895-3901.
- Allen HJ, Impellitteri CA, Macke DA, Heckman JL, Poynton HC, Lazorchak JM, Govindaswamy S, Roose DL & Nadagouda MN (2010) Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(12):2742-2750.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF) (2005) *Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Edition*.
- Andreoli TE, Bangham JA & Tosteson DC (1967) The formation and properties of thin lipid membranes from HK and LK sheep red cell lipids. *Journal of General Physiology* 50(6):1729-1749.
- Angel BM, Batley GE, Jarolimek CV & Rogers NJ (2013) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* 93(2):359-365.
- Anonyme (2009) *Black lipid membrane via wikimedia.org (public property)*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Black_lipid_membrane.svg.
- Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, Moon MC & Yu IJ (2012) Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology* 10:1-11.
- Bailey CM, Kamaloo E, Waterman KL, Wang KF, Nagarajan R & Camesano TA (2015) Size dependence of gold nanoparticle interactions with a supported lipid bilayer: A QCM-D study. *Biophysical Chemistry* 203:51-61.
- Bangham AD (1968) Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 18:29-95.
- Bangham AD, Standish MM & Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* 13(1):238-252.
- Benn TM & Westerhoff P (2008) Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology* 42(11):4133-4139.
- Berger N, Sachse A, Bender J, Schubert R & Brandl M (2001) Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 223(1-2):55-68.
- Bianchini A & Wood CM (2003) Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(6):1361-1367.
- Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR & Perrie Y (2011) Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics* 417(1-2):138-150.

- Bienvenue E, Boudou A, Desmazes JP, Gavach C, Georgescauld D, Sandeaux J, Sandeaux R & Seta P (1984) Transport of mercury compounds across bimolecular lipid membranes: effect of lipid composition, pH and chloride concentration. *Chemico-Biological Interactions* 48(1):91-101.
- Blinova I, Niskanen J, Kajankari P, Kanarbik L, Kakinen A, Tenhu H, Penttinen OP & Kahru A (2013) Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Environmental Science and Pollution Research* 20(5):3456-3463.
- Bone AJ, Colman BP, Gondikas AP, Newton KM, Harrold KH, Cory RM, Unrine JM, Klaine SJ, Matson CW & Di Giulio RT (2012) Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of Ag nanoparticles: Part 2-toxicity and Ag speciation. *Environmental Science & Technology* 46(13):6925-6933.
- Bonicelli MG, Giansanti L, Ierino M & Mancini G (2011) Interaction of cationic liposomes with cell membrane models. *Journal of Colloid and Interface Science* 355(1):1-8.
- Boullemant A, Lavoie M, Fortin C & Campbell PGC (2009) Uptake of hydrophobic metal complexes by three freshwater algae: unexpected influence of pH. *Environmental Science & Technology* 43(9):3308-3314.
- Bradford A, Handy RD, Readman JW, Atfield A & Muhling M (2009) Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environmental Science & Technology* 43(12):4530-4536.
- Buffet PE, Richard M, Caupos F, Vergnoux A, Perrein-Ettajani H, Luna-Acosta A, Akcha F, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Guibbolini M, Risso-De Faverney C, Thomas-Guyon H, Reip P, Dybowska A, Berhanu D, Valsami-Jones E & Mouneyrac C (2013) A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). *Environmental Science & Technology* 47(3):1620-1628.
- Buffet PE, Zalouk-Vergnoux A, Chatel A, Berthet B, Metais I, Perrein-Ettajani H, Poirier L, Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Risso-de Faverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Valsami-Jones E & Mouneyrac C (2014) A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Science of the Total Environment* 470:1151-1159.
- Buffle J & Stumm W (1994) General chemistry of aquatic systems. *Chemical and biological regulation of aquatic systems*, Buffle J & De Vitre RR (Édit.). p 1-42.
- Burchardt AD, Carvalho RN, Valente A, Nativo P, Gilliland D, Garcia CP, Passarella R, Pedroni V, Rossi F & Lettieri T (2012) Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and *Cyanobacterium Synechococcus* sp. *Environmental Science & Technology* 46(20):11336-11344.
- Campbell PGC, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP & Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133(1–2):189-206.
- Campbell PGC & Fortin C (2013) Biotic ligand model. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer. p 237-246.

- Carrozzino JM & Khaledi MG (2005) pH effects on drug interactions with lipid bilayers by liposome electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 1079(1-2):307-316.
- Carruthers A & Melchior DL (1983) Studies of the relationship between bilayer and water permeability and bilayer physical state. *Biochemistry* 22(25):5797-5807.
- Castile JD & Taylor KMG (1999) Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *International Journal of Pharmaceutics* 188(1):87-95.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec - Ministère du Développement durable d'EedPdQ (2011) Détermination de la toxicité létale CL50 48h *Daphnia magna* MA.500 - D. mag 1.1, Rév. 1.
- Chen KL & Bothun GD (2014) Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes. *Environmental Science & Technology* 48(2):873-880.
- Chen ZZ, Campbell PGC & Fortin C (2012) Silver binding by humic acid as determined by equilibrium ion-exchange and dialysis. *Journal of Physical Chemistry A* 116(25):6532-6539.
- Chen ZZ, Porcher C, Campbell PGC & Fortin C (2013) Influence of humic acid on algal uptake and toxicity of ionic silver. *Environmental Science & Technology* 47(15):8835-8842.
- Cheng YW, Yin LY, Lin SH, Wiesner M, Bernhardt E & Liu J (2011) Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight. *Journal of Physical Chemistry C* 115(11):4425-4432.
- Cleveland D, Long SE, Pennington PL, Cooper E, Fulton MH, Scott GI, Brewer T, Davis J, Petersen EJ & Wood L (2012) Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of Silver nanomaterials leached from consumer products. *Science of the Total Environment* 421:267-272.
- Cohen BE & Bangham AD (1972) Diffusion of small nonelectrolytes across liposomes membranes. *Nature* 236(5343):173-&.
- Conine AL & Frost PC (2017) Variable toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*: effects of algal particles and animal nutrition. *Ecotoxicology* 26(1):118-126.
- Cowan CE, Jenne EA & Crecelius EA (1985) Silver speciation in seawater: the importance of sulfide and organic complexation. *Marine and estuarine geochemistry*.
- Croteau MN, Misra SK, Luoma SN & Valsami-Jones E (2011) Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. *Environmental Science & Technology* 45(15):6600-6607.
- Cumberland SA & Lead JR (2009) Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *Journal of Chromatography A* 1216(52):9099-9105.
- Dartmouth Electron Microscope Facility (2007) *Scanning electron microscope image, showing an example of green algae via wikimedia.org (public property)*. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlamydomonas6-1.jpg>.
- Das P, Metcalfe CD & Xenopoulos MA (2014) Interactive effects of silver nanoparticles and phosphorus on phytoplankton growth in natural waters. *Environmental Science & Technology* 48(8):4573-4580.

- Das P, Xenopoulos MA & Metcalfe CD (2013) Toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticle suspensions to the aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91(1):76-82.
- Deamer DW & Bramhall J (1986) Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chemistry and Physics of Lipids* 40(2-4):167-188.
- Dembitsky VM & Rozentsvet OA (1996) Distribution of polar lipids in some marine, brackish and freshwater green macrophytes. *Phytochemistry* 41(2):483-488.
- Deo N & Somasundaran P (2003) Effects of sodium dodecyl sulfate on mixed liposome solubilization. *Langmuir* 19(18):7271-7275.
- Deserno M & Gelbart WM (2002) Adhesion and wrapping in colloid-vesicle complexes. *Journal of Physical Chemistry B* 106(21):5543-5552.
- Dobias J & Bernier-Latmani R (2013) Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environmental Science & Technology* 47(9):4140-4146.
- Ducat E, Brion M, Lecomte F, Evrard B & Piel G (2010) The experimental design as practical approach to develop and optimize a formulation of peptide-loaded liposomes. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 11(2):966-975.
- Dwivedi AD, Dubey SP, Sillanpaa M, Kwon YN, Lee C & Varma RS (2015) Fate of engineered nanoparticles: Implications in the environment. *Coordination Chemistry Reviews* 287:64-78.
- El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT & Tolaymat TM (2010) Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science & Technology* 44(4):1260-1266.
- Enoch HG & Strittmatter P (1979) Formation and properties of 1000-A-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(1):145-149.
- Environnement Canada (2000) SPE 1/RM/14 Deuxième édition - Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*. *Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Centre de technologie environnementale, Ottawa, Canada*:1-36.
- Evjen TJ, Hagtvet E, Nilssen EA, Brandl M & Fossheim SL (2011) Sonosensitive dioleoylphosphatidylethanolamine-containing liposomes with prolonged blood circulation time of doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 43(4):318-324.
- Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS & Lead JR (2011) Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* 37(2):517-531.
- Farkas J, Peter H, Christian P, Urrea JAG, Hasselov M, Tuoriniemi J, Gustafsson S, Olsson E, Hylland K & Thomas KV (2011) Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environment International* 37(6):1057-1062.
- Finkelstein A (1972) Thin lipid membranes - A model for cell membranes. *Archives of Internal Medicine* 129(2):229-240.
- Finkelstein A & Cass A (1967) Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. *Nature* 216(5116):717-718.

- Finkelstein A & Cass A (1968) Permeability and electrical properties of thin lipid membranes. *Journal of General Physiology* 52(1):145-172.
- Flewelling RF & Hubbell WL (1986) The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. *Biophysical Journal* 49(2):541-552.
- Fortin C (2000) *Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique*. Ph.D. (INRS-Eau). 179 p
- Fortin C & Campbell PGC (2000) Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(11):2769-2778.
- Fortin C & Campbell PGC (2001) Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporters in metal uptake. *Environmental Science & Technology* 35(11):2214-2218.
- Fu PP, Xia Q, Hwang H-M, Ray PC & Yu H (2014) Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(1):64-75.
- Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Bayston R, Brown PD, Winship PD & Reid HJ (2004) Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(6):1019-1024.
- Georgantzopoulou A, Cambier S, Serchi T, Kruszewski M, Balachandran YL, Grysan P, Audinot JN, Ziebel J, Guignard C, Gutleb AC & Murk AJ (2016) Inhibition of multixenobiotic resistance transporters (MXR) by silver nanoparticles and ions in vitro and in *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment* 569:681-689.
- Geranio L, Heuberger M & Nowack B (2009) The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science & Technology* 43(21):8113-8118.
- Gil-Allue C, Schirmer K, Tlili A, Gessner MO & Behra R (2015) Silver nanoparticle effects on stream periphyton during short-term exposures. *Environmental Science & Technology* 49(2):1165-1172.
- Glover CN & Wood CM (2004) Physiological interactions of silver and humic substances in *Daphnia magna*: effects on reproduction and silver accumulation following an acute silver challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 139(4):273-280.
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW & Nowack B (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology* 43(24):9216-9222.
- Gottschalk F, Sun TY & Nowack B (2013) Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution* 181:287-300.
- Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo JC & Barber DS (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9):1972-1978.
- Gutknecht J (1981) Inorganic mercury (Hg²⁺) transport through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology* 61(1):61-66.
- Harris EH (2009) *The Chlamydomonas Sourcebook Second edition - Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*. Academic Press - Elsevier.

- Hazani AA, Ibrahim MM, Arif IA, Shehata AI, El-Gaaly G, Daoud M, Fouad D, Rizwana H & Moubayed N (2013) Ecotoxicity of Ag-nanoparticles to microalgae. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7:233-241.
- He D, Dorantes-Aranda JJ & Waite TD (2012) Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environmental Science & Technology* 46(16):8731-8738.
- Herrin RT, Andren AW & Armstrong DE (2001a) Determination of silver speciation in natural waters. 1. Laboratory tests of Chelex-100 chelating resin as a competing ligand. *Environmental Science & Technology* 35(10):1953-1958.
- Herrin RT, Andren AW, Shafer MM & Armstrong DE (2001b) Determination of silver speciation in natural waters. 2. Binding strength of silver ligands in surface freshwaters. *Environmental Science & Technology* 35(10):1959-1966.
- Hiriart-Baer VP, Fortin C, Lee DY & Campbell PGC (2006) Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology* 78(2):136-148.
- Hoheisel SM, Diamond S & Mount D (2012) Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(11):2557-2563.
- Hopfer U, Lehninger AL & Lennarz WJ (1970) Effect of polar moiety of lipids on ion permeability of bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology* 2(1):41-+.
- Hou WC, Moghadam BY, Corredor C, Westerhoff P & Posner JD (2012) Distribution of functionalized gold nanoparticles between water and lipid bilayers as model cell membranes. *Environmental Science & Technology* 46(3):1869-1876.
- Howe G & Merchant S (1992) Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 98(1):127-136.
- Huang WD, Zhang LX, Yang QP & Wang ZM (2014) Polyvinylpyrrolidone as an efficient stabilizer for silver nanoparticles. *Chinese Journal of Chemistry* 32(9):909-913.
- Huster D, Jin AJ, Arnold K & Gawrisch K (1997) Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by O-17 NMR. *Biophysical Journal* 73(2):855-864.
- Israelachvili JN (2011) Van der Waals and double-layer forces acting together : the DLVO theory. *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, London, England. p 8.
- Jang MH, Bae SJ, Lee SK, Lee YJ & Hwang YS (2014) Effect of material properties on stability of silver nanoparticles in water. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14(12):9665-9669.
- Jemec A, Kahru A, Potthoff A, Drobne D, Heinlaan M, Bohme S, Geppert M, Novak S, Schirmer K, Rekulapally R, Singh S, Aruoja V, Sihtmae M, Juganson K, Kakinen A & Kuhnel D (2016) An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: Harmonising techniques for high quality data. *Environment International* 87:20-32.
- Jo HJ, Choi JW, Lee SH & Hong SW (2012) Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. *Journal of Hazardous Materials* 227:301-308.
- Jones AM, Garg S, He D, Pham AN & Waite TD (2011) Superoxide-mediated formation and charging of silver nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 45(4):1428-1434.

- Kaegi R, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Mueller E, Vonbank R, Boller M & Burkhardt M (2010) Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution* 158(9):2900-2905.
- Kaegi R, Voegelin A, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Burkhardt M & Siegrist H (2011) Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental Science & Technology* 45(9):3902-3908.
- Kahru A & Dubourguier HC (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269(2-3):105-119.
- Kalman J, Paul KB, Khan FR, Stone V & Fernandes TF (2015) Characterisation of bioaccumulation dynamics of three differently coated silver nanoparticles and aqueous silver in a simple freshwater food chain. *Environmental Chemistry* 12(6):662-672.
- Keller CA & Kasemo B (1998) Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* 75(3):1397-1402.
- Kennedy AJ, Hull MS, Bednar AJ, Goss JD, Gunter JC, Bouldin JL, Vikesland PJ & Steevens JA (2010) Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environmental Science & Technology* 44(24):9571-9577.
- Kettler K, Veltman K, van de Meent D, van Wezel A & Hendriks AJ (2014) Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(3):481-492.
- Khan FR, Paul KB, Dybowska AD, Valsami-Jones E, Lead JR, Stone V & Fernandes TF (2015) Accumulation dynamics and acute toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*: implications for metal modeling approaches. *Environmental Science & Technology* 49(7):4389-4397.
- Kim I, Lee BT, Kim HA, Kim KW, Kim SD & Hwang YS (2016) Citrate coated silver nanoparticles change heavy metal toxicities and bioaccumulation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 143:99-105.
- Kwak JI, Cui R, Nam SH, Kim SW, Chae Y & An YJ (2016) Multispecies toxicity test for silver nanoparticles to derive hazardous concentration based on species sensitivity distribution for the protection of aquatic ecosystems. *Nanotoxicology* 10(5):521-530.
- Lam IKS & Wang WX (2006) Accumulation and elimination of aqueous and dietary silver in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64(1):26-35.
- Le Bihan O, Bonnafous P, Marak L, Bickel T, Trepout S, Mornet S, De Haas F, Talbot H, Taveau JC & Lambert O (2009) Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *Journal of Structural Biology* 168(3):419-425.
- Leclerc S & Wilkinson KJ (2014) Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii* - nanoparticle or the free ion? *Environmental Science & Technology* 48(1):358-364.
- Lee, DY, Fortin C & Campbell PGC (2004) Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4):1012-1018.
- Lee, DY, Fortin C & Campbell PGC (2005) Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 75(2):127-135.
- Lee, YJ, Kim J, Oh J, Bae S, Lee S, Hong IS & Kim SH (2012) Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1):155-159.

- Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, Baker JR, Orr BG & Banaszak Holl MM (2008) Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Letters* 8(2):420-424.
- Levard C, Hotze EM, Lowry GV & Brown GE, Jr. (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology* 46(13):6900-6914.
- Li X & Lenhart JJ (2012) Aggregation and dissolution of silver nanoparticles in natural surface water. *Environmental Science & Technology* 46(10):5378-5386.
- Li XA, Lenhart JJ & Walker HW (2010) Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* 26(22):16690-16698.
- Li Y, Zhang W, Niu JF & Chen YS (2013) Surface-coating-dependent dissolution, aggregation, and reactive oxygen species (ROS) generation of silver nanoparticles under different irradiation conditions. *Environmental Science & Technology* 47(18):10293-10301.
- Limpiteprakan P, Babel S, Lohwacharin J & Takizawa S (2016) Release of silver nanoparticles from fabrics during the course of sequential washing. *Environmental Science and Pollution Research* 23(22):22810-22818.
- Liu, JY & Hurt RH (2010a) Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology* 44(6):2169-2175.
- Liu BX, Mazouchi A & Gradinaru CC (2010b) Trapping single molecules in liposomes: surface interactions and freeze-thaw effects. *Journal of Physical Chemistry B* 114(46):15191-15198.
- Lombi E, Donner E, Scheckel KG, Sekine R, Lorenz C, Von Goetz N & Nowack B (2014) Silver speciation and release in commercial antimicrobial textiles as influenced by washing. *Chemosphere* 111:352-358.
- Lord F (2011) Réglementation des nanotechnologies dans le domaine agroalimentaire.
- Lorenz C, Windler L, von Goetz N, Lehmann RP, Schuppler M, Hungerbühler K, Heuberger M & Nowack B (2012) Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* 89(7):817-824.
- Lorin A, C. F, Thomas A & Brasseur R (2004) Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 8(3):163-176.
- Lowry GV, Espinasse BP, Badireddy AR, Richardson CJ, Reinsch BC, Bryant LD, Bone AJ, Deonarine A, Chae S, Therezien M, Colman BP, Hsu-Kim H, Bernhardt ES, Matson CW & Wiesner MR (2012a) Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environmental Science & Technology* 46(13):7027-7036.
- Lowry GV, Gregory KB, Apte SC & Lead JR (2012b) Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental Science & Technology* 46(13):6893-6899.
- Luoma SN (2008) Silver nanotechnologies and the environment : old problems or new challenges? (Woodrow Wilson International Center for Scholars).
- Luther GW, Church TM, Scudlark JR & Cosman M (1986) Inorganic and organic sulfur cycling in salt-marsh pore waters. *Science* 232(4751):746-749.
- Mackevica A, Olsson ME & Hansen SF (2017) The release of silver nanoparticles from commercial toothbrushes. *Journal of Hazardous Materials* 322:270-275.

- Mackevica A, Skjolding LM, Gergs A, Palmqvist A & Baun A (2015) Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. *Aquatic Toxicology* 161:10-16.
- Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM & Mura P (2006) Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 312(1-2):53-60.
- Malaekheh-Nikouei B, Malaekheh-Nikouei M, Oskuee RK & Ramezani M (2009) Preparation, characterization, transfection efficiency, and cytotoxicity of liposomes containing oligoamine-modified cholesterol as nanocarriers to Neuro2A cells. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 5(4):457-462.
- Malvern (2004) *Zetasizer nano series user manual - MAN0317 Issue 2.1*. Malvern Instruments Ltd. 288 p
- Malysheva A, Voelcker N, Holm PE & Lombi E (2016) Unraveling the complex behavior of AgNPs driving NP-cell interactions and toxicity to algal cells. *Environmental Science & Technology* 50(22):12455-12463.
- Mandal S, Gole A, Lala N, Gonnade R, Ganvir V & Sastry M (2001) Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds. *Langmuir* 17(20):6262-6268.
- Martell AE, Smith RM & Motekaitis RJ (2004) NIST critically selected stability constants of metal complexes v. 8.0. *National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA*.
- Mason RP, Reinfelder JR & Morel FMM (1996) Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science & Technology* 30(6):1835-1845.
- McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N & Morris D (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment* 575:231-246.
- McLaughlin J & Bonzongo JCJ (2012) Effects of natural water chemistry on nanosilver behavior and toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1):168-175.
- McTeer J, Dean AP, White KN & Pittman JK (2013) Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology* 0(0):1-12.
- McTeer J, Dean AP, White KN & Pittman JK (2014) Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology* 8(3):305-316.
- MDDELCC (2016) *Suivi de la qualité des rivières et petits cours d'eau*. http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eco_aqua/rivieres/annexes.htm#ph. Accessed 27 October 2016
- Melby ES, Mensch AC, Lohse SE, Hu D, Orr G, Murphy CJ, Hamers RJ & Pedersen JA (2016) Formation of supported lipid bilayers containing phase-segregated domains and their interaction with gold nanoparticles. *Environmental Science: Nano* 3(1):45-55.

- Mestre S, Chiva C, Palacios MD & Amoros JL (2012) Development of a yellow ceramic pigment based on silver nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society* 32(11):2825-2830.
- Miao AJ, Luo Z, Chen CS, Chin WC, Santschi PH & Quigg A (2010) Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *Plos One* 5(12):e15196.
- Miao AJ, Schwehr KA, Xu C, Zhang SJ, Luo ZP, Quigg A & Santschi PH (2009) The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution* 157(11):3034-3041.
- Michel R & Gradzielski M (2012) Experimental aspects of colloidal interactions in mixed systems of liposome and inorganic nanoparticle and their applications. *International Journal of Molecular Sciences* 13(9):11610.
- Millour M, Pelletier E & Gagné J-P (2017) Behavior of silver nanoparticles in stratified estuarine mesocosms: Particle size distribution and role of the halocline.
- Mitrano DM, Rimmel E, Wichser A, Erni R, Height M & Nowack B (2014) Presence of nanoparticles in wash water from conventional silver and nano-silver textiles. *Acs Nano* 8(7):7208-7219.
- Mittelman AM, Lantagne DS, Rayner J & Pennell KD (2015) Silver dissolution and release from ceramic water filters. *Environmental Science & Technology* 49(14):8515-8522.
- Moghadam BY, Hou WC, Corredor C, Westerhoff P & Posner JD (2012) Role of nanoparticle surface functionality in the disruption of model cell membranes. *Langmuir* 28(47):16318-16326.
- Moore MN (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32(8):967-976.
- Mueller NC & Nowack B (2008) Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* 42(12):4447-4453.
- Mühling M, Bradford A, Readman JW, Somerfield PJ & Handy RD (2009) An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Marine Environmental Research* 68(5):278-283.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH & Sigg L (2008a) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17(5):372-386.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L & Behra R (2008b) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42(23):8959-8964.
- Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L & Behra R (2012) Assessing ionic availability to algae from different coated silver nanoparticles. *NanoSpain Conference, Santander, Spain* (February 27 - March 01).
- Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L & Behra R (2015) Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*.
- Newton KM, Puppala HL, Kitchens CL, Colvin VL & Klaine SJ (2013) Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(10):2356-2364.

- Nowack B, Krug HF & Height M (2011) 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science & Technology* 45(4):1177-1183.
- Nyman CJ & Salazar T (1961) Complex ion formation of mercury(II) and thiosulfate ion. *Analytical Chemistry* 33(11):1467-1469.
- Odzak N, Kistler D, Behra R & Sigg L (2014) Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environmental Pollution* 191:132-138.
- Ohki K, Nagaoka S, Sogami M & Nozawa Y (1986) Ca^{2+} translocation activities of phosphatidylinositol, diacylglycerol and phosphatidic acid inferred by quin-2 in artificial membrane systems. *Chemistry and Physics of Lipids* 39(3):237-249.
- Oukarroum A, Bras S, Perreault F & Popovic R (2012) Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78:80-85.
- Ovecka M, Lang I, Baluska F, Ismail A, Illes P & Lichtscheidl IK (2005) Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226(1-2):39-54.
- Park JW, Oh JH, Kim WK & Lee SK (2014) Toxicity of citrate-coated silver nanoparticles differs according to method of suspension preparation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93(1):53-59.
- Parsegian A (1969) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221(5183):844-846.
- Paula S, Volkov AG, VanHoek AN, Haines TH & Deamer DW (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal* 70(1):339-348.
- Phinney JT & Bruland KW (1994) Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science & Technology* 28(11):1781-1790.
- Piccapietra F, Allué CG, Sigg L & Behra R (2012a) Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate. *Environmental Science & Technology* 46(13):7390-7397.
- Piccapietra F, Sigg L & Behra R (2012b) Colloidal stability of carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater. *Environmental Science & Technology* 46(2):818-825.
- Pletikapic G, Zutic V, Vinkovic Vrcek I & Svetlicic V (2012) Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance. *Journal of Molecular Recognition* 25(5):309-317.
- Purcell TW & Peters JJ (1998) Sources of silver in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(4):539-546.
- Ravindran A, Chandran P & Khan SS (2013) Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 105:342-352.
- Reinfelder JR & Chang SI (1999) Speciation and microalgal bioavailability of inorganic silver. *Environmental Science & Technology* 33(11):1860-1863.
- Ribeiro F, Gallego-Urrea JA, Jurkschat K, Crossley A, Hassellöv M, Taylor C, Soares AMVM & Loureiro S (2014) Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment* 466-467(0):232-241.

- Ribeiro F, Van Gestel CAM, Pavlaki MD, Azevedo S, Soares A & Loureiro S (2017) Bioaccumulation of silver in *Daphnia magna*: Waterborne and dietary exposure to nanoparticles and dissolved silver. *Science of the Total Environment* 574:1633-1639.
- Richter R, Mukhopadhyay A & Brisson A (2003) Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophysical Journal* 85(5):3035-3047.
- Romer I, Gavin AJ, White TA, Merrifield RC, Chipman JK, Viant MR & Lead JR (2013) The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicology Letters* 223(1):103-108.
- Ruiz M & Grandjean N (2007) *Cell membrane detailed diagram via wikimedia.org (public property)*.
https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Cell_membrane_detailed_diagram_fr.svg.
- Sakka Y, Skjolding LM, Mackevica A, Filser J & Baun A (2016) Behavior and chronic toxicity of two differently stabilized silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*.
- Sarpietro MG, Pitarresi G, Ottimo S, Giuffrida MC, Ognibene MC, Fiorica C, Giammona G & Castellit F (2011) Interaction between drug loaded polyaspartamide-poly lactide-polysorbate based micelles and cell membrane models: a calorimetric study. *Molecular Pharmaceutics* 8(3):642-650.
- Satsoura D, Kucerka N, Shivakumar S, Pencer J, Griffiths C, Leber B, Andrews DW, Katsaras J & Fradin C (2012) Interaction of the full-length Bax protein with biomimetic mitochondrial liposomes: A small-angle neutron scattering and fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818(3):384-401.
- Schiavo S, Duroudier N, Bilbao E, Mikolaczyk M, Schafer J, Cajaraville MP & Manzo S (2017) Effects of PVP/PEI coated and uncoated silver NPs and PVP/PEI coating agent on three species of marine microalgae. *Science of the Total Environment* 577:45-53.
- Seitz F, Rosenfeldt RR, Storm K, Metreveli G, Schaumann GE, Schulz R & Bundschuh M (2015) Effects of silver nanoparticle properties, media pH and dissolved organic matter on toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111:263-270.
- Seo J, Kim S, Choi S, Kwon D, Yoon TH, Kim WK, Park JW & Jung J (2014) Effects of physiochemical properties of test media on nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93(3):257-262.
- Sessa G & Weissmann G (1968) Phospholipid sheres (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* 9:310-318.
- Shi JP, Ma CY, Xu B, Zhang HW & Yu CP (2012) Effect of light on toxicity of nanosilver to *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(7):1630-1638.
- Shimanouchi T, Sasaki M, Hiroiwa A, Yoshimoto N, Miyagawa K, Umakoshi H & Kuboi R (2011) Relationship between the mobility of phosphocholine headgroups of liposomes and the hydrophobicity at the membrane interface: A characterization with spectrophotometric measurements. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 88(1):221-230.
- Sigg L & Lindauer U (2015) Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide. *Environmental Pollution* 206:582-587.
- Sorensen SN & Baun A (2014) Controlling silver nanoparticles exposure in algal toxicity testing - A matter of timing. *Nanotoxicology*:1-9.

- Stensberg MC, Madangopal R, Yale G, Wei QS, Ochoa-Acuna H, Wei A, McLamore ES, Rickus J, Porterfield DM & Sepulveda MS (2014) Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 8(8):833-842.
- Stevenson LM, Dickson H, Klanjscek T, Keller AA, McCauley E & Nisbet RM (2013) Environmental feedbacks and engineered nanoparticles: mitigation of silver nanoparticle toxicity to *Chlamydomonas reinhardtii* by algal-produced organic compounds. *Plos One* 8(9).
- Stumm W & Morgan JJ (1996) *Aquatic Chemistry. Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, USA, 3rd edition. 1022 p
- Szabo G, Eisenman G & Ciani S (1969) The effects of the macrotetralide actin antibiotics on the electrical properties of phospholipid bilayer membranes. *The Journal of membrane biology* 1(1):346-382.
- Tay T, Agius C, Hamilton R, Bodle J & Rockman S (2015) Investigation into alternative testing methodologies for characterization of influenza virus vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(7):1673-1684.
- Taylor C, Matzke M, Kroll A, Read DS, Svendsen C & Crossley A (2016) Toxic interactions of different silver forms with freshwater green algae and cyanobacteria and their effects on mechanistic endpoints and the production of extracellular polymeric substances. *Environmental Science-Nano* 3(2):396-408.
- Thamdrup B, Finster K, Fossing H, Hansen JW & Jorgensen BB (1994) Thiosulfate and sulfite distributions in porewater of marine sediments related to manganese, iron and sulfur geochemistry. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 58(1):67-73.
- Tiede K, Boxall ABA, Wang XM, Gore D, Tiede D, Baxter M, David H, Tear SP & Lewis J (2010) Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25(7):1149-1154.
- Tokudome Y, Jinno M, Todo H, Kon T, Sugibayashi K & Hashimoto F (2011) Increase in ceramide level after application of various sizes of sphingomyelin liposomes to a cultured human skin model. *Skin Pharmacology and Physiology* 24(4):218-223.
- Topuz E, Sigg L & Talinli I (2014) A systematic evaluation of agglomeration of Ag and TiO₂ nanoparticles under freshwater relevant conditions. *Environmental Pollution* 193:37-44.
- Treuel L, Jiang XE & Nienhaus GU (2013) New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society Interface* 10(82):14.
- Tuominen M, Schultz E & Sillanpää M (2013) Toxicity and stability of silver nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in boreal freshwater samples and growth media. *Nanomaterials and the Environment* 1:48-57.
- Ulm L, Krivohlavek A, Jurasin D, Ljubojevic M, Sinko G, Crnkovic T, Zuntar I, Sikic S & Vrcek IV (2015) Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research* 22(24):19990-19999.
- Unrine JM, Colman BP, Bone AJ, Gondikas AP & Matson CW (2012) Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of Ag nanoparticles. Part 1. aggregation and dissolution. *Environmental Science & Technology* 46(13):6915-6924.

- US Department of Energy (1994) Chapter 5 Physical and Thermodynamic data. *Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water*, Dickson AG & Goyet C (Édit.). p 22.
- Vigneault B, Holdner J & Bélanger J (2003) Validation of an anion exchange method for the preservation and analysis of thiosalt speciation in mining waste waters - Report MMSL 03-002. CANMET Ressources naturelles.
- Villarreal MR (2007) *Cross section of a liposome via wikimedia.org (public property)*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures_ES.svg.
- von Moos N, Bowen P & Slaveykova VI (2014) Bioavailability of inorganic nanoparticles to planktonic bacteria and aquatic microalgae in freshwater. *Environmental Science-Nano* 1(3):214-232.
- Wang Q, Lim M, Liu X, Wang Z & Chen KL (2016a) Influence of solution chemistry and soft protein corona on the interactions of silver nanoparticles with model biological membranes. *Environmental Science & Technology* 50(5):2301-2309.
- Wang S, Lv J, Ma J & Zhang S (2016b) Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Nanotoxicology* 10(8):1129-1135.
- Watanabe H (2011) *Female adult of the water flea Daphnia magna*. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/image.pgen.v07.i03>.
- Wessels JGH (1993) Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist* 123(3):397-413.
- Woodrow Wilson International Center for Scholars (2017) *The project on Emerging Nanotechnologies*. www.nanotechproject.org/cpi/
- Xia K, Weesner F, Bleam WF, Bloom PR, Skyllberg UL & Helmke PA (1998) XANES studies of oxidation states of sulfur in aquatic and soil humic substances. *Soil Science Society of America Journal* 62(5):1240-1246.
- Xu XM, Khan MA & Burgess DJ (2012) Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 423(2):410-418.
- Xue CH, Chen J, Yin W, Jia ST & Ma JZ (2012) Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. *Applied Surface Science* 258(7):2468-2472.
- Yetisen AK, Qu H, Manbachi A, Butt H, Dokmeci MR, Hinstroza JP, Skorobogatiy M, Khademhosseini A & Yun SH (2016) Nanotechnology in textiles. *American Chemical Society nano* 10(3):3042-3068.
- Yi P & Chen KL (2013) Interaction of multiwalled carbon nanotubes with supported lipid bilayers and vesicles as model biological membranes. *Environmental Science & Technology* 47(11):5711-5719.
- Yoo-iam M, Chaichana R & Satapanajaru T (2014) Toxicity, bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae (*Chlorella sp.*), water flea (*Moina macrocopa*), blood worm (*Chironomus spp.*) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). *Chemical Speciation & Bioavailability* 26(4):257-265.
- Yue Y, Li X, Sigg L, Suter MJ, Pillai S, Behra R & Schirmer K (2017) Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: a side by side comparison. *J Nanobiotechnology* 15(1):16.

- Zhang Z, Yang X, Shen M, Yin Y & Liu J (2015) Sunlight-driven reduction of silver ion to silver nanoparticle by organic matter mitigates the acute toxicity of silver to *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Sciences* 47(14):7713-7721.
- Zhao CM & Wang WX (2010) Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 44(19):7699-7704.
- Zhao CM & Wang WX (2011) Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(4):885-892.
- Zhao CM & Wang WX (2012a) Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 6(4):361-370.
- Zhao CM & Wang WX (2012b) Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 46(20):11345-11351.
- Zhao CM & Wang WX (2013) Regulation of sodium and calcium in *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(4):913-919.
- Zhou DX, Abdel-Fattah AI & Keller AA (2012) Clay particles destabilize engineered nanoparticles in aqueous environments. *Environmental Science & Technology* 46(14):7520-7526.

Annexe 1 : Différents protocoles expérimentaux pour la préparation de LUVs

Réf.	Lipides	Solvant organique	Type d'évaporation	Solvant aqueux	# cycles gel / dégel	Gel		Dégel		Extrusion		LUVs
						T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	Type de filtres	# de passages	Taille (nm)
Satsoura <i>et al.</i> (2012)	PC, PE, PI, PS, CL (48 : 28 : 10 : 10 : 4)	CHCl ₃	Sous flux d'N ₂ puis sous vide pendant 2 h	10 mM HEPES pH 7,0, 200 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA	10	n.r.		n.r.		PolyC 50 nm (100 nm et 200 nm)	n.r.	50
Xu <i>et al.</i> (2012)	DPPC, DMPC, DSPC, DTAP, CL	2 mL CHCl ₃	Sous vide à température ambiante pendant 2 h puis gardé sous vide toute la nuit	10 mM HEPES pH 7,4	4	-196	10	65	10	PolyC 200 nm (LIPEX extruder)	n.r.	155,8±19,4
Evjen <i>et al.</i> (2011)	DOPE, DSPC, DSPE-PEG ₂₀₀₀ , CH (62 : 10 : 8 : 20 mol %)	CHCl ₃ /CH ₃ OH (9:1 v:v) 60°C	Évaporateur rotatif sous vide pendant 6-8 h	300 mM sulfate d'ammonium 25°C	3	Mélange glace / acétone / méthanol		25 (DOP E) 75 (DSPE)	n.r.	PolyC 800 à 80 nm (LIPEX extruder)	n.r.	85±5
Tokudome <i>et al.</i> (2011)	SPM 77,95 mg	1mL CHCl ₃ 100 mM	Évaporateur rotatif 40°C 50 hPa puis gardé sous vide pendant 1 h	PBS pH 7,4	5	-196	n.r.	n.r.		PolyC (x2) 100, 200 ou 400 nm	5	102,7-181,0-224,0-380,1
Sarpietro <i>et al.</i> (2011)	DMPC	CHCl ₃ /CH ₃ OH (1:1 v:v)	Sous flux d'N ₂ puis lyophilisation sous vide	168 µL TRIS 50 mM pH 7,4	Aucun : chauffage à 37°C et 1 min vortex (x3) puis gardé dans bain d'eau 37°C	/		/		PolyC 100 nm (LiposoFast Basic extruder) (pression modérée / T>Tm + 5°C)	19	120,2±6,01

Annexe 1 (suite) : Différents protocoles expérimentaux pour la préparation de LUVs

Réf.	Lipides	Solvant organique	Type d'évaporation	Solvant aqueux	# cycles gel/dégel	Gel		Dégel		Extrusion		LUVs
						T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	Type de filtres	# de passages	Taille (nm)
Bonicelli <i>et al.</i> (2011)	DMPC, DPPC, N-NBD-PE, N-Rh-PE	CHCl ₃	n.r. puis gardé toute la nuit à pression réduite (0,4 mbar)	PBS 0,01 M pH 7,4	6	-196°C	n.r.	40°C	n.r.	PolyC 100 nm (2,5 mL LIPEX extruder à T>Tm)	10	n.r.
Liu <i>et al.</i> (2010b)	POPC/biotin-DMPE 99 :1 ou POPC/biotin-DMPE/RhB-DHPE 99 :1 :0,28	CHCl ₃	Sous flux d'N ₂ puis flacon ouvert dans dessiccateur sous vide pendant la nuit	10-200 µL 500 nM tampon fluorescent (vigoureuse hydratation 5 min/hydratation calme 15 min)	Évités excepté quand indiqués, dilution MLV jusqu'à 5mg/mL	-196°C	30 s	30°C	n.r.	PolyC 100 nm (mini-extruder Avanti Polar Lipids)	35	110
Ducat <i>et al.</i> (2010)	SPC, CH, mPEG-2000-DSPE (47 :47 :6 mol %)	3 mL CHCl ₃	Sous pression réduite	1,5 mL 10 mM HEPES	1, 3, 6, 11	-196°C	1 min	30°C	5 min	PolyC 200 nm	5	162±4,4
Malaekhe-Nikouei <i>et al.</i> (2009)	DOTAP, CH, dérivé de CH (2 :1 :1)	CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1 v:v)	Évaporateur rotatif puis lyophilisation pendant la nuit	Phosphate 0,1 mM pH 7,2 puis vortex à 45°C	Gardés à T ambiante pendant 1 h puis à 4°C	/		/		PolyC 400 et 100 nm à 45°C (Thermobarrel extruder)	11	246 à 436-167 à 434
Maestrelli <i>et al.</i> (2006)	PC, CH (60 mg/40 mg)	CHCl ₃	Évaporateur rotatif 58°C, résidu apparaît, gardé ensuite 2 h à la même température	4 mL eau distillée puis vortex	9	-196°C	30 s	58°C	30 s	PolyC 200 nm 58°C (mini-extrudeur Avanti Polar Lipids)	19	220 à 260

n.r. : non renseigné PolyC : polycarbonate PC : phosphatidylcholine PE : phosphatidyléthanolamine PI : phosphatidylinositol PS : phosphatidylsérine CL : cardiolipine DPPC : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-2-PC DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-PC DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-PC DPTAP : 1,2-dipalmitoyl-3-triméthylammonium-propane DOPE : dioleoylPE DSPE-PEG : polyéthylène glycol distearoylPE CH : cholestérol SPM : sphingomyéline POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PC RhB-DHPE : rhodamin-biotin dihexadecanoylPE SPC : soybeanPC SPG : soy phosphatidylglycérol DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les algues

Rouge foncé : extrêmement toxique (C(E)_{L50} < 100 µg/L) ; rouge : très toxique (C(E)_{L50} = 100-1000 µg/L) ; orange : toxique (C(E)_{L50} = 1000-10 000 µg/L).

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	CE50s (µg Ag total/L) ou % réduction	Temps d'exposition	Référence
Inhibition de la croissance cellulaire	<i>P. subcapitata</i>	26,6	Oxyde d'argent, 2-5 nm	190	96 h	Griffitt <i>et al.</i> (2008)
		13,4	Citrate	3,0	72 h	Angel <i>et al.</i> (2013)
		5,9	PVP	19,5	96 h	Kennedy <i>et al.</i> (2010)
		41 (TEM)	PVP	9,9	72 h	Tuominen <i>et al.</i> (2013)
		175	Amidon	51,0	48 h	Sorensen & Baun
		40	PVP	115	72 h	Ribeiro <i>et al.</i> (2014)
		49	Citrate	310	72 h	
		127-132	Alcanes	32,4		
	Phytoplancton Lac Chemung (Ontario)	10 (fournisseur)	Polyacrylate (fonctions carboxyles)	2,21 (8 µgP/L) 3,78 (18 µgP/L) 5,12 (33 µgP/L) 6,83 (58 µgP/L) 6,08 (108 µgP/L)	72 h	Das <i>et al.</i> (2014)
	<i>O. danica</i>	1-35 (82,6%)	Fonctions carboxyles	0,1	2 jours	Miao <i>et al.</i> (2010)
	<i>T. pseudonana</i>	20		50% (1,08 mg/L)		
		40	Maltose	60% (1,08 mg/L)	72 h	Burchardt <i>et al.</i> (2012)
	<i>Chlorella sp.</i>	100		40% (1,08 mg/L)		
		84,6 (TEM)	aucun	890	48 h	Yoo-iam <i>et al.</i> (2014)
	<i>I. galbana</i>			39		
<i>P. tricornutum</i>	104	PVP/PEI	60	72 h	Schiavo <i>et al.</i> (2017)	
<i>T. suecica</i>			5,2			

TEM microscope électronique à transmission ; PVP polyvinylpyrrolidone ; PEI Polyéthylèneimine

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	CE50s (µg Ag total/L)	Temps d'exposition	Référence											
Inhibition de la photosynthèse	<i>C. reinhardtii</i>	10-200	Carbonate	356	1 h	Navarro <i>et al.</i> (2008b)											
				113	2 h												
				95	3 h												
				87	4 h												
				90	5 h												
		n.i.	Carbonate PEG Lactate Chitosan PVP	322 139 232 307 84	1 h	Navarro <i>et al.</i> (2012)											
							40 25 17 456 52 35 45 70 84	Carbonate Chitosan Citrate Dexpanthénol Gélatine Lactate NDB PEG PVP	315 346 567 30,2 510 218 406 129 85,3								
										1 h	Navarro <i>et al.</i> (2015)						
												Périphyton	30-56	Citrate	8964	2 h	Gil-Allue <i>et al.</i> (2015)
	160	2 h															

n.i. non indiqué ; PEG polyethelene glycol ; PVP polyvinylpyrrolidone ; NDB sodium dodecylbenzenesulfonate

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	CE _{50S} , CI _{50S} , CL _{50S} (µg Ag total/L) ou % réduction	Temps d'exposition	Référence
Mort de l'organisme	<i>C. closterium</i>	25,6	Citrate	100% (10 mg/L)	24 h	Pletikapic <i>et al.</i> (2012)
	<i>C. fusiformis</i>					
	<i>C. vulgaris</i>	50 (nominal)	n.i.	68% (50 mg/L) 91% (200 mg/L)	8 jours	Hazani <i>et al.</i> (2013)
	<i>D. tertiolecta</i>			73% (50 mg/L) 95% (200 mg/L)		
	<i>C. vulgaris</i>	307,3	n.i.	34% (1 mg/L) 51% (10 mg/L)	24 h	Oukarroum <i>et al.</i> (2012)
	<i>D. tertiolecta</i>	448,9		44% (1 mg/L) 75% (10 mg/L)		
Réduction de la production de chlorophylle		76,8 (ACT)		1600		
	<i>P. subcapitata</i>	192 (SPG)	n.i.	22,6	96 h	McLaughlin & Bonzongo (2012)
		174 (CM)		4,61		
Réduction de la production de chlorophylle	<i>C. reinhardtii</i>	40	Citrate	n.i.	6 jours	Stevenson <i>et al.</i> (2013)

n.i. non indiqué ; ACT Alachua Conservation Trust (zone humide) ; SPG rivière Ichetucknee (zone humide urbaine) ; CM milieu de culture, MHW eau à dureté modérée

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	CI50s (µg Ag total/L) ou % réduction/augmentation	Temps d'exposition	Référence
Augmentation du stress oxydant	<i>C. vulgaris</i>	307,3	n.i.	44% augmentation de la formation de ROS 45% augmentation peroxydation lipidique (1 mg/L)	24 h	Oukarroum <i>et al.</i> (2012)
	<i>D. tertiolecta</i>	448,9		123% augmentation de la formation de ROS 48% augmentation peroxydation lipidique (1 mg/L)		
Inhibition de l'activité enzymatique	<i>C. marina</i>	300 (0,54 et 1,08 mg/L) 500 (1,2 mg/L)	Citrate	11 et 41% augmentation de la production de superoxyde (22 et 216 µg/L)	1 h	He <i>et al.</i> (2012)
	Périphyton	30-56	Citrate	1,8 mg/L (GLU) 2,5 mg/L (LAP)	2 h	Gil-Allue <i>et al.</i> (2015)
Inhibition de la respiration				50% réduction de la respiration (10,8 mg/L)		

n.i. non indiqué ; ROS reactive oxygen species ; GLU β-glucosidase ; LAP leucine aminopeptidase

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des différents effets des AgNPs observés chez les daphnies

Rouge foncé : extrêmement toxique (C(E)_{L50} < 100 µg/L) ; rouge : très toxique (C(E)_{L50} = 100-1000 µg/L) ; orange : toxique (C(E)_{L50} = 1000-10 000 µg/L).

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	Type d'exposition	CL ₅₀ S (µg Ag total /L) ou % survie	Temps d'exposition	Référence
Mort de l'organisme	<i>D. pulex</i>	26,6	Oxyde d'argent	Eau	40	48 h	Griffitt <i>et al.</i> (2008)
		773,6 (69,5%)	Café		1,0		
		5,94 (98%)	Citrate		1,1		
		681,4 (81,4%)	SA sans enrobage	Eau	16,7	48 h	Allen <i>et al.</i> (2010)
		39,39 (73,5%)	SA avec enrobage organique		31,5		
	<i>D. magna</i>	40-50	Carbonate	Eau	100% survie (0-500 µg/L)	48 h	Zhao & Wang (2011)
				Nourriture	100% survie (0-156 µg/g poids sec)		
		123,9	Lactate		28,7		
		79,7	PVP	Eau	2,0	48 h	Zhao & Wang (2012a)
		65,3	NDB		1,1		
	13,3	Citrate (sol-type)	Eau	0,75	48 h	Lee <i>et al.</i> (2012)	
	60-100	n.i. (powder-type)		7,98			

n.i. non indiqué ; PVP polyvinylpyrrolidone ; NDB sodium dodecylbenzenesulfonate

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	Type d'exposition	CL _{50S} , CE _{50S} (µg Ag total/L) ou % survie	Temps d'exposition	Référence	
Mort de l'organisme	<i>C. dubia</i>	76,8 (ACT)			221	48 h	McLaughlin & Bonzongo (2012)	
		192 (SPG)	n.i.	Eau	0,433			
		174 (MHW)			0,482			
		14,7 (4 mg/L SRHA)	Citrate	Eau	0,7			
		4,2 (4 mg/L SRHA)	PVP		5,7			
			72-477	Aucun	Eau	4,31-30,38	48 h	Hoheisel <i>et al.</i> (2012)
			1-10	Fonctions carboxyles	Eau	2,75	48 h	Das <i>et al.</i> (2013)
			10 (TEM)	Citrate	Eau	7,46	24 h	Romer <i>et al.</i> (2013)
		<i>D. magna</i>	106,2	GA		3,16 (MHW)	48 h	Newton <i>et al.</i> (2013)
			74	PEG	Eau	3,41 (MHW)		
	80,7		PVP		14,81 (MHW)			
		19,63	Polymère inconnu	Nourriture	100% survie (<i>C. reinhardtii</i> exposée à 100 µg Ag/L)	5 jours	McTeer <i>et al.</i> (2013)	
		127-132	Alcanes	Eau	11,41	24 h	Ribeiro <i>et al.</i> (2014)	
					11,02	48 h		

n.i. non indiqué ; ACT Alachua Conservation Trust ; SPG rivière Ichetucknee ; MHW eau à dureté modérée ; SRHA Suwannee River humic acid ; PVP polyvinylpyrrolidone ; GA gomme arabique ; PEG polyethelene glycol

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	Type d'exposition	CL _{50S} , CE _{50S} (µg Ag/L)	Temps d'exposition	Référence
Mort de l'organisme	D. magna	121	n.i.	Eau	10,1 (néonates) 47,6 (sans nourriture)	72 h	Stensberg <i>et al.</i>
		44,5 (10 µg Ag/L) 48,2 (50 µg/L) 55,4 (100 µg/L)	Acide citrique	Eau	184 (nourriture faible) 302 (nourriture élevée)	48 h	Mackevica <i>et al.</i> (2015)
		20-100	PVP PEG	Eau	5,9 13,4	48 h	Khan <i>et al.</i> (2015)
		150-200	Citrate		8,5		
		395,7 (53,8%) 46,2 (49,3%)	Citrate	Eau	12,4	48 h	Ulm <i>et al.</i> (2015)
		n.i.	Aucun	Eau	1,252 (0% AgNPs) – 0,279 (88,31% AgNPs)	8 h	Zhang <i>et al.</i> (2015)
		143	Citrate	Eau	19,2 (LOEC)	21 jours	Sakka <i>et al.</i> (2016)
		96	Stabilisation stérique		> 27,5 (LOEC)		
		10 (fournisseur)	Polyacrylate (fonctions carboxyles)	Eau	5,2 (sans algue) 17 (avec algues)	2 jours	Conine & Frost (2017)
		40-50	Carbonate	Eau	5 (LOEC)		
Modification de la croissance		40-50	Carbonate	Eau	Taille réduite de 3,35 (contrôle) à 3,13 nm (50 µg Ag/L)	21 jours	Zhao & Wang (2011)
		44,5 (10 µg Ag/L) 48,2 (50 µg/L)	Acide citrique	Eau	Augmente (10 µg Ag/L) ou réduit la croissance (30-50 µg Ag/L)	21 jours	Mackevica <i>et al.</i> (2015)

n.i. non indiqué ; PVP polyvinylpyrrolidone ; PEG polyethelenglycol ; LOEC Lowest Observed Effect Concentration

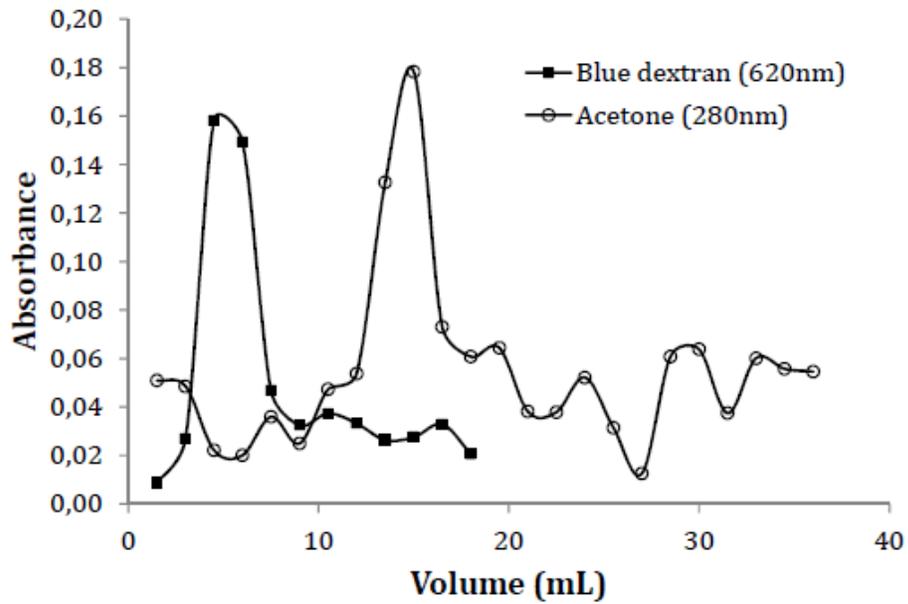
Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	Type d'exposition	Résultats ou CE50s (µg Ag total/L)	Temps d'exposition	Référence
Modification de la croissance		10 (fournisseur)	Polyacrylate (fonctions carboxyles)	Eau	Réduction de la croissance (nourriture à faible teneur en phosphore et concentrations en AgNPs élevées)	6 jours	Conine & Frost (2017)
		7,32	Citrate		4		
Perturbation du comportement natatoire jusqu'à l'immobilité	<i>D. magna</i>	6,47	Aucun	Eau	2	48 h	Asghari <i>et al.</i> (2012)
		17,97	Aucun		187		
		147,7 à 1428	PVP	Eau	9,0 à 3844,1	24 h	Jo <i>et al.</i> (2012)
		786,0 et 3411	n.i.		4,2 et 1404,6		
		11,27	Citrate	Eau	13,8 et 6,1 (deux méthodes de suspension différentes) 4,94 (MHW)	48 h	Park <i>et al.</i> (2014)
Réduction du potentiel de reproduction		9,5 (TEM)	Citrate	Eau	45,06 (ISO) 63,73 (HW)	48 h	Seo <i>et al.</i> (2014)
		40-50	Carbonate	Eau	50 (LOEC)	21 jours	Zhao & Wang (2011)
		6,0-8,4	PVP	Eau	54 (AFW) 98,7 à 236,3 (NW)	48 h	Blinova <i>et al.</i> (2013)

n.i. non indiqué ; PVP polyvinylpyrrolidone ; MHW eau à dureté modérée ; ISO International Organization for Standardization; HW eau dure ; TEM microscope électronique à transmission

Effets significatifs observés	Organisme	Diamètre hydrodynamique initial (nm)	Revêtement	Type d'exposition	Résultats ou CE50s (µg Ag total/L)	Temps d'exposition	Référence
		127-132	Alcanes	Eau	1,0	21 jours	Ribeiro <i>et al.</i> (2014)
Réduction du potentiel de reproduction		44,5 (10 µg Ag/L)	Acide citrique	Eau	Pas d'effet	21 jours	Mackevica <i>et al.</i> (2015)
		48,2 (50 µg/L)					
		143	Citrate	Eau	40 (LOEC)	21 jours	Sakka <i>et al.</i> (2016)
96	Stabilisation stérique						
Perturbation de l'osmorégulation	<i>D. magna</i>	58,5	PVP	Eau	Na : afflux ↓, efflux ↑ Ca : afflux ↑, efflux → (2 µg Ag total/L)	48 h	Zhao & Wang (2013)
		121	n.i.	Eau	Augmente l'efflux de protons (130 et 650 ng Ag total/L)	30 min	Stensberg <i>et al.</i> (2014)
Augmentation du stress oxydant		395,7 (53,8%) 46,2 (49,3%)	Citrate	Eau	CAT ↑, SOD →, GSH ↑ (> 0,5 µg Ag total/L)	48 h	Ulm <i>et al.</i> (2015)
					ROS intracellulaire ↑ (1-5 µg Ag total/L)		
Perturbation de l'activité enzymatique					Activité AChE ↑ (> 1 µg Ag total/L)	48 h	

n.i. non indiqué ; PVP polyvinylpyrrolidone ; LOEC Lowest Observed Effect Concentration ; AFW artificial freshwater ; NW natural waters ; CAT catalase (enzyme antioxydante) ; SOD superoxide dismutase (enzyme antioxydante) ; GSH glutathion ; ROS reactive oxygen species ; AChE acetylcholinesterase

Annexe 4 : Séparation entre le Blue Dextran (2 000 kDa) et l'acétone (58 Da) sur colonne Sephadex 20 cm x 1 cm, analyses des fractions collectées effectuées sur spectrophotomètre UV-visible à 620 et 280 nm.



Annexe 5 : Prééquilibre des bouteilles en HDPE avant les expériences d'exposition des liposomes aux métaux dissous

Bouteilles Lot 1 : faible adsorption

Espèces dominantes	Concentration initiale (nM)	Adsorption après 100 min
Ag ⁺	23,9 ± 1,4	5,3 ± 3,7%
AgS ₂ O ₃ ⁻	24,4 ± 0,9	12,4 ± 2,3%
AgCl ⁰	24,5 ± 1,9	3,7 ± 2,3%
HgCl ₂ ⁰	137,8 ± 0,7	5,7 ± 0,4%
Cd(DDC) ₂ ⁰	122,6 ± 7,4	6,3 ± 3,4%

Bouteilles Lot 1 après un lavage à l'acide (HNO₃ 10%) : forte adsorption

Espèces dominantes	Concentration initiale (nM)	Adsorption après 100 min
Ag ⁺	24,3 ± 0,2	82,3 ± 14,8%
AgS ₂ O ₃ ⁻	25,4 ± 1,2	85,7 ± 9,1%

Bouteilles Lot 2 : forte adsorption

Espèces dominantes	Concentration initiale (nM)	Adsorption après 100 min
Ag ⁺	21,3 ± 1,5	46,8 ± 5,9%
Ag ⁺	22,9 ± 0,8	75,2 ± 1,3%

Bouteilles Lot 2 après prééquilibre : faible adsorption

Espèces dominantes	Concentration initiale (nM)	Adsorption après 100 min
Ag ⁺	19,7 ± 1,8	3,3 ± 0,7%
AgS ₂ O ₃ ⁻	23,8 ± 0,6	22,2 ± 2,9%
AgCl ⁰	20,2 ± 3,0	18,8 ± 1,8%

Annexe 6 : Synthèse des résultats et comparaison avec la littérature

Espèce	Passe 1 / Ne passe pas 0		Masse moléculaire (g/mol)	Charge	K _{ow} = [M] _{octanol} / [M] _{eau}		
	Présente étude	Littérature					
Ag⁺	0	0	Fortin & Campbell (2000)	108	+1	0,03	Reinfelder & Chang (1999)
HgCl₂⁰	0	1 (film lipidique et algues)	Bienvenue <i>et al.</i> (1984) Gutknecht (1981) Mason <i>et al.</i> (1996)	272	0	3,3	Mason <i>et al.</i> (1996)
Cd(DDC)₂⁰	0	1 (algues)	Boullemant <i>et al.</i> (2009) Phinney & Bruland (1994)	408	0	270 ± 28 (pH 7, D _{ow})	Boullemant <i>et al.</i> (2009)
AgS₂O₃⁻	1	0 (algues)	Fortin & Campbell (2001)	203	-1		n.d.
AgCl⁰	1	0 (Chlamydomonas reinhardtii)	Fortin & Campbell (2000)	143	0	0,09	Reinfelder & Chang (1999)
H₂O	1	1	Bangham <i>et al.</i> (1965)	18	0		/

n.d. non documenté M métal

Annexe 7 : Analyse ICP-MS des eaux de Rimouski, utilisées dans l'expérience en mésocosmes

µg/L	Résultats analyse ICPMS		
	Rivière Neigette	Eau douce Station	Eau de mer station
Be / 9	0,03	0,03	<0,01
B / 11	65,9	28,9	198,6
Na / 23	6 579,2	3 305,6	>cal
Mg / 24	5 315,2	8 440,0	>cal
Al / 27	181,5	316,7	44,1
K / 39	1052,8	998,4	31 532,0
Ca / 44	25 792,0	34 656,0	31 784,0
Ti / 47	2,1	1,7	3,7
V / 51	0,7	<ld	2,1
Cr / 53	1,8	1,2	6,4
Mn / 55	2,1	0,8	<ld
Fe / 57	444,4	566,9	578,4
Co / 59	2,7	0,3	0,2
Ni / 60	3,6	2,2	1,1
Cu / 63	39,2	27,5	45,3
Zn / 66	3361,6	28,1	0,5
As / 75	0,3	0,2	2,0
Se / 82	0,7	0,4	9,9
Rb / 85	<ld	0,2	9,5
Sr / 88	127,4	167,0	542,4
Mo / 95	108,1	<ld	<ld
Ag / 107	30,8	0,5	0,2
Cd / 111	0,3	<ld	<ld
Sn / 118	0,5	0,4	0,2
Sb / 121	1,1	0,2	0,2
Cs / 133	<ld	<ld	<ld
Ba / 137	56,1	105,0	<ld
Hg / 202	0,1	<ld	<ld
Tl / 205	<ld	<ld	<ld
Pb / 208	0,8	0,5	<ld
U / 238	0,2	0,3	0,2

<ld = sous la limite de quantification

>cal = excède la courbe de calibration

N.B. eau douce de la station est l'eau de la ville de Rimouski après déchlorination.

Références citées dans les annexes :

- Allen HJ, Impellitteri CA, Macke DA, Heckman JL, Poynton HC, Lazorchak JM, Govindaswamy S, Roose DL & Nadagouda MN (2010) Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(12):2742-2750.
- Angel BM, Batley GE, Jarolimek CV & Rogers NJ (2013) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* 93(2):359-365.
- Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, Moon MC & Yu IJ (2012) Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology* 10:1-11.
- Blinova I, Niskanen J, Kajankari P, Kanarbik L, Kakinen A, Tenhu H, Penttinen OP & Kahru A (2013) Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Environmental Science and Pollution Research* 20(5):3456-3463.
- Boullemant A, Lavoie M, Fortin C & Campbell PGC (2009) Uptake of hydrophobic metal complexes by three freshwater algae: unexpected influence of pH. *Environmental Science & Technology* 43(9):3308-3314.
- Burchardt AD, Carvalho RN, Valente A, Nativo P, Gilliland D, Garcia CP, Passarella R, Pedroni V, Rossi F & Lettieri T (2012) Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and *Cyanobacterium Synechococcus sp.* *Environmental Science & Technology* 46(20):11336-11344.
- Conine AL & Frost PC (2017) Variable toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*: effects of algal particles and animal nutrition. *Ecotoxicology* 26(1):118-126.
- Das P, Xenopoulos MA & Metcalfe CD (2013) Toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticle suspensions to the aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91(1):76-82.
- Das P, Metcalfe CD & Xenopoulos MA (2014) Interactive Effects of Silver Nanoparticles and Phosphorus on Phytoplankton Growth in Natural Waters. *Environmental Science & Technology* 48(8):4573-4580.
- Evjen TJ, Hagtvet E, Nilssen EA, Brandl M & Fosshem SL (2011) Sonosensitive dioleoylphosphatidylethanolamine-containing liposomes with prolonged blood circulation time of doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 43(4):318-324.
- Gil-Allue C, Schirmer K, Tlili A, Gessner MO & Behra R (2015) Silver nanoparticle effects on stream periphyton during short-term exposures. *Environmental Science & Technology* 49(2):1165-1172.
- Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo JC & Barber DS (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9):1972-1978.
- Hazani AA, Ibrahim MM, Arif IA, Shehata AI, El-Gaaly G, Daoud M, Fouad D, Rizwana H & Moubayed N (2013) Ecotoxicity of Ag-nanoparticles to microalgae. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7:233-241.

- He D, Dorantes-Aranda JJ & Waite TD (2012) Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environmental Science & Technology* 46(16):8731-8738.
- Hoheisel SM, Diamond S & Mount D (2012) Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(11):2557-2563.
- Jo HJ, Choi JW, Lee SH & Hong SW (2012) Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. *Journal of Hazardous Materials* 227:301-308.
- Kennedy AJ, Hull MS, Bednar AJ, Goss JD, Gunter JC, Bouldin JL, Vikesland PJ & Steevens JA (2010) Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environmental Science & Technology* 44(24):9571-9577.
- Khan FR, Paul KB, Dybowska AD, Valsami-Jones E, Lead JR, Stone V & Fernandes TF (2015) Accumulation dynamics and acute toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*: implications for metal modeling approaches. *Environmental Science & Technology* 49(7):4389-4397.
- Lee, YJ, Kim J, Oh J, Bae S, Lee S, Hong IS & Kim SH (2012) Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1):155-159.
- Mackevica A, Skjolding LM, Gergs A, Palmqvist A & Baun A (2015) Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. *Aquatic Toxicology* 161:10-16.
- Mason RP, Reinfelder JR & Morel FMM (1996) Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science & Technology* 30(6):1835-1845.
- McLaughlin J & Bonzongo JCJ (2012) Effects of natural water chemistry on nanosilver behavior and toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(1):168-175.
- McTeer J, Dean AP, White KN & Pittman JK (2013) Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology* 0(0):1-12.
- Miao AJ, Luo Z, Chen CS, Chin WC, Santschi PH & Quigg A (2010) Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *Plos One* 5(12):e15196.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L & Behra R (2008b) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42(23):8959-8964.
- Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L & Behra R (2012) Assessing ionic availability to algae from different coated silver nanoparticles. *NanoSpain Conference, Santander, Spain* (February 27 - March 01).
- Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L & Behra R (2015) Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*.
- Newton KM, Puppala HL, Kitchens CL, Colvin VL & Klaine SJ (2013) Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(10):2356-2364.

- Oukarroum A, Bras S, Perreault F & Popovic R (2012) Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78:80-85.
- Park JW, Oh JH, Kim WK & Lee SK (2014) Toxicity of citrate-coated silver nanoparticles differs according to method of suspension preparation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93(1):53-59.
- Pletikapic G, Zutic V, Vinkovic Vrcek I & Svetlicic V (2012) Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance. *Journal of Molecular Recognition* 25(5):309-317.
- Ribeiro F, Gallego-Urrea JA, Jurkschat K, Crossley A, Hassellöv M, Taylor C, Soares AMVM & Loureiro S (2014) Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment* 466–467(0):232-241.
- Reinfelder JR & Chang SI (1999) Speciation and microalgal bioavailability of inorganic silver. *Environmental Science & Technology* 33(11):1860-1863.
- Romer I, Gavin AJ, White TA, Merrifield RC, Chipman JK, Viant MR & Lead JR (2013) The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicology Letters* 223(1):103-108.
- Sakka Y, Skjolding LM, Mackevica A, Filser J & Baun A (2016) Behavior and chronic toxicity of two differently stabilized silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*.
- Sarpietro MG, Pitarresi G, Ottimo S, Giuffrida MC, Ognibene MC, Fiorica C, Giammona G & Castellit F (2011) Interaction between drug loaded polyaspartamide-poly lactide-polysorbate based micelles and cell membrane models: a calorimetric study. *Molecular Pharmaceutics* 8(3):642-650.
- Satsoura D, Kucerka N, Shivakumar S, Pencer J, Griffiths C, Leber B, Andrews DW, Katsaras J & Fradin C (2012) Interaction of the full-length Bax protein with biomimetic mitochondrial liposomes: A small-angle neutron scattering and fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818(3):384-401.
- Schiavo S, Duroudier N, Bilbao E, Mikolaczyk M, Schafer J, Cajaraville MP & Manzo S (2017) Effects of PVP/PEI coated and uncoated silver NPs and PVP/PEI coating agent on three species of marine microalgae. *Science of the Total Environment* 577:45-53.
- Seo J, Kim S, Choi S, Kwon D, Yoon TH, Kim WK, Park JW & Jung J (2014) Effects of physiochemical properties of test media on nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93(3):257-262.
- Stensberg MC, Madangopal R, Yale G, Wei QS, Ochoa-Acuna H, Wei A, McLamore ES, Rickus J, Porterfield DM & Sepulveda MS (2014) Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 8(8):833-842.
- Sorensen SN & Baun A (2014) Controlling silver nanoparticles exposure in algal toxicity testing - A matter of timing. *Nanotoxicology*:1-9.
- Stevenson LM, Dickson H, Klanjscek T, Keller AA, McCauley E & Nisbet RM (2013) Environmental feedbacks and engineered nanoparticles: mitigation of silver nanoparticle toxicity to *Chlamydomonas reinhardtii* by algal-produced organic compounds. *Plos One* 8(9).

- Tokudome Y, Jinno M, Todo H, Kon T, Sugibayashi K & Hashimoto F (2011) Increase in ceramide level after application of various sizes of sphingomyelin liposomes to a cultured human skin model. *Skin Pharmacology and Physiology* 24(4):218-223.
- Tuominen M, Schultz E & Sillanpää M (2013) Toxicity and stability of silver nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in boreal freshwater samples and growth media. *Nanomaterials and the Environment* 1:48-57.
- Ulm L, Krivohlavek A, Jurasin D, Ljubojevic M, Sinko G, Crnkovic T, Zuntar I, Sikic S & Vrcek IV (2015) Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research* 22(24):19990-19999.
- Xu XM, Khan MA & Burgess DJ (2012) Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 423(2):410-418.
- Yoo-iam M, Chaichana R & Satapanajaru T (2014) Toxicity, bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae (*Chlorella sp.*), water flea (*Moina macrocopa*), blood worm (*Chironomus spp.*) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). *Chemical Speciation & Bioavailability* 26(4):257-265.
- Yue Y, Li X, Sigg L, Suter MJ, Pillai S, Behra R & Schirmer K (2017) Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: a side by side comparison. *J Nanobiotechnology* 15(1):16.
- Zhang Z, Yang X, Shen M, Yin Y & Liu J (2015) Sunlight-driven reduction of silver ion to silver nanoparticle by organic matter mitigates the acute toxicity of silver to *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Sciences* 47(14):7713-7721.
- Zhao CM & Wang WX (2011) Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(4):885-892.
- Zhao CM & Wang WX (2012a) Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 6(4):361-370.
- Zhao CM & Wang WX (2013) Regulation of sodium and calcium in *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(4):913-919.