

Université du Québec
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**IMMUNOTOXICITÉ DES NANOPARTICULES DE Cd/S, Cd/Te ET
D'Ag SUR DES ESPÈCES MODÈLES**

Par
Audrey BRUNEAU

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en biologie

Pour
Le doctorat en biologie de l'institut Armand-Frappier
Institut national de la recherche scientifique
Université du Québec

Et
Le doctorat d'océanologie biologique
École doctorale des sciences de la mer
Université de Bretagne Occidentale

Jury d'évaluation

Président de jury et examinateur interne	Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur interne	Dario Moraga Université de Bretagne Occidentale
Examineur externe	Claude Émond Université de Montréal
Examineur externe	Jean-Marc Lebel Université de Caen
Directeur de recherche	Michel Fournier INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Michel Auffret Université de Bretagne Occidentale

*Quand on voyage vers un objectif, il est très important de prêter attention au chemin.
C'est toujours le chemin qui nous enseigne la meilleure façon d'y parvenir,
et il nous enrichit à mesure que nous le parcourons.*
Paulo Coelho

AVANT PROPOS

A l'heure actuelle, l'engouement pour les nanoparticules cache un réel enjeu à la fois pour les chimistes, les physiciens, les biologistes et les toxicologues. Aussi petites soient elles, les nanoparticules suscitent beaucoup des réflexions chez la plupart des chercheurs. Bien que, depuis 10 ans les scientifiques se penchent de plus en plus sur le cas des nanoparticules manufacturées, les nanoparticules au sens large existent depuis tous les temps dans l'environnement, sous forme de nanoparticules naturelles.

Cependant, l'engouement pour les nanotechnologies ne cesse ne s'accroître et les nanoparticules sont produites à large échelle et incorporées dans notre quotidien. Leurs propriétés spécifiques leur confèrent des avantages dans bien des domaines, malheureusement, certaines de ces particules sont formées de métaux déjà reconnus comme toxiques pour les organismes. Il est donc essentiel pour les toxicologues et écotoxicologues de se pencher, pendant qu'il est encore temps, sur les réels impacts de ces matériaux émergents. Ainsi, dans le cadre de son projet de doctorat, il a été essentiel de travailler avec des solutions commerciales qui sont susceptibles de se retrouver dans le milieu environnant. Il a été aussi fondamental de caractériser le matériel étudié ce qui a permis la collaboration de différentes équipes de recherche de hautes qualités, spécialisées dans leurs domaines d'expertise.

Les études de toxicologie des nanoparticules sur différents modèles d'animaux en est à son balbutiement, la force de ce projet a donc été de réaliser une étude multimodèle et d'intégrer aussi des notions de toxicité chez des organismes déjà perturbés par leur milieu. Les expériences *in vitro* sont la base de la recherche dans le domaine des nanoparticules, elles permettront par la suite de pouvoir mieux cerner les réactions *in vivo* des nanoparticules.

La recherche en toxicologie des nanoparticules démarre tout juste, elle a un avenir prometteur mais encore beaucoup de travail reste à faire, et principalement en chimie, afin de doser les nanoparticules contenues réellement dans le milieu. D'autre part, l'usage des nanoparticules nécessite une réglementation, idéalement internationale, afin de minimiser les expositions et les risques encourus. Vous l'aurez compris, lorsqu'on parle de nanoparticules, il faut automatiquement évoquer une collaboration entre les laboratoires scientifiques, mais aussi avec les institutions, c'est seulement à cette condition que les connaissances dans ce nouveau domaine avanceront.

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

A l'heure actuelle, l'usage des nanoparticules est de plus en plus médiatisé. Elles sont maintenant utilisées à grande échelle et sont présentes dans tous les domaines : biologie, médecine, ingénierie, optique, électronique, mécanique, chimie, pharmacologie, cosmétique.

Les nanoparticules sont utilisées en raison de leurs propriétés spécifiques. Dans le domaine médical, par exemple, les nanoparticules de Cd/S Cd/Te aussi nommées quantum dots (QDs) sont utilisées comme sondes fluorescentes. Quant aux nanoparticules d'argent (AgNPs), elles sont principalement employées pour leurs propriétés antimicrobiennes. Cependant, de récentes études ont démontrés que ces nanoparticules induisent une certaine toxicité. Malheureusement, peu de recherches ont été réalisées sur les nanoparticules et le système immunitaire.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'évaluer l'immunotoxicité des nanoparticules de Cd/S, Cd/Te et d'Ag sur des espèces modèles. Dans le cadre de ces travaux, nous avons défini quatre sous-objectifs : 1) déterminer l'impact des nanoparticules sur différentes cellules et systèmes immunitaires ; 2) évaluer les facteurs influençant la toxicité des nanoparticules; 3) identifier les atteintes mécanistiques de la réponse immunitaire 4) établir la toxicité des nanoparticules en fonction des stress environnementaux.

Afin d'évaluer la toxicité des ces matériaux émergents nous avons choisi d'étudier *in vitro* les performances du système immunitaire de quatre modèles d'animaux : l'humain, la souris (*Mus musculus*), la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et la moule (*Mytilus edulis*). Ces espèces ont été définies car elles représentent des espèces sentinelles de leur milieu de vie. Ainsi, ces espèces sont souvent utilisées dans des études écotoxicologiques ou dans les études de risques.

Dans un premier temps, nous devions déterminer l'impact de ces contaminants émergents sur les performances du système immunitaire. Les résultats des différents paramètres immunitaires ont démontrés que les nanoparticules induisent des altérations des performances du système immunitaire. Selon les espèces, les nanoparticules (QDs et d'AgNPs) induisent une immunostimulation ou une immunosuppression. Le modèle mammifère semble être le plus sensible aux NPs. D'autre part, nos résultats ont mis en évidence le fait que les NPs n'induisent pas toutes la même toxicité, les AgNPs sont plus toxiques que les QDs. Finalement, nos résultats ont démontré qu'il existait une gradation de la toxicité des nanoparticules en fonction des espèces exposées.

Dans un deuxième temps, nous devons déterminer si la toxicité des nanoparticules était influencée par leur chimie, par la nature du métal les composants et par leurs tailles. Nos expériences ont permis de démontrer que les NPs ne sont pas stables dans les différents milieux de cultures utilisés pour chacun des modèles d'animaux. Elles sont stables dans l'eau stérile, dans le RPM1c et RPM1c sans bicarbonate. Toutefois, elles se désagrègent dans l'eau de mer. D'autre part, notre étude a démontré que les NPs non transformées (celles qui ne subissent pas de filtration etc.) sont internalisées entièrement dans les cellules. Selon les espèces, les métaux dissous contenus dans la particule sont plus toxiques que la NP attestant une certaine stabilité de la particule. De plus, la taille joue un rôle dans la toxicité des QDs. Les résultats obtenus par ultrafiltration attestent que les particules de grosses tailles sont plus toxiques que celles de petites tailles. Ces dernières, quant à elles, induisent des phénomènes de stimulation du système immunitaire à faible dose plus communément appelé phénomène d'hormèse.

Dans un troisième temps, nous devons évaluer les mécanismes de défense de la cellule lors d'expositions *in vitro* au NPs. Les résultats ont montré une production de thiols à faible dose de QDs et une diminution à fortes concentrations. Ceci suggère que les nanoparticules induisent un stress oxydatif, qui à forte dose n'est plus contrôlé par la cellule. De même, il a été observé que de fortes concentrations de QDs induisent la production des métallothionéines. Cela pourrait être attribué au relargage des ions métalliques toxiques contenus dans le noyau de la particule. D'autre part, les résultats obtenus en imagerie électronique et confocale nous ont permis d'affirmer que les QDs et AgNPs induisent des phénomènes d'apoptose et de nécrose chez les cellules immunitaires.

Dans un quatrième temps, nous devons déterminer si une exposition aux contaminants naturels modulait la toxicité des nanoparticules chez la moule bleue. Ces études *in vitro* ont été réalisées à la fois dans des sites choisis en France et au Québec. Les résultats obtenus ont démontré que des organismes déjà sensibilisés par leur milieu de vie sont encore plus sensibles à une exposition aux NPs. Par ailleurs, lors de phénomène « *stress on stress* » des NPs non toxiques au laboratoire deviennent toxiques à forte dose lors d'expérience de terrain. Finalement, ces expériences ont contribué à une meilleure connaissance de la toxicité des NPs selon différents modèles d'études. Elles ont apporté beaucoup de renseignements sur les performances des systèmes immunitaires de différents modèles d'animaux. Ceci a permis d'évaluer la sensibilité de chaque espèce et de classer celles-ci selon les risques d'exposition. D'autre part, l'utilisation de nanoparticules commerciales et le volet de caractérisation chimique de la thèse ont permis de mieux évaluer les réels enjeux liés aux particules. Les

résultats concernant la sensibilité des différents modèles d'animaux pourront être utilisés dans les prochaines études de risques. Dans le futur, il serait intéressant de mener plus d'études sur la génotoxicité des NPs, sur les processus de métabolisations associés et leur impact sur le développement du système immunitaire.

Étudiant

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Il n'est pas facile de remercier en quelques mots les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ma thèse. En espérant ne faire aucune omission, je vais en quelques lignes, remercier celles et ceux qui m'ont soutenu durant ce parcours.

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au Professeur Michel Fournier pour m'avoir permis de réaliser cette thèse sur un sujet d'actualité. Je le remercie aussi, pour sa confiance, son soutien, son aide durant mon projet ce qui m'a permis de devenir une meilleure scientifique. Qu'il soit également remercié pour m'avoir fait connaître différents chercheurs qui ont aiguillé ma recherche. J'aimerais aussi remercier mon co-directeur, le Professeur Michel Auffret pour son encadrement, ses corrections et son implication dans ma thèse, pour sa confiance et son organisation dans la mission de terrain sur Brest.

Je remercie vivement le Professeur Jacques Bernier, le Professeur Jean-Marc Lebel, le Professeur Claude Émond et le Professeur Dario Moraga d'avoir accepté de corriger et d'évaluer ma thèse.

Je remercie sincèrement les professeurs-chercheurs qui m'ont aidé ou qui ont collaboré avec moi durant cette thèse : le Docteur Pauline Brousseau pour son aide et ses conseils scientifiques, le Docteur Sophie Gauthier Clerc et son équipe pour leurs résultats complémentaires à ma thèse, le Docteur Chady Stephan pour sa gentillesse et ses conseils en chimie des nanoparticules, les Docteurs Patrice Turcotte et Christian Gagnon pour leurs explications et leurs aides sur les mystères de l'ultrafiltration, le Docteur François Gagné pour ses conseils dans la rédaction des articles et tous ses encouragements, le Docteur Azam Tayabali pour ses photos en imagerie confocale et en microscopie électronique, le Docteur Stéphane Masson et l'Aquarium du Québec pour avoir été les fournisseurs officiels de moules durant ma thèse.

Par ailleurs, je souhaite remercier le personnel technique au Québec et en France pour leur aide et leur soutien. Merci à Marlène Fortier pour m'avoir formé aux techniques du laboratoire et pour son aide dans mes expériences, merci à Marcel Desrosiers pour ses précieux conseils en cytométrie de flux, merci à Alain Marhic à Brest pour son aide lors de mes expositions en aquarium. En France, je tiens à remercier le Docteur Christophe Lambert, le Professeur Philippe Soudan, le Docteur Hansy Haberkorn pour leurs précieuses suggestions concernant mon projet de thèse.

J'aimerais aussi adresser un merci particulier au personnel administratif pour leurs conseils et leur patience : merci à Jocelyne Ash pour son écoute et nos moments de jasette. Un grand merci à Anne Philippon pour sa gentillesse et son efficacité.

Mais une thèse c'est aussi beaucoup de lectures, j'aimerais aussi remercier Michel Courcelles pour ses conseils, son aide et nos échanges dans les corridors. Merci également à Danielle Chartrand et Diane Sauvé pour leur aide et compréhension.

J'aimerais aussi adresser de chaleureux remerciements aux personnes qui m'ont épaulé dans les missions annuelles de terrain au Saguenay : Dr. Patty Gillis, Charline Lemer, Marie-Gilles Fortin, Mélanie Douville, Joëlle Auclair, Joanna Prime, Dr. Christian Blaise, Sylvain Trottier, Chad Boyko. Je garde un très bon souvenir de ces missions dans le fjord et des soirées passées autour d'un barbecue.

J'aimerais aussi remercier les stagiaires Jeremy Denes, Sophie Baranger et Amélie Jauvin côtoyés durant ma thèse et pour leur travail sur mon projet.

Mais la thèse c'est aussi de nombreuses heures passées au laboratoire, qui m'ont permis de mieux connaître mes collègues. J'aimerais les remercier chaleureusement pour leur gentillesse, pour nos fous rires et pour tous ces petits souvenirs que nous garderons ; merci à Hayet, Héloïse, Sophie, Meriem, Nadjat, Hamida, Émilie et aussi à mes amies de passage qui ont égayées mes journées, merci à ma belge adorée Marie et à Célie. J'aimerais aussi remercier les différentes collègues d'autres laboratoires avec lesquels il a été agréable de parler de sciences et autres.

Un merci particulier à mes amis de France et du Québec qui ont été là pour me soutenir durant cette thèse, merci à mes fougères (et Fern's Power !!!), merci à Audrey, Claudia, Ahmed, Bénédicte, Christophe, Soizic, Ronan, Anne, Céline, les Maries, Jennifer, Leila, Yannick, Élisabeth, Nico, Chacha, Marion, Louisch, Rémi, merci à Zaza pour ce beau terrain en France et tes passages sur Brest. J'aimerais aussi adresser un gros merci à ma meilleure amie qui m'a soutenu tout au long de ma thèse.

Enfin, j'aimerais remercier ma mère et ma grand mère pour leur patience, leur gentillesse, leur soutien durant toutes mes études. Je les remercie de m'avoir épaulé quels que soient mes choix et de m'avoir encouragé à persévérer. Je leur dis merci de m'avoir donné le courage d'avancer et de devenir ce que je suis actuellement. Enfin, lors de mon doctorat j'ai rencontré Philippe, après trois années nous avons parcouru beaucoup de chemin tous les deux. Je le remercie pour son écoute, sa patience, son aide, pour m'avoir rassuré dans mes moments de doutes et pour avoir cru en moi.

J'aimerais dédier ma thèse à ma famille, mes amis et à Philippe.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS	V
RÉSUMÉ GÉNÉRAL.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XVIII
LISTE DES TABLEAUX	XXVIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXXI
I- INTRODUCTION, MISE EN SITUATION	1
II- REVUE DE LITTÉRATURE	3
1. LA DEMARCHE EN ECOTOXICOLOGIE	3
1.1 <i>Les notions de base en écotoxicologie</i>	3
1.2 <i>La notion d'espèces sentinelles</i>	7
2. LES ESPECES SENTINELLES DU PROJET DE RECHERCHE	9
2.1 <i>La moule bleue : Mytilus edulis</i>	9
2.1.1 La biologie de l'animal	9
2.1.2 La répartition	12
2.2 <i>La truite arc en ciel : Oncorhynchus mykiss</i>	13
2.2.1 La biologie de l'animal	13
2.2.2. La répartition	15
2.3 <i>La souris C57BL6</i>	16
3. DIFFERENTS SYSTEMES IMMUNITAIRES	16
3.1 <i>Développement du système immunitaire, notions générales chez les mammifères</i>	16
3.1.1 L'immunité innée	17
3.1.2 L'immunité acquise	24
3.1.3 Processus inflammatoire	27
3.2 <i>Les cellules immunitaires de moules</i>	29
3.3 <i>Le système immunitaire de la truite arc en ciel</i>	33
4. LES METAUX : DES POLLUANTS PRIORITAIRES	38
4.1 <i>Le cadmium</i>	38
4.2 <i>L'argent, véritable agent antimicrobien</i>	41
4.3 <i>Le tellure un métal trace peu connu</i>	43
5. LES NANOMATERIAUX DES MOLECULES PEU CONNUES (VERS UNE VOIE DE CONSCIENTISATION DES EFFETS)	44
5.1 <i>Définition du mot nanoparticule</i>	44
5.2 <i>Historique sur les nanoparticules</i>	45
5.3 <i>Sur le plan structurel, les différents types de nanoparticules</i>	46
5.3.1 Les Points quantiques (Quantum dots), les nanocristaux ou atomes artificiels	47
5.3.2 Les nanoparticules d'argent	61
5.4 <i>Observation des nanoparticules</i>	66
5.5 <i>Impact des nanoparticules</i>	67
OBJECTIFS DE LA THESE	70
CHAPITRE 1 : IMMUNOTOXICITÉ DES NANOPARTICULES	74
INTRODUCTION DU CHAPITRE 1 :	75
MATÉRIEL ET MÉTHODE	78
1. OBTENTION ET PURIFICATION DES LEUCOCYTES HUMAINS	78

2. OBTENTION ET PURIFICATION DES LEUCOCYTES DE SOURIS	79
3. OBTENTION ET PURIFICATION DES LEUCOCYTES DE TRUITES	80
4. OBTENTION ET PREPARATION DES HEMOCYTES DE MOULES	80
5. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES UTILISEES DANS LE PROJET DE RECHERCHE	81
5.1 Les nanoparticules de cadmium de Vive Nano® ou Quantum dots (QDs)	81
5.2 Les nanoparticules d'argent de Vive Nano®	82
6. DETERMINATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE	84
7. DETERMINATION DE LA PHAGOCYTOSE	84
8. DETERMINATION DE LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE REALISEE SUR L'HUMAIN, LA SOURIS ET LA TRUITE	85
9. CYTOGRAMMES DES PATRONS CELLULAIRES DES DIFFERENTS MODELES ETUDIES	85
10. CALCUL DES CONCENTRATIONS D'INHIBITION	86
11. TESTS STATISTIQUES.....	87
RESULTATS DE LA SECTION 1 : IMPACT DES NANOPARTICULES SUR DIFFÉRENTES CELLULES IMMUNITAIRES.	87
1. IMMUNOTOXICITE DES NANOPARTICULES DES QDS	87
1.1 CELLULES HUMAINES.....	88
1.2 CELLULES DE SOURIS	90
1.3 CELLULES DE TRUITE ARC-EN-CIEL	90
1.4 CELLULES DE MOULE BLEUE	92
1.5 DISCUSSION SUR LES QDS	92
2. IMMUNOTOXICITE DES AGNPS.....	95
2.1 CELLULES DE SOURIS	96
2.2 CELLULES DE TRUITE ARC-EN-CIEL	97
2.3 CELLULES DE MOULE BLEUE	98
2.4 DISCUSSION SUR LES AGNPS VIVE®	98
RESULTATS DE LA SECTION 2 : RÉACTIONS IMMUNITAIRES DES DIFFÉRENTES ESPÈCES MODÈLES	101
1. IMMUNOTOXICITE DES CD/S, CD/TE QDS SELON LES ESPECES MODELES DU PROJET	101
1.1 VIABILITE ET PHAGOCYTOSE DES DIFFERENTS MODELES	101
1.2 VIABILITE DES LYMPHOCYTES ET TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE	105
1.3 DISCUSSION SUR LES QDS	106
2. IMMUNOTOXICITE DES AGNPS SELON LES ESPECES MODELES DU PROJET	109
2.1 VIABILITE ET PHAGOCYTOSE SELON LES DIFFERENTS MODELES	109
2.2 VIABILITE ET TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE DES DIFFERENTS MODELES.....	113
2.3 DISCUSSION SUR LES AGNPS	115
3. CALCUL DES CI 50 POUR LES DEUX TYPES DE NANOPARTICULES SELON LES MODELES ANIMAUX, SYNTHESE DES RESULTATS	116
3.1 VIABILITE.....	116
3.2 PHAGOCYTOSE.....	117
3.3. TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE.....	118
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU CHAPITRE 1	119
CHAPITRE 2 : ÉTUDES DES FACTEURS INFLUENÇANTS LA TOXICITÉ.....	126
INTRODUCTION DU CHAPITRE 2 :	127
1. CARACTERISATION DES PARTICULES	129

1.1 MATERIEL ET METHODE.....	130
1.1.1 Visualisation des nanoparticules au microscope électronique.....	130
1.1.2 Milieux de culture et nanoparticules.....	130
1.1.3 Caractérisation des nanoparticules.....	131
1.1.4 Cellules et milieux de culture avec les QDs et les AgNPs ViveNano®.....	132
1.2 RESULTATS.....	134
1.2.1 Visualisation des nanoparticules au TEM.....	134
- Les Quantum Dots.....	134
- les AgNPs ViveNano®.....	135
1.2.2 Mesure des limites de détection du Nexion 300.....	135
1.2.3 Les nanoparticules d'argent de ViveNano® dans les différents milieux de culture.....	138
1.2.4 Les cellules et surnageant avec les QDs et les AgNPs ViveNano®.....	143
1.3 CONCLUSION GENERALE SUR LA CHIMIE DES NANOPARTICULES.....	144
2. ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS DES NANOPARTICULES ET DES METAUX-TRACES LES COMPOSANT ...	147
2.1. MATERIEL ET METHODE-SPECIATION.....	147
2.1.1. Rappel sur les méthodes.....	147
2.1.2 Caractérisation des nanoparticules et choix des doses.....	147
2.1.3 Gammes dose réponse Cd, Te et mélange.....	148
2.1.4 Gamme dose réponse d'AgNP et d'AgNO ₃	150
2.1.5 Tests statistiques.....	150
2.2 RESULTATS POUR LES NANOPARTICULES DE CADMIUM (QDs).....	150
2.2.1 Cellules de moules bleues.....	151
2.2.2 Cellules de truites arc-en-ciel.....	154
2.2.3 Cellules de souris.....	157
2.2.4 Cellules d'humains.....	160
2.2.5 Calcul des IC 50 des QDs, pour les différentes espèces modèles.....	165
2.3 DISCUSSION SUR LES QDS SELON LES DIFFERENTES ESPECES.....	166
2.4 RESULTATS POUR LES NANOPARTICULES D'ARGENT DE VIVENANO®.....	171
2.4.1 Cellules de moules bleues.....	171
2.4.2 Cellules de truites arc-en-ciel.....	173
2.4.3 Cellules de souris.....	175
2.4.4 Calcul des CI 50 des AgNPs ViveNano®, pour les différentes espèces modèles.....	177
2.5 DISCUSSION SUR LES AGNPS VIVENANO® SELON LES DIFFERENTES ESPECES.....	178
2.6 CONCLUSIONS GENERALES SUR LES EFFETS DES NANOPARTICULES VS LEURS COMPOSES METALLIQUES.....	180
3. INFLUENCE DE LA DIMENSION DES NANOPARTICULES SUR LEUR TOXICITE.....	181
3.1 MATERIEL ET METHODE.....	182
3.1.1 Caractérisation des nanoparticules.....	182
3.1.2 Exposition des cellules aux NPs.....	186
3.1.3 Tests statistiques.....	186
3.2 RESULTATS SUR L'INFLUENCE DE LA DIMENSION DES QDS.....	187
3.2.1 Distribution de taille de CdTe.....	187
3.2.2 Cellules de truites arc-en-ciel.....	189
3.2.3 Cellules de moules bleues.....	192
3.2.4 Cellules d' <i>Elliptio complanata</i>	193
3.3 RESULTATS SUR L'INFLUENCE DE LA DIMENSION DES PARTICULES DANS LE TEMPS.....	194
3.3.1 Cellules de truite arc-en-ciel.....	195
3.3.2 Cellules de moules d'eau douce, <i>Elliptio complanata</i>	199
3.3.3 Cellules d'humains.....	203

3.4 RESULTATS SUR L'INFLUENCE DE LA TAILLE DES NANOPARTICULES DE TED PELLA ^{INC}	206
3.5 DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES SUR L'INFLUENCE DE LA TAILLE DES NPS	207
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU CHAPITRE 2	214
CHAPITRE 3 : ATTEINTES MÉCANISTIQUES DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ET ANALYSES DE BIOMARQUEURS CHEZ LA SOURIS ET LA MOULE BLEUE	216
INTRODUCTION DU CHAPITRE 3.....	217
1. MATÉRIEL ET METHODE	220
1.1 OBTENTION DES CELLULES DE SOURIS ET DE MOULES	220
1.2 EXPOSITION AUX NANOPARTICULES.....	220
1.3 PROTOCOLE DES METALLOTHIONEINES (MT)	221
1.4 PROTOCOLE DE LA PRODUCTION EOR	223
1.5 PROTOCOLE DE LA PRODUCTION DE THIOLS.....	223
1.6 PROTOCOLE D'APOPTOSE.....	224
1.7 PROTOCOLE POUR L'IMAGERIE CONFOCALE ET ELECTRONIQUE	225
1.8 TESTS STATISTIQUES.....	226
2. RÉSULTATS	227
2.1 CHEZ LE MODELE MURIN C57BL/6.....	227
2.2 CHEZ LE MODELE DE BIVALVE, LA MOULE BLEUE.....	229
2.3 ALTERATION CELLULAIRE.....	230
-Au confocal.....	231
-au TEM.....	233
3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS SUR LES ALTÉRATIONS CELLULAIRES	238
4. CONCLUSIONS SUR LES ACTIONS MECANISTIQUES	243
CHAPITRE 4 : TOXICITÉ DES NANOPARTICULES EN FONCTION DES STRESS ENVIRONNEMENTAUX.....	245
INTRODUCTION DU CHAPITRE 4.....	246
MISE EN CONTEXTE DU SITE DU SAGUENAY.....	248
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES-SAGUENAY.....	251
1.1 ÉCHANTILLONNAGE DES SITES, COLLECTE DES DONNEES ET TRANSPORT DE BIVALVES	251
1.2 OBTENTION DES TISSUS ET ANALYSES.....	252
1.3 OBTENTION ET PREPARATION DE L'HEMOLYMPHE	252
1.4 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES UTILISEES DANS LE PROJET DE RECHERCHE	253
1.5 DETERMINATION DE VIABILITE, CELLULARITE DES MOULES EXPOSEES AUX NANOPARTICULES	254
1.6 DETERMINATION DE LA PHAGOCYTOSE POUR LES MOULE DE TERRAIN.....	254
1.7 DETERMINATION DE LA PHAGOCYTOSE POUR LES MOULE EXPOSEES AUX NANOPARTICULES	255
1.8 ESSAI DU CYCLE CELLULAIRE POUR LES MOULES DE TERRAIN	255
1.9 ANALYSE DE LA FRACTION HUMORALE DE L'HEMOLYMPHE	256
1.9.1 Dosage de l'activité de la pro-phénoloxydase (pro-PO) Protocole modifié de (Coles and Pipe 1994) et (Muñoz, Meseguer et al. 2006).....	257
1.9.2 Dosage de l'activité de la phosphatase acide (Pac) Modifié de (Hong, Xiang et al. 2006; Jing, Li et al. 2006).....	258
1.9.3 Dosage des protéines globales dans le plasma (Bradford 1976).....	258
1.10 TESTS STATISTIQUES.....	259

2. RÉSULTATS POUR LES ÉCHANTILLONNAGES RÉALISÉS DANS LE SAGUENAY	260
2.1 LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	260
2.2 DONNEES MORPHOMETRIQUES DES MOULES BLEUES	262
2.3 PARAMETRES IMMUNOLOGIQUES POUR LES MOULES DE TERRAIN.....	263
2.3.1 Sites échantillonnés	263
2.3.2 Évolution temporelle des sites	265
2.3.3 Cycle cellulaire-échantillonnage 2009	267
2.4 PARAMETRES IMMUNITAIRES OBTENUS DES POOLS D’HEMOCYTES EXPOSES A DES NANOPARTICULES	269
2.4.1 La viabilité.....	269
2.4.2 La phagocytose.....	276
2.5 PARAMETRES HUMORAUX ANALYSES SUR LE PLASMA DES MOULES BLEUES.....	286
3. DISCUSSION SUR LES EXPERIENCES MENEES AU SAGUENAY	287
MISE EN CONTEXTE DU SITE DE BREST	293
4. MATÉRIEL ET METHODE-BREST	295
4.1 OBTENTION DES TISSUS ET ANALYSES.....	295
4. 2 OBTENTION ET PREPARATION DE L’HEMOLYPHE	295
4.3 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES UTILISEES DANS LE PROJET DE RECHERCHE	295
4.4 DETERMINATION DE LA VIABILITE POUR LES MOULES EXPOSEES AUX NANOPARTICULES	296
4.5 DETERMINATION DE LA CELLULARITE ET DE LA VIABILITE, MOULES DE TERRAIN	296
4.6 DETERMINATION DE LA PHAGOCYTOSE, MOULES DE TERRAIN	296
4.7 DETERMINATION DE LA PHAGOCYTOSE POUR LES MOULES EXPOSEES AUX NANOPARTICULES	296
4.8 DONNEES HYDROLOGIQUES 2010, LE PROJET SOMLIT (SERVICE D’OBSERVATION EN MILIEU LITTORAL).....	297
4.9 TESTS STATISTIQUES.....	300
5. RÉSULTATS POUR LES ÉCHANTILLONNAGES RÉALISÉS DANS LA RADE DE BREST	301
5.1 DONNEES MORPHOMETRIQUES.....	301
5.2 PARAMETRES IMMUNOLOGIQUES POUR LES MOULES DE TERRAIN.....	302
5.2.1 Viabilité.....	302
5.2.2 Phagocytose	303
5. 3 PARAMETRES IMMUNITAIRES OBTENUS DES POOLS DE MOULES EXPOSES AUX NANOPARTICULES.....	304
5.3.1Viabilité des pools (essais préalables)	304
5.3.2Viabilité avec exposition à des nanoparticules d’argent de Ted PellaInc	305
5.3.3 Viabilité avec les nanoparticules d’argent de VivNano®	306
5.3.4Viabilité avec les Nanoparticules de cadmium de VivNano®.....	307
5.3.5 Phagocytose avec exposition à des nanoparticules d’argent de Ted PellaInc	308
5.3.6 Phagocytose avec exposition à des nanoparticules d’argent de ViveNano®.....	310
5.3.7 Phagocytose avec exposition à des nanoparticules cadmium de ViveNano®.....	311
5.4 CONCLUSION DES EXPERIENCES MENEES SUR BREST	312
6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU CHAPITRE 4	314
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES, PERSPECTIVES	318
1. DISCUSSION DES RESULTATS DE LA THESE.....	319
2. CONTRIBUTION A L’AVANCEMENT DES CONNAISSANCES	327
3. PERSPECTIVES	328
ANNEXES	333
ANNEXE 1 : RESULTATS DES TAILLES DE NANOPARTICULES D’ARGENT (TED PELLA^{INC})	334

1-MATERIEL ET METHODE	335
1.1 CARACTERISATION DES PARTICULES.....	335
1.2 OBTENTION DES CELLULES ET EXPOSITION CELLULAIRE.....	335
1.3 TESTS STATISTIQUES.....	335
2- RESULTATS	335
2.1 Cellules de moules bleues.....	336
2.2 Cellules de truites arc-en-ciel.....	337
2.3 Cellules de souris.....	339
2.4 Cellules d'humain.....	341
3. CONCLUSIONS ET DISCUSSION	341
ANNEXE 2 : CAMPAGNES D'ECHANTILLONNAGE DANS LE SAGUENAY 2008, 2009, 2010.	
RESULTATS AVEC MYA ARENARIA	342
1. PROTOCOLE 2008.....	344
1.1 Collection de l'hémolymphe.....	344
1.2 Compte cellulaire et viabilité.....	344
1.3 Phagocytose.....	344
2. RESULTATS ET DISCUSSION 2008.....	345
3. PROTOCOLE 2009.....	345
4. RESULTATS ET DISCUSSION 2009.....	347
5. PROTOCOLE 2010.....	348
5.1 Essais sur la fraction humorale de l'hémolymphe.....	348
5.1.1 Dosage de l'activité de la pro-phénoloxydase (pro-PO) Protocole modifié de (Coles and Pipe 1994) et (Muñoz, Meseguer et al. 2006).....	349
5.1.2 Dosage de l'activité de la phosphatase acide (Pac) Modifié de (Hong, Xiang et al. 2006; Jing, Li et al. 2006).....	350
5.1.3 Dosage des protéines globales dans le plasma (Bradford 1976).....	351
5.1.4 Dosage de la L leucine aminopeptidase dans le plasma modifié de Travers et al, 2008. (Travers, Silva et al. 2008).....	351
6. RESULTATS ET DISCUSSION 2010.....	353
ANNEXE 3 : TESTS IN VITRO ET IN VIVO AVEC LES METAUX SUR CRASSOSTREA GIGAS	358
PRESENTATION DU MODELE DE RECHERCHE	359
I. EXPOSITION IN VITRO D'HEMOCYTES DE C.GIGAS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CADMIUM ET DE CUIVRE	360
1.1 MATERIEL ET METHODE.....	360
1.1.1 Prélèvement des hémocytes :.....	360
1.1.2 Incubation avec les toxiques :.....	360
1.1.3 Protocole de viabilité.....	361
1.1.4 Protocole de phagocytose.....	361
1.1.5 Protocole de production de EOR (espèces oxygénées réactives).....	361
1.2 RESULTATS ET DISCUSSION.....	362
2. EXPOSITION IN VIVO DE CRASSOSTREA GIGAS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CADMIUM ET DE CUIVRE	364
2.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	364
2.2 RESULTATS ET DISCUSSION.....	365
ANNEXE 4 : VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE	371

ARTICLES SOUMIS ET EN SOUMISSION.....	372
AUTRES ARTICLES.....	372
PRÉSENTATIONS ORALES ET AFFICHES RÉALISÉES DURANT LA THÈSE	373

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : a) Organisation d'une moule montrant la localisation du muscle adducteur postérieur dans le sinus duquel se pratique la ponction de l'hémolymphe b) ponction d'hémolymphe à l'aide d'une seringue de 1 ml.....	9
Figure 2 : Organisation interne de la moule	10
Figure 3 : Cycle de développement et d'exploitation aquicole des moules	11
Figure 4 : Les premiers stades de développement des œufs.	12
Figure 5 : Développement d'embryons à partir du premier stade trochophore (A) jusqu'au stade de larve D (D). L'organe cilié de nage et de nutrition (velum) peut être vu dans B et la formation de la première valve de la coquille dans C (2jours).....	12
Figure 6 : Répartition de deux espèces de mytilidés <i>Mytilus galloprovincialis</i> au sud et <i>Mytilus edulis</i> au Nord	13
Figure 7 : Répartition de <i>Mytilus edulis</i> dans le Golfe du Saint Laurent	13
Figure 8 : Organisation interne de la truite	14
Figure 9 : Cycle de production de la TAC en élevage.....	15
Figure 10 : Principaux pays producteurs d' <i>Oncorhynchus mykiss</i>	16
Figure 11 : Morphologie typique d'un monocyte et d'un macrophage.....	20
Figure 12 : Phagocytose et apprêtement d'un antigène exogène par les macrophages..	23
Figure 13 : Différents types de cellules immunitaires chez la moule bleue colorés au Giesma, les hémocytes ont été incubés avec des billes de latex.....	30
Figure 14 : Résultats d'une différenciation cellulaire à l'aide d'un gradient Percoll.....	30
Figure 15 : Différents types cellulaires a) monocyte de saumon, b) neutrophile et monocyte de hareng, c) cellules basophiles de saumon, d) lymphocyte de saumon, e) éosinophile de hareng, f) neutrophile de saumon, g) neutrophile du tête de boules , h) thrombocyte de tête de boules	34
Figure 16 : Principaux organes responsables de l'immunité innée et acquise chez la truite arc en ciel.	35
Figure 17 : Dimension de différentes entités biologiques et physiques dont les points quantiques. QDs sont à peu près de la même taille que les phycoérythrine.	44
Figure 18 : Réponse non homogène : A) Mesures d'ensemble du spectre d'absorption et d'émission pour un simple nanocristal et dans un échantillon, B) excitation inhomogène pour un spectre d'absorption et d'émission pour un échantillon de 36 Å.	47

Figure 19 : Structure en plan d'un Point quantique montrant l'agencement des différentes couches de la particule et la nature de celles-ci.	48
Figure 20 : Structure d'une sonde multifonctionnelle: enrobage d'une couche de TOPO dans une solution aqueuse.....	50
Figure 21 : (a) microscope électronique en transmission montrant des points quantiques (capés avec TOPO) de 4 nm de diamètre et (b) solutions contenant différents types de particules de CdSe.	51
Figure 22 : Différence de spectre lumineux entre une sonde (fluorochrome standard : Rhodamine) et celui de 6 types de nanoparticules différentes.....	51
Figure 23 : Récapitulatif des différentes fonctions des points quantiques utilisés en bioimagerie	54
Figure 24 : Structure d'une nanoparticule d'argent observée au microscope électronique en transmission.....	67
Figure 25 : Représentation schématique de la dispersion des nanoparticules dans l'environnement	68
Figure 26 : Différentes voie d'entrée des nanoparticules dans la cellule.....	69
Figure 27 : Cytogrammes des préparations cellulaires de chaque modèle animal montrant les différentes populations identifiables à partir des critères de taille et de structure.	86
Figure 28 : Courbe théorique expliquant le calcul de la Concentration d'Inhibition à 50 %.	87
Figure 29 : Valeurs moyennes de la viabilité, de la phagocytose et de la transformation lymphoblastique des cellules immunitaires d'humain.	89
Figure 30 : Viabilité, phagocytose et transformation lymphoblastique chez C57BL/6..	90
Figure 31 : Viabilité, phagocytose et transformation lymphoblastique pour <i>Oncorhynchus mykiss</i>	91
Figure 32 : Paramètres immunitaires pour <i>Mytilus edulis</i> exposés durant 21 h à des QDs. n=9..	92
Figure 33 : Récapitulatif des variations significatives de la viabilité, de la phagocytose et de la transformation lymphoblastique chez la souris..	96
Figure 34 : Récapitulatif des variations significatives de la viabilité, phagocytose, et transformation lymphoblastique chez la TAC.	97
Figure 35 : Récapitulatif des variations significatives de la viabilité et phagocytose chez la moule. Viabilité n=8 et phagocytose n=8.	98
Figure 36 : Viabilité des cellules immunitaires des différents modèles d'études, monocytes d'humain n=3, macrophages de souris n=10, macrophages de truites n=11, hémocytes de moules n=9.....	102
Figure 37 : Immunocapacité des cellules immunitaires des différents modèles d'études, monocytes d'humains n=3, macrophages de souris n=10, macrophages de truites n=11, hémocytes de moules n=9.	103

Figure 38 : Immunoefficacité des cellules immunitaires des différents modèles d'études, monocytes d'humain n=3, macrophages de souris n=10, macrophages de truites n=11, hémocytes de moules n=9.	104
Figure 39 : Viabilité des lymphocytes des différents modèles exposés à des nanoparticules de cadmium Cd/S, Cd/Te.	105
Figure 40 : Transformations lymphoblastique des lymphocytes T de différentes espèces du projet de recherche.	106
Figure 41 : Viabilité des macrophages de souris n= 6, truites n= 9 et les hémocytes de moules bleue n= 8 après exposition durant 21 heures aux nanoparticules d'argent.	110
Figure 42 : Immunocapacité des macrophages de souris n= 6, truites n= 9 et les hémocytes de moules bleue n= 8 après exposition 21 heures aux nanoparticules d'argent.	111
Figure 43 : Immunoefficacité des macrophages de souris n= 6, truites n= 9 et les hémocytes de moules bleues n= 8 après exposition 21 heures aux nanoparticules d'argent.	112
Figure 44 : Viabilité des lymphocytes de souris n= 6, truites n= 9 après exposition 48 heures et 72 heures aux nanoparticules d'argent.	113
Figure 45 : Transformation lymphoblastique des lymphocytes T de différentes espèces du projet de recherche.	114
Figure 46 A et B : Images des nanoparticules de cadmium en microscopie électronique.	134
Figure 47 A et B : Images des nanoparticules de d'argent en microscopie électronique.	135
Figure 48 : Courbe de calibration réalisée avec le Nexion 300 et les différentes tailles de nanoparticules d'AgNPs TP.	137
Figure 49 : Dosages des différentes isotopes mesurés dans le mélange AgNP et eau stérile.	138
Figure 50 : Différents isotopes mesurés dans le mélange AgVivN et RPMIc	139
Figure 51 : Dosages des isotopes contenus dans le mélange AgVivN et RPMIc sans bicarbonate	140
Figure 52 : Dosages des isotopes contenus dans le mélange AgVivN et eau de mer	140
Figure 53 : Dosages des isotopes contenus dans le mélange QDs et différents milieux de culture. ..	141
Figure 54 : Mesures des isotopes de Cd et de Te dans les macrophages de souris et dans le milieu de culture des cellules.	143
Figure 55 : Mesures des isotopes d'argent dans les macrophages de souris et dans le milieu de culture des cellules.	144
Figure 56 : Viabilité des hémocytes après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	152

Figure 57 : Immunoactivité et immunoefficacité des hémocytes de moules exposées durant 21 h aux QDs vs les métaux qui les composent.....	153
Figure 58: Viabilité des truites après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	154
Figure 59 : Phagocytose chez la truite après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	155
Figure 60 : Viabilité des lymphocytes de truites après exposition durant 72 h avec les QDs et les métaux composant la particule.	156
Figure 61 : Viabilité des macrophages de souris après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	157
Figure 62 : Phagocytose des macrophages de souris après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	158
Figure 63 : Viabilité des lymphocytes après exposition durant 48 h avec les QDs et les métaux composant la particule.	159
Figure 64 : Transformation lymphoblastique des souris après 48h d'exposition aux QDs et aux métaux.	160
Figure 65 : Viabilité des monocytes d'humains après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	160
Figure 66 : Phagocytose des monocytes d'humains après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule.	162
Figure 67 : Viabilité des lymphocytes après exposition durant 48 h avec les QDs et les métaux composant la particule.	163
Figure 68 : Transformation lymphoblastique d'humains après 48h d'exposition aux QDs et aux métaux.	164
Figure 69 : Viabilité et phagocytose de moules exposées aux nanoparticules d'argent.....	172
Figure 70 : Viabilité et phagocytose des macrophages de truites exposées durant 21h aux AgNPs et au nitrate d'argent.....	173
Figure 71 : Viabilité des lymphocytes exposés durant 72h avec des AgNPs = 9, et de l'argent dissous	174
Figure 72 : Viabilité et phagocytose des macrophages de souris exposés durant 21h aux AgNP et au nitrate d'argent.....	175
Figure 73 : Viabilité et transformation lymphoblastique des Lymphocytes T de souris exposées durant 48 h aux AgNPs et au nitrate d'argent.....	176

Figure 74 : Principe de la méthode d'ultrafiltration et de filtration réalisées avec l'appareil de P. Turcotte. Schéma modifié de P. Turcotte.	183
Figure 75 : Viabilité des macrophages d'O. mykiss.....	190
Figure 76 : Immunocapacité, phagocytose d'une bille et plus pour O. mykiss	191
Figure 77 : Immunoefficacité, phagocytose de 3 billes et plus pour d'O. mykiss.....	192
Figure 78 : Suivi temporel de la viabilité des macrophages de truites mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	195
Figure 79 : Suivi temporel de la viabilité des lymphocytes de truites arc-en-ciel mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	196
Figure 80 : Suivi temporel de l'immunoefficacité des macrophages de truites arc-en-ciel mises en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	198
Figure 81 : Suivi temporel de la viabilité des hémocytes de moule d'eau douce mises en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.	200
Figure 82 : Suivi temporel de l'immunoactivité des hémocytes de moules d'eau douce mises en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	201
Figure 83 : Suivi temporel de la viabilité des monocytes d'humain mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	203
Figure 84 : Suivi temporel de l'immunocapacité des macrophages d'humain mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	204
Figure 85 : Suivi temporel de l'immunoefficacité des macrophages d'humain mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations.....	205
Figure 86 : Induction d'apoptose et nécrose suite à l'exposition aux QDS des hémocytes de moule bleue.	225
Figure 87 : Résultats liés à l'activité immunitaire chez la souris pour les différents biomarqueurs considérés..	227
Figure 88 : Réaction oxydative chez la souris exposée aux nanoparticules de cadmium Cd/s Cd/te et au CdCl ₂ durant 21h.	228
Figure 89 : Réponse immunitaire chez la moule bleue exposée aux nanoparticules de Cd/Te, Cd/S durant 21h. a) Production de thiols. b) Sécrétion de métallothionéines	229
Figure 90: Apoptose pour la moule bleue exposée aux QDs. Pourcentage de cellules viables, mortes et en apoptose.....	229
Figure 91 : Marquages de phalloïdine et de rhodamine sur des macrophages de souris.....	231
Figure 92 : Macrophages de souris exposés aux différentes concentrations de QDs durant 3h	232

Figure 93 : Macrophages de souris exposés à 118.75 µg/ml de cadmium contenu dans les QDs.	233
Figure 94 : Visualisation des cellules de macrophages de souris non exposés aux nanoparticules d'argent.....	233
Figure 95 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 4,46 µg/ml de nanoparticules.	234
Figure 96 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 8,93 µg/ml de nanoparticules.	235
Figure 97 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 17,85 µg/ml de nanoparticules.	236
Figure 98 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 35,7 µg/ml de nanoparticules.	237
Figure 99: Carte des différents sites échantillonnés, dans la région de Fjord Saguenay.	249
Figure 100 : Cytogrammes de cycle cellulaire chez les moules bleues.....	256
Figure 101 : Paramètres chimiques prélevés lors de la campagne d'échantillonnage 2009.....	261
Figure 102 : Données sur les tissus prises durant les trois campagnes de terrain dans le fjord du Saguenay.....	262
Figure 103 : Viabilité des hémocytes de moules bleues prises selon différents sites d'échantillonnage.	263
Figure 104 : Immunocapacité des hémocytes de moules bleues prises selon différents sites d'échantillonnage.....	264
Figure 105 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues prises selon différents sites d'échantillonnage.....	264
Figure 106 : Suivi temporel de la viabilité des hémocytes de moules bleues durant les 3 années de campagne d'échantillonnage dans le Saguenay	265
Figure 107 : Suivi temporel de l'immunoactivité des hémocytes de moules bleues durant les 3 années de campagne d'échantillonnage dans le Saguenay.	266
Figure 108 : Suivi temporel de l'immunoefficacité des hémocytes de moules bleues durant les 3 années de campagne d'échantillonnage dans le Saguenay.....	267
Figure 109 : Différentes phase du cycle cellulaire mesuré pour les moules bleues de terrain lors de la campagne d'échantillonnage 2009.....	268
Figure 110 : Viabilité moyenne des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en nanoparticules d'argent (AgNPs TP) de 20 nm de diamètre.	269

Figure 111 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en AgNPs TP de 40 nm de diamètre.....	270
Figure 112 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en AgNPs TP de 60 nm de diamètre.....	271
Figure 113 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en AgNPs TP de 80 nm de diamètre.....	272
Figure 114 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en nanoparticules d'argent de la compagnie ViveNano® (AgNPs ViveNano).....	273
Figure 115 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en nanoparticules de cadmium(QDs).....	274
Figure 116 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés aux AgNPs TP de 20 nm de diamètre en 2009 et en 2010	276
Figure 117 : Phagocytoses des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs TP de 20 nm de diamètre..	277
Figure 118 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs TP de 40 nm de diamètre.	278
Figure 119 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs TP de 60 nm de diamètre.	279
Figure 120 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés aux AgNPs TP de 80 nm de diamètre et ce durant 21h.	280
Figure 121 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés aux AgNPs TP de 80 nm de diamètre durant 21h.....	281
Figure 122 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs ViveNano® en 2010.....	282
Figure 123 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules de cadmium (QDs) et ce durant 21h.....	283
Figure 124 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules de cadmium (QDs) durant 21h	284
Figure 125 : Résultats des dosages de protéines mesurées sur le plasma de 15 moules prisent sur le terrain lors de la campagne d'échantillonnage 2010	286
Figure 126 : Sites d'échantillonnages dans la rade de Brest, Bretagne, France..	294
Figure 127 : Deux sites échantillonnés dans la zone portuaire de Brest.	294

Figure 128 : Localisation de la station d'échantillonnage SOMLIT pour les paramètres chimiques de l'eau.....	298
Figure 129 : Données de chimie récoltées par la station SOMLIT au court des années 2009 et 2010.	298
Figure 130 : Paramètres chimiques recueillis par la station d'échantillonnage Portzic du projet SOMLIT pour le mois de mai 2010.	299
Figure 131 : Données biologiques prises sur les moules bleues échantillonnées à différents sites à Brest.....	301
Figure 132 : Viabilité des hémocytes de moules bleues échantillonnées sur les différents sites sélectionnés en 2010.	302
Figure 133 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues prélevées lors de la campagne d'échantillonnage dans la rade de Brest en mai 2010.....	303
Figure 134 : Viabilité des pools d'hémocytes de moules bleues prises sur le terrain en 2010 dans 3 sites à Brest.....	304
Figure 135 : Viabilité des hémocytes de moules bleues exposés à différentes tailles de nanoparticules d'argent et selon une gamme de concentration.	305
Figure 136 : Viabilité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules d'argent de ViveNano selon une gamme de concentration.	306
Figure 137 : Viabilité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules de cadmium QDs selon une gamme de concentration.	307
Figure 138 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés à différentes tailles de nanoparticules d'argent.....	308
Figure 139 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés à différentes tailles de nanoparticules d'argent. N pools =6.....	309
Figure 140 : Immunoactivité et immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules d'argent de ViveNano.	310
Figure 141 : Immunoactivité et immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposées à des nanoparticules de cadmium (QDs).	311
Figure 142 : Schéma récapitulatif des voies d'entrée des NPs dans la cellule immunitaire et de leurs actions.....	326
Figure 143 : Viabilité et phagocytose pour la moule exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella ^{inc}	336
Figure 144 : Viabilité et phagocytose pour la truite arc-en-ciel exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella ^{inc}	337

Figure 145 : Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique pour la truite arc-en-ciel exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella ^{inc}	338
Figure 146 : Viabilité des macrophages et phagocytose pour la souris exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella ^{inc}	339
Figure 147 : Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique pour la souris exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella ^{inc}	340
Figure 148 : Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique pour les lymphocytes d'humain exposés aux nanoparticules d'argent de Ted Pella ^{inc}	341
Figure 149 : Différents sites d'échantillonnages des Myes situés dans le fjord du Saguenay.....	343
Figure 150 : Résultats des paramètres immunitaires dosés sur des myes pour l'année 2008.....	345
Figure 151 : Viabilité et cellularité des hémocytes de myes pour l'année 2009.	347
Figure 152 : Viabilité des hémocytes de myes pris à différents points des plages selon un transect, groupement des données.....	353
Figure 153 : Dosages des différents paramètres humoraux sur les myes de terrain lors de la campagne d'échantillonnage de 2010.....	354
Figure 154 : dosage de L-leucine aminopeptidase dans le plasma des myes récoltées sur le terrain au Saguenay en 2010.....	355
Figure 155 : A gauche une mye et son siphon enfouis dans le sédiment, à droite récolte des moules bleue de l'Anse saint Etienne.....	356
Figure 156 : Observation de perles dans les manteaux des moules bleues présentes aux sites d'échantillonnages.....	357
Figure 157 : dissection d'une huitre creuse <i>Crassostrea gigas</i> . L'hémolymphe est ponctionnée dans le gros muscle postérieur de l'animal.....	360
Figure 158 : Différents paramètres immunitaires mesuré chez l'huitre creuse lors de l'exposition à différentes doses de contaminants métalliques.....	362
Figure 159 : Plan d'expérimentation <i>in vivo</i> avec des huitres creuses <i>Crassostrea gigas</i> durant 9 jours	364
Figure 160 : Différents paramètres immunitaire mesurés sur les huitres à T0 avant l'expérience.....	365
Figure 161 : Viabilité des hémocytes d'huitres après 3 jours d'incubation avec les métaux	365
Figure 162 : Viabilité des hémocytes d'huitres après 9 jours d'incubation avec les toxiques.....	366
Figure 163 : Phagocytose des hémocytes d'huitres après 3 jours d'incubation avec les métaux.....	366
Figure 164 : Phagocytose des hémocytes d'huitres après 6 jours d'incubation avec les métaux.....	367

Figure 165 : Production d'EOR par les hémocytes d'huitres après exposition *in vivo* durant 3 jours.
.....367

Figure 166 : Production d'EOR par les hémocytes d'huitres après exposition *in vivo* durant 6 jours.368

Figure 167 : Mortalité des huitres creuses au fur et mesure de l'expérimentation.....368

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes cellules du système immunitaire de la lignée monocytaire et leurs caractéristiques.....	19
Tableau 2 : Récapitulatif des différentes cellules du système immunitaire de la lignée lymphoïde et leurs caractéristiques.....	26
Tableau 3 : Protéines responsables de la communication cellulaire lors d'une réaction immunitaire.....	37
Tableau 4 : Sources des différents types de nanoparticules présentes actuellement dans l'environnement.....	45
Tableau 5 : Avantages de deux types de sondes lumineuses les fluorochromes standards et les points quantiques.....	52
Tableau 6 : Différentes études menées en toxicité des QDs sur différents modèles animaux.....	56
Tableau 7 : Différentes études menées sur les nanoparticules d'argent et leur toxicité relative.....	63
Tableau 8 : Gamme de contamination testée pour les expériences avec les QDs.....	82
Tableau 9 : Gamme de contamination testée avec les d'AgNPs Vive Nano [®]	83
Tableau 10 : a) Récapitulatifs des CI 50 pour les viabilités des monocytes d'humains, des macrophages de truites arc-en-ciel et de souris et des hémocytes de moules bleues. b) Récapitulatifs des CI 50 pour les viabilités des lymphocytes T d'humains, de truites arc-en-ciel et de souris.....	116
Tableau 11 : a) et b) Récapitulatif des CI 50 pour les deux paramètres de phagocytose des monocytes d'humains, des macrophages de truites arc-en-ciel et de souris et les hémocytes de moules bleues.	117
Tableau 12 : Récapitulatifs des CI 50 pour les transformations lymphoblastiques des LT d'humains, de truites arc-en-ciel et de souris.....	118
Tableau 13 : Gradient de sensibilité des différents modèles animaux aux QDs selon les paramètres immunitaires.....	121
Tableau 14 : Gradient de sensibilité des différents modèles animaux aux AgNPs selon les paramètres immunitaires.....	123
Tableau 15: Mesure de la concentration d'argent contenue dans les nanoparticules de Ted Pella ^{inc}	132
Tableau 16 : Concentration des NPs testés avec les différents milieux de culture et les macrophages de souris.....	133
Tableau 17 : Seuil de détection des différents isotopes mesurés par le Nexion 300.....	136
Tableau 18 : Seuil de détection moyen des différents isotopes d'intérêt.....	136

Tableau 19 : Mesures des différents isotopes présents dans le mélange QDs et milieux de cultures	142
Tableau 20 : Récapitulatif de la gamme dose réponse de QDs employés dans les expériences.	148
Tableau 21 : Exposition des cellules aux différentes doses de CdCl ₂ et NaTeO ₃ et le mélange	149
Tableau 22 : Récapitulatif de la gamme dose réponse d'AgNP employée dans les expériences.....	150
Tableau 23 : Récapitulatif des actions des QDs et des métaux composant la particule, sur les différents types cellulaires des modèles animaux.....	165
Tableau 24 : Récapitulatif des CI 50 pour les nanoparticules d'argent et le nitrate d'argent dissous.	177
Tableau 25 : Fractions de QDS nanoparticules et la taille associée. Le retentat est plus concentré que le perméat.....	184
Tableau 26 : Fractions des QDs et différentes concentrations de cadmium.....	185
Tableau 27 : Comportement de fractionnement de taille de CdTe pour les différentes dilutions des fractions de Qdots.....	186
Tableau 28 : Concentrations en Cd and Te mesurées dans chaque fraction.....	188
Tableau 29 : Gamme de contaminations testées pour les expériences avec les QDs.....	221
Tableau 30 : Facteur d'induction de DBT/TBT présent aux différents sites d'échantillonnage présents dans le Saguenay.....	250
Tableau 31 : Caractéristiques des différents sites d'échantillonnages et des contaminations potentielles.	251
Tableau 32 : Différents stades de maturation de l'ADN pour les moules bleues de terrain	268
Tableau 33 : Valeurs des CI 50 de viabilité pour les hémocytes de moules bleues selon les différents sites échantillonnés.	274
Tableau 34 : Valeurs de CI50 pour les hémocytes de moules bleues en fonctions des différents sites échantillonnés en 2009 et en 2010.....	275
Tableau 35 : IC 50 calculées, pour les années 2009 et 2010, pour la phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21H aux AgNPs ViveNano®	283
Tableau 36 : CI 50 calculées, pour les années 2009 et 2010, pour la phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21H aux nanoparticules de cadmium (QDs)	285
Tableau 37 : Valeur des CI 50 pour la phagocytose en fonction des différents sites échantillonnés dans la rade de Brest.	311
Tableau 38 : Valeurs des IC 50 pour les différents sites échantillonnés dans la rade de Brest.....	312
Tableau 39 : Courbe standard de p-nitrophénol afin de doser la production de phosphatase acide dans le plasma des myes.	350

Tableau 40 : Dilution pour la réalisation de la courbe standard de Leucine aminopeptidase.....352

LISTE DES ABRÉVIATIONS

³ H	Thymidine tritiée
A	Nombre de masse atomique
Ag ₃ PO ₄	Phosphate d'argent
AgCl	Chlorure d'argent
AgNPs ViveNano [®]	Nanoparticule d'Argent de la compagnie ViveNano [®]
AgNPs TP	Nanoparticule d'Argent de la compagnie Ted Pella ^{inc}
ASE	Anse Saint Etienne
BAR	Anse à la Barque
BAU	Anse de Baude
ASB	Albumine de Sérum Bovin
BSC	Baie Sainte Catherine
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CD	Cluster de différenciation
CI 50	Concentration d'Inhibition à 50 %
Commerce	Port de commerce
Con A	Concanavaline A
Conquet	Plage du Conquet
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
EOR	Espèces oxygénées réactives
GPx	Glutathion peroxydase
Hépès	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-ethanesulfonic acid
HSP 70	Heat Shock Protéines 70
IC	Indice de condition
IF	Interféron
Ig	Immunoglobines
IK	Interleukine
JAK/STAT	Janus kinase/ transducteur et activateur de transcription
JNK	c-Jun amino terminale kinase
LB	Lymphocyte B
LL	Leucocytes lymphoïdes
LNL	Leucocytes non lymphoïdes
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (dose minimale avec effets nocifs observés)

LPS	Lipopolysaccharides bactériens
LT	Lymphocyte T
LT _c	Lymphocyte T cytotoxique
LT _H	Lymphocyte T _{Helper}
LT _r	Lymphocyte T régulateur
MAPK	Protéines Kinases mitogène activées
MDA	Malondialdéhyde
MES	Matière en suspension
Mix	Mélange Cadmium/Tellure
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (dose maximale pour laquelle aucun effet toxique n'est observé)
NK	Cellule Natural Killer – cellule NK
NPs	Nanoparticules
ON	Oxydes nitriques
Pac	Phosphatase acide
PBS	Tampon salin phosphate
ProPO	Prophénoloxydase
Prot	Protéines totales
PRR	Pattern de recognition receptor = récepteur de reconnaissance
QDs	Quantum Dots ou points quantiques
SOD	Superoxyde dismutase
SOMLIT	Service d'Observation en Milieu Littoral
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAC	Truite arc-en-ciel
Te	Tellure
TEM	Microscope Electronique en Transmission
TL	Transformation lymphoblastique
TLR	Toll like receptor ou récepteur Toll
TNF α	Facteur de nécrose tumorale α
Z	Numéro atomique d'un atome
Zn	Zinc
ζ	Potentiel ζ (Zeta) des nanoparticules
n.o	Non observé

Il est à noter que certaines abréviations ont gardé leurs noms anglais afin de faciliter la nomenclature et la comparaison avec d'autres études.

I- Introduction, mise en situation

A l'heure actuelle l'usage des nanoparticules est de plus en plus médiatisé. Elles représentent de gros enjeux financiers, en 2014 plus de 15 % des produits manufacturés seront faits à base de nanoparticules (Iavicoli, Calabrese et al. 2010). Ces nouveaux matériaux représentent donc un très gros marché de production et de vente évalué à 2.4 trillions de dollars en 2014. Elles sont maintenant utilisées à grande échelle. Ainsi, les nanoparticules sont donc présentes dans tous les domaines, biologie, médecine, ingénierie, optique, électronique, mécanique, chimie, pharmacologie, cosmétique (Hardman 2006; Paul and Lyons 2008). Elles sont retrouvées dans les objets utilisés au quotidien. En 2006, plus de 300 produits commerciaux disponibles sur le marché contenaient des nanomatériaux (Maynard, Aitken et al. 2006; Koeneman, Zhang et al. 2009). Ainsi les nanoparticules sont dispersées dans les différents milieux l'eau, l'air et le sol (Biswas 2005; Farre, Gajda-Schranz et al. 2009). Cependant peu d'informations sont connues sur le destin des nanoparticules, leur comportement, les voies d'exposition et de relargage dans le milieu (Simonet and Valcárcel 2009).

Malheureusement, il n'existe pas encore de réglementations concernant l'usage de ces nouveaux matériaux. Le principe de précaution semble la meilleure solution à adopter actuellement (2009). A présent, il n'existe donc pas assez d'informations sur la toxicité des nanoparticules pour prédire tous les risques en fonction de chaque situation, il est donc nécessaire de limiter les contacts directs avec les nanoparticules (2009). L'usage des nanoparticules dans le quotidien est un sujet de débat encore d'actualité (Handy, Owen et al. 2008).

D'autre part, la plupart des nanoparticules sont composées de métaux, dont la toxicité n'est plus à démontrer (Thurn K. Ted 2007). La stabilité des particules est donc un critère primordial. Une altération des particules en fonction de l'environnement pourrait causer des cas de toxicité (Chan 2008). Ainsi, il est fondamental de mener des études écotoxicologiques afin d'obtenir des données et mettre en place des rapports d'évaluation de risques.

En effet certaines théories indiquent que les nanoparticules sont relarguées dans le milieu (Biswas 2005), elles s'ajouteraient alors aux nombreux contaminants déjà présents tels que : les hydrocarbures, les herbicides, les métaux, les contaminants émergents ou les espèces biologiques toxiques. Afin de pouvoir étudier ces pollutions et de prévoir leurs impacts sur

l'environnement et sur l'homme, les études écotoxicologiques utilisent divers organismes, de plusieurs niveaux trophiques, comme bioindicateurs. Il existe de nombreuses espèces animales sentinelles servant de signaux d'alarme lors de contaminations (Lower and Kendall 1990). Les souris principalement utilisées en laboratoire, constituent le modèle de mammifère par prédilection. Les poissons, comme les truites arc en ciel, sont aussi très souvent utilisés pour les détections de toxicité présentes dans les eaux douces. Finalement les mollusques bivalves et particulièrement les moules (*Mytilus sp.*), sont de bons exemples d'espèces sentinelles servant de signaux d'alarme dans les eaux de mer.

En effet, chaque espèce citée précédemment est susceptible d'être exposée à des contaminations présentes dans leurs différents milieux de vie respectifs. Ainsi la souris est à la fois mise en présence de contaminants présents dans l'eau, l'air et le sol et son système immunitaire, très développé, basé sur les réponses immunitaires innées et acquises permettent d'effectuer des extrapolations au modèle humain. La truite quand à elle, est souvent exposée à des contaminants solubles dans les eaux douces, son système immunitaire possède de nombreuses similitudes avec celui des mammifères, comportant aussi un système immunitaire inné et adaptatif présentant des anticorps tétramériques IgM et IgG (Chilmonczyk and Monge 1987; Zelikoff 1994; Köllner, Wasserrab et al. 2002; Passantino, Altamura et al. 2002; Tryphonas, Fournier et al. 2005). La moule, par son activité filtrante, accumule les différents polluants présents dans la colonne d'eau. Dans leur système circulatoire ouvert, des cellules pluripotentes ou hémocytes sont les précurseurs de la réponse immunitaire des bivalves. Remplissant différents rôles (à la fois cellules digestives, immunitaires, nerveuses etc.) ces cellules sont primordiales et vont être à l'origine de mécanismes de défenses telle la phagocytose réalisée par les granulocytes (Sauve, Brousseau et al. 2002).

Il est donc fondamental de pouvoir évaluer les performances du système immunitaire lorsque celui ci est mis en présence de nouvelles molécules comme les nanoparticules. Le système immunitaire représente la protection du corps par excellence quelque soit son degré de complexité (Paul 2008), il permet ainsi de lutter contre les infections (Zolnik, Gonzalez-Fernandez et al. 2010). Selon les cas, il peut être soit sous stimulé ou sur stimulé. Une étude portant sur le système immunitaire prend alors toute son importance.

Les réponses immunitaires des organismes aux polluants peuvent ainsi être étudiées grâce à divers paramètres utilisés lors de bioessais. Ces tests, basés sur l'usage de biomarqueurs, permettent d'observer les états et les réponses d'un organisme à différentes doses de

contaminants (Gestel and Brummelen 1996; Fournier, Cyr et al. 2000; Lassere, Johnson et al. 2007; Monserrat, Martinez et al. 2007).

Ce projet de recherche s'inscrit dans ce contexte ; il est composé de quatre volets. Le premier porte sur l'étude de deux types de nouveaux contaminants : les nanoparticules de Cd/S Cd/Te aussi nommées quantum dots (QDs) et les nanoparticules d'argent (AgNPs ViveNano®). Leurs impacts sur le système immunitaire a été étudié sur 4 espèce modèles : l'humain, la souris (*Mus musculus*), la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et la moule (*Mytilus edulis*). Ce volet consiste aussi à déterminer si la toxicité des QDs et des AgNPs est identique selon les modèles d'animaux sélectionnés, si une gradation de la réponse spécifique peut être mise en place. Le second volet, visera à l'étude comparative de la toxicité des NPs et celle engendrée par les composants métalliques des NPs. Sachant que la taille et la forme sont des critères agissants sur la toxicité des particules, ce volet portera aussi sur l'impact de différentes tailles de QDs et des AgNPs sur le système immunitaire des différentes espèces modèles. Le troisième volet sera axé sur la mécanistique associée aux NPs, à l'expression de la toxicité sur les mécanismes de défense de la cellule. Enfin, le quatrième volet consistera à l'étude de l'effet des nanoparticules chez des organismes bivalves déjà sensibilisés par leur milieu de vie, ces études *in situ* seront réalisées à la fois en France et au Québec.

II- Revue de littérature

1. La démarche en écotoxicologie

1.1 Les notions de base en écotoxicologie

Lorsque le terme d'écotoxicologie est évoqué, il sous entend à la fois les notions d'écologie et de toxicologie. Cette science étudie donc l'impact des polluants toxiques dans les écosystèmes et la biosphère entière. Dans ce sens, l'écotoxicologie vise en l'étude de la toxicité potentielle de contaminants chez les espèces vivantes (notion de danger) et la probabilité d'effets néfastes sur l'environnement (notion de risque). Vers les années 1950, en Amérique du Nord, l'écotoxicologie aquatique a pris un essor fulgurant. Les premiers tests étaient basés sur des toxicités aiguës chez les poissons suite aux rejets agricoles et industriels dans les cours d'eau. Cependant, les résultats de l'époque étaient limités en raison de leur non extrapolation aux autres espèces, communautés et populations du milieu. Dans les années 1970, des essais laboratoires (tests biologiques ou bioessais) plus poussés sur des invertébrés, des algues, des bactéries, puis des multi-espèces (ainsi que ceux en microcosmes en mésocosmes et *in situ*)

ont été inclus dans les études et ont permis une prédictibilité à court et long terme sur différents niveaux biologiques de l'écosystème (Santiago, Becker Van Slooten et al. 2002).

Actuellement les bioessais sont étroitement liés à l'analyse de nouvelles substances ou produits chimiques mis sur le marché (règle de l'OCDE et de la commission européenne pour l'évaluation des risques sur l'environnement) et à la surveillance du milieu aquatique dans le cadre de programme d'action pour la réglementation des pollutions. Dans ce contexte les buts des bioessais sont multiples à savoir : enregistrer les nouveaux composés utilisés (tels les pesticides, phytosanitaires, antisalissures, etc.), surveiller les eaux usées des stations d'épuration, étudier les sites à risque et évaluer l'écotoxicité de ces milieux, contrôler les eaux de percolation, de décharges et les boues, et enfin contrôler l'impact des sédiments (exemple lors de dragages).

La démarche écotoxicologique suit souvent le même patron de cheminement. Tout d'abord chaque recherche débute par une hypothèse à savoir s'il y a réellement un danger pour l'organisme étudié, pour l'environnement et pour l'homme ? Ainsi le départ de toutes démarches en écotoxicologie nécessite la description des sites d'études ou son contexte, l'analyse des données de caractérisation, la sélection des substances d'intérêts et l'élaboration d'un modèle conceptuel.

Par la suite une évaluation toxicologique est nécessaire, il s'agit de créer une revue des données toxicologiques existantes pour des substances d'intérêt et aussi de choisir des valeurs de référence toxicologique. En parallèle, une estimation de l'exposition réelle est nécessaire, ceci nécessite l'étude de différents réservoirs comme l'eau, le sol, les sédiments et l'air dans le but de prédire l'exposition réelle des organismes aux contaminants. Cette approche implique donc une étude des circulations et de la distribution des contaminants chimiques, et des données sur la transformation ou de la dégradation de ceux-ci. Mais le point le plus important est bien sur de pouvoir qualifier et de quantifier la pollution, c'est-à-dire, définir le niveau de contamination. Pour cela, l'estimation de l'exposition nécessite un choix de récepteurs écologiques, de médias environnementaux et de voies d'exposition. Ceci sous entend le choix de scénarios d'exposition et l'estimation des doses de toxines (Cours en gestion de l'environnement, Université de Bruxelles).

Afin de répondre à ces interrogations, la troisième étape de la démarche écotoxicologique est la caractérisation du risque. Pour cela, des courbes doses réponses sont réalisées afin d'évaluer les effets néfastes d'une substance sont caractéristiques de cette étape. Il est

question à cette étape de caractériser certains termes : définir la NOEC (No Observed Effect Concentration ou concentration maximale pour laquelle aucun effet toxique n'est observé) et la LOEC (Lowest Observed Effect Concentration ou concentration minimale avec effets nocifs observés) (Duffus and Worth 2006).

Toutes ces informations nécessitent donc une inférence des tests de laboratoire sur les conditions réelles du milieu naturel. Cependant, les conditions expérimentales sont très différentes de celles en laboratoire, de plus les facteurs environnementaux comme la température, l'humidité, le vent, la salinité peuvent avoir des conséquences importantes, malheureusement ces conditions ne peuvent pas toujours être reproduites en laboratoire. Dans le même ordre d'idée des facteurs externes tels, l'activité industrielle (avec les métaux, les composés organiques, les matières plastiques), la diversification de l'industrie chimique, l'agriculture (engrais, pesticides, fertilisants...), les pollutions anthropiques sont aussi des paramètres à prendre en considération. D'autre part, lorsqu'un composé chimique ou biologique toxique se retrouve dans le milieu (par l'une des voies évoquées précédemment) sa détection est variable, elle est fonction de son temps de résidence (Cours en gestion de l'environnement, Université de Bruxelles). Ce temps est dépendant de la circulation atmosphérique, des eaux de surface et des nappes phréatiques. La plupart du temps, les toxines s'accumulent dans les sédiments et leur relargage est d'autant plus long que le composé est stable. En milieu aquatique, il y a à la fois adsorption des polluants et dissolution dans l'eau. La grande persistance de ces substances dans les écosystèmes favorise leur transfert à l'ensemble des réseaux trophiques de l'écosystème (Widmeyer and Bendell-Young 2007).

La notion de risque prend alors tout son sens, effectivement chaque écosystème est organisé selon un réseau trophique. Chaque réseau trophique est formé d'un ensemble de chaînes alimentaires organisées selon des maillons, les producteurs primaires et les proies formant toujours la base de la chaîne et les prédateurs apicaux le sommet. Le fonctionnement de ces chaînes alimentaires est essentiellement régulé par des effets cascades « top down » et « bottom up » (Larkin 1996). L'effet « top down » ou contrôle descendant correspond à la régulation des composantes de bas niveaux trophiques par un ou plusieurs prédateurs supérieurs. Au contraire l'effet « bottom up », où contrôle ascendant, est la régulation des composantes du réseau trophique par leurs proies (Chassot 2005).

Lors d'une contamination, un phénomène d'amplification biologique (bioamplification ou biomagnification) d'un niveau trophique à un autre, est observé car le niveau inférieur sert de réservoir alimentaire au suivant et donc, par une relation directe, le niveau supérieur de la chaîne alimentaire concentre les substances toxiques présentes dans le niveau inférieur (Hayes 2007). En effet, la pyramide de concentration des composés toxiques dans les niveaux trophiques est inversée par rapport à la pyramide des biomasses.

Dans ce contexte, certaines notions importantes peuvent être définies. La bioconcentration est le résultat de l'absorption, de la distribution et de l'élimination d'une substance présente dans l'eau (l'air et le sol) qui passe à travers les membranes biologiques (Mackay 1982). D'autre part, la bioamplification se définit comme le résultat net, pour une espèce, de l'absorption (via air, eau, sol, sédiments, nourriture), de la distribution et de l'élimination d'une substance. Les teneurs observées dans les tissus d'espèces situées au sommet des chaînes alimentaires seront d'autant plus élevées que le composé est stable et que la chaîne est longue. Au sein d'une chaîne trophique la notion de transfert est donc fondamentale, elle se définit par un facteur de transfert qui est le rapport des concentrations en polluants entre le niveau trophique n et $n+1$.

Les effets des produits toxiques sur la chaîne alimentaire produisent différents effets notoires. Les principaux sont souvent ceux les plus observés et permettent d'évaluer le degré de toxicité (la toxicité aiguë, de grande intensité, sur une durée courte, elle s'oppose à la toxicité chronique plus diffuse et agissant sur du long terme). Parmi ces réponses biologiques, une baisse de la reproduction, une altération de la croissance, du comportement (entrave à l'alimentation, inhibition à la réaction de fuite devant les prédateurs, accouplement défectueux, entrave au frai) avec des conséquences immédiates sur les effectifs de la seconde génération sont les caractéristiques les plus évidentes.

Ainsi, ce qui s'observe à l'échelle individuelle, peut se répercuter à l'échelle de la population. Les premières indications observables sont une réduction d'abondance et de richesse spécifique, des effets sur la dominance (diminution de l'effectif de l'espèce la plus dominante). Effectivement, l'impact est plus grand sur les espèces spécialisées sur le plan alimentaire que sur les espèces généralistes ; les prédateurs voient leur nombre décroître davantage que celui des herbivores. Des effets sur les espèces-clefs de peuplement peuvent aussi causer de grands désordres dans l'équilibre de l'écosystème. Ces espèces aussi nommées « keystone species », sont fondamentales pour l'écosystème elles déterminent la présence et

l'absence d'autres espèces et régulent donc l'écosystème. A plus grosse échelle, une perturbation écosystémique peut entraîner des effets sur le fonctionnement de l'écosystème (flux d'énergie, les cycles des éléments), des effets sur la biomasse et la productivité, des effets sur la production primaire, des effets sur la productivité secondaire, des effets sur la décomposition des matières organiques.

L'observation des différents résultats au laboratoire et en milieu naturel permet donc de caractériser les risques toxiques *in situ* sur les biocénoses exposées aux polluants. La finalité de la démarche visant la gestion de ces risques. En fonction des différents phénomènes observés, qu'ils s'agissent de relation dose-réponse, de seuils de contamination, d'actions synergiques de polluants, d'effets sur les populations, une notion d'acceptabilité va être définie. L'élaboration de normes de protection et de lois représentent le dernier maillon de la démarche en écotoxicologie, ces normes sont souvent relatives à chaque pays, cependant les études tendent de plus en plus à la définition et l'usage de normes de protections internationales.

1.2 La notion d'espèces sentinelles

Dans un contexte d'écotoxicité, de nombreuses études basent leur démarche sur des bioindicateurs (Zhou, Zhang et al. 2008). Un bioindicateur est une espèce végétale, fongique ou animale, ou un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou encore un groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (des modifications physico-chimiques, microclimatiques, biologiques et fonctionnelles) de l'environnement (Lower and Kendall 1990; Hayes 2007).

Les bioindicateurs ont l'avantage de pouvoir servir pour des détections analytiques car la concentration du polluant dans les êtres vivants est très supérieure à celle dans les biotopes (bioconcentration). De plus, lors de bioessais, il est plus évident de pouvoir contrôler la bioaccessibilité du polluant pour la biomasse (sa disponibilité). Les bioindicateurs servent aussi dans les pollutions aiguës et chroniques. Aux vues des différents avantages des bioindicateurs certaines conditions sont fondamentales dans le choix de ceux ci. Ces règles différencient un bon bioindicateur d'un faible bioindicateur. Dans l'idéal, un bioindicateur est une espèce relativement sédentaire afin d'établir une relation entre la concentration de polluants observée et le site géographique. En effet, les espèces migratrices sont souvent de mauvais bioindicateurs étant donné qu'elles fréquentent de nombreux sites aux contaminations diverses. Un bon bioindicateur est fondamentalement une espèce abondante,

elle devrait présenter une forte longévité (plusieurs classes d'âge) et être de taille raisonnable pour la dissection (quantité de tissus, échantillonnage) (Rainbow 1995). Finalement, le point essentiel, une corrélation simple entre la concentration de l'individu et celle du biotope et de l'alimentation doit exister.

Même si un bioindicateur est sélectionné selon ces différents critères, il est essentiel de garder en tête que chaque espèce est soumise à des facteurs intrinsèques et externes qui vont agir sur la réponse biologique. Concernant les facteurs intrinsèques, selon l'âge et/ou le stade de développement, le stade de l'embryon, la taille de l'individu (le temps de demi-vie d'un polluant est d'autant plus court que l'espèce a un faible poids) les réponses vont être différentes. Comme la concentration d'un polluant est fonction de la masse du polluant en fonction de la masse de tissu (ou de fluide), il est nécessaire que l'échantillonnage soit homogène (sexe, âge et poids). Les facteurs externes agissant sur l'espèce bioindicatrice sont le métabolisme lui-même lié au cycle des saisons. Le métabolisme est en effet dépendant de ce cycle, les paramètres du milieu changent donc en fonction des différentes saisons. Lors de l'usage de bioindicateurs, des données physicochimiques comme la température, le pH, la salinité, les courants sont indispensables. Comme il a été évoqué dans le chapitre précédent lors d'études comportant des bioindicateurs, il faudra prendre en compte les facteurs abiotiques, la bioaccessibilité des toxines, la durée et l'intensité de l'exposition.

Dans le milieu terrestre les lichens (et mousses), les plantes (à tubercules), les invertébrés (annélides), les vertébrés tels certains oiseaux (les plumes), les cervidés (les bois) sont considérés comme de bons bioindicateurs (Cours en gestion de l'environnement, Université de Bruxelles). Dans le domaine marin, les études utilisent souvent des algues, mousses, mollusques, et poissons comme bioindicateurs. Les principales espèces de mollusques principalement étudiées lors d'étude de monitoring sont les moules (*Mytilus sp.*), pour les poissons il s'agit du mulot, de la perche, du flet, de la truite arc en ciel etc. (*Mullus sp.*, *Perca sp.*, *Platichthys flesus*, *Onchorhynchus mykiss*) (Viarengo, Dondero et al. 2007). Les bioindicateurs sont donc des espèces utilisées dans des études de biomonitoring (Zhou, Zhang et al. 2008).

2. Les espèces sentinelles du projet de recherche

2.1 La moule bleue : *Mytilus edulis*

2.1.1 La biologie de l'animal

Les moules, mollusques bivalves de la famille des Mytilidés, du genre *Mytilus*, sont des organismes qui constituent une composante écologique importante en tant que consommateurs primaires (Deegan 1997). Les moules sont des organismes ubiquistes vivant sur les zones côtières et estuariennes, ce sont des très bons bioindicateurs pour les pollutions environnementales (Phillips 1976; Auffret, Mujdzic et al. 2002; Au 2004; Bolognesi, Buschini et al. 2004; Nigro, Falleni et al. 2006). Ces bivalves filtreurs sont donc souvent reconnus comme une espèce sentinelle (Brousseau, Pellerin et al. 2000; Canty, Hagger et al. 2007; Viarengo, Dondero et al. 2007). Elles sont sédentaires, souvent accrochées en « paquets », sur les rochers, grâce au byssus. Les moules sont formées de deux valves maintenues à l'aide de puissants muscles adducteurs antérieurs et postérieurs (Figure 1).

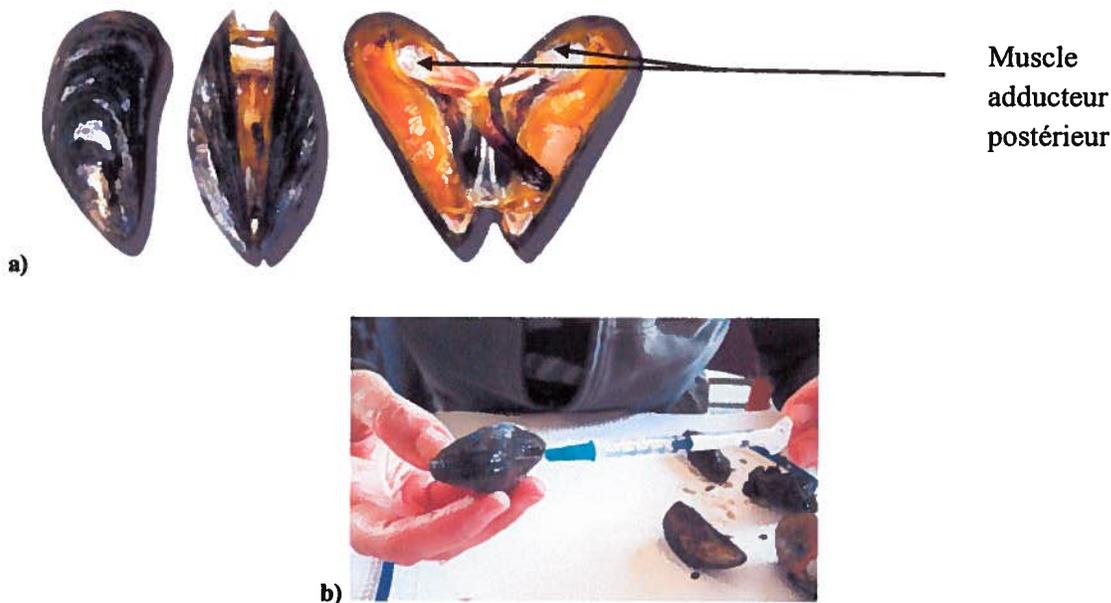


Figure 1 : a) Organisation d'une moule montrant la localisation du muscle adducteur postérieur dans le sinus duquel se pratique la ponction de l'hémolymphe b) ponction d'hémolymphe à l'aide d'une seringue de 1 ml.

D'autres structures sont remarquables chez ces bivalves comme les cténidies ou branchies. Les moules sont donc des filibranches, les branchies ont deux fonctions à savoir : une fonction directe pour la respiration et une indirecte pour l'alimentation (Gossling 1992.; Au

2004). En effet, les particules flottantes dans l'eau de mer adhèrent sur les branchies, puis sont ensuite transportées vers les palpes labiaux de la bouche (Figure 2).

La bouche est le premier organe du système digestif. Il est assez rudimentaire et commence donc par la bouche suivi par un œsophage court et un estomac aussi nommé glande digestive (structure verdâtre de l'individu) ou les aliments seront digérés par des enzymes. Finalement, « les déchets » de la digestion seront évacués par l'intestin et l'orifice anal débouchant dans le siphon exhalant. Il est à noter que les particules trop grosses ou les sédiments sont directement rejetés par le siphon exhalant sous forme de pseudofécès (Figure 2). Les branchies et la glande digestive sont donc deux organes très importants pour les moules pour leurs rôles fondamentaux dans la collecte de nourriture, l'absorption et la digestion. (Au *et al.*, 2004).

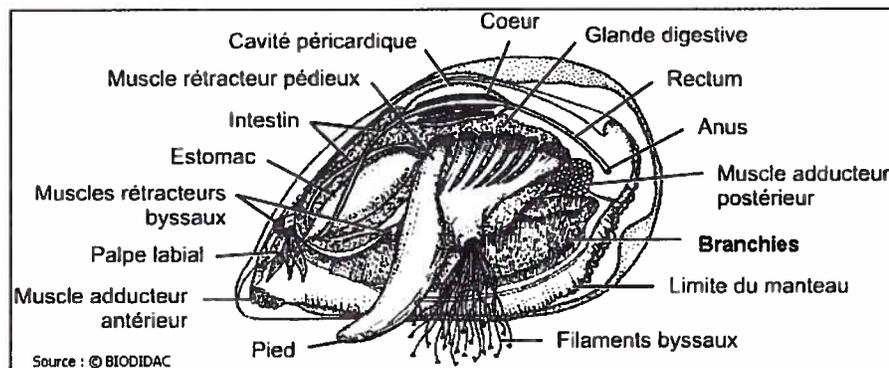


Figure 2 : Organisation interne de la moule (http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/fra/Profils_economique/Moule_2003 ; visité le 23/07/2011).

Concernant la reproduction, la moule est une espèce hermaphrodite gonochorique (dont les sexes sont séparés et ceci tout au long de leur vie). Les pontes ont lieu à différents moments de l'année en fonction des différents endroits sur Terre : en méditerranée par exemple la ponte a lieu en septembre, au printemps et en juin dans les pays du nord suivi par une ponte en hiver (Lemaire and S. Cartier 2006). En règle générale, le contenu en lipides des moules est maximale de janvier, février, mars et juin au moment de la reproduction (Lin 2003). Il est très facile de déterminer la différence entre les mâles et les femelles, de même que le stade de la ponte, par simple observation des gonades en coupe au microtome (Gauthier-Clerc, Pellerin et al. 2002; Juhel and Mcnamara 2003). La fécondation est externe c'est-à-dire qu'à une période particulière de l'année, les gamètes des mâles et des femelles vont être émis, simultanément, dans la colonne d'eau. Le cycle reproducteur des moules est marqué par des périodes de l'année, il peut aussi être influé par les phénomènes extérieurs comme la

température de l'eau, la circulation des courants, la salinité (Lemaire and S. Cartier 2006).
Différents stades de développement des gonades sont observables :

- Le stade 0 ou phase de repos, elle consiste en une période d'accumulation des réserves lipidiques et glucidiques, en vue de la reproduction.
- Le stade 1 : La glande sexuelle se développe
- Le stade 2 : Le manteau des individus se colore, celui de la femelle devient rouge orangé et celui du mâle jaune crème.
- Le stade 3 ou stade de maturité sexuelle, l'émission des gamètes à lieu à ce stade.

Le cycle de développement des moules est marqué par différentes mutations (Figure 3Figure 4Figure 5), en effet une fois fécondé l'œuf va se diviser, puis prendre la forme d'une larve dite trochophore, puis l'étape de métamorphose donnera une larve véligère, qui se transformera elle-même en un juvénile semblable à l'adulte.

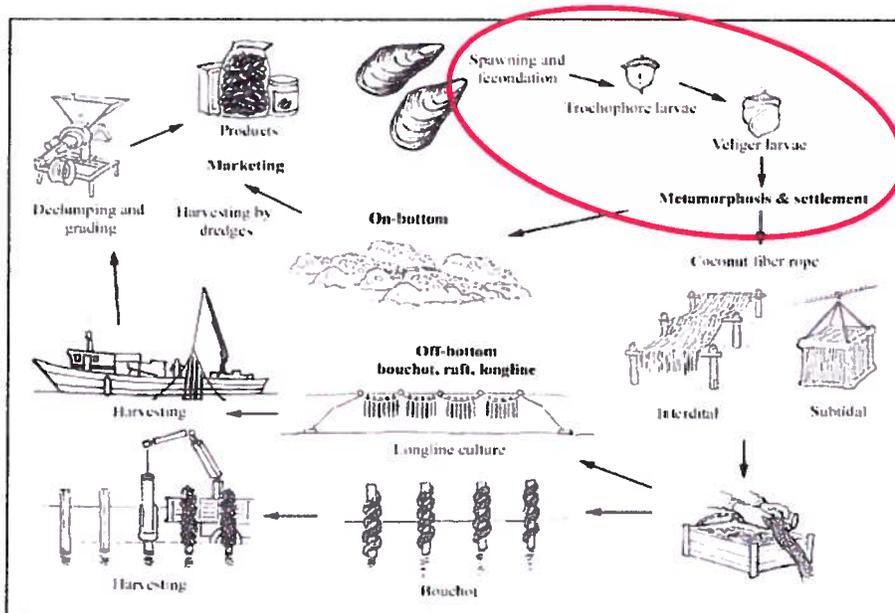


Figure 3 : Cycle de développement et d'exploitation aquicole des moules (sur http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en vue le 30/10/2010)

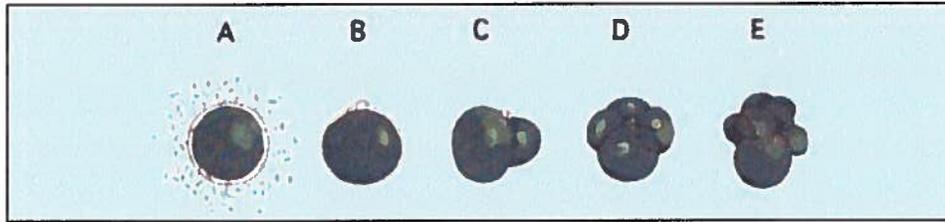


Figure 4 : Les premiers stades de développement des œufs; A - Spermatozoïdes fourmillant autour de l'œuf; B - Apparition du premier globule polaire suite à la fécondation; C - Stade deux cellules montrant aussi le second globule polaire; D - Stade quatre cellules; E- Stade huit cellules (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720f/y5720f08.htm> visité le 23/07/2011).

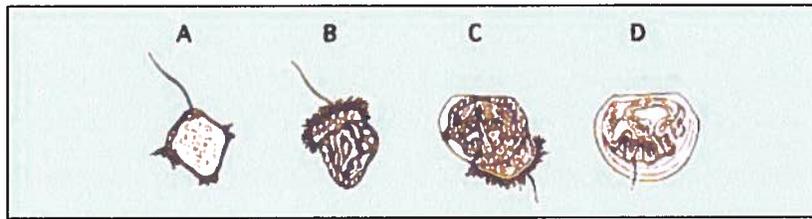


Figure 5 : Développement d'embryons à partir du premier stade trochophore (A) jusqu'au stade de larve D (D). L'organe cilié de nage et de nutrition (velum) peut être vu dans B et la formation de la première valve de la coquille dans C (2jours) (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720f/y5720f08.htm> visité le 23/07/2011).

2.1.2 La répartition

Les invertébrés représentent environ 95% des espèces animales, et forment une importante composante du domaine marin (Canesi, Lorusso et al. 2007). Outre ce phénomène, ces organismes possèdent une grande répartition car ils ont un fort intérêt économique (en raison de leur aspect commercial) (Dyrynda 1998; Thorarinsdottir 2003) (Rodríguez-Domínguez 2006; Lallias, Lapègue et al. 2007). En Europe, la moule bleue *Mytilus edulis* est surtout présente dans la partie nord et *Mytilus galloprovincialis* dans la partie sud (Figure 6). Au Canada, la moule bleue est principalement retrouvée dans le golfe et au nouveau Brunswick (Mallet com. pers.) (Figure 7) mais elle est aussi recensée dans le fjord du Saguenay (Bosse 1996).



Figure 6 : Répartition de deux espèces de mytilidés *Mytilus galloprovincialis* au sud et *Mytilus edulis* au Nord (http://aquaculture.ifremer.fr/layout/set/print/filieres/filiere_mollusques/decouverte_mollusques/moule le 23/07/2011).



Figure 7 : Répartition de *Mytilus edulis* dans le Golfe du Saint Laurent (<http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/pe/profil/mussel-moule/mussel-moule-f.php> visité le 23/07/2011).

2.2 La truite arc en ciel : *Oncorhynchus mykiss*

2.2.1 La biologie de l'animal

Les truites arc en ciel (TAC) sont des poissons téléostéens de la famille des salmonidés du genre *Oncorhynchus*, ils sont originaires d'Amérique du Nord mais peuvent être aussi retrouvés en Europe ou ils ont été introduits. La TAC ou *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) se différencie génétiquement de la truite commune européenne (la truite *fario*, créée lors de la dérive des continents). Les TAC sont très utilisées dans les études écotoxicologiques et surtout en tant que bioindicateurs (Ellis 1977). La TAC est aussi un poisson exploité

commerciallement, elle fait donc souvent l'objet de recherche scientifique étant donné son intérêt économique (Passantino, Altamura et al. 2002). L'anatomie de la truite est représentée à la Figure 8.

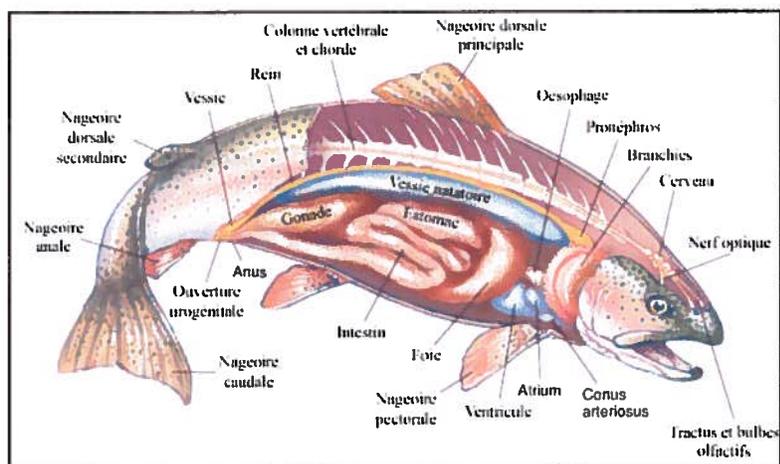


Figure 8 : Organisation interne de la truite (adapté de : <http://www.biographixmedia.com/biology/trout-fish-anatomy.html>, visité le 31/10/2010).

Ce poisson se répartit normalement dans le sous-continent nord-américain : L'Amérique du Sud ou son trouvé des poissons autochtones. La TAC est surtout retrouvée dans les eaux froides, les criques, les rivières de toutes taille et les lacs. Ce poisson peut être anadrome (qui vit dans l'océan mais se reproduit dans des rivières ou cours d'eau bien oxygénés, de flux rapide et fond en gravier) est parfois retrouvé dans les courants côtiers, la TAC peut aussi de retrouver dans les lacs. Il se nourrit de nombreuses sortes d'invertébrés aquatiques et terrestres et de petits poissons. Les poissons anadrome et certains poissons de lac peuvent éventuellement migrer pour pondre en remontant les cours d'eaux.

Il existe des différences en fonction des truites sédentaires et migratrices, en effet les truites anadrome atteignent vite leur taille et poids adultes (7-10 kg en 3 ans) la souche d'eau douce dépassant rarement 4.5 kg. La TAC peut supporter de grandes variations de températures (0-27 °C) (Gall and Crandell 1992). Par contre les températures d'élevage et de ponte doivent être contrôlées (inférieure à 21°C et 9°C < t < 14°C).

Les femelles peuvent produire jusqu'à 2000 œufs/ Kg et la ponte a lieu seulement une fois par année (janvier- mai). La TAC fait l'objet de nombreuses études en aquaculture afin d'optimiser la reproduction, le taux de croissance, la résistance aux maladies et d'améliorer la

qualité de la chair et son goût. La reproduction naturelle en élevage n'étant pas réalisée, les truitelles sont obtenus pas fécondation artificielle en écloserie (Figure 9).

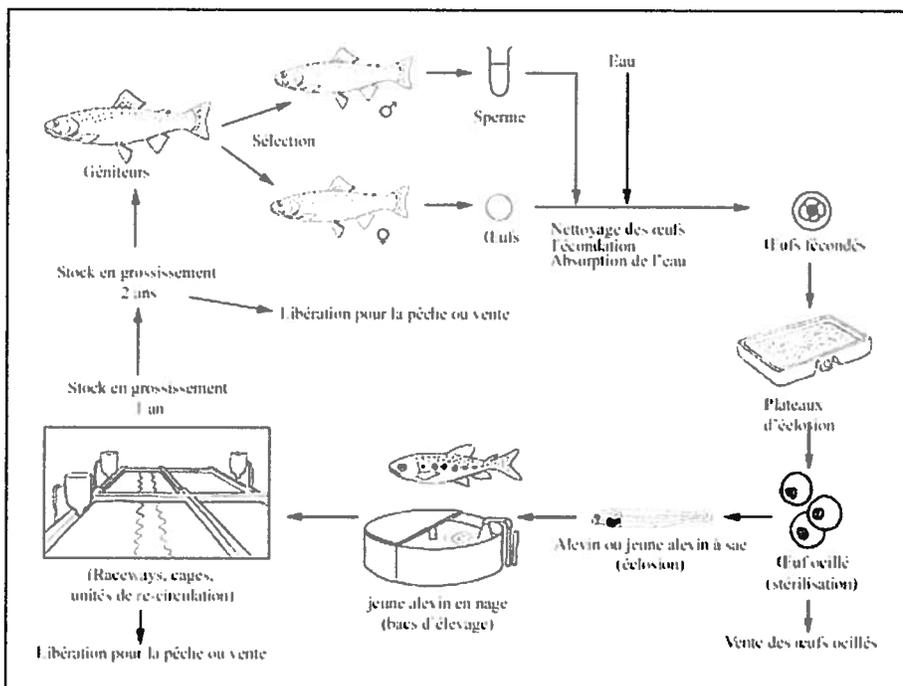


Figure 9 : Cycle de production de la TAC en élevage. Les Géniteurs sont tout d'abord choisi par sélection génétique puis une fécondation artificielle est réalisée en écloserie. Par la suite les alevins grandiront dans des bassins d'élevage avant d'être placés dans des bassins de stockage. (Source http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/fr dernière visite le 19/04/ 2011).

2.2.2. La répartition

LA TAC est un poisson très adaptable à son environnement, c'est une des raison qui explique sa large répartition (Gall and Crandell 1992). De plus, la TAC, comme il a été évoqué précédemment est un animal très exploité. Beaucoup de pays font de l'élevage de truites mais les premiers producteurs sont situés en Europe, Amérique du Nord, Chili, Japon, et Australie (Figure 10).

Depuis les années 1990, la production de TAC a augmenté de manière fulgurante spécialement en Europe et au Chili. Ceci est du à une augmentation de production des pays internes de l'Europe (Danemark, France, Italie, Allemagne, Espagne) afin d'approvisionner les marchés locaux, la mariculture en cages (Norvège et Chili) à des fins d'export (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/fr visité le 19/04/2011).



Figure 10 : Principaux pays producteurs d'*Oncorhynchus mykiss* (Statistiques des Pêches FAO, 2006) (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/fr, visité le 01/11/2010).

2.3 La souris C57BL6

Les souris C57BL6 sont les modèles d'animaux les plus utilisés en laboratoire. Ces souris sont surtout utilisées dans des études d'immunologie (Godleski JJ and JD. 1972; Holladay, Xiao et al. 2010). De plus les souris C57BL6 présentent des propriétés immunologiques et comportementales uniques (Sarna, Dyck et al. 2000; Von Stebut and Udey 2004; Nasir 2009). Actuellement des études sont aussi menées avec les nanoparticules (Manolova, Flace et al. 2008; Nasir 2009).

3. Différents systèmes immunitaires

3.1 Développement du système immunitaire, notions générales chez les mammifères

En fonction des différents modèles animaux, le système immunitaire est un système de défense plus ou moins adaptatif qui permet au corps de se protéger contre des molécules du non soi (tel que des micro-organismes pathogènes). Certains organes, types cellulaires, et molécules sont impliqués dans la réponse immunitaire dépendamment de l'animal considéré. D'une manière générale, et ce pour l'ensemble des êtres vivants, lors d'une réponse immunitaire plusieurs phases peuvent être identifiées dont la phase de reconnaissance du non soi et la réponse effectrice en vue d'éliminer ou neutraliser l'organisme étranger (Kuby, Golsby et al. 2001).

Deux composantes de l'immunité existe : l'immunité naturelle (ou innée) non spécifique et l'immunité acquise (ou adaptative). Ces deux réponses agissent souvent de concert lors d'une réponse immunitaire en effet, la réponse non spécifique étant la première ligne de défense lors de la période suivant l'exposition au pathogène, elle permet l'activation et l'optimisation de

la réponse spécifique (Kuby, Golsby et al. 2001). Au fil de l'évolution le système immunitaire s'est développé et spécialisé (Cooper 2003; Paul 2008).

3.1.1 L'immunité innée

L'immunité innée comporte quatre types de barrières défensives : anatomique, physiologique, inflammatoire et phagocytaire (Kuby, Golsby et al. 2001). La barrière anatomique est essentiellement composée de la peau et des muqueuses. La peau constitue une barrière mécanique qui retarde l'entrée des agents infectieux dans l'organisme, quant aux défenses relatives aux muqueuses elles reposent davantage sur des phénomènes de compétitions microbiennes, de sécrétions de mucus et de présences de cils vibratiles. La barrière physiologique est composée de paramètres physiques de l'organisme, tels que le pH et la température. De plus, cette barrière peut aussi compter sur la présence de protéines possédant des activités antimicrobiennes telles que les lysozymes, l'interféron et les protéines du complément. La barrière inflammatoire est quant à elle une séquence d'événements complexes qui visent à optimiser la réponse immunitaire de l'hôte en réaction à un dommage tissulaire. Lors de cette réponse inflammatoire, trois événements caractéristiques se produisent : la vasodilatation des capillaires environnants, l'augmentation de la perméabilité vasculaire de ces capillaires et l'arrivée de cellules phagocytaires en provenance de ces capillaires dans le tissu lésé. La dernière barrière du système immunitaire naturel est marquée par la grande diversité des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles, les monocytes / macrophages et les cellules dendritiques. De plus, le système immunitaire inné comporte d'autres composantes cellulaires, non phagocytaires, telles que mastocytes et les cellules NK (Kumar and Sharma 2010).

Les différents types de cellules impliqués dans la réponse immunitaire innée sont générés suite à la différenciation de cellules souches lors de l'hématopoïèse (Kuby, Golsby et al. 2001). Cette différenciation est induite par la présence de différentes cytokines et facteurs de croissances dans l'environnement immédiat de ces cellules progénitrices. Les cellules souches myéloïdes sont, entre autre, à l'origine des précurseurs monocytaires et granulocytaires. Les précurseurs monocytaires se différencieront en monocytes, macrophages et cellules dendritiques (Tableau 1), alors que les précurseurs granulocytaires se différencieront en neutrophiles, les mastocytes et les basophiles. En contrepartie, ce sont les cellules souches lymphoïdes, progénitrices de l'ensemble des cellules lymphoïdes (cellules T et B), incluant les cellules Natural Killer ou NK.

Les cellules NK circulent en permanence dans le sang. Elles possèdent des récepteurs spécifiques permettant d'identifier des cellules cibles. Elles possèdent aussi à leur surface des marqueurs d'identification CD16 et CD 56 (présents simultanément ils permettent la reconnaissance des NK). Les NK sont spécialisées dans l'élimination des cellules infectées par un virus ou une bactérie, ou les cellules cancéreuses.

Les monocytes sont un type cellulaire occupant une fonction importante dans le développement de l'organisme, le maintien de son homéostasie et la défense immunitaire. Ces dernières sont responsables de l'élimination des corps apoptotiques, des composés toxiques et sont impliqués dans la lutte contre certaines infections bactériennes (Franc, Dimarcq et al. 1996). Afin d'effectuer ces diverses fonctions, les monocytes expriment à leur surface une vaste diversité de récepteurs scavenger qui leur permettent de reconnaître; micro-organismes, lipides et cellules mortes (Auffray, Sieweke et al. 2009). De plus, les monocytes apportent une contribution importante à la défense de l'hôte en se différenciant en macrophage tissulaire et en cellules dendritiques lorsqu'elles sont en présence d'un contexte pro-inflammatoire (Randolph, Inaba et al. 1999; Geissmann, Jung et al. 2003; Serbina and Pamer 2006; Varol, Landsman et al. 2007; Auffray, Sieweke et al. 2009). Les monocytes sont un type cellulaire relativement bien conservé dans le règne animal car ceux-ci sont retrouvés chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens ainsi que chez les poissons (Herbomel, Thisse et al. 1999).

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes cellules du système immunitaire de la lignée monocyttaire et leurs caractéristiques.

	Monocytes	Macrophages	Cellules dendritiques
Distribution	Sanguine	tissulaire	tissulaire
Signe particulier	Noyau en fer à cheval	Noyau en fer à cheval Mitochondries, REG et Golgi abondant	Long prolongements membranaires
Marqueur caractéristiques	CD 123 CD14 CR3 RFcγI et III	CD14 CR3 CD68 RFcγI et III	CD83 CD80 ET CD86 CD 11c CMH classe II
Rôles principaux	Phagocytose	Phagocytose Homéostasie du milieu Présentation de l'antigène	Présentation de l'antigène

Les macrophages sont très différents des monocytes selon plusieurs critères : ils sont 5 à 10 fois plus gros, les organites cellulaires sont plus nombreux et plus complexes, leur capacité phagocytaire est plus élevée ainsi que leur quantité d'enzymes hydrolytiques (Figure 11). Les macrophages sont activés par des nombreuses molécules microbiennes en raison de la présence à leur surface de « récepteurs Toll » (aussi appelés en anglais toll like receptor), de récepteurs à opsonines (spécifique à la fonction Fc des anticorps et récepteurs du système du complément). Les macrophages peuvent s'activer grâce à l'intervention de cytokines sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires aussi appelés lymphocytes T helper (L_TH) mais aussi par des constituants des parois cellulaires bactérienne. Les macrophages activés ont donc à la fois une capacité plus grande à tuer les microbes, mais aussi une sécrétion augmentée de médiateurs de l'inflammation, et une capacité accrue à activer les cellules T.

Ainsi les principaux rôles des macrophages sont des la phagocytose des micro-organismes, des cellules mortes, des corps apoptotiques et de corps inertes. Ils peuvent aussi sécréter des cytokines et participé à l'organisation de la réponse inflammatoire. Ils participent à la présentation antigénique au lymphocytes helper (L_TH) (Espinosa and Chillet 2010).

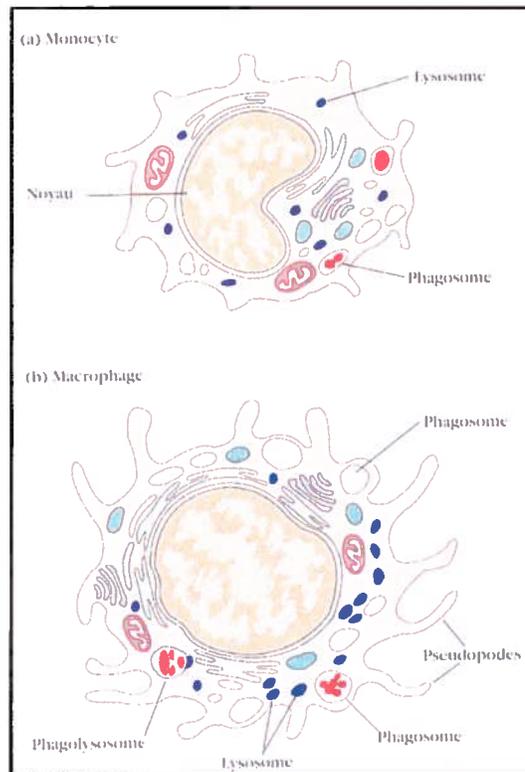


Figure 11 : Morphologie typique d'un monocyte et d'un macrophage. Les macrophages sont de 5 à 10 fois plus gros que les monocytes et contiennent davantage d'organites cellulaires, en particulier des lysosomes (Kuby, Goldsby et al. 2001).

Les cellules dendritiques sont spécialisées dans l'apprêtement de l'antigène et sa présentation aux cellules T. Ces cellules sont donc qualifiées de cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles (voir section sur l'immunité acquise). Ces cellules sont classées selon leur localisation, elles sont principalement tissulaires (cellules de Langerhans, cellules dendritiques interstitielles, cellules dendritiques interdigitées). Ces cellules après avoir capté les antigènes par phagocytose ou endocytose se différencient et migrent dans le sang ou la lymphe vers les organes lymphoïdes pour enclencher la réponse spécifique. Lors de leur activation les cellules dendritiques vont diminuer leur activité phagocytaire et stimuler leur capacité de présentation antigénique en surexprimant les molécules de CMH et les facteurs de costimulation présents à la surface cellulaire (Granucci and Zanoni 2009).

Les granulocytes sont classés en neutrophiles, éosinophiles et basophiles, ces cellules se distribuent dans le sang. Les neutrophiles sont les cellules principales de l'immunité innée et sont principalement impliqués dans les processus inflammatoires. Ces cellules sont principalement localisées dans le sang, le long des parois des vaisseaux mais leur temps de demi vie dans ce compartiment est court (moins d'un jour). Puis ils rentrent dans les tissus

lors de réponses inflammatoires. Les neutrophiles sont très connus pour les enzymes et molécules anti microbiennes contenus dans leurs granules. Les enzymes lytiques des neutrophiles sont contenues dans des granules primaires et secondaires. Les granules primaires (azurophiles) sont les plus gros granules, ils représentent un type de lysosomes contenant des peroxydases, des lysozymes et des enzymes lytiques (protéases). Les granules secondaires contiennent de la collagénase, de la lactoferrine et du lysozyme. Les petits granules de stockage contiennent des lysozymes, des gélatinases, des activateurs du plasminogène et des cathepsines B, D. Ces granules, dans le processus de phagocytose, vont fusionner avec le phagosome comme dans le cas des macrophages. Les neutrophiles, une fois activés, peuvent générer des facteurs chimiotactiques (processus de relargage de protéines pro-inflammatoires) qui attirent les monocytes et macrophages et les cellules dendritiques (voir processus inflammatoire). Les neutrophiles sont les premiers types cellulaires à être recrutés dans le cas de tissus infectés (Espinosa and Chillet 2010). En contrepartie, les éosinophiles sont principalement retrouvés dans les tissus et dans les sous-muqueuses. Au même titre que les neutrophiles, les éosinophiles sont des cellules phagocytaires. Leur rôle est prépondérant dans la défense contre les parasites.

Les différents modèles cellulaires présentés ci-dessus peuvent ingérer du matériel extracellulaire via le phénomène de phagocytose. Par ailleurs les cellules immunitaires possèdent à leur surface membranaire, et/ou dans les cellules, des récepteurs de reconnaissances de pathogènes (PRR pour pathogen recognition receptors) qui vont reconnaître les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs : pathogen-associated molecular patterns). Ainsi les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles expriment des PRR. Il existe différents types de PRR tels que les récepteur toll (TLRs), les récepteurs RIG-I (RLRs), les récepteurs NOD (NLRs) et des récepteurs à ADN (cytosolic sensors for DNA). Chez les humains il existe 10 sortes de TLR dont 9 sont communs avec la souris (12 TLR totaux chez la souris) (Kumar, Kawai et al. 2011). Chaque TLR reconnaît ces propres ligands. Ainsi les TLR peuvent reconnaître le peptidoglycane, les lipopolysaccharides, les hémagglutinines, l'ADN et l'ARN virale, les flagellines, le zymosan etc. La famille des RLR consiste en trois membres RIG-I, MDA5, and LGP2. Ces récepteurs reconnaissent l'ARN des virus contenu dans le cytoplasme des bactéries infectées et induisent des cytokines inflammatoires et des interférons (Kumar, Kawai et al. 2011). Les récepteurs à ADN réagissent lorsqu'ils sont en contact avec de l'ADN provenant de différents sources (ADN viral, ADN plasmidique, ADN de cellules mortes). Ce

contact induit la production du TLR-9. Les récepteurs NOD sont quand à eux une famille de molécules sensibles par des ligands présents à l'intérieur du cytoplasme des cellules.

Ainsi une fois que les cellules ont reconnu l'antigène, les différents types cellulaires présentés précédemment vont éliminer celui-ci via le processus de phagocytose. La phagocytose est un mécanisme de défense naturel est un type d'endocytose basé sur l'englobement par la cellule du matériel particulaire afin de former un phagosome (Figure 11). L'essentiel de la phagocytose est réalisée par des cellules spécifiques dont la plupart réalisent l'endocytose, telle l'endocytose médiée par un récepteur ou la pinocytose, (Kuby, Golsby et al. 2001).

Les macrophages sont un des acteurs principaux de la phagocytose. Ainsi les macrophages peuvent à la fois ingérer des molécules exogènes (micro-organismes entiers, fraction de micro-organismes) mais aussi des produits endogènes (tels que les cellules hôtes lésées ou mortes, des débris cellulaires etc.) (Kuby, Golsby et al. 2001). Lors de la phagocytose le macrophage va adhérer à l'antigène exogène, puis va former des pseudopodes, véritables protrusions membranaires afin d'englober le matériel fixé (Figure 12). Par la suite, les pseudopodes vont fusionner ensemble en incluant le matériel exogène, et former le phagosome. Il est à noter que les anticorps peuvent venir opsoniser l'antigène lors de sa présentation aux cellules phagocytaires (Abbas and Lichtman 2006). Cette opsonisation favorise la phagocytose mais n'est pas un pré requis à la phagocytose. Ce phagosome va rentrer dans la voie d'apprêtement endocyttaire et fusionner avec un lysosome pour former un phagolysosome. C'est à cette étape que les enzymes hydrolytiques et les lysozymes vont digérer le matériel exogène. Finalement les résidus de la digestion vont être exocytés du macrophage ou présenté au système immunitaire de l'hôte dans un contexte de CMH de classe II (Figure 12). Les macrophages sont donc des cellules qui participent activement à l'homéostasie de l'organisme (Paul 2008).

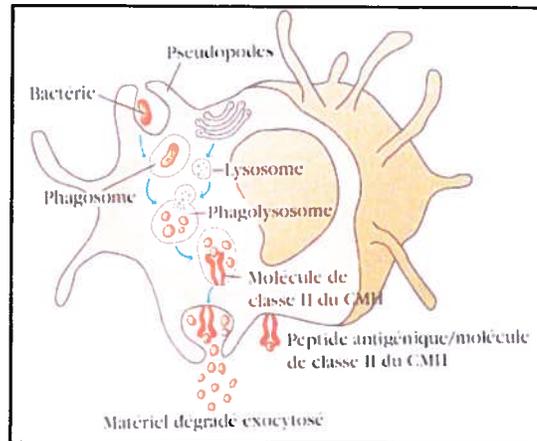


Figure 12 : Phagocytose et apprêtement d'un antigène exogène par les macrophages. La plupart des produits résultant de la digestion sont exocytés mais certains peptides peuvent entrer en interaction avec des molécules de classe II du CMH, pour former des complexes présent à la surface des cellules et présentés aux cellules T_H (Kuby, Goldsby et al. 2001).

Lors de la phagocytose, dès le contact de l'antigène sur la membrane du phagocyte, de nombreux médiateurs de l'activité antimicrobienne et cytotoxique sont émis dans le phagosome par les cellules phagocytaires. Ces substances sont souvent des formes réactives de l'oxygène, telles que des anions superoxydes, des radicaux hydroxyles, du peroxyde d'hydrogène et des anions hypochlorite. Des intermédiaires réactifs dérivés de l'azote sont aussi produits comme l'oxyde nitrique, le dioxyde d'azote et l'acide nitreux. D'autre part, des microbicides comme les défensives, le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) les lysozymes et des enzymes hydrolytiques peuvent être sécrétés. Ainsi au cours de la phagocytose le processus de flambée respiratoire (respiratory burst) est activé, il s'agit du mécanisme oxygène dépendant. Ce phénomène de production d'oxydes nitriques (ON) est réalisé par les macrophages et le résultat d'une stimulation par les cytokines, par de l'interféron γ issue des lymphocytes T (LT), par les lipopolysaccharides bactériens (LPS) ou par des parasites. La plupart des activités antimicrobiennes engendrent la production d'oxyde nitrique et substances dérivantes. Lors d'une trop forte réaction de l'organisme cette production peut être libérée dans le milieu extracellulaire et peut causer des dommages.

Pour prévenir les dommages cellulaires causés par la production d'espèces oxygénées réactives (EOR), de nombreux oxydants enzymatiques sont produits pour les éliminer (Kelly, Havrilla et al. 1998). Les oxydants sont générés comme une réponse intracellulaire normale de la mitochondrie et des peroxysomes comme la plupart des enzymes du système. Ce système est donc basé sur une défense enzymatique comme la catalase (CAT), la superoxyde

dismutase, le glutathion peroxydase qui peuvent maintenir l'homéostasie (Finkel and Holbrook 2000). De même, il existe des composés non enzymatiques, de petite masse moléculaire comme l'ascorbate, le pyruvate, les flavonoïdes, les caroténoïdes qui permettent de contrôler la production de ROS (Finkel and Holbrook 2000).

Ainsi, les macrophages représentent un type cellulaire impliqué dans les réponses immunitaires non spécifiques. Cependant ces cellules coopèrent aussi avec celles spécifiques à l'immunité acquise. Dans certains cas, les macrophages peuvent faciliter la mise en place du système adaptatif en exposant les antigènes aux cellules T spécifiques à cet antigène. D'autre part, lors de la mise en présence des macrophages avec les pathogènes, ces derniers vont sécréter des médiateurs immunitaires aussi nommée cytokines.

Par ailleurs, il existe un autre phénomène similaire à la phagocytose appelé la pinocytose (incluant la macropinocytose). Il concerne l'absorption de particules de taille $> 1 \mu\text{m}$. Cette voie peut être réalisée ou non par la voie d'endocytose dépendante des clathrines ou cavéoles. Les cavéoles consistent à des invaginations de la membrane de 50-80 nm contenant des sphingolipides, cholestérol ; des récepteurs et des cavéolines (Zhang and Monteiro-Riviere 2009) .

3.1.2 L'immunité acquise

L'immunité acquise comporte quatre caractéristiques fondamentales qui la différencient de l'immunité naturelle. Elle possède une spécificité antigénique, une diversité, une mémoire immunitaire, et aussi la faculté de reconnaître le soi du non soi. Les 2 principaux types de cellules lymphoïdes sont les lymphocytes T et les lymphocytes B.

Les lymphocytes B (LB) se différencient des lymphocytes T par la synthèse et la sécrétion de molécules d'immunoglobulines (ou anticorps) (Tableau 2). Les immunoglobulines sont des glycoprotéines solubles qui reconnaissent l'antigène. Leur mission étant de contribuer à l'élimination de leur antigène spécifique ou des microorganismes porteurs de l'antigène (Male, Brostoff et al. 2007). Il existe chez l'humain différents types d'immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Toutes les immunoglobulines (excepté l'IgD) sont bi fonctionnelles c'est-à-dire qu'elles vont à la fois fixer l'antigène mais vont aussi contribuer à la lyse ou à l'élimination de complexes immuns en activant les mécanismes effecteurs (Male, Brostoff et al. 2007). De plus, il est à noter que les portions Fc des immunoglobulines sont reconnues par les cellules mononucléaires, les neutrophiles, les cellules NK, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes. Dans le cas d'un complexe antigène anticorps, de nombreuses fonctions Fc

sont libres et peuvent s'attacher via des récepteurs aux cellules ci-dessus. On dit que l'anticorps opsonine l'antigène le rendant plus attractif aux cellules phagocytaires (Male, Brostoff et al. 2007).

L'interaction antigène – anticorps d'une cellule B mature naïve mise en contact avec un lymphocyte Th induit son activation et sa différenciation des clones de cellules B spécifique. Au cours de ce processus le LB se différencie et produit une population de plasmocytes et de cellule B mémoires. Les plasmocytes ne possèdent pas d'anticorps à leur surface mais ils les synthétisent et les sécrètent. Selon les différentes phases de la réponse immunitaire différents anticorps vont être sécrétés (IgM puis IgG). Les clones des LB activés vont continuer de se multiplier et former dans les follicules un centre germinatif ou mature la réponse B. Puis les anticorps vont être émis dans la circulation sanguine et rejoindre le tissu où siège la réponse inflammatoire. Durant la phase effectrice les anticorps contribuent à l'élimination des microorganismes.

Les lymphocytes T (LT) possèdent à leur surface un récepteur des cellules T ou TCR constitué de deux chaînes α et β (γ et δ). Ces LT ne reconnaissent pas l'antigène libre. La plupart des cellules T ne reconnaissent l'antigène que lorsqu'il est lié à des classes particulières de molécules du SoI codée par des gènes du système majeur d'histocompatibilité (Kuby, Goldsby et al. 2001). Les lymphocytes T ont donc les fonctions des réguler la réponse adaptatives et de cytotoxicité (Tableau 2). Selon des critères fonctionnels deux types de LT sont identifiables (Espinosa and Chillet 2010) :

- les lymphocytes T helper (LT_h) ou lymphocytes T auxiliaires exprimant les récepteurs CD 4
- les lymphocytes T cytotoxiques (LT_c) exprimant les récepteurs CD 8

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes cellules du système immunitaire de la lignée lymphoïde et leurs caractéristiques.

	Lymphocyte T	Lymphocyte B	NK
Localisation	sanguine	sanguine	Sanguine
Marqueurs caractéristiques	TCR CD3 CD4 ou CD8	BCR CD19 CD 21, CR 1,2,4 CD79 a,b	NKR CD16 CD 56
Rôle	<u>Lymphocyte T</u> <u>CD4+</u> : contrôle de la mise en route des réponses immunitaires adaptatives <u>Lymphocytes T</u> <u>CD8+</u> : élimination des cellules infectées et cancéreuses	Réponse immunitaire humorale adaptative	Elimination des cellules infectées par un virus, une bactérie, ou cellules cancéreuses

La présentation antigénique joue un rôle central dans le déclenchement et le maintien de la réponse immunitaire. Il existe différents acteurs :

- Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques, les macrophages
- Les interactions moléculaires complexes induisant la présentation de petits fragments antigéniques reconnus par les LT
- Les molécules de costimulation des CPA activant les LT dans certaines conditions
- Les molécules d'adhérence favorisant la présentation antigénique
- L'activité des cytokines agissant sur la division des lymphocytes

Les cellules dendritiques vont capter les antigènes, elles vont exprimer des molécules du CMH de classe II (interagissant avec les cellules T et les CD4 des LT h). Les cellules vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et vont sensibiliser les LT via la présentation des antigènes sur des CMH de classe II (Male, Brostoff et al. 2007). La sensibilisation et l'activation des cellules T s'effectuera donc via la formation d'une synapse immunologique entre ces deux types cellulaires. Le LT CD4 naïf sera donc ainsi activé puis entrera en prolifération. Ce phénomène est appelé sélection et amplification clonale. À cette étape le LT va produire de l'IL-2 et ses récepteurs, qui vont ainsi permettent la stimulation de la croissance des LT. Puis les LT vont se différencier en lymphocyte Th effecteur de différents types. Selon les cytokines inductrices le LT va se différencier en un LTh effecteurs et produire lui aussi différentes cytokines. Les lymphocytes T helper ainsi effecteurs vont ainsi activer les lymphocytes B, les lymphocytes T cytotoxiques, et les macrophages lors de coopération cellulaire. De plus des LT vont être mise en mémoire (LT mémoires effecteurs et LT mémoires centraux) pour une prochaine réponse immunitaire (Espinosa and Chillet 2010).

Il est possible de stimuler la prolifération des LT, ou blastogenèse, par des agents mitogènes *in vitro* tels que la concanavaline A (Con A) (Paetkau, Mills et al. 1976; Duncan Matthew R. , George Frederick W. et al. 1982; Scharsack, Steinhagen et al. 2001). Cette prolifération lymphocytaire est aussi nommée test de stimulation lymphocytaire ou transformation lymphoblastique (TL). Elle est facilement détectée par l'intermédiaire de thymidine tritiée (^3H) incorporée à l'ADN des cellules en division par mesure de la radioactivité du ^3H . Un résultat élevé indique que les lymphocytes ont proliférés et ont donc été activés ce qui confirme leur capacité à répondre à un antigène (Male, Brostoff et al. 2007).

3.1.3 Processus inflammatoire

La réponse inflammatoire correspond à une réponse du système immunitaire. Elle peut être soit aiguë et dure environ 48h, soit chronique. Très souvent la réponse inflammatoire aiguë est typique du système immunitaire inné et la réponse inflammatoire chronique celle du système immunitaire adaptatif.

A titre d'exemple, les métaux afin de pouvoir être pris en charge par le système immunitaire sont souvent complexés à des protéines. En effet, le cadmium possède une forte affinité aux groupements thiols, et peut facilement remplacer le zinc dans certains complexes enzymes-métal (Swiergosz-Kowalewska 2001). Ainsi lors de sa pénétration dans l'organisme le métal va être transporté dans le sang. Il va être principalement lié à des protéines de faibles poids

moléculaires telles que les métallothionéines et se lier aux groupements SH- des autres protéines, ce qui peut diminuer leur toxicité. Cependant selon la nature de l'exposition, les métaux sont souvent la source de stress oxydatif, de modifications d'ADN (gène aberrant et inhibition de la réparation des dommages à l'ADN), et entraînent le cancer et la circulation d'anticorps libres.

Ainsi, les métaux entraînent une réponse inflammatoire. La première étape du processus inflammatoire vise à l'activation du processus inflammatoire et s'amorce par la reconnaissance de la molécule. Une fois reconnue les macrophages vont participer activement à l'élimination des molécules via la phagocytose. Cependant les macrophages vont aussi sécréter de nombreuses cytokines inflammatoire telles que IL-1 IL-6 et le TNF- α et des chémokines qui vont permettre le recrutement des neutrophiles et des monocytes (Espinosa and Chillet 2010).

Les cytokines ont à la fois un rôle local et un rôle systémique. Leur but est de conditionner l'infection et de conditionner l'organisme à la réponse inflammatoire. IL-1 est principalement produite par la lignée monocyttaire suite à la reconnaissance des PAMPs. IL-1 permet l'augmentation des molécules d'adhérence des leucocytes. Le TNF- α ou facteur de nécrose tumoral est sécrété par les macrophages dans un premier temps. A faible dose le TNF- α augmente l'expression des molécules d'adhérence. Toutefois à dose modérée il induit la synthèse hépatique de protéines, stimule l'hématopoïèse et agit sur le système nerveux central. Enfin, à forte dose il induit le choc septique. L'IL-6 est une cytokine qui est produite par les phagocytes, les macrophages, et les cellules dendritiques. Cette cytokine stimule la phagocytose et la flambée oxydative. Elle augmente, chez les cellules endothéliales, l'expression des molécules d'adhérence qui vont être utilisées par les différentes cellules immunitaires afin de rejoindre le tissu enflammé par diapédèse. De plus, elle induit la sécrétion de CCL2 (Chémokines ligand 2) pour recruter des monocytes. Elle induit aussi la sécrétion des protéines de la phase aiguë (Espinosa and Chillet 2010). Finalement, l'INF- γ permet l'expression des CMH II, augmente l'activation de la présentation antigénique des macrophages, l'activation des lysosomes des macrophages et augmente l'activité des cellules NK.

Puis la deuxième étape consiste en une vasodilatation. Plusieurs molécules vasoactives vont être mises en cause : des acteurs de la coagulation, des médiateurs de l'inflammation, et du monoxyde d'azote.

La troisième étape est le recrutement des cellules de l'immunité. En fonction de la durée de l'inflammation différentes cellules vont être recrutées. Des agents chimiotactiques vont être sécrétés. Elles vont permettre d'attirer par exemple les monocytes et les neutrophiles. Ainsi les premières cellules recrutées lors du processus inflammatoire sont les neutrophiles. Dans un deuxième temps, les monocytes sont recrutés, ils vont se différencier sur le site infectieux en macrophages et vont compléter l'activité phagocytaire des neutrophiles. Les monocytes peuvent aussi se différencier en cellules dendritiques qui captent les antigènes et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux lymphocytes et initier la réponse adaptative (Espinosa and Chillet 2010). C'est à ce moment dans le processus inflammatoire, que la voie du complément va être activée. Selon le type de microorganismes ou de substances étrangères différentes voies sont possibles : voie classique, voie des lectines ou voie alternative. Lors du processus inflammatoire les lymphocytes T auxiliaires (LT helper), vont aussi activer les macrophages qui deviennent alors super actifs (phénomène de flambée oxydative).

La quatrième étape est la phase effectrice. Cette étape repose sur la phagocytose. Elle est d'abord pratiquée par les neutrophiles qui sont recrutés en grand nombre et génèrent, lors de leur activation, les processus de flambée oxydative. Lorsque l'infection est importante les neutrophiles s'accumulent, phagocytent massivement et meurent. Les macrophages moins nombreux ont un rôle d'organisation de la réponse immunitaire. Ceux issus des monocytes vont aider les neutrophiles et phagocyter les corps apoptotiques et les neutrophiles morts. La phase effectrice est aussi marquée par la sécrétion de cytokines qui dans un premier active le système (IL-1 et TNF- α) puis les TGF- β qui ont un effet inhibiteur de la réponse inflammatoire. La dernière étape est celle de la réparation tissulaire.

3.2 Les cellules immunitaires de moules

Comme chez la plupart des mollusques, le système circulatoire est un système semi-ouvert (Arumugam 2000). Les cellules circulantes des moules font partie intégrante de l'hémolymphe et baignent donc les organes internes de l'animal (Sauve, Brousseau et al. 2002). Ces cellules, aussi appelées hémocytes, ont donc à la fois le rôle de cellules « sanguines » mais aussi de cellules immunitaires (Rodríguez-Domínguez 2006) (Figure 13). En plus l'hémolymphe comporte aussi des effecteurs antibactériens (Söderhäll 2010).

Ces cellules pluripotentes c'est-à-dire qui participent à la fois à l'homéostasie, à la nutrition et à la défense (Pipe, 1990) sont retrouvées dans l'organisme sous différents aspects.

Effectivement, il existe des cellules granuleuses et agranuleuses chez les moules (Figure 14). Les cellules granuleuses ou granulocytes contiennent deux types de granules : des petits (0.2-0.3 mm) et des gros granules (0.5- 1.5 mm). Les granulocytes à petits granules sont des basidophiles et les granulocytes à gros granules sont des éosinophiles (Pipe, Farley et al. 1997). Les éosinophiles sont souvent qualifiés de cellules positives. Enfin, les deux dernières populations d'hémocytes sont les cellules intermédiaires et les hyalinocytes. Les cellules agranuleuses sont comme leur nom l'indique des cellules sans granules (Auffret 1989). Les hyalinocytes sont donc les cellules immunitaires les plus petites des trois sortes, elles ont peu de cytoplasme et un noyau peu défini elles vont se situer aux faibles tailles et complexité (Figure 14). Ces cellules, morphologiquement différentes peuvent être séparées à l'aide d'un gradient Percoll (Pipe, Farley et al. 1997).

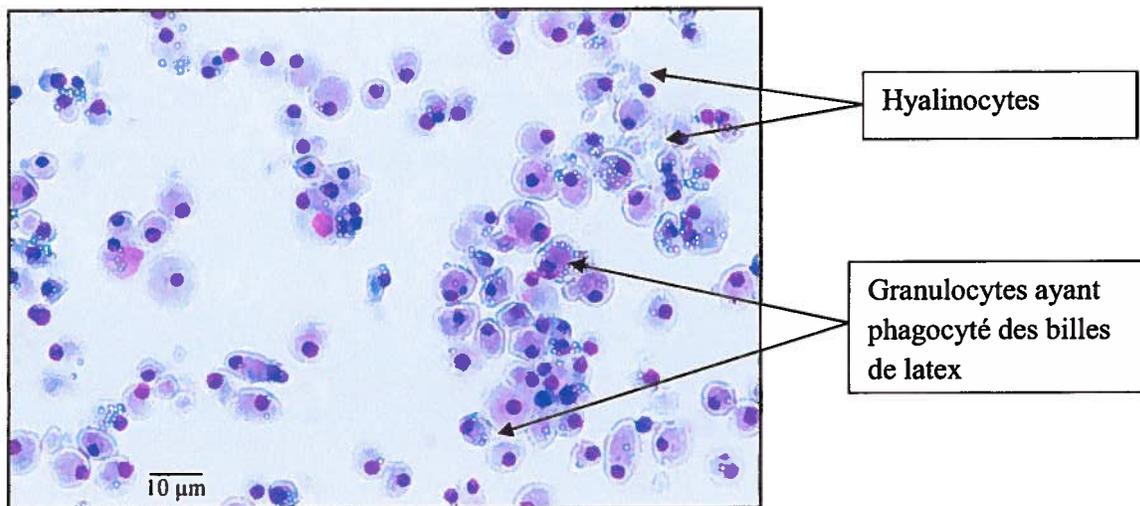


Figure 13 : Différents types de cellules immunitaires chez la moule bleue colorés au Giesma, les hémocytes ont été incubés avec des billes de latex. Droits d'auteur réservés à d'Amélie Jauvin.

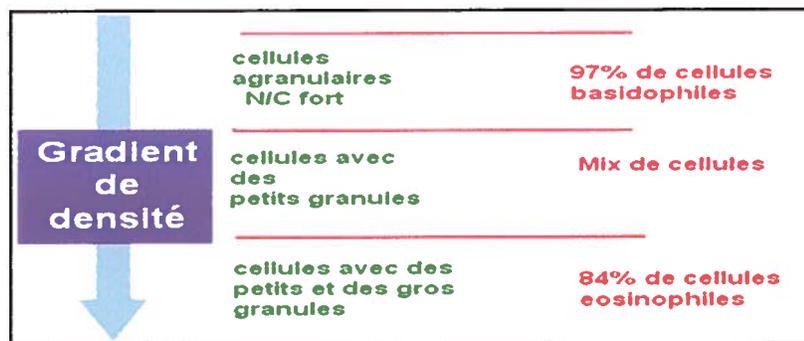


Figure 14 : Résultats d'une différenciation cellulaire à l'aide d'un gradient Percoll (Pipe *et al.*, 1997).

De plus, de facteurs présents dans l'hémolymphe peuvent aider la phagocytose, les agglutinines (lectines) et des peptides antimicrobiens. Trois groupes de cationiques, cystéines peptides (4KDa) ont été identifiées chez les mollusques comme des agents antimicrobiens : les défensives, les mytilines, les mysticines. Ces peptides sont synthétisés comme précurseurs par les cellules circulantes avant d'être stockées dans les cellules granuleuses (Cooper 2003). Ces peptides servent donc à la réponse aux agents infectieux, à la réponse intracellulaire via la phagocytose et à la réponse extracellulaire lors d'une réponse systémique tardive (Salzet 2001).

Le système immunitaire des moules est bien connu pour être sensible et réagir dès les premiers signes d'une pollution (Akaishi, St-Jean et al. 2007). De plus, la sédentarité des moules implique une filtration des particules en suspension dans la colonne d'eau, véhiculées par les courants de marées (Sauve, Brousseau et al. 2002). D'autre part, la moule possède un système circulatoire ouvert, ce qui augmente la surface de contact entre les contaminants et les constituants de l'animal (Arumugam 2000; Au 2004). Les cellules immunitaires vont donc être influencées par des paramètres externes du milieu tels la salinité, la température, la courantologie, les saisons, la concentration en chlorophylle a et en xénobiotiques (Fournier, Pellerin et al. 2002; Lemaire and S. Cartier 2006; Cao, Ramos-Martinez et al. 2007). De ce fait, les hémocytes, sont exposées directement aux polluants tels les métaux lourds, le phytoplancton toxique, et toutes sortes de nouveaux contaminants susceptibles de se retrouver dans le milieu marin (Damiens, Mouneyrac et al. 2007). Les paramètres internes comme le sexe, le stade, la reproduction (Seed 1992; Zardi 2007) de l'animal vont aussi avoir une action sur les hémocytes (Duchemin 2007). Ces différents paramètres peuvent parfois rendre la réponse immunitaire complexe (Cao, Ramos-Martinez et al. 2007).

Les premières étapes de la reconnaissance immunitaire chez les bivalves est très importante, elles reposent sur l'identification des récepteurs de reconnaissances (aussi nommée en anglais Pattern recognition receptor, PRR), de molécules pathogènes (ou Pathogen-Associated Molecular Pattern PAMPs) (Söderhäll 2010). Il existe 7 groupes de reconnaissances des PAMPs chez les invertébrés marins. Les 7 PRR identifiés chez la moule bleue sont :

- Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (cette protéine permet la reconnaissance des membranes bactériennes). Cette protéine active la voie de phagocytoses et d'activation des récepteurs Toll, et les voies de transduction et de production des produits antimicrobiens (hydrolyse du peptidoglycane).

- les récepteurs spécifiques aux bactéries Gram-négatives (LPS, et β -1,3-glucane). Ces protéines permettent l'activation de la voie d'activation de la phospholipase, la cytolysse, l'agrégation bactérienne, et la réaction d'opsonisation.
- les lectines de type C. Ces protéines se fixent aux sucres terminaux des glycoprotéines et glycolipides. Les lectines sont reconnues pour être une sorte d'anticorps de la réponse immunitaire innée des bivalves.
- Les galectines sont des lectines de types β -galactoside elles permettent la reconnaissance de pathogène microbiens, d'algues unicellulaires.
- les récepteurs scavenger (éboueurs en français) : ce sont des récepteurs spécialisés dans l'endocytose de différents PAMPs
- les récepteurs Toll : Le récepteur intracellulaire Toll/interleukine-1 joue un rôle majeur dans la détection des substances du non-soi. L'expression des ARNm CfToll-1 sont surexprimé par le LPS bactérien.

Le système immunitaire innée des moules est sous le contrôle d'un réseau de voies de signalisation complexe. Chez les bivalves plusieurs voies ont été identifiées :

- la voie Nf- κ B : C'est une voie plutôt conservée à travers l'évolution. Elle a un rôle central dans la réponse immunitaire et est déclenchée par la dégradation d'I κ B. L'activation de la protéine entraîne la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau.
- la voie des protéines kinases mitogènes activées (MAPK). La voie des map kinases régule les processus physiologiques tels que la croissance, la prolifération cellulaire la différenciation, la mort cellulaire et le développement du système immunitaire inné, elles regroupent des kinases extracellulaires, des kinases c-Jun amino terminal kinases (JNKs) and p38 MAPKs.
- la voie Janus kinase et transducteur de signal et activateur de transcription (JAK-STAT) : cette voie est liée à la production de cytokines.
- la voie des récepteur Toll (TLR) : L'expression de certains TLR est sur régulée en présence de LPS et de peptidoglycane.

Le système immunitaire des bivalves possèdent donc différents effecteurs susceptibles de protéger l'organisme : les peptides antimicrobiens, les cytokines, les composés du

complément, les enzymes antioxydantes, les protéines de phase aiguë. Les peptides antimicrobiens sont comme leur nom l'indique spécialisé dans la reconnaissance des bactéries. Les lysozymes sont des enzymes possédant une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram+ et gram -.Elles servent d'enzymes de digestion. Les lectines permettent la reconnaissance du soit et du non soit mais aussi l'opsonisation et la mort de pathogènes potentiels. Les cytokines telles que les interleukines (IK), les interférons (IF), les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les chémokines jouent un rôle sur la phagocytose, la chimiotaxie et la cytotoxicité.

Lors de la réponse immunitaire des espèces oxygénées réactives (EOR) sont souvent produites. Ces EOR telles que les anions superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, les radicaux hydroxyles sont nécessaires pour la défense contre les contaminations. Cependant à forte doses les EOR induisent un phénomène de stress oxydant, la perte des fonctions des cellules suivies par des phénomènes d'apoptose et de nécrose. Afin de contrer les effets néfastes des EOR, il existe chez les bivalves trois types d'enzymes antioxydantes: la Superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). La superoxyde dismutase est une classe d'antioxydant qui permet la transformation des superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Elles font parti des protéines constitutives de l'organisme. Le glutathion peroxydase fait parti de la famille des enzymes contenant des peroxydases, elles sont produites afin de contrer les effets néfastes du stress oxydant. Elle permet la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau (Söderhäll 2010). La catalase est une enzyme centrale qui décompose le peroxydes d'hydrogène en oxygène gazeux et en eau. De plus, lors de phase aiguë de contaminations certaines protéines peuvent être produite telles que les « heat shock proteines » et les métallothionéines.

3.3 Le système immunitaire de la truite arc en ciel

Le système immunitaire des poissons est composé de différents types cellulaires (Figure 15) : deux types de lymphocytes de petites et de grandes tailles (les petits étant prédominants), des granulocytes, des thrombocytes et des globules rouges nucléés (Figure 15) (Scharsack, Steinhagen et al. 2001). Ces différents groupes cellulaires sont différents en taille selon les espèces (Tierney, Farrell et al. 2004). Les lymphocytes sont des cellules sphériques présentant souvent des pseudopodes, ces cellules sont reconnues pour être les principales cellules circulantes. Les thrombocytes sont les cellules les plus petites des leucocytes, elles ne sont pas différenciables des petits lymphocytes lors d'un frottis sanguin, ces cellules interviennent dans la coagulation du sang. Les granulocytes sont des grosses cellules immunitaires

possédant un noyau mononucléaire occupant plus de 33% de la masse cytoplasmique. Il existe trois sortes de granulocytes : les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles. Les éosinophiles représentent plus de la moitié des granulocytes, les basophiles occupent aussi une grande proportion des granulocytes. Le rôle principal des granulocytes est de lutter contre les attaques bactériennes, les contaminations etc. Les monocytes, qui se différencient rapidement en macrophage, sont les plus grosses cellules immunitaires chez les poissons, elles sont caractérisées par un noyau en forme de haricot et présentent de nombreuses vacuoles cytoplasmiques. Il est souvent plus aisé de regrouper l'ensemble des cellules immunitaires sous la dénomination leucocrites (ou leucocytes). De nombreux tests sur les leucocrites basés sur des stress permettent l'évaluation des défenses immunitaires (Tierney, Farrell et al. 2004; Kennedy and Farrell 2008).

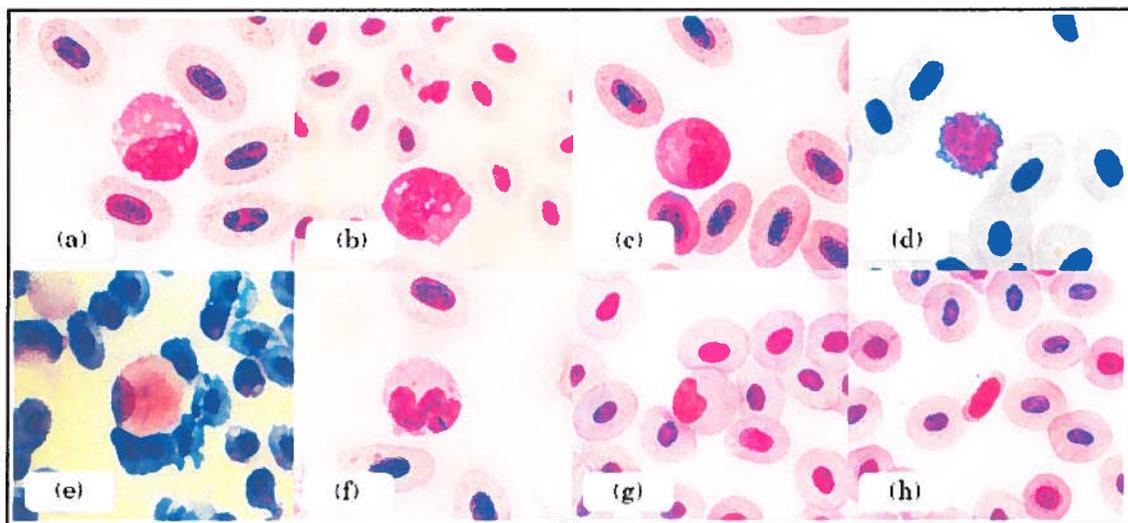


Figure 15 : Différents types cellulaires a) monocyte de saumon, b) neutrophile et monocyte de hareng, c) cellules basophiles de saumon, d) lymphocyte de saumon, e) éosinophile de hareng, f) neutrophile de saumon, g) neutrophile du tête de boules , h) thrombocyte de tête de boules . Coloration au Wright Giesma. (Tiré de Tierney et al, 2004).

Les poissons possèdent donc certains types cellulaires semblables aux mammifères, cependant ils diffèrent des mammifères par une organisation plus simple de la réponse immunitaire (Tort 2004). En effet, les poissons possèdent un système immunitaire inné qui joue un rôle central plus marqué que le système adaptatif (spécifique) (Ellis 2001; Esteban, Rodriguez et al. 2004). Cependant, les poissons possèdent des fonctions semblables à celles des mammifères : les poissons peuvent rejeter les allogreffes, synthétiser des anticorps spécifiques suite à une stimulation antigénique (Zelikoff 1994). De plus, les cellules immunitaires peuvent : - relarguer des messagers tels que les interleukines, les cytokines, des métabolites d'acide

arachidonique, - agir sur des cellules tumorales, - tuer et phagocyter des pathogènes, - relarguer des composés oxygénés (Zelikoff 1994).

Ainsi la réponse immunitaire, bien qu'elle soit différente de celle des mammifères, présente des similitudes. Il est à noter que les poissons possèdent différents organes qui sont à l'origine de la réponse immunitaire. La première barrière immunitaire est physique, elle est représentée par la peau et les branchies qui jouent un rôle fondamental dans le contrôle des attaques externes. Puis les centres de formation des cellules immunitaires forment le deuxième type de barrière immunitaire à savoir : le thymus, le pronéphros, les reins, le foie et l'intestin. Toutefois, la TAC ne possède pas de moelle osseuse. Les principaux organes lymphoïdes sont donc le thymus, le rein antérieur (pronéphros) et la rate. Le sang, par son abondance en leucocytes ($5 \times 10^4 - 10^5 / \mu\text{L}$) est une source importante de lymphocytes (80 % des leucocytes) (Chilmonczyk and Monge 1987). Il faut rappeler que le thymus est le premier organe à être infiltré par les lymphocytes (thymocytes) (Ostrander, Bullock et al. 2000). Une étude de Tatner et al., (1985) a démontré que des thymocytes marqués radioactivement et injectés dans le thymus d'une TAC se déplacent préférentiellement dans la rate (45%) mais aussi dans le pronéphros (17%). La figure ci-dessus indique les différents organes du système immunitaire (Figure 16).

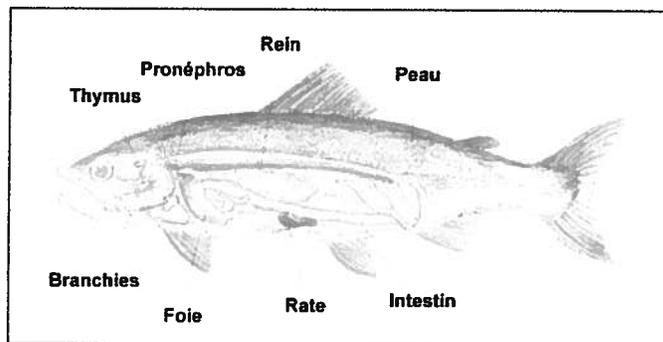


Figure 16 : Principaux organes responsables de l'immunité innée et acquise chez la truite arc en ciel.

Le thymus de la TAC présente de nombreuses différences avec le thymus des vertébrés supérieurs. C'est un organe pair implanté très superficiellement dans l'épithélium des cavités branchiales. Il ne possède ni cortex ni médulla bien différenciés, et les lymphocytes se localisent dans le thymus sans régionalisation contrairement aux mammifères (Ostrander, Bullock et al. 2000). Avec l'âge il subit de légères modifications morphologiques sans jamais évoluer totalement. Un autre organe très important est le rein, il possède plusieurs fonctions

en plus de ses fonctions d'excrétion et d'osmorégulation (tissus postérieur du rein), il est le siège de cellules phagocytiques et hématopoïétiques (tissus antérieur du rein).

Le système immunitaire non spécifique, aussi appelé inné, repose sur les cellules comme les granulocytes et les mononucléaires (macrophages) qui participent à la fois à la réponse inflammatoire chronique et aiguë (Zelikoff 1994). Comme les mammifères les téléostéens et d'autres organismes eucaryotes, les poissons utilisent deux types de cellules phagocytiques comme les neutrophiles et les macrophages (présentés dans les généralités) (Afonso, Lousada et al. 1998). Les macrophages par exemple sont des cellules très importantes dans le système immunitaire. Elles jouent à la fois le rôle de cellules accessoires, effectrices et sécrétrices. Il est bien connu que la première fonction des macrophages est la destruction de pathogènes et la présentation des antigènes aux lymphocytes, et servir à la médiation de différents facteurs comme les cytokines (interleukine-1 et interférons) activant les lymphocytes (induction de la cytolyse). Les macrophages sécrètent aussi des enzymes telles que les lysozymes intervenant dans l'inflammation, l'immunité et la pathogenèse (Narnaware, Baker et al. 1994). Ainsi, différents types de protéines servent de véhicules et permettent l'induction de réponse de l'organisme, certaines sont listées dans le tableau (Tort 2004)

Les poissons présentent donc un système immunitaire inné antigène-dépendant avec une action rapide. Comme il est présenté dans le tableau 1 ci-dessous, de nombreuses protéines permettent une réponse innée chez les poissons. Les lysozymes contribuent à la défense immunitaire innée, elles sont retrouvées dans de nombreux tissus, dans le sérum, et dans des organes tels que la peau, les branchies et le mucus. Leur action est ciblée sur les bactéries et sur la déstabilisation des liens glycosidiques du peptidoglycane (Demers and Bayne 1997). Ainsi, les poissons téléostéens peuvent aussi produire de l'oxyde nitrique servant essentiellement à la signalisation intracellulaire, à la vasodilatation, et à la défense antimicrobienne (Neumann, Fagan et al. 1998).

Tableau 3 : Protéines responsables de la communication cellulaire lors d'une réaction immunitaire.

Protéines	Superoxydes peroxydes
<p>Cytokines : Messenger</p> <p>Chémokines : Messenger</p> <p>Interféron : Inhibe la réplication virale</p>	<p>Produits par les phagocytes</p> <p>Actions Bactéricides</p>
<p>Complément : Action bactériolytique, opsonisation et activation des macrophages</p> <p>Lysozymes : Action bactériolytique</p>	<p>Oxydes nitriques</p>
<p>Phase aiguë : Agglutination précipitation</p> <p>Lectines : Agglutination</p> <p>Immunoglobines : Précipitations, agglutination, opsonisation, complément</p>	<p>Peroxydation</p> <p>Nitrification</p>

D'autre part, les cytokines représentent de vrais médiateurs de la réponse immunitaire, l'interleukine IL-1 principalement produite par les macrophages, affectent principalement la voie de signalisation hypothalamique-pituitaire-inter-rénale (Holland, Pottinger et al. 2002). La réponse spécifique, quant à elle, est similaire à celle des mammifères et repose sur une réponse humorale et à médiation cellulaire (Zelikoff 1994). Les cellules produisant des anticorps sont situées dans la rate et le rein (pronéphros, mésonéphros) et correspondent à la voie humorale (Rijkers, Frederix-Wolters et al. 1980). Tout comme les lymphocytes B ces cellules sont stimulées par un agent mitogène (les lipopolysaccharides) et portent à la surface de leur membrane des immunoglobulines (Zelikoff 1994). Seul l'immunoglobuline M (IgM) est présente chez le poisson, contrairement à toutes celles que l'on retrouve chez les mammifères. D'autre part, l'IgM semble déclencher des réactions plus lentes et plus faibles (Ellis 2001). D'autre part, le système de lymphocytes B mémoires est très peu développé chez les poissons alors que le système des lymphocytes T et de la cytotoxicité est plutôt développé (Fischer, Utke et al. 2003; Yoder 2004). Les lymphocytes T peuvent être stimulés par des agents mitogènes tels que la concanavoline (ConA) et les phytohémagglutinines (PHA)

participent à la réponse à médiation cellulaire (Ellis 1977; Kehrer, Hannan et al. 1998). De plus, il a été démontré chez une lignée cellulaire de poisson rouge que la stimulation par la ConA des cellules leucocytaires du pronéphros entraînait la production des facteurs de croissance induisant la prolifération et la différenciation des macrophages (Neumann, Fagan et al. 1998).

4. Les métaux : Des polluants prioritaires

De nombreux métaux souvent considérés comme des composés métalliques persistants sont responsables d'une forte toxicité chez la plupart des organismes (Zhou, Zhang et al. 2008). Le développement de l'agriculture et de l'industrie a entraîné une forte augmentation des concentrations de métaux dans l'environnement. Ainsi des métaux lourds comme le mercure, le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc, le nickel etc. se retrouvent couramment dans les eaux marines (Coles 1995; Fournier, Pellerin et al. 2001; Richardson 2003; Zhou, Zhang et al. 2008). Ces polluants peuvent s'accumuler dans différents compartiments du domaine marin à savoir la colonne d'eau, les sédiments et les organismes (Rainbow 1995). Les effets délétères des polluants de l'environnement peuvent avoir une action directe sur les tissus ou même sur des mécanismes homéostatiques tels le système immunitaire (Lowe 1988; Auffret and Oubella 1997). Par le phénomène de bioconcentration de nombreux organismes accumulent donc ces métaux (Sauve, Brousseau et al. 2002). La plupart des métaux causent des perturbations chez les organismes marins. A différents niveaux de la chaîne alimentaire, et en fonction du degré de complexité de l'organisme, ses dysfonctionnements sont observables. Chez les mollusques bivalves de fortes concentrations en métal vont induire une inhibition de la phagocytose (Sauve, Brousseau et al. 2002). Dans notre étude nous nous intéresserons plus particulièrement au cadmium et à l'argent qui ont représenté et représente encore des enjeux en toxicologie (ATSDR 1999).

4.1 Le cadmium

Le cadmium est un polluant majeur de l'environnement classé à la 8^{ième} place des 20 substances prioritaires (<http://www.atsdr.cdc.gov>, ATSDR, 2010). La plupart des êtres vivants sont exposés au cadmium par voie aériennes et par ingestion. En effet, le cadmium est principalement émis par la fumée de cigarette, les composés sont ensuite retrouvés dans l'air mais aussi dans l'eau via des processus de diffusions, les récoltes sont alors exposées au cadmium dissous dans les eaux de lessivage (Jarup, Berglund et al. 1998; Järup and Åkesson 2009; Klaassen, Liu et al. 2009). Les enjeux toxicologiques du cadmium sont bien connus et ce depuis les années 1950 ou une intoxication au cadmium, aussi appelé maladie « itai-itai »

(« ouch-ouch ») a été détectée dans la Jinzu River au Japon (Nogawa 1981; Merrill, Morton et al. 2008). Les personnes qui souffraient d'intoxication au cadmium présentaient des insuffisances rénales et des fragilités du squelette (ostéomalicie) (Merrill, Morton et al. 2008). En effet, les études sur les hommes et sur les animaux montrent que le cadmium est responsable de phénomènes d'ostéoporose (Jarup, Berglund et al. 1998). Naturellement ce métal est présent dans l'environnement dans la croûte terrestre à hauteur de 0.1 à 1 ppm, il est principalement retrouvé en liaison avec du Zinc (Zn) (Huff, Lunn et al. 2007). Dans l'industrie, ce métal est utilisé dans la production de stabilisant et de plastiques et alliages, de pigments de peintures, de batteries, les amalgames dentaires (faible proportion) (Louria, Joselow et al. 1972; Huff, Lunn et al. 2007). Son apport dans l'océan global est d'environ 8000 t/ an la moitié provient d'activités humaines (Coles 1995; Joseph 2009). C'est depuis les années 1970 que les études se sont portées sur le cadmium en raison de son impact sur les hommes (par le biais de l'alimentation) (Campbell 2006) et de sa grande distribution. Le cadmium représente donc une priorité environnementale en raison de ces conséquences sur la santé humaine et la maintenance de la biodiversité (Campbell 2006; Zhou, Zhang et al. 2008). Le cadmium est aussi présent comme polluant aquatique majeur retrouvé dans les eaux de surface par l'intermédiaire des rejets urbains et agricoles contenus dans les rivières (Bouraoui Z. 2007; Dailianis and Kaloyianni 2007).

Dans l'organisme le cadmium est principalement lié à une protéine riche en cystéine aussi appelée métallothionéines (Nordberg, Goyer et al. 1975; Joseph 2009). Le cadmium se conjugue donc tout le temps avec des groupes sulfhydriles comme les métallothionéines et le glutathion. Ce complexe se forme souvent dans le foie et est relargué dans la circulation sanguine en passant par les reins (Klaassen, Liu et al. 2009) Le cadmium est surtout connu pour affecter la phase 1 de la réponse biologique (cytochrome P450) et la phase 2 (glutathion-S-transférase GST) (Bouraoui Z. 2007). Roméo et al (2000) indiquent dans leur étude que chez les poissons (*Dicentrarchus labrax*, le bar), le cadmium entraîne une réduction de la stabilité lysosomale, la production de métallothionéines (Romeo, Bennani et al. 2000).

Le cadmium est aussi connu pour ses effets néphrotoxiques, carcinogénétiques, tératogènes, et sa toxicité sur le système endocrinien et reproducteur (Olabarrieta, L'Azou et al. 2001). Chez l'homme, il est classé comme agent cancérigène causant des tumeurs des poumons, de la prostate (Klaassen, Liu et al. 2009). Chez les vertébrés le cadmium augmente la sécrétion de métallothionéines qui servent de mécanismes de protection aux toxicités aiguës (Eisler 1985; Jarup, Berglund et al. 1998; Klaassen, Liu et al. 2009). D'autres part, lors d'exposition

chronique au cadmium, le métal va se stocker dans les organes comme les poumons, le cœur, la rate, les testicules, les glandes salivaires, la prostate, mais les organes principaux stockant le cadmium sont le foie et les reins (Waalkes and Klaassen 1985; Jarup, Berglund et al. 1998; Fowler 2009). Même une fois l'exposition stoppée, le cadmium a toujours des effets en raison de son long temps de demi-vie (Goyer 1995; Jin, Lu et al. 1998). Concernant les reins, les personnes exposées présentent souvent des dommages tubulaires et glomérulaires (Nordberg, Jin et al. 1997), un phénomène de protéinurie et une diminution de la clearance en inuline sont aussi observés (Friberg 1984; Merrill, Morton et al. 2008). D'autre part, la toxicité du cadmium pour le fœtus a aussi été étudiée chez les rongeurs (Levin, Kilpper et al. 1987; ATSDR 1999).

Ce composé toxique est très fréquemment utilisé pour des études *in vivo* sur des bivalves en raison de sa forte bioaccumulation (Ke 2001; Emmanouil, Sheehan et al. 2007). Chez les mollusques bivalves, comme l'huitre (*Crassostrea gigas*), le cadmium induit une diminution de la production de ROS traduisant un effet toxique à forte dose du produit (Auffret, Mujdzic et al. 2002). Chez les mollusques bivalves, de fortes concentrations de cadmium vont induire une augmentation de la concentration en thiols, ce qui traduit une stimulation des molécules défensives telles le glutathion et les métallothionéines impliqués dans les processus de détoxification (Sauve, Brousseau et al. 2002).

De même la toxicité impliquée par les ions Cd^{2+} liés à des groupes sulfhydriles et l'inactivation des groupements thiols causent un stress oxydatif (Rikans and Yamano 2000). Le cadmium diminue la production de glutathion et la production de protéines au groupement sulfhydrile, ce qui induit la production d'espèces oxygénées réactives comme les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, et du peroxydes d'hydrogène, l'excrétion des métabolites lipidiques urinaires, la modulation des stades d'oxydation intracellulaire, des dommages à l'ADN, une altération de l'expression génique et des phénomènes d'apoptose (Stohs, Bagchi et al. 2000).

D'autre part, le cadmium comme la plupart des métaux lourds peut s'accumuler dans l'organisme dans des organes comme les intestins, le foie, les reins, les os et participer au principe de biomagnification (Swiergosz-Kowalewska 2001). Du fait de son accumulation dans l'organisme, la concentration de cadmium et sa toxicité augmentent à mesure de la progression dans les maillons supérieurs de la chaîne trophique. Très souvent les organismes aquatiques sont directement exposés au cadmium, En effet, les poissons, les mollusques

bivalves, les crustacés et les gastéropodes sont bien connus pour leurs teneurs en cadmium (Janssen and Scholz 1979; Poulsen, Riisgård et al. 1982; Eisler 1985; Bjerregaard and Depledge 1994; Ke 2001; Pellerin and Amiard 2009). Cependant, le cadmium est aussi présent dans les sols et donc est potentiellement absorbable par les plantes et ainsi bioaccumulables par les organismes qui consomment ces végétaux (feuilles et tubercules) (Sarwar, Saifullah et al. 2010).

Le processus d'accumulation du cadmium dans l'organisme semble suivre un processus bien défini. Chez *L. elliptica*, il a été démontré que le cadmium passait d'abord par les branchies où il serait séquestré dans la phase soluble, puis était transféré aux composés cellulaires insolubles tels les granules ou les membranes vésiculaires (Choi 2007). Afin de contrer les effets néfastes du cadmium et de tolérer les contaminations, les métallothionéines sont sécrétées et séquestrent le métal (Klaassen and Liu 1998; Waalkes 2003; Fowler 2009). Ces dernières sont des petites protéines contenant beaucoup de cystéines, elles assurent aussi la dispersion des métaux (Jin, Lu et al. 1998).

4.2 L'argent, véritable agent antimicrobien

L'argent est un métal utilisé depuis très longtemps comme essentiel pour la médecine (Edwards-Jones 2009). Il est bien connu que l'argent sert à contrôler les infections (Jain, Arora et al. 2009; Pradeep and Anshup 2009; Travan, Pelillo et al. 2009). Actuellement, de plus en plus de bactéries sont résistantes aux antibiotiques, d'où la nécessité de développer des matériaux anti bactériens ou visant la lutte anti bactérienne.

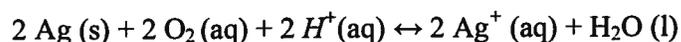
Afin de lutter contre ce problème majeur d'actualité, le domaine médical s'oriente vers l'utilisation de composés d'argent (Travan, Pelillo et al. 2009; Liu and Hurt 2010). L'argent est connu pour ne pas être toxique pour les humains excepté des cas d'argyrie (pigmentation irréversible de la peau en des teintes de gris bleu) ou l'argyrosis (pigmentation irréversible des yeux) après une exposition à de l'argent colloïdal de manière chronique (Hollinger 1996; Mirsattari, Hammond et al. 2004; Sondi and Salopek-Sondi 2004; Chang, Khosravi et al. 2006; Duffus and Worth 2006; Stepien, Morris et al. 2009).

L'argent est classé comme un métal doux qui se lie facilement et fortement aux groupements sulfure pour former des thiolates et des sulfites. Les ions sulfures sont présents seulement en faible quantité dans les eaux naturelles (et les ions argent indirectement). Du fait de sa grande utilisation, environ 700 000 Kg d'argent entrent dans le milieu aquatique. De cette quantité

267 000 kg proviennent d'activités anthropiques, environ 17% provient aussi des fabriques liées au domaine de la photographie (Purcell and Peters 1998; Galvez and Wood 1999).

Différentes études ont déjà mené sur les souris et les humain *in vitro* attestant des variations de viabilité cellulaire, une diminution de la prolifération cellulaire, une diminution de la flambée oxydative et des dommages cellulaires (Liedberg and Lundeberg 1989; McCauley, Linares et al. 1989; Zapata, R et al. 1993; Hollinger 1996). Chez le rat et la souris des études *in vivo* ont été réalisées montrant une diminution significative des leucocytes et des cellules de la moëlle osseuse, une augmentation de la peroxydation lipidique suite à des expositions à l'argent (Rungby and Ernst 1992; Gamelli, Paxton et al. 1993; Shinogi and Maeizumi 1993; Hollinger 1996). Des études ont été menées chez les plantes et la dose la NOEC la plus faible a été trouvée chez *C. dubia* à 0.001 µg d'Ag / L (Blaser, Scheringer et al. 2008). L'argent a été déjà considéré comme un métal toxique pour les organismes marins (Edwards-Jones 2009; Laban, Nies et al. 2009). L'argent s'accumule dans les organismes marins dans le phytoplancton. Il est aussi toxique pour des larves des *Danio rerio* à des doses très faibles. L'argent (présent en sel de nitrate) est un métal des plus toxiques pour les poissons d'eau douce, la concentration létale à 50 % (LC 50) pour les truites arc en ciel (TAC) est de l'ordre de 6,5-65 pg/L (0.06 to 0.6 pM) (Wood, Hogstrand et al. 1996) induisant des dérèglements des transports ioniques (Wood, Hogstrand et al. 1996). Il agit de manière similaire avec les communautés bactériennes en dissipant les flux de la pompe de protons, induisant la mort cellulaire (Sondi and Salopek-Sondi 2004; Kim, Kuk et al. 2007; Lok, Ho et al. 2007; Santoro, Duchsherer et al. 2007; Yoon, Byeon et al. 2008). L'argent est donc plus toxique pour les bactéries que pour les cellules humaines (Quadros and Marr 2010).

La toxicité de l'argent est surtout liée à sa forme ionique la plus courante ou Ag^+ , ses ions sont surtout relâchés lors de modifications de la concentration de dioxygène et de variations de pH dans le milieu. Selon le processus d'oxydation suivant (Edwards-Jones 2009; Liu and Hurt 2010) (Blaser, Scheringer et al. 2008):



Les ions Ag^+ inhibent les enzymes pour les cycles de l'azote du phosphore et du soufre chez les bactéries nitrifiantes (Ratte 1999; Blaser, Scheringer et al. 2008). De plus les ions argent peuvent bloquer la transcription de l'ADN et interrompre le cycle de respiration et la synthèse d'ATP (Kumar, Howdle et al. 2005).

4.3 Le tellure un métal trace peu connu

Découvert en 1782 par Müller, le tellure est principalement utilisé en électronique, optiques, pour la conception de batteries (Chasteen, Fuentes et al. 2009). Il est aussi utilisé comme alliage avec le plomb et le cuivre pour augmenter la résistance à la corrosion et à la distension, comme pigment dans l'industrie du verre (Lauwerys, Haufroid et al. 2007). Ce métalloïde fait parti de la classe des éléments traces, il est très retrouvé dans sa forme non toxiques (Te^0) mais plutôt sus ses formes d'oxyanions TeO_3^{2-} (tellurite) et TeO_4^{2-} (tellurate).

Le métabolisme du tellure n'a pas beaucoup été étudié (Louria, Joselow et al. 1972). Il semble aussi rentré dans l'organisme soit pas inhalation ou ingestion. Le tellure est donc éliminé en partie par les reins, par le tractus gastro-intestinal et les poumons (Lauwerys, Haufroid et al. 2007). Par les voies aériennes il est émis sous forme d'un composé volatil le diméthyltellure d'odeur alliacée. Afin de palier à ce phénomène, il a été définit que la concentration de tellure détecté dans les urines ne devrait pas excéder $1\mu\text{g/L}$.

Le tellure peut engendrer : des troubles digestifs, goût métallique en bouche, nausées, amaigrissent ; des cas d'alopecie, des troubles cutanées (suppression de la sudation), des troubles nerveux (sommolence, dépression).

La toxicité de tellure est surtout liée aux oxyanions tellurite. Il a été prouvé que cet élément était très toxique pour les bactéries à des concentrations inférieures à $1\mu\text{g/ml}$ (Taylor 1999). Ceci rend donc le tellure beaucoup plus toxique, jusqu'à 100 fois, que certains métaux lourds pourtant connus pour leur fortes toxicité comme le cadmium, le fer, le mercure, le cuivre (Nies 1999). Le tellure est neurotoxique pour les rats, ces expériences avaient été réalisées sur des femelles gravides avec des fortes doses de tellure injectées (Duckett 1970; Lampert, Garro et al. 1970). Lors d'une injection accidentelle de tellure chez trois hommes, la toxicité s'est exprimée par la mort de 2 des 3 personnes et les manifestations cliniques étaient les suivantes : douleurs rénales, cyanoses, vomissements, haleine alliacée, perte de conscience (Louria, Joselow et al. 1972). Cependant, certains organismes comme la bactérie gram négative *Stenotrophomonas maltophilia* partagent la capacité de réduire les anions tellurites à la forme la moins toxique le Te^0 (Pages, Rose et al. 2008). Ceci crée des dépôts gris métalliques dans la cellule.

Les ions TeO_3^{2-} interagissent avec les thiols et le glutathion ceci a été vérifié chez *E. coli* (Chasteen, Fuentes et al. 2009). Considérant les similarités chimiques avec le sélénium (Se) et le Te, Turner et al, 2001 ont émis l'hypothèse que le GSH pouvait réduire le TeO_3^{2-} en Te^0

(Turner, Aharonowitz et al. 2001). Le tellure est donc impliqué dans le système de stress oxydatif.

5. Les nanomatériaux des molécules peu connues (vers une voie de conscientisation des effets)

5.1 Définition du mot nanoparticule

Le mot prend sa racine du préfixe grec nanos [nano-], nain, et divise une unité par un milliard. Les nanoparticules sont souvent définies comme des particules de taille inférieure à 100 nanomètres de diamètre (Biswas 2005; Oberdörster 2005; Helland Aasgeir 2006; Fynewever 2007) (The Royal society & The Royal Academy of Engineering, 2004) (Figure 17). Les points quantiques sont donc des nanocristaux colloïdaux, semi-conducteurs avec des propriétés électriques et optiques uniques (Chan and Nie 1998; Smith 2004; Hardman 2006; Maysinger 2007).

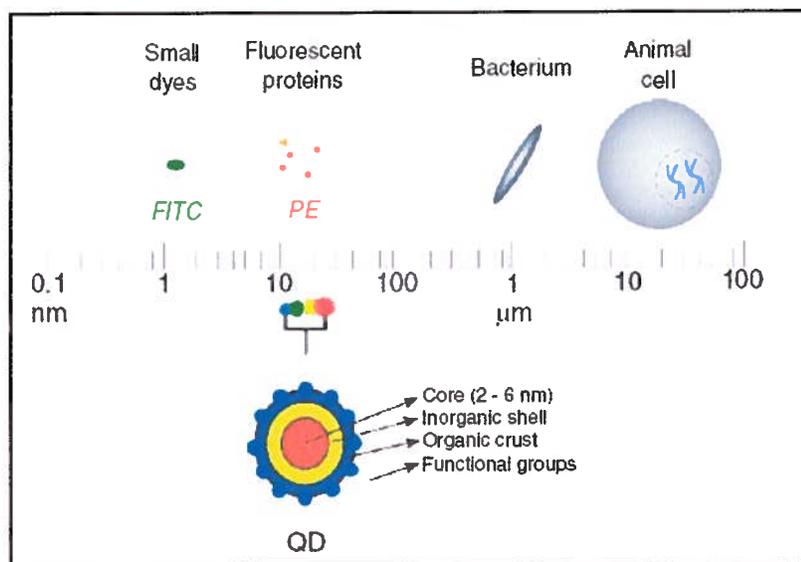


Figure 17 : Dimension de différentes entités biologiques et physiques dont les points quantiques. QDs sont à peu près de la même taille que les phycoérythrine. Extrait de Chattopadhyay et al, 2010. .

Il existe trois genres de nanoparticules (Helland Aasgeir 2006; Nasir 2009) (Tableau 4):

- les particules produites non intentionnellement (ingénierie pétrolière, souderie) ou d'origine naturelle (sel, émission volcanique, feux de forêt) (Moore, Icarus Allen et al. 2006).

- les particules produites dans les usines traditionnelles, comme l'industrie chimique, ou les industries fabricant des polymères (charbon, dioxyde de titane).

-les particules qui sont créées spécifiquement pour leurs propriétés et caractéristiques. Elles existent dans une certaine gamme de taille et sont spécialement fabriquées pour leurs fonctions (nanotubes de carbones, fullerènes, points quantiques voir Annexes 6.2).

En raison de la grande variété de nanoparticules et des méthodes de fabrications, il est difficile d'interpréter et de comparer les résultats (Andrievski 2003) .

Tableau 4 : Sources des différents types de nanoparticules présentes actuellement dans l'environnement (Nasir 2009).

Anthropogénique	Naturel	Accidentel	Fabriqué
Friture	Explosion volcanique	Feux de forêt	Nanotubes de carbone
Cuisine	Océan	Plasma	Points quantique
Sable bitumineux	Biomagnétique	Météorites	Panneaux solaire
Activité minière	Ferritine	Minéraux	Fullerènes
Métallurgie	Virus		Semi-conducteurs
Pots d'échappement	Nuage		

5.2 Historique sur les nanoparticules

L'histoire débute dès 1959 par la remarque de Richard Feynman, lors d'une rencontre annuelle de la Société Américaine de Physique, à l'institut Californien de technologies, en parlant des nanotechnologies : « There is plenty of room at the bottom » (Sastry 2003; Hardman 2006; Maynard 2007). En 1960, le professeur Ryogo Kubo prédisait des grandes avancées dans le domaine de la recherche grâce au développement des nanotechnologies (Hoshino Akiyoshi 2007). En 1986, Eric Drexler évoquait dans son livre « Engines of Creation : The coming Era of Nanotechnology » l'idée d'un futur où l'on pourrait manipuler la matière, atome par atome et ce, dans différents domaines de recherches (Maynard 2007). Cependant, ce n'est que très récemment que les nanotechnologies ont pris un essor fulgurant. En 1998, les premiers tests sur des cellules vivantes pour un marquage cellulaire ont été réalisés par Chan et Nie (Chan and Nie 1998; Smith 2004). L'initiative Nationale Américaine des nanotechnologies (National Nanotechnology Initiative) définissait les nanotechnologies comme « La compréhension et le contrôle de la matière à l'échelle de 1 à 100 nm, ou des phénomènes uniques engagerons de nouvelles applications » (NSET 2004). En 2004, la

Société Royale et l'Académie Royale d'Ingénierie séparaient les termes de nanoscience et de nanotechnologie dans un de leur rapport (Maynard 2007).

“Nanoscience is the study of phenomena and manipulation of materials at atomic, molecular and macromolecular scales, where properties differ significantly from those at a larger scale. Nanotechnologies are the design, characterization, production and application of structures, devices and systems by controlling shape and size at the nanometer scale.”

Quarante ans après la célèbre intervention de M. Feynman, les champs de recherche très variés atteignent des multi-billions de dollars (Maynard 2007). En effet, cette émergence a stimulé un grand nombre de recherches scientifiques et mis l'accent sur le domaine de la physique et de la chimie (Moore, Icarus Allen et al. 2006). D'autre part, depuis ces cinq dernières années, la communauté scientifique s'intéresse de très près aux associations entre les nanoparticules et de la biologie cellulaire (Thurn K. Ted 2007). La pluridisciplinarité devient donc inévitable dans ces cas, et des collaborations entre physiciens, chimistes et biologistes sont à prévoir et ce à travers le monde (Vastag 2004; Paul and Lyons 2008; SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) 2009; Oberdörster 2010).

5.3 Sur le plan structurel, les différents types de nanoparticules

Les nanoparticules forment un grand groupe possédant des catégories de particules différentes (Oberdörster et al., 2005 ; rapport IRSST, 2006). Les nanoparticules peuvent être formées de matériaux tels que le cadmium sélénium (Maysinger 2007), l'or (rapport IRSST, 2006), l'argent (Argyle 2006; Shahverdi, Fakhimi et al. 2007), l'aluminium (Braydich-Stolle 2005), le molybdène (Braydich-Stolle 2005), le polystyrène (Fyneweever 2007) le carbone (Moniruzzaman 2006), le fer (Andrievski 2003), l'oxyde de zinc (Wang 2007), le dioxyde de titane (Oberdörster 1994; Argyle 2006). D'autres nanoparticules sont de natures organiques basées sur du carotène, du lycopène, de la lutéine, de la zéaxanthine, de la asthaxantine etc. (Horn 2001). Les nanoparticules, quelque soit leurs natures, se divisent en six grandes catégories. Elles possèdent chacune des formes et des caractéristiques propres (voir Annexes 6.2). Actuellement elles sont aussi sujette à de nombreux études écotoxicologiques et surveillance en raison de leur large usage et des toxicités observées (Chau, Wu et al. 2007; Oberdörster 2010).

5.3.1 Les Points quantiques (Quantum dots), les nanocristaux ou atomes artificiels

Il s'agit d'un des champs de recherche le plus développé depuis ces 5 dernières années (Zhu W. 2004; Thurn K. Ted 2007). En effet, le haut degré de reproductibilité et le contrôle de la fabrication des points quantiques augmentent l'intérêt porté sur ces matériaux (Empedocles and Bawendi 1999). Les points quantiques de CdSe, qui sont souvent considérés comme des prototypes de nanoparticules colloïdales, peuvent être synthétisés dans des quantités macroscopiques et dont la taille s'étend de 15 à 100Å (Murray 2000). Cependant, peu d'informations sont disponibles pour ce genre de particules et ce, en raison de leur grande variété (Moore, Icarus Allen et al. 2006; Maysinger 2007). En effet, les différentes tailles et formes de points quantiques dans les échantillons induisent un élargissement inhomogène du spectre de lumière (Empedocles and Bawendi 1999) (Figure 18).

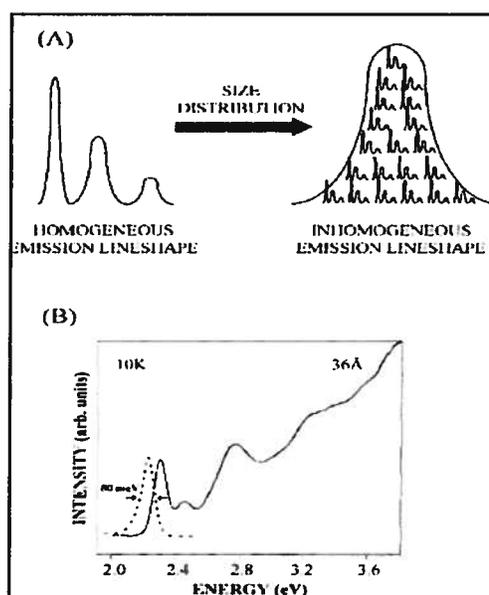


Figure 18 : Réponse non homogène : A) Mesures d'ensemble du spectre d'absorption et d'émission pour un simple nanocristal et dans un échantillon, B) excitation inhomogène pour un spectre d'absorption et d'émission pour un échantillon de 36 Å.

Ils représentent une catégorie spécifique de nanocristal sphérique, colloïdaux semi-conducteurs avec des propriétés uniques d'émission lumineuse (Empedocles and Bawendi 1999; Sutherland 2002; Aitken 2004; Smith 2004; Medintz and Mattoussi 2005; Lovrić 2005a; Gagné, Auclair et al. 2008a). Ils sont retrouvés sous la forme de métaux, matériels magnétiques, d'oxydes métalliques.

D'un point de vue structurel, un point quantique est formé d'un noyau (core) et d'une « coquille » (enrobage, capsule ou shell) et d'un ensemble de couches qui sont susceptibles d'enrober la particule (Figure 19).

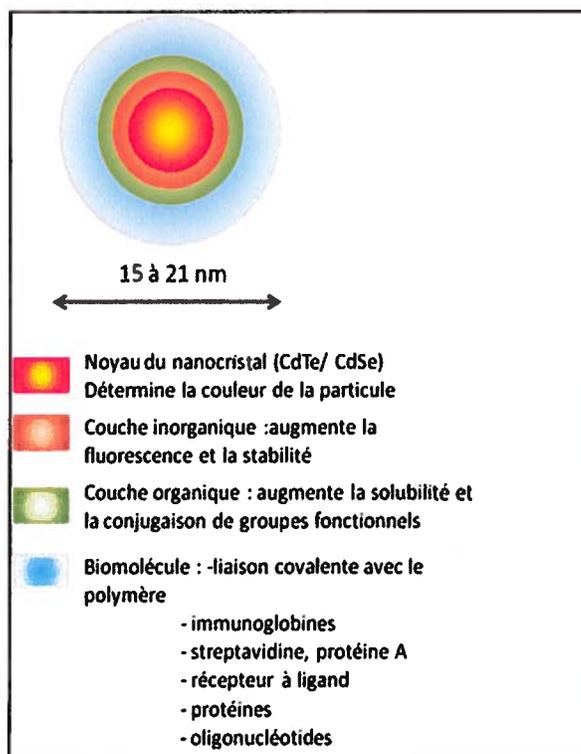


Figure 19 : Structure en plan d'un Point quantique montrant l'agencement des différentes couches de la particule et la nature de celles-ci. Figure adaptée du document général d'Invitrogen® laboratories.

Il est possible que les nanoparticules soient enrobées de différentes couches (ZnS, DHLA acide dihydrolipoïque, ASB (Albumine de sérum bovin), NAC N-Acétylcystéine, polyacrylate), l'enrobage des molécules représente un agent passif stabilisant pour la particule afin de diminuer l'oxydation de sa surface (Derfus 2004; Lovrić 2005a; Gagné, Auclair et al. 2008a) et que les points quantiques ne s'agglomèrent pas (Sutherland 2002; Smith 2004; Wuister 2004). Cette couche entourant le noyau permet aussi d'augmenter la luminescence de la particule (Hikmet 2003). Ceci se fait par l'intermédiaire de longues chaînes aliphatiques ou de « radicaux » stabilisants (acide carboxylique COO-, ou amine NH₃) (Wuister 2004).

Quatre types d'enrobage peuvent être utilisés pour les points quantiques à savoir (Ballou, Lagerholm et al. 2004):

- une première couche organique comme la trioctylphosphine (TOP) ou l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) ou l'hexadécylamine (Kan 2003; Gao 2004). Les groupes

fonctionnels de ces ligands (phosphine, les phosphines oxydes et les amines) s'attachent au point quantique durant sa synthèse. Ces ligands sont hydrophobiques, les particules enrobées de la sorte ne sont donc pas solubles pour des essais aqueux (Sutherland 2002). Mais elles sont solubles dans des solvants non polaires comme l'hexane, le toluène et le chloroforme (Hikmet 2003; Smith 2004).

- une seconde couche permettant la solubilisation en solution aqueuse et la stabilisation des points quantiques doit être déposée. Elle peut être faite de ligands bifonctionnels comme de l'acide mercaptoacétique, qui contient des groupements thiols, ou encore des ligands comme les groupements carboxyle (qui sont très hydrophiliques) (Shiohara, Akiyoshi et al. 2004). D'autre part des ligands, comme l'oxyde tri-n-octylphosphine (TOPO) peuvent permettre la fixation de composé amphiphiliques (acide polyacrylique) souvent noté AMP (Figure 20). Ces polymères contiennent des chaînes alkyles. Cette deuxième méthode est la plus utilisée car elle maintient les propriétés optiques de la particule et permet une meilleure stabilité dans une solution tampon. Cependant, de ce fait, la molécule augmente de taille (Smith 2004).

- une couche de polyéthylène glycol (terminaison par un radical méthoxy). Cette couche est plus communément nommée PEG. Elles sont de deux sortes selon leur poids moléculaire (mPEG-750 et mPEG-5000) (Ballou, Lagerholm et al. 2004).

- Une couche de polyéthylène glycol terminé par des radicaux carboxyl (COOH-PEG-3400) (Ballou, Lagerholm et al. 2004).

D'autre part, ces modifications de surfaces sont employées pour différentes raisons (Thurn K. Ted 2007) :

- augmenter l'absorption cellulaire des nanoconjugués (taille et anticorps) (Gao 2004).
- augmenter la spécificité de l'absorption cellulaire (anticorps et molécules destinés à des fins thérapeutiques (Medintz and Mattoussi 2005)).
- augmenter l'efficacité du marquage intracellulaire ou de la rétention de nanoconjugués (Maysinger 2007).

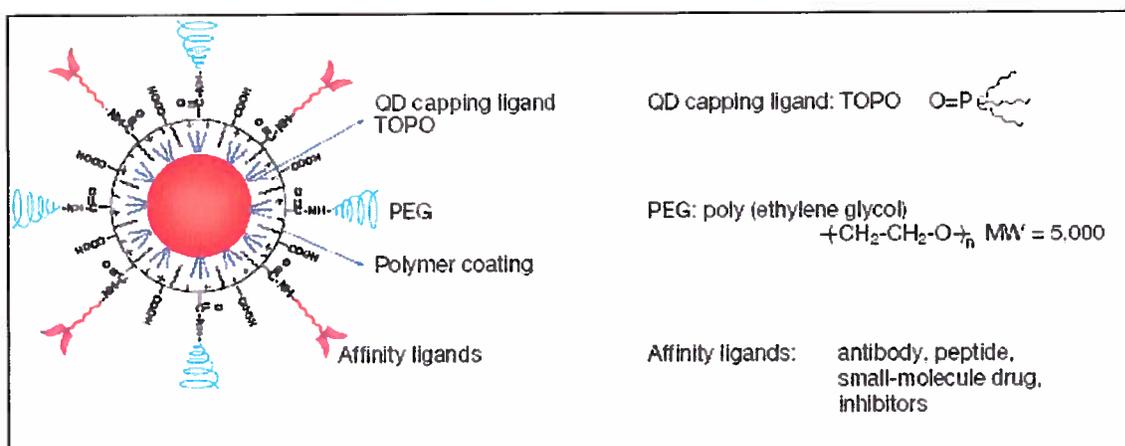


Figure 20 : Structure d'une sonde multifonctionnelle: enrobage d'une couche de TOPO dans une solution aqueuse. Les ligands TOPO se lient avec des ligands hétéro-bifonctionnels (comme des protéines, des anticorps, des petites molécules inhibitrices). Autour de la couche TOPO se trouvent des radicaux carboxyles et amines. La couche de PEG se dépose en dernier. Figure adaptée de Smith et al., 2004

Ainsi les phases d'enrobage (capping) et de conjugaison (bioconjugation) ont lieu très souvent au même moment lors de la synthèse de la particule et augmentent donc l'intégrité de la particule (Sutherland 2002). Il est possible de créer des liaisons covalentes avec des peptides, des anticorps, des acides nucléiques, et avec d'autres molécules de faibles poids (Murphy 2009).

5.3.1.1 Propriétés des points quantiques

En raison de leur taille, les nanoparticules possèdent des propriétés uniques très différentes de celles des protéines et des sondes fluorescentes (Thurn K. Ted 2007). Les points quantiques sont des nanocristaux inorganiques, semi-conducteurs, fluorescents, ils possèdent des propriétés optiques et physicochimiques uniques (Gao 2004; Hardman 2006; Gopee 2007; Smith and Nie 2009).

La fluorescence des points quantiques est influencée par la taille de ceux-ci, plus les particules sont petites plus la fréquence de la lumière émise est faible (Figure 21) (Sutherland 2002).

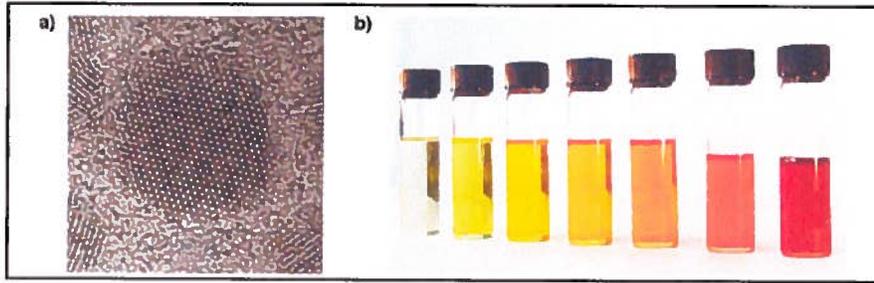


Figure 21 : (a) microscope électronique en transmission montrant des points quantiques (capés avec TOPO) de 4 nm de diamètre et (b) solutions contenant différents types de particules de CdSe. Les tailles de points quantiques vont de 2 nm (à gauche) à 6 nm (à droite). Figure tirée de Sutherland, 2002.

Les nanoparticules sont intéressantes sur le plan de la physique car les points quantiques absorbent l'énergie lumineuse à des longueurs d'ondes supérieures à la plus basse énergie de transition, en d'autres termes les points quantiques convertissent l'énergie lumineuse en une bande passante d'émission étroite (Chan 2008). Les points quantiques présentent de nombreux avantages en raison de leur large bande d'excitation, de leur bande d'émission étroite, à leur résistance au quenching, et surtout grâce à leur stabilité photochimique (Figure 22) (Medintz and Mattoussi 2005; Chan 2008).

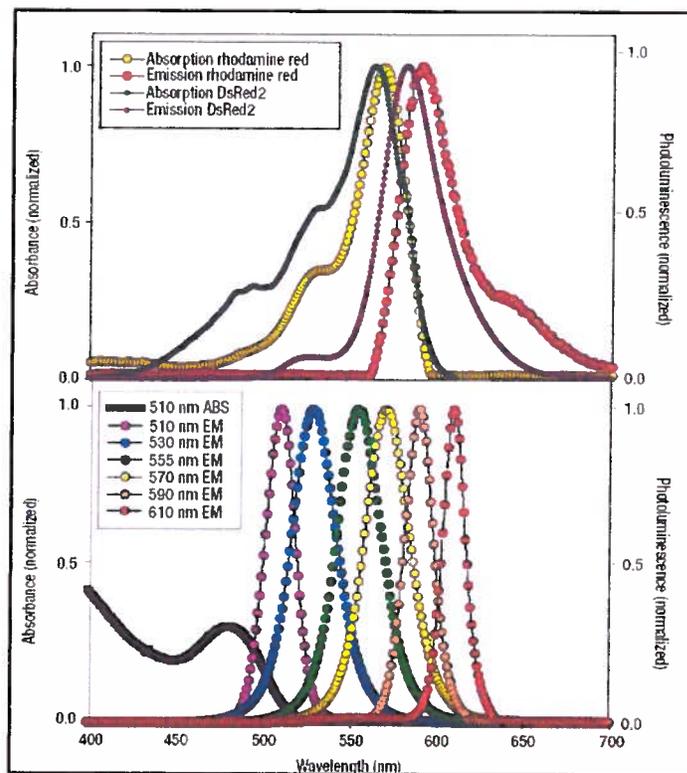


Figure 22 : Différence de spectre lumineux entre une sonde (fluorochrome standard : Rhodamine) et celui de 6 types de nanoparticules différentes (Medintz and Mattoussi 2005).

Les points quantiques sont donc des particules stables, considérés comme des fluorochromes très lumineux, ils ont une bande d'émission lumineuse étroite, une haute absorbance, un très grand déplacement de Stokes, une haute résistance au photoblanchiment, et donc peuvent être excités par différentes couleurs d'émission utilisant une seule longueur d'onde d'émission comme excitant (Åkerman 2002; Ballou, Lagerholm et al. 2004; Chattopadhyay, Stephen et al. 2010).

La photostabilité, qui se définit par un pic d'émission lumineuse très étroit (Gopee 2007; Thurn K. Ted 2007). Les points quantiques ont donc un spectre lumineux dont la longueur d'onde d'absorption est plus petite que celle d'émission contrairement à celui des sondes standards (Ballou, Lagerholm et al. 2004). Le tableau 3 résume convenablement la comparaison entre les points quantiques et les molécules fluorescentes standards utilisées en sciences.

Tableau 5 : Avantages de deux types de sondes lumineuses les fluorochromes standards et les points quantiques.

Propriétés	Sonde Fluorescente	Points quantiques
Bande large d'excitation	x	v
Bande étroite d'émission	x	v
Emission de lumière de haute intensité	modéré	v
Disponible en plusieurs couleurs	v	v
Facilement connectable aux analytes	v	modéré
Résistant aux Quenching	x	v
Photochimiquement stable	x	v
Bon marché et facilement obtainable	v	x

Leurs petites tailles, la nature des conjugués associés aux particules, et leur photostabilité permettent d'utiliser ces nanoparticules en imagerie et de cibler des cellules spécifiques (Ballou, Lagerholm et al. 2004). Les points quantiques pénètrent très bien dans les tissus et peuvent ainsi cibler des tissus et des cellules (Wu 2003). De plus, ils restent longtemps dans le

système circulatoire de l'individu (coefficient d'extinction de 10 à 100 fois supérieur à celui des fluorochromes) (Medintz and Mattoussi 2005). Ce sont donc de bons traceurs médicaux, qui servent très souvent dans le domaine de l'immunotracabilité (Gallego 2006).

5.3.1.2 Domaine d'utilisation

Une grande variété de procédés physiques, chimiques, biologiques, emploient des nanoparticules et les synthétisent (Mohanpuria Prashant 2007).

- La médecine

C'est le principal domaine pour l'usage des points quantiques (Male, Lachance et al. 2008). D'importantes subventions (Vastag 2004; Gallego 2006) sont allouées dans ce sens et beaucoup d'utilisation de nanoparticules sont faites en imagerie médicale (Figure 23) (Brigger, Dubernet et al. 2002; Alivisatos 2004; Ballou, Lagerholm et al. 2004; Hardman 2006).

L'usage des nanoparticules est favorisé dans ce domaine de recherche en raison de la photoémission et de la photostabilité de ces composés (Hoshino Akiyoshi 2007). Ainsi les particules sont aussi bien utilisées pour des expériences *in vitro* et *in vivo* (Medintz and Mattoussi 2005). Ces particules subissent moins la photodégradation due aux lasers tels que ceux des cytomètres en flux (Grieve, Mulvaney et al. 2000; Medintz and Mattoussi 2005). Si bien que les points quantiques très souvent remplacent les billes (fluorochromes) (Grieve, Mulvaney et al. 2000; Lovrić 2005a). Pour les études *in vivo* par exemple, les points quantiques sont utilisés comme agents de contraste ainsi chaque type tissulaire ou cellulaire peut être imagé (Smith 2004). Il est important de noter que la grande surface d'attache des points quantiques permet la fixation de nombreux composés (comme des anticorps, des protéines, des molécules inhibitrices). Ces composés nommés conjugués, situés à la surface des points quantiques, peuvent être des anticorps et vont donc cibler des populations de cellules bien définies (Ballou, Lagerholm et al. 2004).

La « révolution nanoparticulaire » prend toute son importance grâce à l'usage de nanoparticules marquées, les points quantiques peuvent donc être conjugués avec des groupements caractéristiques comme les anticorps et certains types de ligands afin de marquer des cellules cibles telles des cellules néoplasiques (Wu 2003; Brannon-Peppas and Blanchette 2004; Gao 2004). Ainsi les points quantiques portant à leur surface des conjugués spécifiques comme des anticorps, des ligands, des petites molécules qui interagissent avec la surface des cellules cancéreuses sont des priorités en imagerie cancéreuse (Maysinger 2007). Les points

quantiques peuvent aussi marquer des peroxysomes (Colton, Falls et al. 2004), des récepteurs membranaires, de l'ADN (Maysinger 2007) et des gènes (Brannon-Peppas and Blanchette 2004; Maysinger 2007).

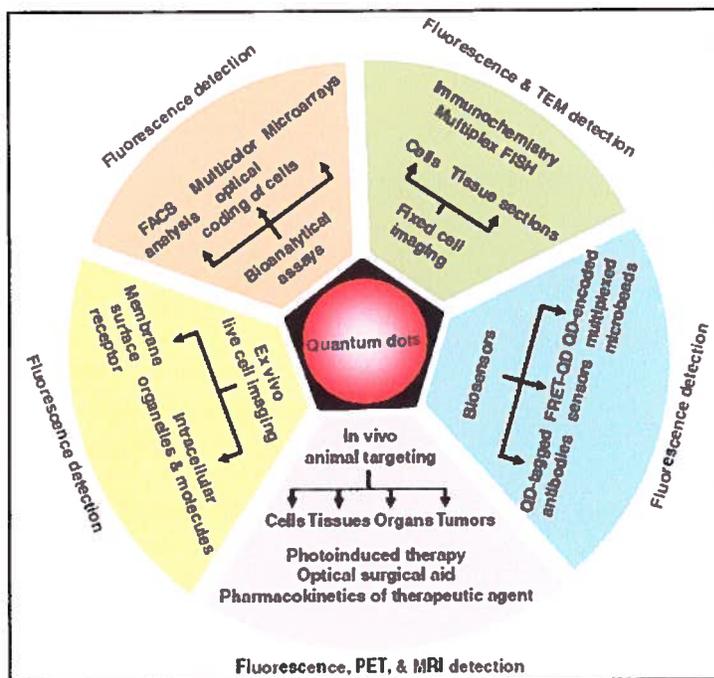


Figure 23 : Récapitulatif des différentes fonctions des points quantiques utilisés en bioimagerie (Michalet et al., 2005).

- Le quotidien

Sur 212 produits de consommation nanotechnique recensés, plus de la moitié d'entre eux (125) se révèlent appartenir à la catégorie « santé et bien être » suivi de la catégorie « électronique et informatique » (30), « maison et jardin » (21) et enfin « produits alimentaires et boissons » (19), le secteur de l'automobile en compte 10 et une catégorie enfant en contient 3. Dans ces groupes de produits, les domaines les plus importants sont les textiles, puis les articles de sport, les cosmétiques, les soins corporels et les protections solaires. Les produits de vitrification par déposition d'une couche nanométrique à la surface des objets courants sont aussi très employés. Les particules remplissent les microfissures à la surface des matériaux et la rende lisse et suppriment tout point d'accrochage avec les poussières, cette technique est utilisée dans le verre à vitre, les revêtements de façade, les cabines de douche, les carrosseries de voitures. En Allemagne, ce principe a été utilisé pour un dentifrice qui vitrifiât les minuscules fissures de l'émail et permettait ainsi aux utilisateurs d'être moins sensibles aux réactions de chaud froid si désagréable pour les dents.

Les nanoparticules sont aussi utilisées dans le domaine des cosmétiques (Hood 2004). En effet, les fullerènes assurent une meilleure conservation des crèmes pour le visage en piégeant à leur surface les molécules responsables du rancissement des graisses. Dans les crèmes solaires le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc sont déjà utilisés pour bloquer les UV.

Dans l'alimentation, les nanoparticules de dioxyde de titane de silicium ou de zinc sont utilisées dans les feuilles ou les bacs plastiques afin d'augmenter leur résistances. Leur application à la surface intérieure des cannettes de bières peut diminuer la perte de gaz carbonique et donc améliorer la conservation du produit. Les nanoparticules se présentent aussi sous la forme d'arômes naturels, de colorants conditionnés sous forme de nanocapsules prête à la dissolution (Ostiguy, Lapointe et al. 2006).

- L'industrie, ingénierie, informatique

Qu'il s'agisse de matériaux d'ingénierie, d'électronique, de plastiques, et d'industries automobiles et aérospatiale les produits de taille nanométrique sont de plus en plus utilisés (Hoshino Akiyoshi 2007). Dans le domaine de l'électroluminescence, les nanoparticules sont utilisées dans les composés électroluminescents tels que les diodes, LED (Hikmet 2003). La couche recouvrant le noyau de la particule est très étudiée car elle doit optimiser la luminescence. Ainsi, il a été démontré que cette luminescence est liée aux orbitales d'énergie et aux nombres d'électrons injectés dans le point quantique (Hikmet 2003).

Dans le domaine de l'ingénierie solaire, de nombreuses recherches s'intéressent aux nanoparticules. Les cellules solaires produisent ce qu'il est communément appelé des couples électrons et « trous » pour chaque photon et ce par le biais d'une réaction d'ionisation (Nozik 2002). Certains panneaux solaires sont basés sur des cellules de Grätzel, ces dernières permettent aussi la transformation d'énergie lumineuse en énergie électrique, ils représentent une combinaison de billes comme agent sensibilisant et d'électrodes faites de nanoparticules afin de séparer les charges électrique. Dans ce domaine les particules les plus utilisées sont celles basées sur du TiO₂ pour les procédés électroniques agissant dans ce type de cellules et les liaisons créées entre les constituants (Grieve, Mulvaney et al. 2000).

L'informatique est un domaine en constante évolution où les nanoparticules sont de plus en plus introduites (Sastri 2003). D'une manière concrète, les spécialistes cherchent à introduire l'ère informatique du nano avec la nanoprocasseur. Ainsi cette technologie de pointe permettrait de grandes avancées dans le stockage de données.

5.3.1.3 Etudes toxicologiques déjà menées sur les QDs

Concernant l'usage de ces nouveaux matériaux, les avis sont très partagés et parfois complètement opposés (Shiohara , Akiyoshi et al. 2004; Thurn K. Ted 2007); mais les premières études de toxicité révèlent qu'il existe bien une cytotoxicité des composés (Oberdörster 2005). Différents tests, sur les effets potentiels des nanoparticules, ont donc été mis en place, et ont révélé des résultats variables, liés à la taille et à la nature de la particule (Oberdörster 2005; Lovrić 2005a) . Il est essentiel de mentionner que des études *in vitro* sur des modèles biologiques, sont souvent menées au préalable d'expériences *in vivo* et ce pour deux raisons : Premièrement car les sondes sont difficiles à inclure dans les cellules et deuxièmement car ces sondes sont potentiellement toxiques (Tableau 6) (Sutherland 2002). Le Tableau 6 regroupe des études en toxicologie menées sur des QDs comportant un noyau de cadmium, ces références sont en partie tirées de Hardman et al.,(2006).

Tableau 6 : Différentes études menées en toxicité des QDs sur différents modèles animaux.

Tissu / Organisme	Type de NPs/ dose	Identification Nom latin	Etude	Effets	Référence
Culture primaire	QDs enrobés de TOPO et solubilisés avec de l'acide mercaptoacétique (0.0625 < 0.25 < 1 mg/ml)	Hépatocytes rats	<i>In vitro</i>	Diminution viabilité avec augmentation des concentrations de QDs Exposition de 8 heures aux UV réduit significativement la viabilité des hépatocytes comparé aux autres temps d'incubation (viabilité moyenne de 6%)	(Derfus 2004)
Lignée cellulaire lymphome T	CdSe/ZnS 10 mg/ml	EL-4 souris	<i>In vitro</i>	Mortalité augmentée avec concentrations en QDs A 0,4 mg/ml après 6h d'exposition	(Hoshino, Hanaki et al. 2004)
Cellules épithéliales de rein	QDs CdSe / ZnS enrobés avec de l'acide mercaptodécanoïque et du sérum d'agneau 3 types de QDs $\lambda = 520, 570, 640$ nm 0 à 0.4 mg/ml 24 h	Singe <i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>In vitro</i>	Diminution de la viabilité cellulaire à 0.1 et 0.2 mg/ml en corrélation avec l'augmentation de concentration	(Shiohara , Akiyoshi et al. 2004)

Cellules phéochromocytes	QDs rouges 640 nm QDs verts 535 nm de 0 à 100µg/ml	Cellules phéochromocytes de rats (lignée PC 12) cellules microgliales de souris (lignée N9)	<i>In vitro</i>	Chromatine condensée déformations de la membrane → cytotoxicité Condensation noyaux (1 jour d'exposition) QDs verts (retrouvées dans le noyau) + toxiques que les rouges	(Lovric 2005a)
Cellules du cancer du sein	CdTe enrobé de MPA 5 ou 10 µg/ml	MCF-7 cellules du cancer du sein Humain	<i>In vitro</i>	Génération d'EOR Réduction du cytochrome c dans les mitochondries	(Lovric, Cho et al. 2005b)
Moule d'eau douce	CdTe (American Dye Source) 24 h à 15°C 0, 1.6, 4 and 8 mg/L CdSO4 à 0.5 mg/L	<i>Elliptio complanata</i>	<i>In vivo</i>	Diminution des cellules immunitaires Capacité cytotoxique des hémocytes à lyser les cellules de mammifères (K-562) fortement augmenté La peroxydation lipidique augmente dans les branchies (5.6 mg/L) et diminué dans la glande digestive (<1.6 mg/L CdTe) Nombre de dommage sur l'ADN : dans les branchies significativement réduit (<1.6 mg/L) CdTe, dans glande digestive ont augmenté (faibles concentration en QDs) augmente fortement (grande concentration)	(Gagné, Auclair et al. 2008a)
Cellules d'intestin	CdTe (American Dye Source) (0,01 -1000 mg de Cd/L) 24h	Caco-2 cellule lignée humain d'intestin	<i>In vitro</i>	Toxicité des nanoparticules à 0,01 mg/L due à leur taille Transport des QDs à travers la membrane intestinale (création de trous à travers la membrane)	(Koeneman, Zhang et al. 2009)
Blastocytes d'embryons	Différentes concentrations de CdSe (encapsulé de TOPO avec et sans ZnS) 0-500 nmol/L QDs 24h	Souris C57BL/6J Et femelles IRC (exprimant un allèle d'un gène)	<i>In vitro</i>	Toxicité plus forte avec l'acide mercaptpropionique, (enrobage non stable), encapsulage avec de la silice-PEG réduit la toxicité. Réduction potentielle du développement embryonnaire post implantation Apoptose cellulaire à 250 et 500 nmol/L (augmentation de 4.2 et	(Chan 2008)

				6.6 / contrôles) Mortalité cellulaire, cytotoxicité, effet tératogène	
Cellules cancéreuses et fibroblastes	CdSe, CdSe / ZnS 18h	NRK fibroblastes, MDA-MB-435S cellules du cancer du sein, CHO, RBL Humain	<i>In vitro</i>	Enrobage de phosphosilicate augmente l'effet toxique (libération Cd ²⁺ à l'intérieur de la cellule). Les enrobages aux polymères ont un effet cytotoxique semblable à celui des nanoparticules de CdSe / ZnS Toxicité est liée à la précipitation des nanoparticules (la méthode dont elles sont enrobées) et au relargage d'ions Cd ²⁺	(Kirchner 2005)
Hépatocytes humains et des cellules cancéreuses du col de l'utérus	QDs CdSe / ZnS enrobés avec de l'acide mercaptodéca noïde et du sérum d'agneau 3 types de QDs λ = 520, 570, 640 nm. de 0 à 0.4 mg/ml/24H	Humain (HeLa)	<i>In vitro</i>	Mêmes résultats que chez le singe Diminution de la viabilité cellulaire pour des concentrations de 0.1 et 0.2 mg/ml corrélation avec l'augmentation de concentration	(Shiohara , Akiyoshi et al. 2004)
ADN	QDs CdSe encapsulé avec du ZnS et de la biotine mis en présence d'UV	Hélice d'ADN (double brin)	<i>In vitro</i>	les radiations et les nanoparticules ont altéré l'ADN → fabrication de radicaux libres de SiO ₂ (résultant de l'oxydation de l'enrobage de ZnS). Proportion d'ADN altérée varie en fonction de la présence (56%) ou de l'absence d'UV (29%).	(Green 2005)
Lignée cellulaire de Souris	Cd/S, Cd/Te 40 nM 30,60 et 120 min	J774.A1 Macrophages de souris	<i>In vitro</i>	Dégradation intracellulaire des QDs à pH 4 Cytotoxicité Réduction significative de l'activité mitochondriale Augmentation significative du relargage du lactate déshydrogénase	(Clift, Rothen- Rutishauser et al. 2008)
cellule leucémique	QDs : CdTe	Cellules K562	<i>In vitro</i>	Toxicité de CdTe ; CdS / CdTe Diminution de la viabilité	(Su, He et al. 2009)

myélogène cellule embryonnaire de rein	CdS / CdTe CdTe/CdS/ZnS 3 µM	HEK293T humain		cellules. Mortalité à 100 % après 48 h Non toxicité de CdTe/CdS/ZnS. A forte concentration durant un long temps d'exposition	
Moule d'eau douce	QDs CdTe (American Dye Source) 24 h à 15°C 0, 1.6, 4 and 8 mg/L CdSO4 à 0.5 mg/L	<i>Elliptio complanata</i>	<i>In vivo</i>	Agrégation des QDs dans la phase particulaire 85% et 15% dans la phase soluble Diminution des cellules immunitaires capables de phagocyter des billes fluorescentes Capacité cytotoxique des hémocytes à lyser les cellules de mammifères (K-562) fortement augmenté La peroxydation lipidique augmente dans les branchies (5.6 mg/L) et diminué dans la glande digestive (<1.6 mg/L CdTe). Nombre de dommage sur l'ADN dans les branchies significativement réduit (<1.6 mg/L) CdTe. Glande digestive, les dommages sur l'ADN ont augmenté (faibles concentration en QDs) augmente fortement (grande concentration)	(Gagné, Auclair et al. 2008a)
Truite arc-en-ciel juvénile	QDs CdTe CdS (Vive Nano) (0,6, 2 et 6 µg/L) CdSO4 (0,6, 1 and 2 µg/L) 48h - 15° C	Leucocytes du pronéphros de truites	<i>In vivo</i>	Augmentation de la sécrétion de métallothionéines Réduction des niveaux d'ubiquitine avec QDs Augmentation du niveau HSP72 Augmentation des niveaux de lactate et de pyruvate	(Louis, Gagné et al. 2010)
Truite arc-en-ciel juvénile	QDs CdTe CdS (Vive Nano) 1, 2 et 6 µg/L	Leucocytes du pronéphros de truites	<i>In vivo</i>	Activation et prolifération des macrophages Induction d'inflammation et stress oxydatif Activation et suppression géniques Induit l'expression génique de	(Gagné, Fortier et al. 2010)

				la vitellogénine	
Souris	QDs CdSe / ZnS	Souris	<i>In vivo</i>	<p>Couche d'enrobage de la particule pouvait altérer la distribution du nanomatériel dans les tissus et les organes</p> <p>Le PEG réduit la capture des QDs dans le foie et la rate (95%),</p> <p>Enrobage prolonge la demi-vie des particules dans le flux sanguin. Autres types d'enrobages (avec ces peptides) augmentent la distribution des particules dans les poumons ou dans les tumeurs du cancer du sein</p>	(Åkerman 2002)
Souris (sang, poumon) Humain (sang)	QDs CdSe/ZnS (Evident Technologies) 1.44-144 pmol/souris 1,2, 24h	Souris male Balb/c Humain	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	<p>Augmentation significative du nombre de neutrophiles et de macrophages suite à l'injection</p> <p>Diminution des lymphocytes</p> <p>Forte toxicité des QDs à fonction carboxyles et amine</p>	(Geys, Nemmar et al. 2008)
Embryon de xenopus	(CdSe) ZnS enrobés avec du n-poly (éthylène glycol) phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) et phosphatidylcoline (PC)	Crapaud (<i>Xenopus</i>)	<i>In vivo</i>	<p>faible activité toxique. anomalies concernant l'aspect des cellules, la mortalité cellulaire, les mouvements cellulaires, l'élongation axiale de l'embryon (doublement de l'axe « spinal » et troncation de la partie postérieure)</p>	(Dubertret and Vincent Noireaux 2002)
Moule d'eau douce	QDs Cd/Te Cd/S (American Dye source) 10 mg/l 24h-15°C	<i>Elliptio complanata</i>	<i>In vivo</i>	<p>Accumulation QDs dans la glande digestive, les branchies et les gonades</p> <p>sécrétion accrue de métallothionéines</p>	(Peyrot, Gagnon et al. 2009)
Poisson	120h 0.2-20 µM de Cd est plus importante que celle du CdCl2	Embryons de poissons <i>Danio</i>	<i>In vivo</i>	<p>toxicités plus élevées pour les QDs que pour des doses de cadmium particulaire équivalent</p>	(King-Heiden, Wiecinski et al. 2009)
Daphnies	QDs CdSe/ZnSe	<i>Daphnia magna</i>	<i>In vivo</i>	Pas de mortalité pour les MPA-	(Kim, Park et

	différents enrobages			QDs	al. 2010)
	50 mg/l et 20 mg/l 48h			Mortalité avec Ga-QDs	
				Production d'EOR à 30 µg/L	

Les QDs CdTe / CdS induisent donc une toxicité cellulaire. Ceci pourrait être du à l'oxydation de l'enrobage de la particule. En effet, le relargage d'ions Cd^{2+} est bien reconnu pour être toxique pour les cellules chez l'humain (Lovric, Cho et al. 2005b). L'encapsulation des points quantiques avec du ZnS tend à réduire cet effet (66% de viabilité) mais la mortalité tombe à zéro si les nanoparticules sont enrobées de 98% de sérum de veau fœtal.

Selon les études présentées précédemment, les QDs CdTe / CdS présentent un risque potentiel pour les organismes, l'usage des points quantiques, *in vivo*, peut donc être remis en question car selon les études de Derfus et al (2003), le cadmium peut être relargué dans la cellule à chaque instant (Derfus 2004). Cependant, l'imagerie par l'intermédiaire des nanoparticules, ne peut pas être remise en question, et il est connu que les effets toxiques varient avec la structure, la taille, l'activité redox et la préparation des nanoparticules. La toxicité cellulaire est dépendante de la concentration en nanoparticules et de la nature cellulaire (Lovric 2005a), il apparaît donc nécessaire de signaler les processus de synthèse, d'enrobage des points quantiques afin de minimiser la toxicité biologique.

5.3.2 Les nanoparticules d'argent

5.3.2.1 Propriétés des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent sont surtout employées pour leurs caractéristiques antimicrobiennes (Lok, Ho et al. 2007; Rai, Yadav et al. 2009; Sharma, Yngard et al. 2009) elles sont aussi beaucoup utilisées pour leur stabilité (Asharani, LianWu et al. 2008a). Les nanoparticules d'argent peuvent être synthétisées de différentes manières, actuellement certaines méthodes dites « vertes » (Sharma, Yngard et al. 2009).

Le plus problématiques avec les nanoparticules d'argent sont les phénomènes de lavage, abrasion, détérioration qui induisent un lessivage des nanoparticules et l'entrée des particules dans le milieu environnant sous différentes formes : nanoparticulaires, agrégat d'argent ou ions solubles (Liu and Hurt 2010). Les propriétés antimicrobiennes sont décuplées avec la diminution en taille de la particule, en effet plus la particule est petite plus la surface totale par unité de volume est forte (Duffin, Tran et al. 2007; Lok, Ho et al. 2007; Carlson, Hussain et al. 2008; Sager and Castranova 2009).

De plus les nanoparticules sont souvent aérosolisées et les expositions aux nanoparticules d'argent se font la plupart du temps soient directement par l'air présent dans l'usine de fabrication de nanoparticules ou par l'air extérieur, celui de l'environnement (Quadros and Marr 2010).

5.3.2.2 Domaines d'utilisation

Du fait de leurs propriétés, les nanoparticules d'argent sont surtout utilisées comme agent antibactérien (Panacěk, Kvitek et al. 2006; Carlson, Hussain et al. 2008; Rai, Yadav et al. 2009; Quadros and Marr 2010). Les nanoparticules sont utilisées dans des domaines très variés. La moitié des nanoparticules produites sont destinées à la fabrication de produit (29%) et l'autre moitié sert à la fabrication de cosmétiques ou aux vêtements et habillement médical (21%).

Pour le quotidien, la plupart des aérosols désinfectants, des déodorants, et des sprays oraux contiennent de l'argent sous forme liquide, les shampooings (sous forme de revêtements solide), les cosmétiques (forme de poudre ou de crème) les lentilles etc. (Santoro, Duchsherer et al. 2007). Les réfrigérateurs, les machines à laver, les détergents à lessive. Mais aussi le domaine de l'alimentation (Chau, Wu et al. 2007), comme les instruments de cuisines, les contenants alimentaires, les biberons pour bébé, les tétines, comme agents de surface. Les nanoparticules sont ainsi enrobées autour des matériaux (Markarian 2002). Les nanoparticules d'argent sont aussi souvent utilisées comme agent antimicrobien dans les textiles (Gupta, Bajpai et al. 2008).

Mais aussi les instruments médicaux comme les cathéters, les systèmes de perfusions, les vêtements textiles, dans les amalgames dentaires, dans les prothèses (Hollinger 1996; Markarian 2002; Gosheger, Hardes et al. 2004; Samuel and Guggenbichler 2004; Blaser, Scheringer et al. 2008; Laban, Nies et al. 2009). D'autre part, les nanoparticules sont aussi employées afin de limiter les infections bactériennes chez les grands brûlés (Jones, Bowler et al. 2004; Ulkur, Oncul et al. 2005; Ahamed, Karns et al. 2008). Elles sont aussi bien sur produites à grande échelle en usine (Wood, Hogstrand et al. 1996) et dans les recycleurs d'air afin de purifier l'air (Sharma, Yngard et al. 2009) et l'eau (Pradeep and Anshup 2009).

Dans le domaine de l'industrie textile, les nanoparticules d'argent ont montré des effets antibactériens. Les particules d'argent fabriqués par *Fusarium oxysporum* peuvent être incorporées aux vêtements d'hôpitaux. Associées à des composés antibiotiques, les AgNPs garantissent une stérilité aux vêtements et minimisent ainsi les infections dues à des bactéries

comme *Staphylococcus aureus* (Sastry 2003; Mohanpuria Prashant 2007; Shahverdi, Fakhimi et al. 2007).

Ainsi, les diverses formes de nanoparticules d'argent employées dans la plupart des instruments du quotidien, mais aussi à grand échelle, rendent la classification des particules difficiles. Peu de documentation existent sur l'incorporation des nanoparticules dans le matériel et comment elles vont être relarguées. Très souvent seulement les indications « inclus nanoparticules d'argent » sont notées sur les produits (Quadros and Marr 2010). Cependant, ces nanoparticules entrent dans l'environnement par lessivage (corrosion des matériaux portant à leur surface des nanoparticules), dans les déchets de traitement (plantes) ou sont relâchées directement dans l'eau (Blaser, Scheringer et al. 2008; Gao, Youn et al. 2009).

5.3.2.3 Études toxicologiques menées sur les AgNPs

La toxicité des nanoparticules d'argent est surtout liée au stress oxydatif. Comme la plupart des métaux l'argent est susceptible de générer des espèces d'oxygénées réactives qui vont être néfastes aux cellules (Argyle 2006). Certaines études ont pu ainsi évaluer la toxicité des nanoparticules sur différents modèles d'animaux et selon les organes / tissus / cellules ciblées (Tableau 7).

Tableau 7 : Différentes études menées sur les nanoparticules d'argent et leur toxicité relative.

Tissu / Organisme	Type de NPs/ dose	Identification Nom latin	Etude	Effets	Référence
Cellule germinales	5, 10, 25, 50, and 100 µg/ml 15 nm	C18-4 (spermatogonie) souris	<i>In vitro</i>	Inhibition de la fonction mitochondriale Augmentation lyse membranaire	(Braydich-Stolle 2005)
Cellule de foie	0, 2.5, 5, 10, 25, 50 µg/ml 15 nm et 100 nm	BRL 3A rats	<i>In vitro</i>	Augmentation de la sécrétion de ROS Réduction de la fonction mitochondriale	(Hussain, Hess et al. 2005)
Cellule souche	25 nm 50 µg/ml	Cells souche de souris	<i>In vitro</i>	Induction apoptose Diminution de la viabilité Dommage sur l'ADN	(Ahamed, Karns et al. 2008)
Cellule	7-10 nm 0, 0,1 ;	HepG2	<i>In vitro</i>	Induction d'hormèse	(Kawata, Osawa et al.

foie	0,2 ;0,5 ; 1 ; 1,5, 2 ; 2.5 ;3 mg/l	humain		Diminution de la viabilité Dommage sur les chromosomes Variation ontologie génique	2009)
Bactérie	0, 25, 50, 75, 100 µg/ml 5 nm	<i>E. coli</i>	<i>In vitro</i>	Change membranaire de surface, lyse membranaire, TEM images	(Morones, Elechiguerra et al. 2005)
Insecte	50 and 100 µg/ml for 24 and 48 h. 10 nm	<i>D. melanogaster</i> (larve)	<i>In vitro</i>	Sécrétion HSP 70 induction P53 Surexpression P 38 Induction d'apoptose Stress oxydative induction SOD, CAT, MDA	(Ahamed, Posgai et al. 2009)
Cellule foie Hépatocyte	0.063, 1.9 , 6.35, 19 mg/L 1,5,10 nm	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>In vitro</i>	Pas d'Induction de ROS Forte cytotoxicité Réduction de l'activité mitochondriale 100% Réduction de l'activité métabolique	(Farkas, Christian et al.)
Cellules cancéreuse col de l'utérus	0,30,60,90,1 20 µg/ml	Hela rate	<i>n vitro</i>	Diminution de la viabilité Induction d'apoptose Induction des gènes des stress (mt-2A, Ho-1)	(Miura and Shinohara 2009)
Macrophages souris Cellules humaines	0 ; 2 ;4 ; 6 ; 10 µM 20, 40, 60 nm (Ted Pella)	RAW264.7 macrophage HCE-T cellule cornéenne	<i>In vitro</i>	Peu d'action bactéricide Activation des cytokines pro inflammatoires (faible)	(Santoro, Duchsherer et al. 2007)
Protéine	0.7 *10 ⁶ g/ml 40 nm	Serum Veau Fétal (SVF)	<i>In vitro</i>	Changement de structure protéique du SVF , modification spatiale Perte des cycles aromatiques des acides aminés	(Liu, Sun et al. 2009)

Cellules poumon humain	0, 25, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 6 à 20 nm	Fibroblaste poumons humain	<i>In vitro</i>	Endocytose et macropinocytose via les clathrines Action s/ le calcium intracellulaire Aberration chromosomale Inhibition prolifération cellulaire déformation cytosquelette	(AshaRani, Hande et al. 2009)
Nématode	0,05 ; 0,1 ; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ≤ 100 nm	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>In vivo</i>	Surexpression génique (M162.5, mtl-2, sod-3, daf-12)	(Roh, Sim et al. 2009)
Poisson d'eau douce	35 nm 0, 0,625, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 mg/L Et < 100 nm	<i>Pimephales promelas</i> (larve)	<i>In vivo</i>	Diminution de la viabilité des embryons Malformation des embryons (déformation craniales, œdème, hémorragies)	(Laban, Nies et al. 2009)
Différents modèles		<i>Danio rerio,</i> <i>Daphnia pulex,</i> <i>Ceriodaphnia dubia,</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>In vivo</i>	Toxicité très forte à de faibles doses	(Griffitt, Luo et al. 2008)
Poisson d'eau douce	1 $\mu\text{g/L}$ et 25 $\mu\text{g/ml}$ 49,6 nm	<i>Oryzias latipes</i>	<i>In vivo</i>	Diminution de la viabilité Induction de stress oxydatif Induction des MT Surexpression génique HSP70, p 53, CYP1A	(Chae, Pham et al. 2009)
Bactéries	8 ; 28 et 35 $\mu\text{g/g}$ Nano aérosolisées	<i>E. coli</i> (ATCC 11775) gram - <i>Bascillus subtilis spizizenii</i> (ATCC 6633) gram +	<i>In vivo</i>	Augmentation du diamètre d'inhibition de croissance Gram + sont plus sensibles que les Gram -	(Yoon, Byeon et al. 2008)
Bactéries	20 μl de 33nM	<i>E. coli</i> (ATCC 43886) <i>S. aureus</i> (ATCC 19636) <i>Levures (mastitis)</i>	<i>In vivo</i>	Forte inhibition de la croissance de bactéries et levure Inhibition différentes selon les types bactériens	(Kim, Kuk et al. 2007)

		<i>bovin)</i>			
Poisson d'eau douce	0, 25, 50, 75, 100 µg/ml 5-20 nm	<i>Danio rerio</i> (larve)	<i>In vivo</i>	Augmentation de la mortalité Malformation du corps Diminution des battements du coeur	(Asharani, LianWu et al. 2008a)
Poisson	0 ; 30 ; 60 ; 120 ; 250 ; 270 mg/L 5-20 nm	<i>Danio rerio</i> adulte	<i>In vivo</i>	Létalité Localisation des NP dans les noyaux et membrane cellulaire Histopathologie : foie Cellules apoptotiques, Condensation chromatine Augmentation de l'induction de MT2 ARNm, Bax Noxa (apoptose)	(Choi, Kim et al.)

Ainsi, la toxicité des nanoparticules d'argent a été observée dans différents modèles d'animaux, dans le milieu aquatique et les plantes (Blaser, Scheringer et al. 2008). Elles sont donc bien toxiques pour les bactéries comme *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Fabrega, Fawcett et al. 2009), les champignons (*Apergillum sp. Penicillium sp.*), et les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* (Navarro, Piccapietra et al. 2008).

5.4 Observation des nanoparticules

Les nanoparticules sont utilisées dans différents domaines de recherche comme il a été mentionné précédemment. Actuellement, il est fondamental de caractériser ces particules et de les observer, étant donné l'importance de leur taille, de leur forme, de leur intégrité, et de leur capacité à s'agréger. Il est donc possible de les observer au microscope optique à épifluorescence (Empedocles and Bawendi 1999) microscope confocal (Carlson, Hussain et al. 2008) et au microscope électronique (à balayage ou en transmission) (Holmes 1997; Morones, Elechiguerra et al. 2005; Maysinger 2007; Mohanpuria Prashant 2007; Thurn K. Ted 2007; Schrand, Schlager et al. 2010) (Figure 24). Dans le cas d'observation sur des organismes entiers comme chez les souris le microscope optique à fluorescence peut aussi être utilisé (modèle microscope inversé Axiovert 135 TV ; (Ballou, Lagerholm et al. 2004).

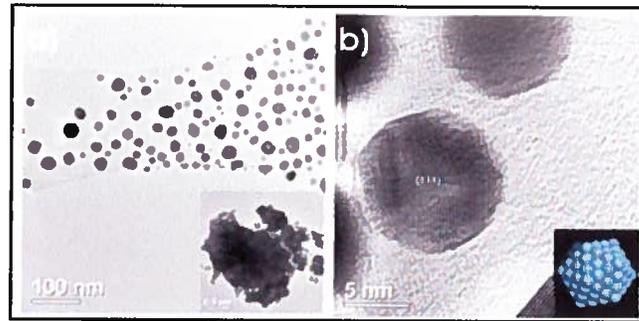


Figure 24 : Structure d'une nanoparticule d'argent observée au microscope électronique en transmission (tirée de Morones et al, 2005).

Ce type de recherche a pris beaucoup d'expansion en raison de la nature même des nanoparticules. Elles sont plus stables et fluorescent plus longtemps (Medintz and Mattoussi 2005; Thurn K. Ted 2007; Chan 2008). Ainsi leur traçabilité est importante pour des durées supérieures à celles des fluorochromes (marqueur FITC).

5.5 Impact des nanoparticules

Les multiples usages des nanoparticules impliquent un fort enjeu économique, ainsi de nombreux pays, tels les Etats unis, l'Europe de l'Ouest, le Japon, la Corée etc. investissent des millions dans les nanotechnologies depuis 1999 (Biswas 2005). De plus, les nanotechnologies atteindraient un budget « mondial » de 1 trillion de dollars (mille milliards) en 2012 (Hardman 2006). De nouvelles interrogations se posent alors : les propriétés uniques de ces particules et les comportements des nouvelles nanotechnologies pourraient-elles engendrer des risques émergents pour la santé et l'environnement ? (Maynard 2007).

En effet, bien que l'attrait pour ces nouveaux matériaux soit exacerbé, peu de recherches ont été menées sur les aspects toxiques de ces particules (Braydich-Stolle 2005; Lovrić 2005a; Argyle 2006; Moore, Icarus Allen et al. 2006; Maynard 2007). Cependant, il apparaît primordial d'évaluer la toxicité des nanoparticules étant donné qu'elles nécessitent l'usage de produits toxiques pour leur fabrication (Sastry 2003). D'autre part, comme il a été évoqué au paragraphe précédent, l'abondance de leur utilisation entraîne forcément des échappées dans l'environnement (Figure 25) (Hardman 2006). De plus, leurs propriétés physiques entraînent une grande mobilité des particules dans l'environnement (Argyle 2006; Koeneman, Zhang et al. 2009). Ainsi, à l'heure actuelle un contrôle des particules de leur toxicité et des impacts nocifs sur les organismes vivant devient prioritaire.

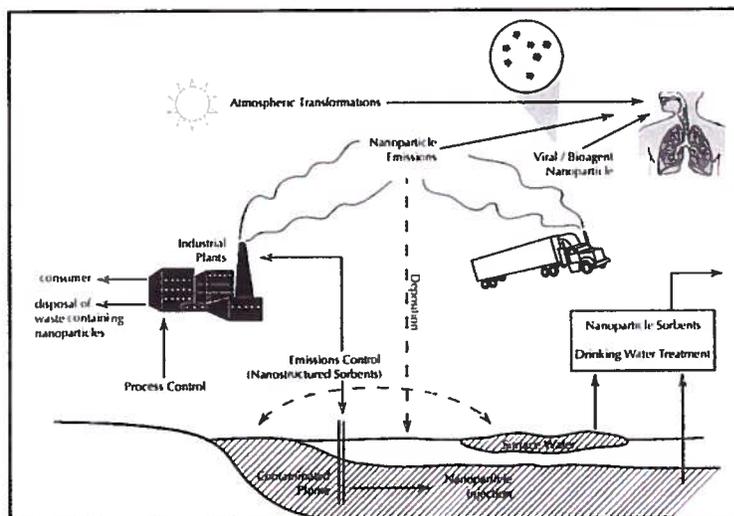


Figure 25 : Représentation schématique de la dispersion des nanoparticules dans l'environnement (tiré de Biswas et Wu, 2005).

Les nanoparticules étant présentes dans l'environnement, les principales voies d'entrée des nanoparticules chez les organismes sont l'inhalation et l'ingestion (Argyle 2006). Chez les animaux terrestres (et les mammifères marins) ces principaux points d'entrée dans le corps d'un organisme vivant sont la peau par voie directe, les poumons par voie respiratoire (inhalation), l'intestin par voie alimentaire (ingestion) (Argyle 2006). Cependant pour les organismes marins, il doit s'agir d'autres voies d'entrée telles les branchies ou tous autres épithéliums (Brigger, Dubernet et al. 2002; Moore 2006). Au niveau cellulaire l'internalisation des particules est réalisée par l'intermédiaire de la voie endosomale et lysosomale (endocytose normale) ou grâce aux lipides membranaires (qui évite ainsi le passage par la voie de dégradation du système endosome/lysosome) (Panyam and Labhasetwar 2003; Zhang and Monteiro-Riviere 2009) (Figure 26).

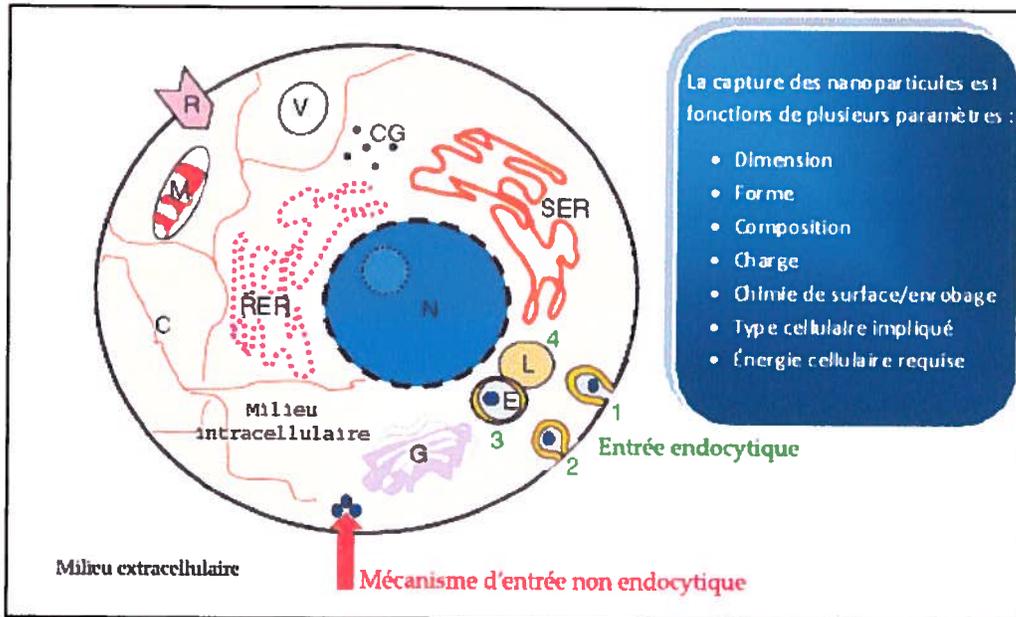


Figure 26 : Différentes voie d'entrée des nanoparticules dans la cellule. Récepteur (R), vacuole (V), mitochondrie (M), granule cytoplasmique (CG), cytosquelette (C), réticulum endoplasmique rugueux (RER), réticulum endoplasmique lisse (SER), noyau (N), Golgi (G), endosome (E), lysosome (L), différentes étapes d'endocytose sont décrites 1-4. Adapté de (Schrand, Schlager et al. 2010). L'endocytose conventionnelle à lieu par l'intermédiaire de clathrines et par des puits sans récepteurs, les nanoparticules sont ensuite transférées au système endosome/ lysosome, ou par simple transcytose (Moore 2006).

Cependant, du fait de leur grande taille, les points quantiques sont trop larges pour pénétrer la barrière endothéliale, et pour être éliminés dans les urines. Mais selon d'autres études sur les hommes, il apparaît évident que les nanoparticules peuvent franchir la barrière épithéliale alvéolaire des poumons et se propager dans l'organisme (Ostiguy, Lapointe et al. 2006). Les nanoparticules « seraient assimilées » par phagocytose, non spécifique, par les cellules immunitaires du système réticuloendothélial, par exemple les macrophages à la surface des alvéoles pulmonaires chez l'humain. Par la suite les nanoparticules seraient transportées dans l'ensemble du système circulatoire (Argyle 2006; Journeay, Suri et al. 2008). Cependant cette phagocytose peut donc induire une inflammation locale et activité l'émission de cytokines (Journeay, Suri et al. 2008). La cinétique de toxicité serait donc différente : pour une toxicité comparable à celle de contaminants, les voies de contaminations et les impacts seraient très différents (Helland Aasgeir 2006). Des chercheurs (Oberdörster 2005) ont trouvé une corrélation entre l'augmentation de cas d'asthme chez l'enfant et l'adulte et l'augmentation de matières particulaires dans l'air ambiant. Ce marquage non spécifique (phagocytose non sélective) peut être réduit avec la couche de PEG et ainsi permettre aux nanoparticules d'acquérir une meilleure circulation dans le système vasculaire mais ce phénomène de

marquage non spécifique ne peut être entièrement solutionné (Ballou, Lagerholm et al. 2004; Smith 2004).

Objectifs de la thèse

La revue de littérature présentée précédemment permet de définir différentes hypothèses de travail et objectifs. La thèse est concentrée sur quatre volets fondamentaux basés sur l'utilisation de biomarqueurs, à savoir l'étude des nanoparticules et la toxicité de celles-ci sur le système immunitaire de différents modèles animaux. Afin d'évaluer la toxicité des ces matériaux émergents, nous avons choisi d'étudier *in vitro* les performances du système immunitaire de quatre modèles d'animaux : l'humain, la souris (*Mus musculus*), la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et la moule (*Mytilus edulis*). Ces espèces ont été définies car elles représentent des espèces sentinelles de leur milieu de vie. Ainsi, ces espèces sont souvent utilisées dans des études écotoxicologiques ou dans les études de risques. Un second volet portera sur la comparaison de l'action des nanoparticules sur les systèmes immunitaires des différentes espèces étudiées. Un troisième volet, plus mécanistique, va permettre de caractériser la toxicité des nanoparticules et son expression. Finalement le dernier volet, *in situ*, étudie la toxicité des nanoparticules chez des organismes bivalves déjà stressés par leurs milieux de vie.

Dans un premier temps, nous devons déterminer l'impact de ces contaminants émergents sur les performances du système immunitaire. Selon la littérature, il a été récemment démontré que les nanoparticules induisaient une certaine toxicité. Nous avons donc émis l'hypothèse que les nanoparticules seraient susceptibles d'induire une toxicité sur les cellules immunitaires. Par ailleurs, il est connu que les différentes espèces appartenant à plusieurs niveaux trophiques possèdent une complexité immunitaire variable. Nous avons émis l'hypothèse que les performances des systèmes immunitaires de ces différentes espèces seraient probablement variables suite à l'exposition au NPs.

Afin de répondre aux hypothèses du premier volet de la thèse, certains objectifs ont été fixés :

- Mettre en place des protocoles d'évaluation de la toxicité des points quantiques et des nanoparticules d'argent chez différentes espèces animales.
- Définir s'il y a une toxicité de ces nanoparticules
- Évaluer si les particules utilisées dans le projet ont des toxicités différentes
- Évaluer la toxicité des nanoparticules selon les différents modèles d'animaux

Dans un deuxième temps, nous devons déterminer si la toxicité des nanoparticules était influencée par leur chimie, par la nature du métal les composants et par leurs tailles. Selon la littérature, il semblerait que la taille des particules influe sur l'assimilation cellulaire de celles-ci. D'autre part, selon certains auteurs la toxicité des nanoparticules serait principalement due au relargage des ions métalliques toxiques, dans le milieu, lors de sa dégradation. Ainsi nous avons émis l'hypothèse que la toxicité serait liée à l'ensemble des paramètres précédemment énoncés. Ainsi les différents objectifs suivants vont permettre de répondre à ces hypothèses :

- Étudier la chimie des particules (dispersion dans leur matrice, forme, concentration en métaux)
- Comparer les effets immunotoxiques des nanoparticules (QDs et AgNPs) vs métaux qui les composent
- Évaluer si la taille des particules a une influence sur sa toxicité

Dans un troisième temps, nous devons déterminer les mécanismes de toxicité induit par les nanoparticules. Selon la littérature, la toxicité des nanoparticules seraient imputables à des phénomènes de stress oxydatifs. De plus, la cytotoxicité des nanoparticules entrainerait des phénomènes d'apoptose et de nécrose cellulaire. Ainsi nous avons émis l'hypothèse que la toxicité des AgNPs et des QDs serait liée à des phénomènes semblables.

Ainsi les différents objectifs suivants vont permettre de répondre à ces hypothèses :

- Analyser les différentes réponses immunitaires engendrées par les nanoparticules
- Visualiser ces contaminants au sein des cellules immunitaires

Dans un quatrième temps, nous devons déterminer le niveau de toxicité des nanoparticules sur des organismes déjà perturbés par leurs conditions environnementales. Nous avons émis l'hypothèse que des organismes, déjà perturbés par des contaminants présents dans leur milieu de vie, seraient susceptibles d'être sensibilisés à une contamination de nature chimique (les nanoparticules).

Ainsi, les études de terrain en France et au Québec vont permettre de:

- Caractériser les différents sites d'étude sélectionnés à l'aide des biomarqueurs utilisés
- Évaluer la toxicité des particules dans des études environnementales

En annexe, les projets complémentaires vont être présentés, ceux qui ont été réalisés en collaboration (Environnement Canada).

Chaque volet de la thèse possède donc des objectifs spécifiques. L'objectif principal est de suivre une gamme dose réponse de concentration de nanoparticules (de différentes natures) à l'aide de plusieurs biomarqueurs de cellules immunitaires. Afin de remplir ces trois volets, deux types d'expériences vont être utilisées :

-les expériences *in vitro*, ce sont des expériences sur des cellules (extraites de l'organisme).

Les quatre parties de la thèse seront expérimentées *in vitro*, en expositions aiguës (contaminants nanoparticulaires).

-les expériences *in situ*, ce sont des expériences dans différents sites de recherches (Saguenay, Bretagne). Ces expériences serviront à l'évaluation *in situ* de « l'état de santé » des populations de bivalves et à la traçabilité de contaminants émergents (nanoparticules).

Afin d'atteindre les différents objectifs, des expériences réalisées à l'aide de biomarqueurs vont être utilisées. Un biomarqueur représente une signature biologique de l'impact ou de la présence de xénobiotiques dans l'organisme, et non la mise en évidence directe de celui-ci (Sarkar, Ray et al. 2006). Les tests de biomarqueurs décrivent les conditions environnementales comme des manifestations de stress chez certaines espèces clés (Bowen and Depledge 2006). Ils sont le premier signal d'une perturbation environnementale, et sont très utilisés auprès des espèces sentinelles dans l'évaluation de risques (Lower and Kendall 1990; Fournier and De Guise 2004; Nigro, Falleni et al. 2006). Depuis les deux dernières décennies, la science des biomarqueurs a considérablement pris de l'ampleur (Gestel and Brummelen 1996; Au 2004). Actuellement, de nombreux biomarqueurs sont utilisés dans le cadre de biomonitoring de population de bivalves (Sauve, Brousseau et al. 2002; Au 2004; Bowen and Depledge 2006; Neuberger-Cywiak 2007; Viarengo, Dondero et al. 2007) mais aussi pour les poissons (Wester 1994). D'autre part, les souris sont aussi beaucoup utilisées dans les tests d'évaluation de risque (Nassimi, Schleh et al. 2009). L'utilisation de biomarqueurs immunotoxicologiques dans ces programmes de suivi, implique différents niveaux d'intégration à savoir :

-Niveau génotoxique

-Niveau cellulaire et moléculaire (Van der Oost, Beyer et al. 2003) . Par définition, les biomarqueurs sont sensibles au stress au niveau cellulaire et moléculaire. Ils peuvent être rapidement activés, et ce, dès les premiers signaux des effets toxiques sur les organismes.

-Niveau tissulaire

-Niveau organisme. Les biomarqueurs peuvent indiquer la capacité potentielle d'un organisme à survivre.

Un biomarqueur peut prendre toutes les formes d'essais. Depuis l'évaluation histologique des dommages tissulaires, aux essais moléculaires pour mesurer par exemple l'activité oxydative. Certaines contaminations sont souvent associées à certains biomarqueurs comme les métallothionéines lors de pollutions aux métaux lourds (Burnett 1997). Ces contaminations sont parfois détectables à faibles doses et peuvent parfois induire une croissance cellulaire ou une fonction cellulaire. En effet, en raison de la communication cellulaire, de nombreux signaux extracellulaires peuvent être interprétés par les cellules du milieu intracellulaire et induire des réactions spécifiques (Burnett 1997).

Les biomarqueurs permettent d'avoir des réponses histocytologiques faciles à déterminer et qui permettent d'avoir une bonne idée de la santé et de la fitness à l'échelle de l'individu. Par extrapolation, il est possible de définir l'état de santé d'une population entière (Van der Oost, Beyer et al. 2003; Au 2004).

CHAPITRE 1 : IMMUNOTOXICITÉ DES NANOPARTICULES

INTRODUCTION DU CHAPITRE 1 :

Actuellement le domaine des nanoparticules connaît un véritable essor, beaucoup de recherches sont menées en toxicologie sur des lignées cellulaires (Kirchner 2005) ainsi que sur des expositions *in vivo* (Mortensen, Oberdörster et al. 2008), attestant des effets néfastes de ces nouveaux matériaux sur l'intégrité cellulaire (Fent 2010). Toutefois, peu d'études sont menées sur les performances du système immunitaire exposé aux nanoparticules. Notre étude va donc porter sur deux types de nanoparticules très utilisées dans le domaine médical : les nanoparticules de cadmium (Cd/S, Cd/Te) aussi nommées points quantiques (QDs) et les nanoparticules d'argent (AgNPs). Le premier chapitre de cette thèse vise à étudier la toxicité potentielle de ces nanoparticules sur les performances des cellules du système immunitaire des différents modèles d'animaux. Dans un premier temps les impacts des deux types de nanoparticules vont être étudiés sur les différentes cellules. Dans un deuxième temps, une comparaison des performances du système immunitaire des différentes espèces va être quantifiée.

La première section de ce chapitre va permettre d'évaluer la potentielle toxicité de nanoparticules utilisées dans ce projet, à savoir les QDs et les AgNPs. Cette caractérisation nous a permis d'établir les doses d'exposition à utiliser.

Il a déjà été démontré que les nanoparticules de cadmium présentaient une toxicité pour les organismes (Lovric, Cho et al. 2005b; Hardman 2006; Chan 2008). Des effets cytotoxiques ont été mis en évidence pour des cellules de souris et d'humain. Cette cytotoxicité serait principalement liée aux ions Cd^{2+} émis lors de la dégradation des particules. Les ions cadmium sont en effet très connus pour leur toxicité depuis les épisodes d'intoxication que le Japon connu en 1950. (Nogawa 1981). Les points quantiques (QDs) seraient aussi à l'origine de phénomènes de stress oxydatif et d'expression de métallothionéines chez de nombreuses lignées cellulaires (Kirchner 2005). De même, les nanoparticules formées d'argent sont souvent employées pour leurs propriétés antimicrobiennes (Argyle 2006; Carlson, Hussain et al. 2008; Edwards-Jones 2009). L'effet inhibiteur sur les fonctions cellulaires des ions argent est bien connu chez les bactéries (Miura and Shinohara 2009; Rai, Yadav et al. 2009). En effet, la forme ionique serait toxique en raison de son inactivation des groupements thiols et des enzymes vitales, engendrant des phénomènes apoptotiques. De plus, elle serait responsable de la réduction de la fonction mitochondriale et de l'induction de stress oxydatif (Morones, Elechiguerra et al. 2005).

A l'heure actuelle, très peu d'études sont faites sur le système immunitaire et l'action des nanoparticules sur ce dernier. De plus, aucune n'a été réalisée sur plusieurs types de cellules du système immunitaire exposées aux QDs et AgNPs. Pourtant, le système immunitaire est la barrière de défense de l'organisme par excellence (Kuby, Goldsby et al. 2001). Le système immunitaire joue à la fois un rôle protecteur au niveau des organes, de la génération cellulaire, de la prolifération et de la différenciation cellulaire. C'est pour ces raisons, qu'une atteinte au système immunitaire est considéré comme prioritaire (Cabassi 2007). Dans cette première section, les objectifs seront d'évaluer la toxicité potentielle des nanoparticules de cadmium et d'argent selon les différents modèles d'animaux choisis préalablement et de définir si les nanoparticules sont des substances néfastes pour ceux-ci. Ces modèles représentent différents maillons de la chaîne alimentaire, mais aussi des espèces sentinelles de leur milieu de vie (Lower and Kendall 1990; Hayes 2007). Ainsi, la moule bleue a été sélectionnée car il s'agit d'une espèce sentinelle du milieu marin. Elle est utilisée dans les études toxicologiques en raison de son mode de vie sessile et du fait qu'elle filtre en permanence la colonne d'eau (Sauve, Brousseau et al. 2002). La truite arc-en-ciel sert aussi de modèle environnemental sensible, souvent utilisée dans le cadre d'études écotoxicologiques pour les pollutions présentes à la fois dans les eaux douces et dans les eaux de mers. (Zhou, Zhang et al. 2008). Finalement, la souris et l'homme sont des modèles principalement retrouvés dans les études de risques qui visent à évaluer la toxicité potentielle d'un composant sur l'homme.

Ces différents modèles d'animaux vont donc permettre de tester les performances des systèmes immunitaires lorsque ceux-ci sont mis en contact avec des contaminants émergents, tels que les nanoparticules. Ce projet est basé sur l'étude des différentes cellules immunitaires présentes chez ces modèles animaux, à savoir : les monocytes et neutrophiles (sang périphérique humain), les macrophages (tissus de souris et de truite), les lymphocytes (sang et tissus d'humain, de souris et de truite) et les hémocytes (hémolymphe de moule). De plus, de récentes études ont démontrées que les nanoparticules pouvaient pénétrer le système immunitaire par phagocytose et endocytose (Bartneck, Keul et al. 2009; Yang, Zhao et al. 2010; Yue, Wei et al. 2010). Ce qui nous laisse penser que ces derniers peuvent avoir une réelle influence sur l'immunocompétence des organismes ciblés.

Partant de l'hypothèse que la toxicité de certaines nanoparticules a été étudiée, nous allons tenter de démontrer que les nanoparticules d'argent (AgNPs ViveNano[®]) et de cadmium (QDs) sont toxiques pour les cellules immunitaires de 4 modèles animaux selon une gamme dose effet. Nous nous attendons donc à observer ce genre de réactions pour les cellules

immunitaires. Ainsi, des phénomènes d'immunostimulation ou d'immunodépression sont susceptibles d'être observés. Connaissant l'étroite relation des systèmes immunitaires acquis et innés, des perturbations de ces derniers chez les 4 modèles sont à prévoir. Le but de ce chapitre va donc être d'évaluer la réponse du système immunitaire lors d'exposition *in vitro* à des nanoparticules commerciales.

La deuxième section de ce chapitre va permettre de comparer les performances *in vitro* du système immunitaire des différents modèles animaux étudiés.

En effet, chacun des modèles choisis étant une espèce sentinelle d'un milieu de vie particulier, ils sont souvent utilisés en écotoxicologie afin de pouvoir anticiper les risques liés aux nanoparticules. Le but de cette section 2 va donc être de déterminer l'espèce ou les espèces la ou les plus sensible(s) aux QDs et AgNPs. Ceci dans l'objectif d'évaluer quel est le ou les modèle(s) le ou les plus représentatif(s) pour des études d'évaluations de risques.

De plus en plus d'études se sont concentrées sur les effets cytotoxiques des nanoparticules, sur des lignées humaines, afin d'analyser les risques potentiels représentés par les nanomatériaux (Royal Academy of Engineering 2004; Oberdörster 2005; Maynard, Aitken et al. 2006; Moore, Icarus Allen et al. 2006). Beaucoup d'entre elles concernent les cellules de mammifères, les lignées cellulaires et les bactéries (Baun, Hartmann et al. 2008). Certaines études sont aussi réalisées sur des organismes aquatiques, principalement des poissons et des invertébrés (Lovern, Strickler et al. 2007; Gagné, Auclair et al. 2008a). Souvent les études sont menées sur la toxicité de plusieurs nanoparticules comme les recherches de Farkas et al, 2009 qui ont étudié l'effet des nanoparticules d'or et d'argent sur des hépatocytes de truite arc-en-ciel (Farkas, Christian et al. 2009). Toutefois, peu d'études ont comparé différents modèles animaux appartenant à différents niveaux trophiques.

Les différences de réponse immunitaire sont souvent liées aux types cellulaires, à la métabolisation des contaminants, à la dose de contaminants exposés. Donc, chaque type cellulaire réagit différemment à une exposition aux nanoparticules. D'autre part, il est important de mentionner que les systèmes immunitaires des différents modèles ne sont pas tous aussi complexes (Nappi 2000; Cooper and Alder 2006). Bien que le système immunitaire chez tous les organismes ait un rôle de protections contre les agents microbiens et rejettent tous les composant du non soit, il existe des différences inter-espèces (Galloway and Depledge 2001). Les modèles d'animaux choisis présentent à la fois des similarités et des différences d'organisation du système immunitaire (Salo, Dautremepuits et al. 2005; Cooper

and Alder 2006). En effet, tous les organismes présentent un système immunitaire non adaptatif c'est-à-dire, un système inné, non spécifique, non anticipatoire, non clonal, cependant les vertébrés possèdent en plus un système immunitaire acquis, qui est adaptatif, anticipatoire, clonale et combinatoire (Cooper 2003). Chez les vertébrés, le système immunitaire acquis est basé sur des cellules lymphoïdes et non lymphoïdes communicants via des molécules messagères. Quant au système immunitaire inné, il est principalement basé sur des cellules phagocytaires. Chez les invertébrés, la seule réponse du système est innée mais possèdent des mécanismes de défenses hôte pathogènes très développés (Galloway and Depledge 2001). Le système de défense des invertébrés varie de celui des vertébrés selon les critères suivants (Galloway and Depledge 2001) : 1) Il n'y a pas de mécanismes de développement de tissus lymphoïdes ni de coopérations cellulaires durant des mécanismes de défenses. 2) Les mécanismes de défenses tels que les immunoglobines sont absents. 3) La reconnaissance des molécules de surface via les immunoglobines est absente cependant les mécanismes de reconnaissance du soi et du non soi sont présents.

Les différents modèles d'étude sont susceptibles de ne pas présenter le même seuil de toxicité aux nouveaux matériaux (Ostiguy, Lapointe et al. 2006). Ainsi, il est important de comparer les sensibilités des différentes espèces afin de pouvoir identifier les espèces les plus à risque (Fournier, Cyr et al. 2000). D'autre part, comme il a été évoqué précédemment les espèces utilisées dans ce projet présentent des différences de système immunitaire. Certaines espèces utiliseront préférentiellement la phagocytose que la composante humorale lors de la réponse immunitaire (Fournier, Cyr et al. 2000).

Actuellement, les données d'écotoxicologie mettent sur l'importance de la stabilité, de la taille, de la forme, de l'agrégation, de la concentration en métal, de la distribution des nanoparticules et de la solubilité (Gwinn and Lang ; Oberdörster 2010). Mais, il est aussi important de pouvoir comparer la toxicité des différentes nanoparticules pour un modèle d'étude donné. Ainsi des différences de sensibilité entre les espèces et entre les nanoparticules sont des informations clés pour la caractérisation de la toxicité des nouveaux matériaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. Obtention et purification des leucocytes humains

Des échantillons de sang frais ont été rassemblés de 3 donateurs, supposés sains n'ayant jamais été confrontés aux nanoparticules, de l'Institut National de la Recherche Scientifique, à l'Institut Armand Frappier (INRS-IAF). Ces échantillons ont été prélevés par ponction

veineuse d'un des membres supérieurs, ainsi environ 60 ml de sang total ont été rassemblés pour chaque donneur. Le sang a été immédiatement purifié sur un gradient Lympholyte H. Cette méthode permet d'enlever les débris cellulaires, les cellules mortes et une partie des érythrocytes. Ainsi seul les cellules immunitaires suivantes : les monocytes et les lymphocytes sont conservées. Brièvement, le sang a été dilué 1 : 1 (v : v) dans du tampon phosphate (PBS), la suspension cellulaire a été soigneusement mise sur un gradient de purification de mammifère, Lympholyte H (1.086 g/ml; Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Canada). Les leucocytes ont alors été isolés par centrifugation pendant 20 minutes à 800×g. La couche de leucocytes a été lavée trois fois avec PBS à 800×g et resuspendue dans du milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Sur, le Canada) complété avec HEPES (10mM/L) (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 1% pénicilline (100 U/ml)/ Streptomycine (100 mg/ml) (Sigma, ON, Canada), and 10% (v : v) de sérum humain inactivé (Sigma, ON, Canada). Puis les cellules vivantes ont été comptées à l'aide d'un Coulter Beckmann, 100 µl de cellules ont été placées avec 10 ml de liquide à scintillation, durant 1 min les événements de plus de 6 µm ont été comptés permettant ainsi de calculer la concentration cellulaire (la mesure a été répétée 2 fois).

2. Obtention et purification des leucocytes de souris

Des souris femelles C57Bl/6 âgées de 4-6 semaines ont été achetées à la compagnie Charles River, Canada (St Constant, QC, Canada). Elles ont été placées dans des cages d'exposition avec un cycle de lumière automatique de 12 heures de jour / 12 heures de nuit. Elles ont été alimentées avec un régime de rongeur standard et une eau du robinet *ad libitum* pour l'acclimatation de 2 semaines. Toutes les conditions de bons traitements aux animaux ont été respectées dans cette expérience. Après, les souris ont été anesthésiées à l'aide d'un système d'anoxie au CO₂. La rate a été prélevée aseptiquement et a été broyée dans le milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Puis, la suspension cellulaire a été filtrée à travers une laine nylon (inclue dans des pipettes Pasteur). Les cellules ont par la suite été lavées deux fois dans du RMPI et ensuite récupérées par centrifugation à 250×g pendant 10 min. Puis, les cellules ont été suspendues dans du milieu RPMI-1640 complété avec HEPES (10mM/L) (Sigma-Aldrich, ON, Canada), pénicilline de 1 % (100 U/ml) / Streptomycine (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) et 10 % (v : v) de sérum de veau fœtal inactivé (SVF) (Sigma-Aldrich, ON, Canada). La viabilité cellulaire a été déterminée par l'exclusion au bleu de trypan au microscope.

3. Obtention et purification des leucocytes de truites

Les poissons, exempts de toutes maladies et contaminations chimiques, ont été obtenus du Centre Saint Laurent (Environnement Canada, Montréal, QC) et ont été anesthésiés avec 0.1 % de MS-222 (Tricaine Methanesulfonate) (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Pour chaque animal, le pronéphros a été prélevé dans des conditions stériles (sous hotte à flux laminaire). Les tissus ont été et homogénéisés sur une grille en acier inoxydable stérile avec du milieu de culture RPMI 1640 sans bicarbonate (Sigma-Aldrich, ON, Canada) complété avec de l'héparine (10 U/ml) (CDMV, Qc, le Canada), de l'HEPES (10mM) (Sigma-Aldrich, ON, Canada), de la pénicilline (100 U/ml) / Streptomycine (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) et 10 % de sérum de veau fœtal inactivé (SVF) (Sigma-Aldrich, ON, Canada), ajusté à pH 7.2. Les cellules ont été isolées par centrifugation sur un gradient Lympholyte-M (densité =1.085; Cedarlane, ON, Canada) à 600×g pendant 20 minutes, et à température ambiante. Les cellules ont été isolées et lavées deux fois dans PBS (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Finalement, les cellules ont été resuspendues dans du RPMI sans bicarbonate, contenant 10 % SVF, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et 10 mM HEPES, pour les tests de phagocytose et de viabilité. Pour la transformation lymphoblastique, les cellules ont été resuspendues dans du RPMI sans bicarbonate, contenant 10 % SVF, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 10 mM HEPES et 3.6 µl/L de β-βmercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, ON, Canada).

4. Obtention et préparation des hémocytes de moules

Les moules adultes utilisées dans le projet étaient de l'espèce *Mytilus edulis*. Ces moules sont élevées sur des boudins dans la lagune du Havre-aux-Maisons, Québec, Canada. Par la suite, elles sont expédiées dans une glacière à l'Aquarium de Québec (QC, Canada) où elles vont être acclimatées avant d'être réexpédiées à l'INRS-Institut Armand Frappier à Laval. L'hémolymphe des moules a été ponctionnée dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue 23G puis immédiatement transférée individuellement sur la glace afin d'éviter l'agrégation des hémocytes (Auffret and Oubella 1997; Braydich-Stolle 2005; Araya, Siah et al. 2008). Avant les expériences d'exposition, un compte initial d'hémocytes de moules individuelles (cellularité) et une viabilité individuelle initiale ont été déterminés à l'aide d'une trousse ViaCount (Guava des Technologies, CA, USA). Les résultats ont été lus avec un cytomètre en flux (Guava PCA Cytometer). Cette étape a permis de sélectionner les individus en excluant ceux dont les prélèvements présentaient des gamètes (événements facilement identifiables avec le cytomètre car ils sont de petites tailles et petites complexités). De même,

les prélèvements qui présentaient trop de débris ont été filtrés sur une membrane de nylon 80 µm. En plus, des deux critères précédents, seuls les individus dont les viabilités étaient > 80% ont été conservés et ceci afin d'optimiser et standardiser les tests. Des « pools » d'hémocytes (n= 9) ont été réalisés avec les individus sélectionnés, afin d'avoir un volume cellulaire suffisant pour évaluer toutes les conditions d'exposition. Finalement, les cellules ont été exposées à une gamme dose effets de nanoparticules.

5. Caractérisation des nanoparticules utilisées dans le projet de recherche

5.1 Les nanoparticules de cadmium de Vive Nano® ou Quantum dots (QDs)

Les nanoparticules de Cd/S Cd/Te utilisées dans le projet de recherche sont achetées de la compagnie Vive Nano® (Toronto, ON, Canada, <http://www.vivenano.com/index.html>). Ces particules sont faites d'un noyau de cadmium/tellure (7 % de CdTe en poids sec, le contenant métallique dosé par ICP < 97% CdTe) et enrobées avec un polymère de dérivé d'acide polyacrylique comportant des groupements COOH à la surface du point quantique. Cet enrobage sert de façon à stabiliser et à empêcher l'agrégation de particules dans la solution. De plus, cet enrobage permet de stabiliser la taille moyenne des particules à 2-5 nm. Ces particules sont vendues dans une solution aqueuse de couleur ambrée, à pH de 6-8. La concentration de la solution mère des QDs est de 20 mg/ml. La solution est stable 6 mois si elle est conservée à 4°C. Toutes les expériences qui ont été menées dans ce projet ont été réalisées avec des QDs durant les six mois suivant la réception des particules.

D'autre part, ces nanoparticules sont très fluorescentes et peuvent être excitées à des longueurs d'onde inférieures à 500 nm puis émettent à 530 nm. Ces dernières possèdent un spectre d'émission étroit, mais beaucoup plus fort que les billes organiques (fluorescéine). Les QDs peuvent être conjugués à des composés aminés dans des conditions neutres. La gamme dose réponse des QDs a été mise en place avec la concentration de la solution mère, dite pure. Des dilutions série par deux ont permis de faire les différentes concentrations testées. Les équivalents en concentration en cadmium ont été calculés grâce aux mesures de la compagnie Vive Nano® et vérifiés par ICP-MS (Patrice Turcotte voir section de chimie, chapitre 3). La gamme dose effet a été montée en fonction de la valeur de la concentration de la solution mère de nanoparticules donnée par la compagnie Vive Nano®; soit 20 mg/ml de QDs. Toutes les dilutions ont été effectuées dans de l'eau stérile. Afin de respecter l'osmolarité cellulaire, moins de 5 % d'eau ont été ajouté dans les tubes d'exposition composés de cellules et de la

solution de nanoparticules. Ainsi toutes les dilutions de nanoparticules ont respectées le rapport 1/21.

Tableau 8 : Gamme de contamination testée pour les expériences avec les QDs. Les QDs étant stables dans l'eau, toutes les dilutions ont été effectuées dans de l'eau stérile.

Dilution	Concentration en QDs en mg/ml	Concentrations testées <i>in vitro</i> en µg/ml
Solution mère pure	20	952.4
½	10	476.2
¼	5	238.1
1/8	2.5	119.05
1/16	1.25	59.52
1/32	0.63	29.76
1/64	0.31	14.88
1/128	0.16	7.44
1/256	0.078	3.72
Témoin	0	0

5.2 Les nanoparticules d'argent de Vive Nano®

La solution commerciale de nanoparticules d'argent utilisée dans ce projet provenait de la compagnie Vive Nano® (AgNPs Vive Nano®) (Toronto, ON, Canada, <http://www.vivenano.com/store.html>). Selon les données de la compagnie, elles sont composées d'argent et d'un enrobage de polyacrylate de sodium. Cet enrobage, comme pour les QDs, sert à stabiliser la nanoparticule. Les nanoparticules portent à leur surface des fonctions carboxyle. La suspension de nanoparticules est d'apparence noire, de pH 5-7. Le contenu métallique dosé par ICP est de > 97% d'argent (données Vive Nano®). La concentration de la solution mère est de 1.5 mg/ml de nanoparticules, et selon la compagnie cette suspension contiendrait environ 1 g/L d'Ag. Les particules ont une taille < 20 nm, peuvent être dispersées dans l'eau et ne s'agrègent pas (données Vive Nano®). Ces

nanoparticules sont stables si elles sont conservées à 4°C durant 6 mois. Toutes les expériences qui ont été menées dans ce projet, ont été réalisées avec des AgNPs durant les six mois suivant leur réception.. Les équivalents en concentration en argent ont été calculés grâce aux mesures de la compagnie Vive Nano® et vérifiés par Perkin Elmer® (Voir section de chimie, mesure à l'ICP-MS chapitre 3).

La gamme dose effet a été réalisée en fonction de la valeur de la concentration de la solution mère de nanoparticules donnée par la compagnie Vive Nano® ; soit 1,5 mg/ml de AgNPs Vive Nano®. Toutes les dilutions ont été effectuées dans de l'eau stérile. Afin de respecter l'osmolarité cellulaire, moins de 5 % d'eau ont été ajouté dans les tubes d'expositions composés de cellules et de la solution de nanoparticules. Ainsi toutes les dilutions de nanoparticules ont respectées le rapport 1/21.

Tableau 9 : Gamme de contamination testée avec les d'AgNPs Vive Nano®. Il est important de mentionner que les AgNPs sont stables dans l'eau donc toutes les dilutions ont été effectuées dans de l'eau stérile.

Dilution	Concentration en AgNPs Vive Nano® en mg/ml	Concentrations testées <i>in vitro</i> en µg/ml
Solution mère pure	1.5	71.4
½	0.75	35.7
¼	0.38	17.85
1/8	0.19	8.93
1/16	0.09	4.46
1/32	0.047	2.23
1/64	0.023	1.12
1/128	0.012	0.56
1/256	0.006	0.28
Témoin	0	0

Pour les QDs et les AgNPs Vive Nano[®], les tubes témoins sont composés de 500 µl hémolymphe et de 25 µl d'eau stérile pour les tests de viabilité, et phagocytose. Dans le cas de la transformation lymphoblastique, les puits de microplaques « témoin négatif » contiennent 200 µl de cellules ajustées aux différentes concentrations dans du RPMIc, et 10 µl d'eau stérile. Le témoin positif contient 200 µl de cellules dans du RPMIc + 20mg/ml Concanavaline A (ConA) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) et 10 µl d'eau stérile.

6. Détermination de la viabilité cellulaire

La viabilité des macrophages, des lymphocytes (poisson, souris, homme) et des hémocytes (moules), après l'exposition avec différentes concentrations de QDs et d'AgNPs (la Table 1), ont été évaluées par cytométrie en flux, en utilisant de l'iodure de propidium (IP) (Sigma-Aldrich, ON, Canada). L'IP est un agent intercalant qui entre dans les cellules mortes en raison de l'augmentation de leurs perméabilités membranaires. Un volume de 4 µL d' IP (100 µg/ml) a été ajouté à chaque tube de polypropylène, anti-adhérent, de 5 ml, à fond rond (Sarstedt, QC, Canada), ces tubes contenaient un volume de 500 µL de chaque suspension cellulaire. Une fois ajouté, les tubes étaient incubés durant 1 minute avant la lecture. Les échantillons ont été analysés avec un cytomètre en flux par excitation avec un laser d'argon ($\lambda = 488 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) (Facs Calibur, Becton Dickinson, CA, USA). L'excitation de l'IP est détectée par le FL3 avec le filtre bande passante 625 nm-42 nm. Un marqueur M1 (= 5%) sera placé sur l'histogramme de comptage et au moins 5000 événements ont été enregistrés.

7. Détermination de la phagocytose

L'activité phagocytaire a été mesurée dans les macrophages, monocytes (poisson, souris, homme) et les hémocytes (moule) selon la méthodologie publiée par Brousseau *et al.*, 1999. Un duplicata de 500 µL de chaque suspension cellulaire a été ajouté dans un tube de polypropylène de 5 ml à fond rond. Après 3 heures d'incubations avec des concentrations différentes de QDs et d'AgNPs (Tableau 8 et Tableau 9), des billes fluorescentes en latex (Polysciences^{Inc}, PA, USA) ont été ajoutées aux suspensions cellulaires afin de respecter un ratio de 100:1 (billes : cellule). Après une période d'incubation ; pour les truites et les moules de 18h à 15°C, pour les humains et les souris d'une heure à 37°C, les cellules ont été fixées. Les cellules ont donc été placées délicatement sur un gradient composé 4 ml de RPMIc et complété avec 3 % d'albumine de sérum bovin (ASB) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) pour l'humain, la souris et la truite. Pour la moule, ce gradient est composé d'une solution d'eau de mer à 3.5 % de sel de mer et de 3% d'ASB. Les tubes vont être par la suite centrifugés à 150 x g pendant 8 minutes à 4°C. Cette étape va permettre d'enlever les billes libres et celles

attachées aux parois cellulaires. Puis, le culot cellulaire va être resuspendue et fixé dans 0.3 ml PBS supplémenté avec 0.5 % de formaldéhyde (Sigma-Aldrich, ON, Canada) et de 0,2% sodium azide (Sigma-Aldrich, ON, Canada) pour la truite, la souris et l'humain (Brousseau, Pellerin et al. 2000). Pour la moule, les cellules ont été fixées dans une solution de 3.5 % d'eau de mer stérile additionnée de 0.5% formaldéhyde et de 0.2% sodium azide (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un laser argon (λ d'excitation = 488 nm \pm 10 nm) (Facs Calibur, Becton Dickinson, CA, USA). L'excitation des billes est détectée par le FL1 avec le filtre bande passante 530 nm-42 nm. Environ 10 000 évènements ont été acquis. Les analyses ont permis de discriminer deux paramètres, l'activité de phagocytose ou la phagocytose de 1 bille et plus (M1) et l'immunoefficacité ou la capacité de phagocyter 3 billes et plus (M2).

8. Détermination de la prolifération lymphocytaire réalisée sur l'humain, la souris et la truite

Les effets des QDs et des AgNPs Vive Nano[®] sur la prolifération de lymphocytes T, avec de la concanavaline A (Sigma-Aldrich, ON, Canada), qui est un stimulant mitogène, ont été évalués selon la méthode standard de micro culture (Brousseau, Pellerin et al. 2000). Les cellules de poisson (5×10^5 cellules/puit) ont été cultivées dans des conditions appropriées (15°C, avec une atmosphère humidifiée sans CO₂), durant un temps approprié (90 h), dans des plaques 96 puits à fond plat (Sarstedt, Qc, le Canada) et dans conditions stériles. Les cellules d'humain et de souris (2.5×10^5 cellules/puit) ont été cultivées durant 48h (37°C dans une atmosphère humidifiée avec CO₂) dans des plaques 96 puits à fond rond (Sarstedt, QC, Canada) dans conditions stériles. La prolifération lymphocytaire a été évaluée selon les concentrations de QDs et d'AgNPs Vive Nano[®] selon les Tableau 8 et Tableau 9, et stimulée par 20 μ g/ml de ConA. Puis, les cellules ont été pulsées avec 0.5 μ Ci/puit de thymidine tritiée (6.7 Ci mmol^{-1}) (MP Biomédical, OH, USA) pendant les 18 derniers heures d'incubation. A la fin de l'incubation, les plaques ont été congelées. Puis les plaques ont été récoltées à l'aide d'un « Harvester » semi automatique (Skatron Instruments As, Norvège) et transférées sur un filtre en fibre de verre (Skatron Instruments As). La radioactivité incorporée à l'ADN produite lors de la croissance cellulaire a été déterminée par l'utilisation d'un compteur à scintillation microbeta Trilux (Perkin Elmer, Toronto, Canada).

9. Cytogrammes des patrons cellulaires des différents modèles étudiés

Suite au protocole d'extraction cellulaire, les cellules immunitaires ont été identifiées à l'aide de cytogrammes (Figure 27). Les cellules de petites tailles auront une diffraction faible et donc

un FSC petit (et inverse). D'autre part, un signal de grand angle définit la complexité de la cellule (Size Scatter height, SSC). Des cellules, dont les contours seront plus complexes (présences d'organelles, de replis, de marqueurs) auront une SSC élevée (et inverse). Les cellules n'ont pas été marquées spécifiquement cependant différentes populations sont identifiables suite à la purification de cellules (Figure 27).

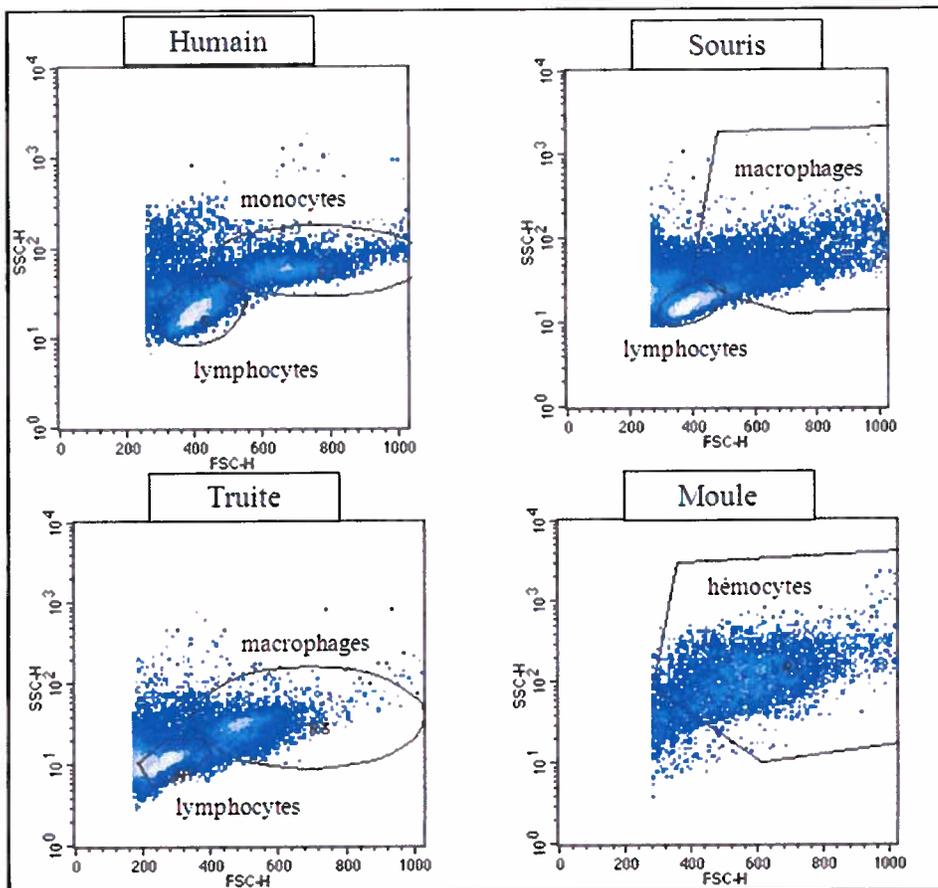


Figure 27 : Cytogrammes des préparations cellulaire de chaque modèle animal montrant les différentes populations identifiables à partir des critères de taille et de structure.

10. Calcul des concentrations d'inhibition

Afin de mieux caractériser la réponse immunitaire et de pouvoir évaluer la sensibilité de cette réponse selon les espèces, des Concentrations d'Inhibition à 50 % (CI 50) ont été calculées (Figure 28). Ces données renseignent sur la sensibilité d'une variable, telles que la viabilité, la phagocytose, la transformation lymphoblastique par rapport à la réponse normale.

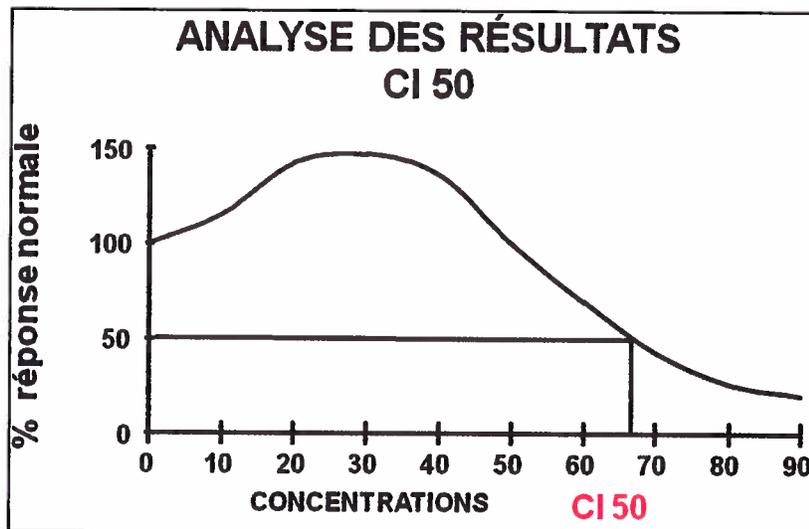


Figure 28 : Courbe théorique expliquant le calcul de la Concentration d'Inhibition à 50 %. Cette dose correspond à la valeur à laquelle 50 % de la réponse normale est observée. Cette CI 50 peut s'appliquer sur tous les paramètres immunitaires mesurés. Document tiré de (Klaassen, Watkins et al. 2008).

11. Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). La différence de viabilité, d'activité et d'efficacité de phagocytose ont été examinées utilisant une analyse factorielle des variations à une voie (ANOVA), lorsque les résultats étaient significatifs, un test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Lorsque les données n'étaient pas normales, un test non paramétrique de Kruskal et Wallis avec mise en rang a été réalisé. Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$. Afin de calculer les concentrations d'inhibition à 50%, des courbes doses réponses ont été réalisées en utilisant Microsoft® office Excel 2007. Les CI 50 ont ensuite été calculées à l'aide de droites de régressions linéaires.

Résultats de la section 1 : IMPACT DES NANOPARTICULES SUR DIFFÉRENTES CELLULES IMMUNITAIRES.

1. Immunotoxicité des nanoparticules des QDs

Suite à l'exposition aux nanoparticules de cadmium, QDs de la compagnie ViveNano®, les paramètres immunitaires suivants ont été observés chez les quatre modèles :

- Pour les humains : la viabilité des monocytes, l'activité de la phagocytose (ou capacité à phagocyter 1 bille et plus), l'immunoefficacité (ou aptitude à phagocyter 3 billes ou plus) ainsi que la transformation lymphoblastique (Figure 29).

- Pour la souris : la viabilité des macrophages, la phagocytose ainsi que la transformation lymphoblastique (Figure 30).

- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages, la phagocytose (immunocapacité et immunoefficacité), la transformation lymphoblastique (Figure 31).

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (immunocapacité et immunoefficacité) (Figure 32).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

1.1 Cellules humaines

La viabilité des macrophages ou cellules mononuclées humaines est significativement diminuée dès $119 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) et très significativement diminuée pour des valeurs $> 238 \mu\text{g/ml}$ (Figure 29).

La phagocytose est observée selon deux paramètres ; la capacité à phagocyter une bille plus ou immunocapacité (M1), et l'efficacité à phagocyter 3 billes et plus ou immunoefficacité (M3).

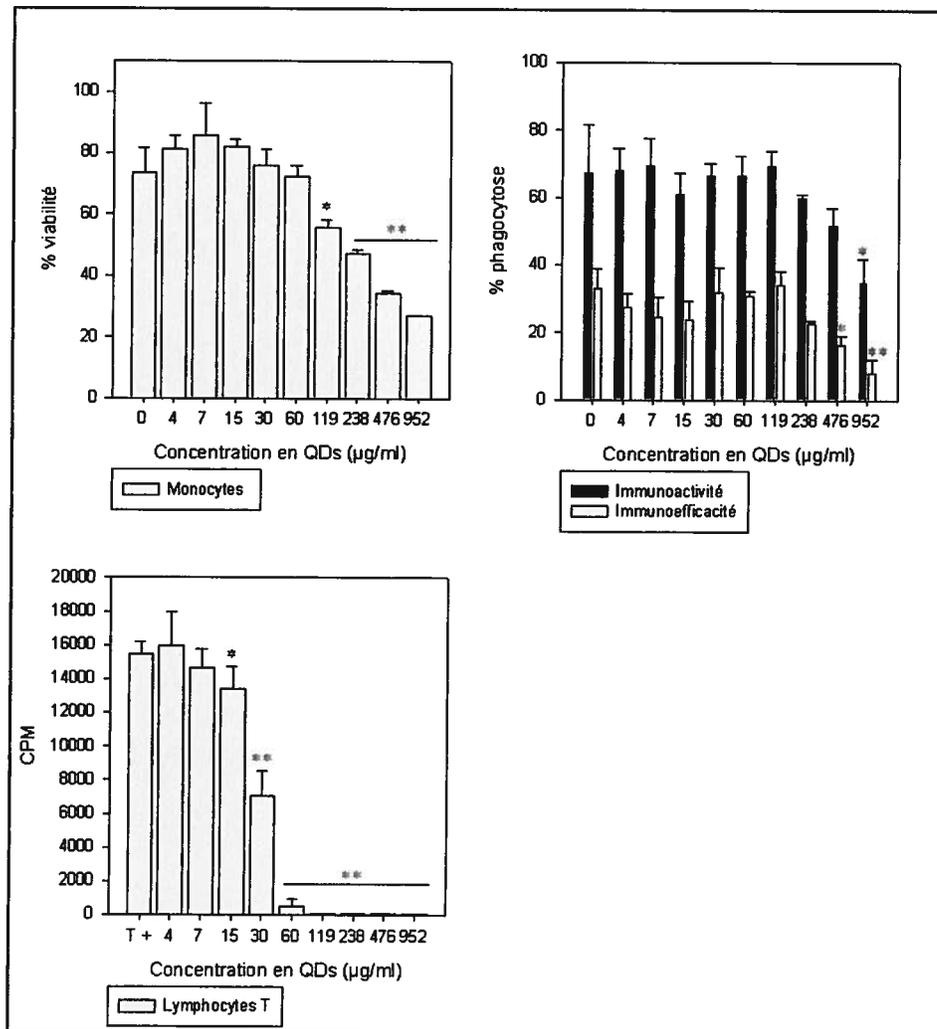


Figure 29 : Valeurs moyennes de la viabilité, de la phagocytose et de la transformation lymphoblastique des cellules immunitaires d'humain. n=3. * p< 0.05, ** p< 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.**

La phagocytose diminue dès 119 µg/ml mais de façon non significative. Pour l'activité de phagocytose et l'immunoefficacité de phagocytose, les concentrations les plus fortes ont diminuées significativement (M1 p< 0.05 ; M2 p <0.001) (Figure 29). La transformation lymphoblastique est très sensible dès 15 µg/ml et une diminution significative des CPM est alors observées (p> 0.05) (Figure 29).

1.2 Cellules de souris

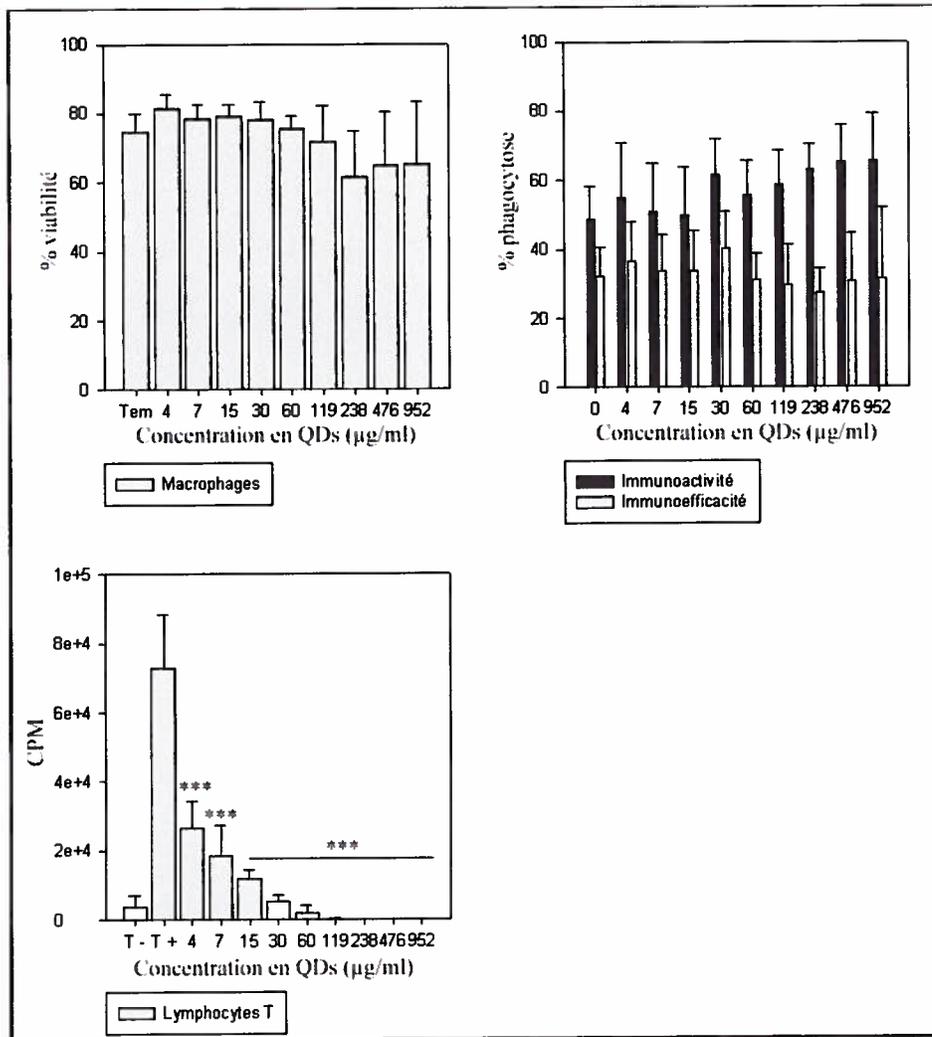


Figure 30 : Viabilité, phagocytose et transformation lymphoblastique chez C57BL/6. Viabilité n=10, Phagocytose n=6 et Transformation n=10. T - = Témoin négatif sans QDs et sans agent mitogène. T + = témoin positif sans QDs mais avec un agent mitogène. * p < 0.05, ** p < 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.**

Chez la souris aucune variation significative de la viabilité et de la phagocytose n'est observée (Figure 30). Une légère stimulation non significative de la phagocytose est observée pour les macrophages de souris. Cependant la transformation lymphoblastique est très significativement diminuée dès la première concentration de la gamme soit 4 µg/ml (p < 0.0001).

1.3 Cellules de truite arc-en-ciel

La viabilité des macrophages de la truite arc-en-ciel (TAC) diminue significativement dès 30 µg/ml (p < 0.05) et très significativement dès 119 µg/ml (p < 0.001). Cependant, une stimulation de la phagocytose est observée à partir de 60 µg/ml, elle devient significative à

476 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) et très significative pour la dose la plus forte 952 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$). L'efficacité de phagocytose est stimulée dès 60 $\mu\text{g/ml}$ mais cette augmentation n'est jamais significative.

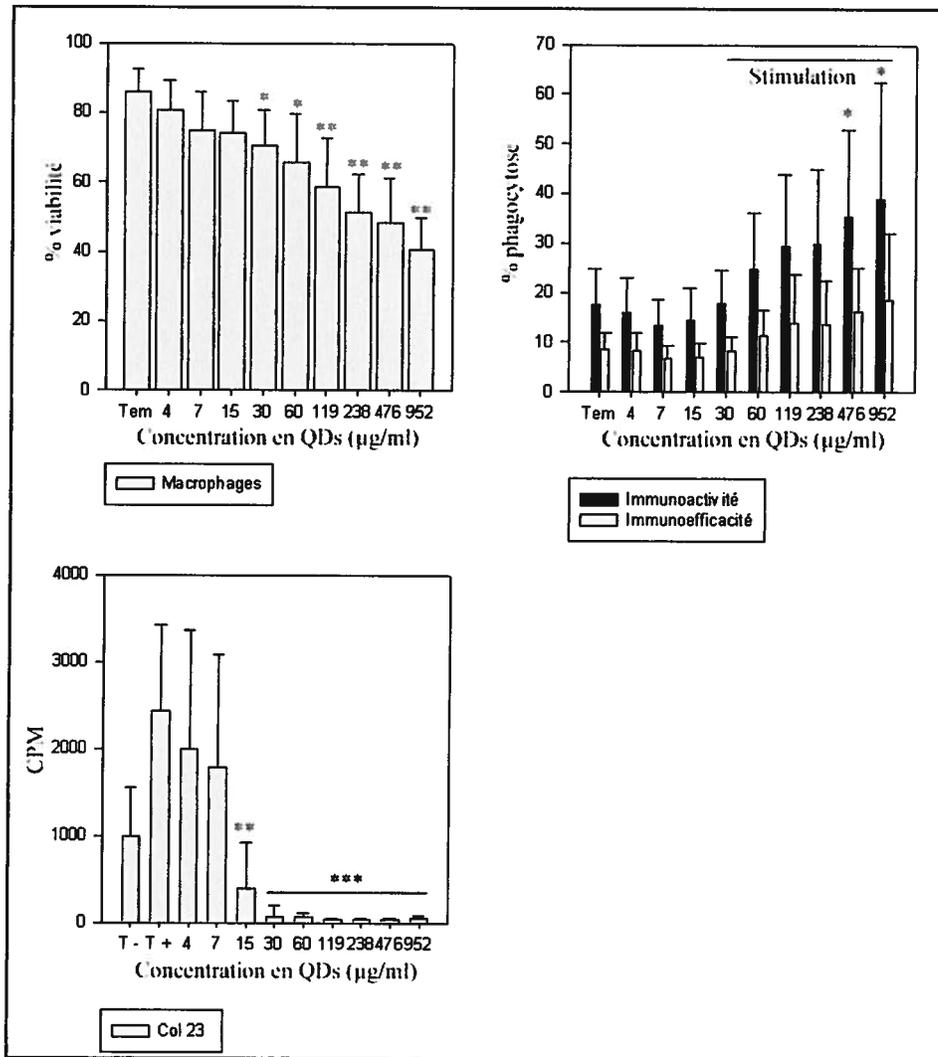


Figure 31 : Viabilité, phagocytose et transformation lymphoblastique pour *Oncorhynchus mykiss*. Viabilité N = 11, Phagocytose n = 11, Transformation n = 8. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.0001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.**

1.4 Cellules de moule bleue

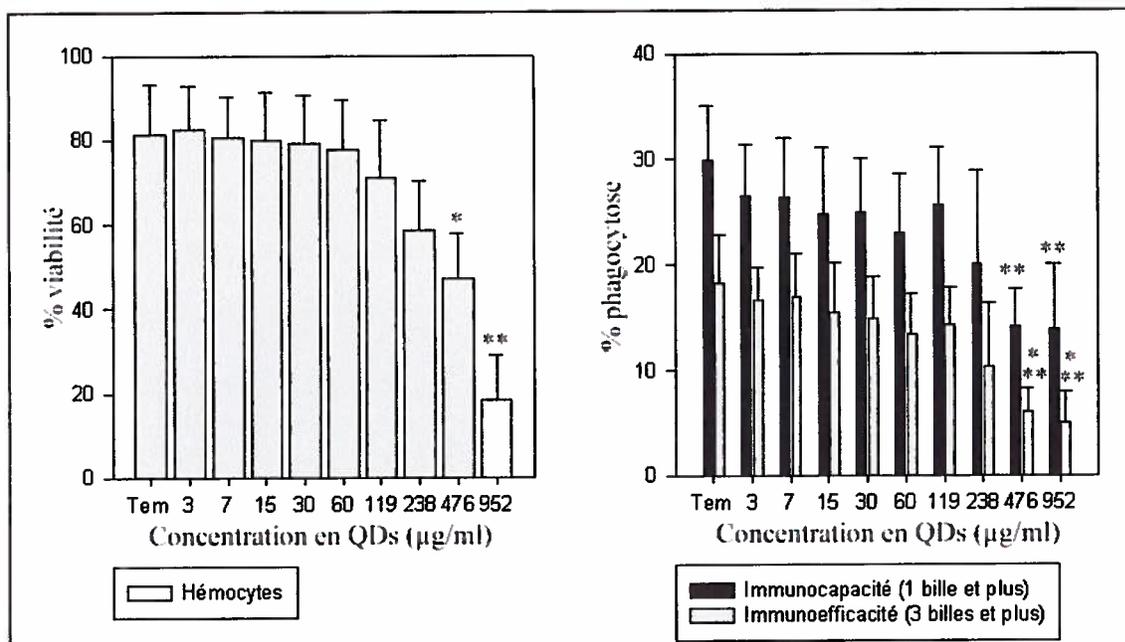


Figure 32 : Paramètres immunitaires pour *Mytilus edulis* exposés durant 21 h à des QDs. n=9. * p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

La viabilité des hémocytes de moules diminue significativement dès 476 µg/ml (p < 0.05) et très significativement pour 952 µg/ml (p < 0.001). L'activité de phagocytose de hémocytes, est très significativement diminuée dès 476 µg/ml (p < 0.001). Quand à l'efficacité de phagocytose de hémocytes est très significativement diminuée dès 476 µg/ml (p < 0.0001).

1.5 Discussion sur les QDs

À l'heure actuelle, très peu d'étude ont été réalisées sur les performances du système immunitaire mise en présence de QDs. Les éléments de comparaison que nous avons utilisés afin de discuter de ces résultats font donc références à des cellules ou des lignées cellulaires de différents modèles animaux.

Selon nos résultats, un effet immunotoxique des nanoparticules de cadmium, est observé sur les populations de macrophages et monocytes de trois des quatre modèles étudiés. En effet, que ce soit pour la truite, la moule ou l'humain, une diminution de la viabilité cellulaire est observée en fonction de l'augmentation de la concentration des QDs. Cette toxicité dose dépendante des QDs a déjà été démontrée par plusieurs auteurs (Hoshino, Hanaki et al. 2004; Shiohara, Akiyoshi et al. 2004; Oberdörster 2005; Hardman 2006). Cependant, en fonction des espèces utilisées dans ce projet, la phagocytose est stimulée ou inhibée en présence d'une forte concentration de QDs. Par exemple, l'immunocapacité et l'immunoefficacité des

macrophages de truites sont stimulées par l'augmentation de la concentration en QDs ; alors que ces paramètres sont inhibés chez la moule et l'humain pour des conditions identiques.

En effet, selon nos résultats, la viabilité des hémocytes de moules est diminuée pour de fortes concentrations en QDs alors que pour une même concentration la phagocytose est très significativement diminuée. Ces résultats démontrent une atteinte mécanistique des hémocytes de moules. Inversement, pour la truite, une stimulation de la phagocytose est observée avec l'augmentation de la concentration de QDs. Cette stimulation du système immunitaire, aussi appelée hormèse (Iavicoli, Calabrese et al. 2010) a déjà été observée à faible dose pour des métaux. À faible dose, les métaux induisent une stimulation des paramètres immunitaires en réponse à un stress afin de contrebalancer les effets néfastes de ceux-ci et de maintenir l'homéostasie du système (Calabrese 2009). Ce phénomène a déjà été observée pour des nanoparticules (Sterne et al. 2008, Iavicoli, Calabrese et al. 2010).

Bien que des effets immunotoxiques aient été observés chez la plupart des populations de macrophages et de monocytes de nos modèles étudiés, la souris ne semble pas présenter de perturbations immunitaires. Cette observation est confirmée par les travaux *in vitro* de Derfus *et al.*, (2004) effectuées sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat et mis en présence de QDs. Cette dernière étude a démontré qu'une exposition prolongée (24 heures) à une concentration de 1 mg/ml de QDs n'engendrait pas une diminution de la viabilité. Cependant, lors d'une étude sur la toxicité des QDs chez une lignée de phéochromocytes de rats, publiée par Lovric *et al.*, en 2005, une cytotoxicité importante est observée (Lovrić 2005a). Il est toutefois à noter que les QDs utilisés lors de ces travaux étaient non enrobés. Ainsi, d'autres travaux ont démontrés que les QDs disponibles commercialement ainsi que ceux étant conjugués à des protéines, présentent des dimensions plus importantes que les QDs non enrobés et sont non toxiques lorsque testés chez l'humain (Wu et al. 2003). Enfin, Kirchner et al. ont publiés une étude en 2005 présentant une forte toxicité des QDs sur différentes lignées cellulaires dont des fibroblastes de rates de rats (Kirchner 2005). Cependant, lors de ces travaux des QDs fabriqués en laboratoire ont été utilisées. Ceux-ci sont susceptibles d'être moins standards qu'une solution commerciale, et donc de présenter plus de variations de leurs paramètres physico-chimiques. De plus, le seul critère de viabilité testé est l'adhérence des cellules. Ainsi, ces résultats ne sont pas suffisamment convaincants pour remettre en question l'absence de toxicité des QDs que nous avons documentés chez les macrophages et monocytes de souris.

D'autre part, selon nos résultats, les deux types de réponses ; innée et acquise, ne réagissent pas de la même manière suite à une exposition aux QDs. La réponse immunitaire innée, ou phagocytose, chez la souris n'est pas altérée. Toutefois, une diminution de la réponse immunitaire acquise, ou transformation lymphoblastique est observée. Il est donc possible que le temps de contact avec les nanoparticules, utilisées dans nos travaux, soit trop court pour observer un effet sur les macrophages de souris. En effet, cette toxicité lymphocytaire a déjà été documentée par les travaux de Hoshino et al., (2004). Les auteurs ont démontré un effet cytotoxique chez une lignée de lymphome T de souris lorsque ces derniers étaient exposés à une concentration de 200 µg/ml de QDs enrobés (Hoshino, Hanaki et al. 2004). Ces derniers résultats confirment une toxicité chez l'ensemble des modèles possédant un système immunitaire acquis (homme, souris et truite).

Ainsi, notre étude permet de démontrer que les QDs induisent une cytotoxicité sur les cellules immunitaires des différents modèles animaux étudiés. Ces résultats sont importants d'autant plus que peu d'études sont menées sur les performances du système immunitaire lorsqu'il est confronté à des nanoparticules. Notre étude vient donc confirmer que les nanoparticules sont toxiques selon les modèles à différents seuils de toxicité. En effet en observant nos résultats, tous les modèles ne présentent pas les mêmes sensibilités, les souris n'étant pas sensibles comparées aux humains (développement du système immunitaire semblable). La toxicité des QDs est donc liée à deux paramètres : la concentration en nanoparticules et le modèle étudié (son degré de développement du système immunitaire).

En résumé, cette première section permet donc de valider l'hypothèse que les QDs ont une action sur les performances du système immunitaire des différents modèles. Cependant, tous les modèles ne réagissent pas de la même manière. Les macrophages de souris semblent peu sensibles aux QDs alors que les monocytes d'humain le sont. Les seuils de toxicité des QDs ne sont donc pas les mêmes pour deux types de mammifères. La moule est affectée par de fortes concentrations de QDs, la diminution de phagocytose des hémocytes est liée à la diminution de viabilité de ceux-ci. Pour la truite, un phénomène d'hormèse est observé ce qui n'est pas retrouvé pour les autres modèles.

De plus, les résultats de cette section présentent de fortes atteintes de la transformation lymphoblastique suggérant une perturbation de l'immunité à plus long terme. Cette diminution de viabilité lymphocytaire et l'altération de la transformation lymphoblastique pourraient être liées à l'activité des lymphocytes T (LT) activés. Une étude de Hoshino et al,

2004 axée sur les lymphocytes T de souris a mis en évidence une diminution de la viabilité des cellules et de la fluorescence des QDs lors d'une exposition aux QDs. Ces altérations seraient supposément liées selon les auteurs, à une dégradation de la surface de la particule en raison du changement de pH, conséquence même de l'activation des LT (Hoshino, Hanaki et al. 2004).

2. Immunotoxicité des AgNPs

Suite à l'exposition aux nanoparticules d'argent de la compagnie ViveNano[®], les paramètres immunitaires suivants ont été observés chez les quatre modèles :

- Pour la souris : la viabilité des macrophages, la phagocytose et la transformation lymphoblastique (Figure 33).

- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages, la phagocytose et la transformation lymphoblastique (Figure 34).

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (Figure 35).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

2.1 Cellules de souris

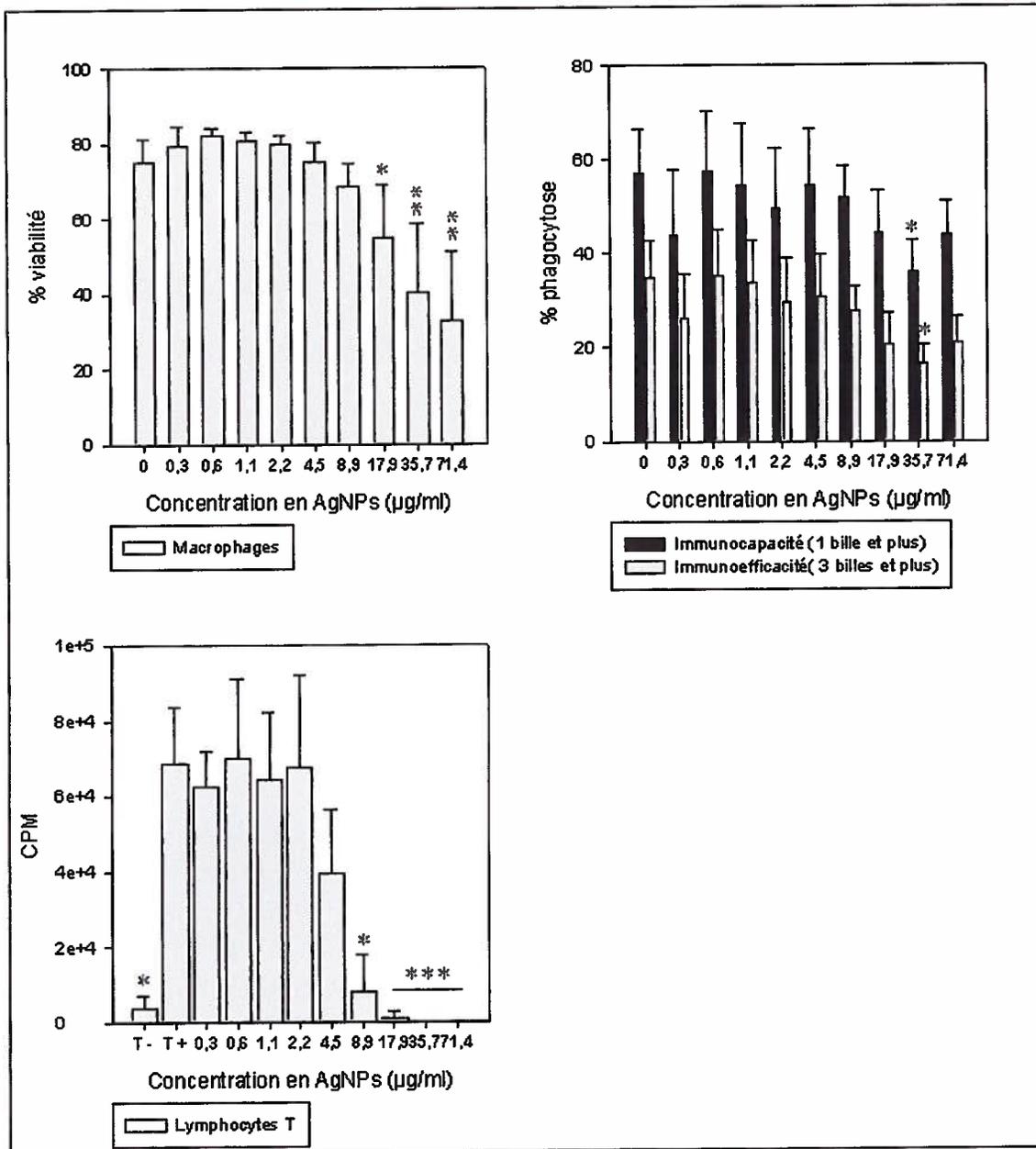


Figure 33 : Récapitulatif des variations significatives de la viabilité, de la phagocytose et de la transformation lymphoblastique chez la souris. Viabilité n= 6, phagocytose n= 6, transformation lymphoblastique n=6* p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Une diminution significative de viabilité est observée ($p < 0.05$) et cette diminution devient très significative dès $35.7 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (Figure 33). La phagocytose est diminuée à $35.7 \mu\text{g/ml}$. La transformation lymphoblastique diminue significativement dès $8.9 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) et très significativement dès $17.9 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (Figure 33).

2.2 Cellules de truite arc-en-ciel

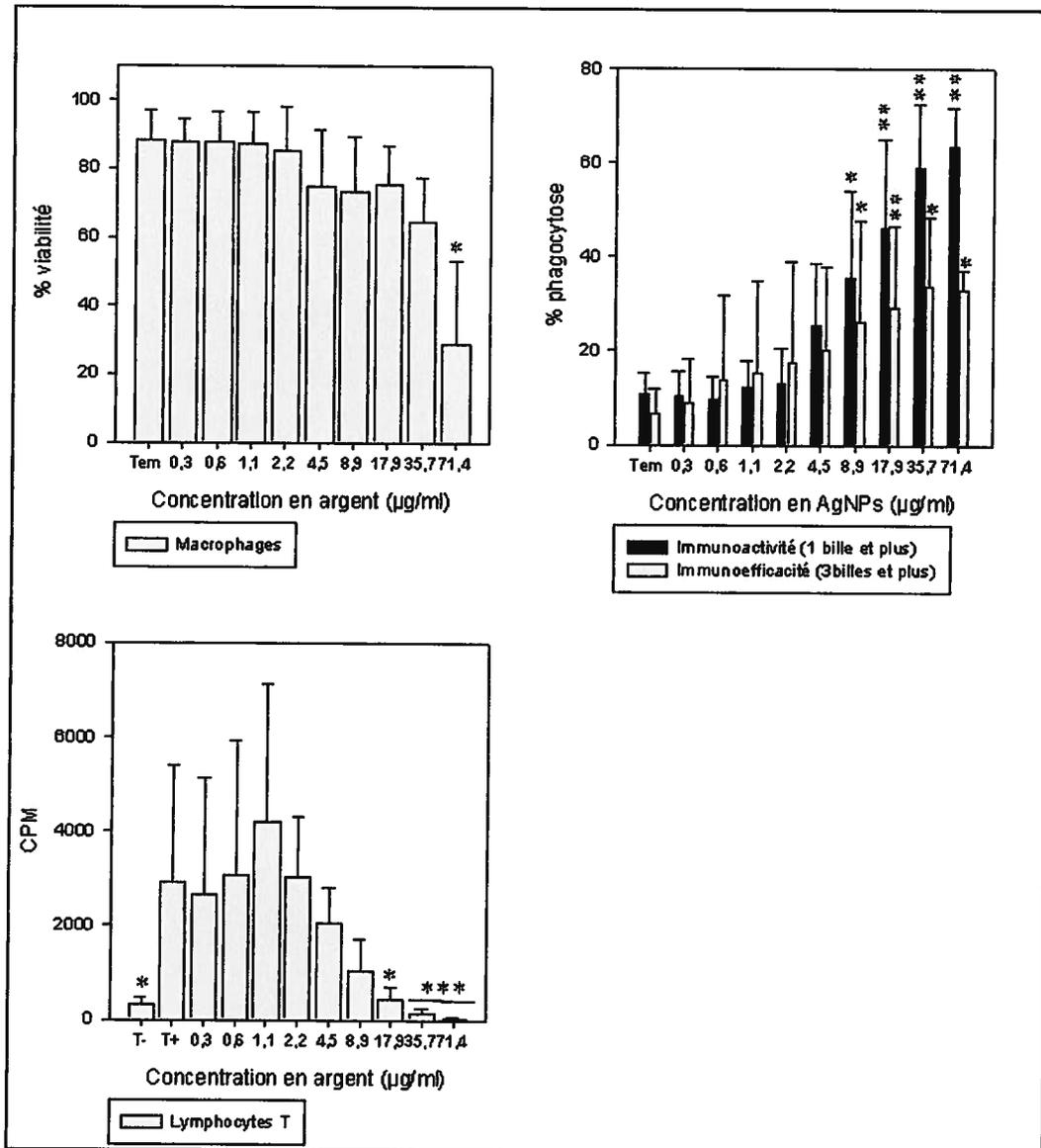


Figure 34 : Récapitulatif des variations significatives de la viabilité, phagocytose, et transformation lymphoblastique chez la TAC. Viabilité n=9, phagocytose n=6, transformation lymphoblastique n=6. * p< 0.05, ** p< 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types. T- = Témoin, cellules incubées sans QDs et sans le mitogène. T+ = Témoin, cellules incubées sans QDs avec le mitogène.**

La viabilité de la truite arc-en-ciel diminue significativement seulement à la plus forte concentration de la gamme dose réponse pour les AgNPs ViveNano®, soit 71,4µg/ml (p< 0.05) (Figure 34). Cependant pour la phagocytose, l'immunoactivité et l'immunoefficacité sont significativement stimulées dès 8,9 µg/ml (p< 0, 05) et très significativement stimulées dès 17.9 µg/ml (p< 0.001). La prolifération lymphoblastique est significativement diminuée dès 17.9 µg/ml (p< 0.05) et très significativement diminué à 35.7 µg/ml (p< 0.0001) (Figure 34).

2.3 Cellules de moule bleue

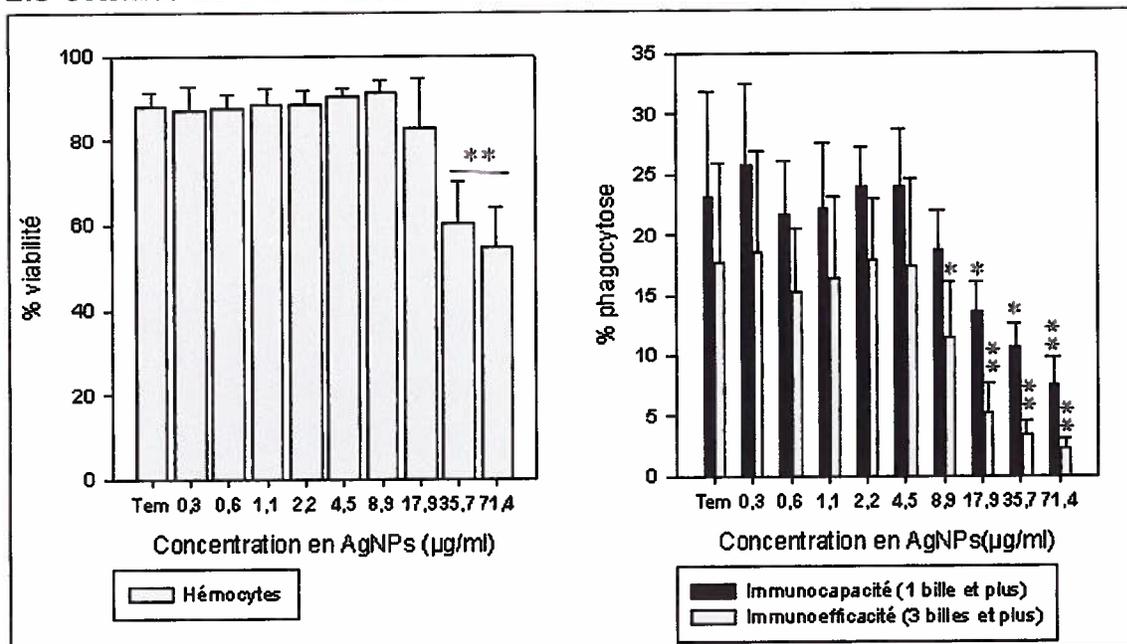


Figure 35 : Récapitulatif des variations significatives de la viabilité et phagocytose chez la moule. Viabilité n=8 et phagocytose n=8. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

La viabilité des hémocytes est très significativement diminuée dès 35.7 µg/ml (p<0.001). L'immunoactivité est significativement diminuée dès 17.9 µg/ml (p<0.05) et très significativement diminuée à 71.4 µg/ml (p<0.001) (Figure 35). Quand à l'immunoefficacité, elle diminue significativement à partir de 8.9 µg/ml (p<0.05) et très significativement dès 17.9 µg/ml (p< 0.001) (Figure 35).

2.4 Discussion sur les AgNPs ViveNano®

Les résultats présentés dans ce projet indiquent une toxicité des nanoparticules d'argent sur le système immunitaire lorsque ces dernières sont exposées à différents modèles animaux. En raison de la faible existence de données sur la toxicité des nanoparticules d'argent sur le système immunitaire, les éléments de comparaison utilisés vont être principalement des données sur des lignées cellulaires de différents modèles animaux.

Selon nos résultats, une modification des paramètres immunitaires est observée en fonction de l'augmentation de la concentration en AgNPs, et cela pour tous les modèles testés (souris, truite et moule). De façon plus spécifique, nous avons noté une diminution significative de la viabilité des macrophages (souris et truite) et des hémocytes pour de fortes doses d'AgNPs.

Concernant les macrophages de truite, la viabilité est significativement diminuée pour une concentration de 71,4 µg/ml. Ces résultats ne sont toutefois pas en accord avec ceux publiés par Farkas et al, 2009. Ces derniers ont réalisé des tests sur des hépatocytes de truites arc-en-ciel et ont mesuré une diminution significative de l'intégrité membranaire lorsque les cellules étaient exposées sur une période de 48 heures à une concentration de 19 µg/ml d'AgNPs. De plus, suite à cette exposition, les travaux de Farkas ont pu mettre en évidence une atteinte de l'activité mitochondriale dès 6.35 µg/ml (Farkas, Christian et al. 2009). Ces valeurs sont très faibles par rapport à celles retrouvées pour les cellules du système immunitaire de truite. Il est envisageable que les réponses immunitaires puissent être différentes selon le type cellulaire impliqué. De plus, l'utilisation de nanoparticules non standardisées par Farkas et al. (2009), lors de cette étude, a pu nuire à la stabilité de celles-ci et ainsi augmenter de façon significative la toxicité observée. Enfin, la taille des particules utilisées par ce groupe se situe entre 5 et 10 nm, alors que celles utilisées pour nos travaux étaient inférieures à 20 nm, ce qui peut avoir une influence sur la toxicité observée. Il a déjà été démontré, dans des modèles de cellules épithéliales et de macrophages, que les petites particules, qui ont donc un ratio surface/volume plus grand, seraient susceptibles d'induire une toxicité plus grande (Karlsson, Gustafsson et al. 2009; Yue, Wei et al. 2010).

Quant aux résultats de viabilité recueillis dans notre modèle murin, ces derniers s'avèrent similaires à ceux réalisés avec des lignées cellulaires. La cytotoxicité des nanoparticules d'AgNPs a été étudiée avec Braydich-Stolle et al, 2005 sur une lignée de cellules germinales de souris exposées à une concentration de 5 à 10 µg/ml (Braydich-Stolle 2005). À 10 µg/ml des effets sur l'apparence de la cellule (intégrité cellulaire) étaient observés. Une réduction de l'activité mitochondriale et une lyse cellulaire étaient aussi observées suite à une exposition à cette concentration. La CI 50 de ce type cellulaire a été calculé à 8.75 µg/ml, valeur qui est assez proche de celle retrouvée pour la viabilité des macrophages de souris établis dans nos travaux (IC 50 souris = 36.39 µg/ml données présentées dans la section suivante). De même, pour des cellules HeLa (lignée cellulaire de cellules cervicales cancéreuses humaines) les auteurs ont observé une diminution significative de la viabilité, une induction de l'apoptose ainsi qu'une IC 50 de 92 µg/ml (Miura and Shinohara 2009). Ces résultats indiquent que selon la nature des cellules la cytotoxicité est plus ou moins forte.

Concernant la moule, la viabilité est significativement diminuée pour de fortes concentrations d'AgNPs (35,7 et 71,4 µg/ml) cependant, il est intéressant de noter que pour des concentrations moyennes, la phagocytose est significativement diminuée alors que la viabilité

ne l'est pas. Ainsi ces résultats confirment une altération mécanistique des hémocytes de moule en présence d'AgNPs.

Les résultats de phagocytose observés selon les différents modèles montrent une perturbation de la réponse immunitaire innée. Avec les nanoparticules d'argent (AgNPs ViveNano[®]), la phagocytose est stimulée chez les truites, ce phénomène aussi appelé hormèse a déjà été observé avec des nanoparticules (Shin, Ye et al. 2007; Iavicoli, Calabrese et al. 2010). L'hormèse un phénomène dose effet. Ainsi les faibles doses induisent des stimulations et les fortes doses des inhibitions (Eaton and Klaassen 2001; Iavicoli, Calabrese et al. 2010). Ce phénomène est présenté comme la résultante d'une surcompensation de l'organisme afin de respecter l'homéostasie du milieu (Lefcort, Freedman et al. 2008). Le phénomène d'hormèse n'est cependant pas observé dans les deux autres modèles étudiés (souris et moule). Peu d'informations ont jusqu'alors été publiées sur l'impact des nanoparticules sur la phagocytose. Lorsque l'on compare avec la littérature, pour des nanoparticules de même nature (inorganique), il a déjà été démontré que celles-ci peuvent être internalisées par les macrophages humains, tel que nous le confirmons chez la souris au chapitre 3 (Bartneck, Keul et al. 2009). Par exemple, pour des nanoparticules d'or il a été prouvé que les cellules immunitaires favorisaient les voies de pinocytose plutôt que les voies de phagocytose (Bartneck, Keul et al. 2009). La voie de pinocytose est un type d'endocytose non spécifique visant à intégrer du matériel extracellulaire [deux types de pinocytose sont connues la micropinocytose (80 nm de diamètre) et la macropinocytose (1 µm de diamètre)]. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas d'identifier la voie d'assimilation utilisée par les macrophages en présence d'AgNPs. Ainsi les différents acteurs du système immunitaire inné participent activement à l'élimination des composantes étrangères à l'organisme telles que les nanoparticules. Ceci a aussi été observé pour des macrophages alvéolaires des rats exposés à 25 µg/ml d'AgNPs, de 55 nm de diamètre, après 24h d'incubation. Les nanoparticules étaient situées dans des vacuoles (Carlson, Hussain et al. 2008). De plus, les études de Asharani et al, en 2009, démontraient la présence de nanoparticules d'argent dans les phagosomes, en plus du cytosol et du noyau, de fibroblastes de poumons humains confirmant les voies phagocytaires des nanoparticules comme une des entrées dans la cellule (AshaRani, Hande et al. 2009). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que l'augmentation de la phagocytose observée dans nos résultats chez la truite, est la résultante de l'activation du macrophage et participe à l'élimination active des composants étrangers.

Pour la prolifération des LT chez la truite arc-en-ciel, une inhibition de la prolifération cellulaire et ce pour des concentrations supérieures à 17,9 µg/ml est observée. De plus, nous pouvons aussi observer que cette inhibition de la prolifération lymphocytaire survient alors que la viabilité relative des cellules T est maintenue à 78% (résultats non présentés). Chez la souris, le même phénomène est observé. Alors que nous pouvons observer une inhibition de la prolifération lymphocytaire significative dès 8,9µg/ml, la viabilité relative des LT se situe à 88% (résultats non présentés). Toutefois, la viabilité des LT dans le modèle murin ne se maintient pas et chute rapidement après l'atteinte de la prolifération. Ces données étant précurseurs dans la littérature scientifique il est impossible de mettre ces résultats en perspective avec d'autres modèles. Cependant, selon Eom et al, (2010) les AgNPs seraient responsables d'une rupture du cycle cellulaire chez des cellules Jurkat T (lignée immortalisée de cellules T) induisant la diminution des cellules en phase G 1 et l'augmentation de cellules dans la phase G2-M (Eom and Choi 2010). Ce débalancement du cycle cellulaire conduit à la formation de cellules à ADN subdiploïdes (Eom and Choi 2010). Les nanoparticules seraient susceptibles de perturber la mitose de la cellule, entraînant une déficience en cellule G1 et contribuant à l'accroissement du matériel génétique dans les cellules en phase G2-M. La rupture du cycle conduit à la suppression de la prolifération cellulaire, à l'accumulation de fragments d'ADN, et à l'apoptose cellulaire.

Concernant la transformation lymphoblastique des truites et des souris, elle est affectée pour des doses plus faibles que celles de la phagocytose, ces résultats confirment donc l'hypothèse que la réponse mitotique est diminuée lors d'une exposition aux AgNPs. Par ailleurs, la transformation lymphoblastique semble être un test plus sensible que celui de la phagocytose.

Résultats de la Section 2 : RÉACTIONS IMMUNITAIRES DES DIFFÉRENTES ESPÈCES MODÈLES

1. Immunotoxicité des Cd/S, Cd/Te QDs selon les espèces modèles du projet

1.1 Viabilité et phagocytose des différents modèles

Suite à l'exposition aux nanoparticules de cadmium Cd/S Cd/Te, les paramètres immunitaires suivants ont été observés chez les espèces modèles.

- La viabilité des différents types cellulaires (Figure 36)

- La phagocytose est évaluée selon deux critères, l'activité (ou capacité à phagocyter 1 bille et plus) ainsi que l'immunoefficacité (ou aptitude à phagocyter 3 billes ou plus). Ces deux paramètres ont été mesurés pour les modèles cellulaires, pour l'immunoactivité (Figure 37) pour l'immunoefficacité (Figure 38)

- La transformation lymphoblastique (Figure 39 et Figure 40).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

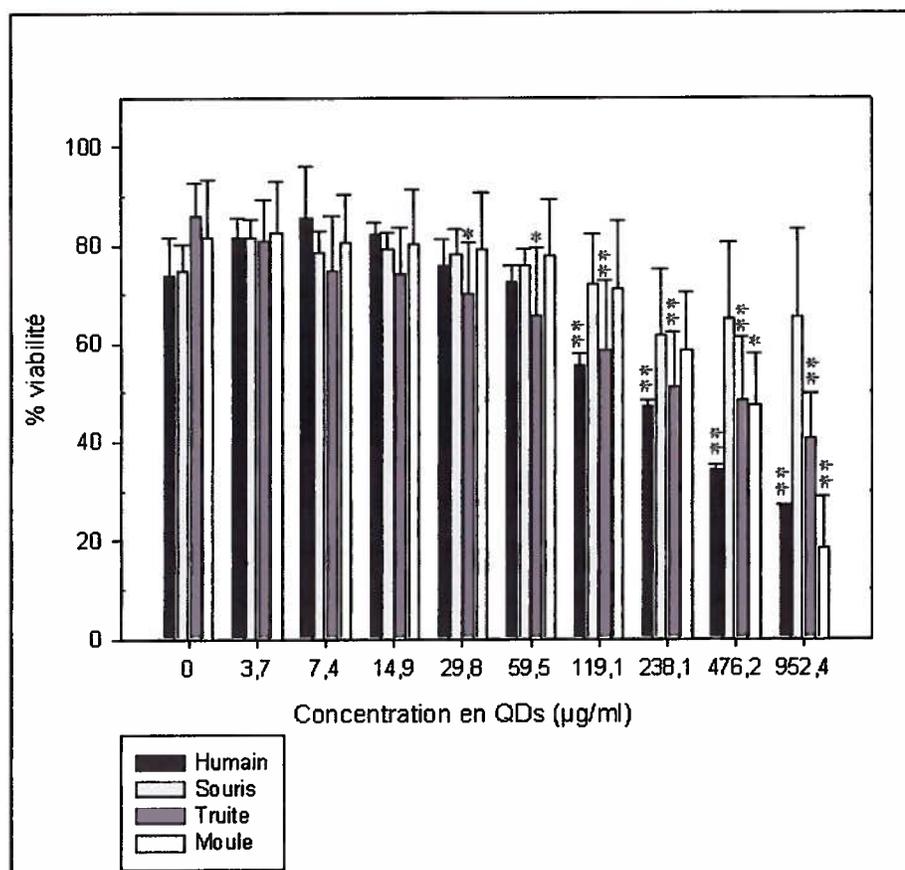


Figure 36 : Viabilité des cellules immunitaires des différents modèles d'études, monocytes d'humain n=3, macrophages de souris n=10, macrophages de truites n=11, hémocytes de moules n=9. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Une diminution significative de la viabilité cellulaire est observée avec l'augmentation du contenu en cadmium présent dans la nanoparticule. Plus la concentration en cadmium augmente plus la viabilité diminue. Une diminution significative de la viabilité des monocytes d'humain est observée dès 119,1 µg/ml ($p < 0.001$). Aucune altération de la viabilité cellulaire n'est observée pour les macrophages de souris après 4 heures d'incubation avec les

nanoparticules de cadmium. Cependant, une diminution de la viabilité est observée pour des concentrations de 238,1 $\mu\text{g/ml}$ et plus, attestant une influence de la concentration de cadmium sur les cellules. D'autre part, les écarts types plus grands indiquant que les réponses individuelles plus variables (Figure 36).

Les truites, quand à elle, présentent des atteintes de viabilité plus fortes que celles des souris et des humains. La viabilité des macrophages de truites diminue significativement dès 29,8 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). Finalement, une diminution significative de la viabilité des hémocytes est observée à 476, 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$), elle devient très significative à 952,4 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (Figure 36). Les CI50 des différents types cellulaires sont répertoriées dans le Tableau 10).

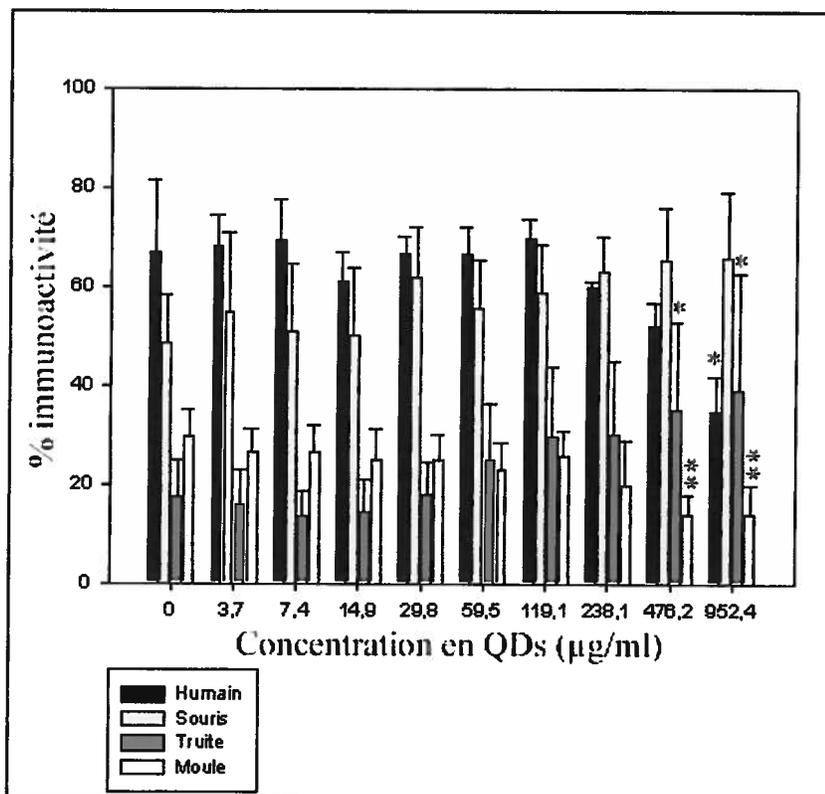


Figure 37 : Immunocapacité des cellules immunitaires des différents modèles d'études, monocytes d'humains n=3, macrophages de souris n=10, macrophages de truites n=11, hémocytes de moules n=9. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

L'activité phagocytaire pour les monocytes d'humains diminue significativement pour la plus forte valeur à savoir 952,4 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 37).

Aucune différence significative n'est observée pour l'immunocapacité et l'immunoefficacité des macrophages de truites cependant, une stimulation est observée pour des concentrations

supérieures ou égales à 59,5 µg/ml. Pour les souris, aucune différence significative n'est observée. Cependant, comme pour la truite, l'activité de phagocytose est stimulée pour des valeurs supérieures ou égales à 119,1 µg/ml (Figure 37).

L'activité et la capacité phagocytaire des hémocytes de moules diminue significativement pour une concentration de 476.2 µg/ml et plus ($p < 0.05$ pour l'immunoactivité et $p < 0.001$ pour l'immunoefficacité).

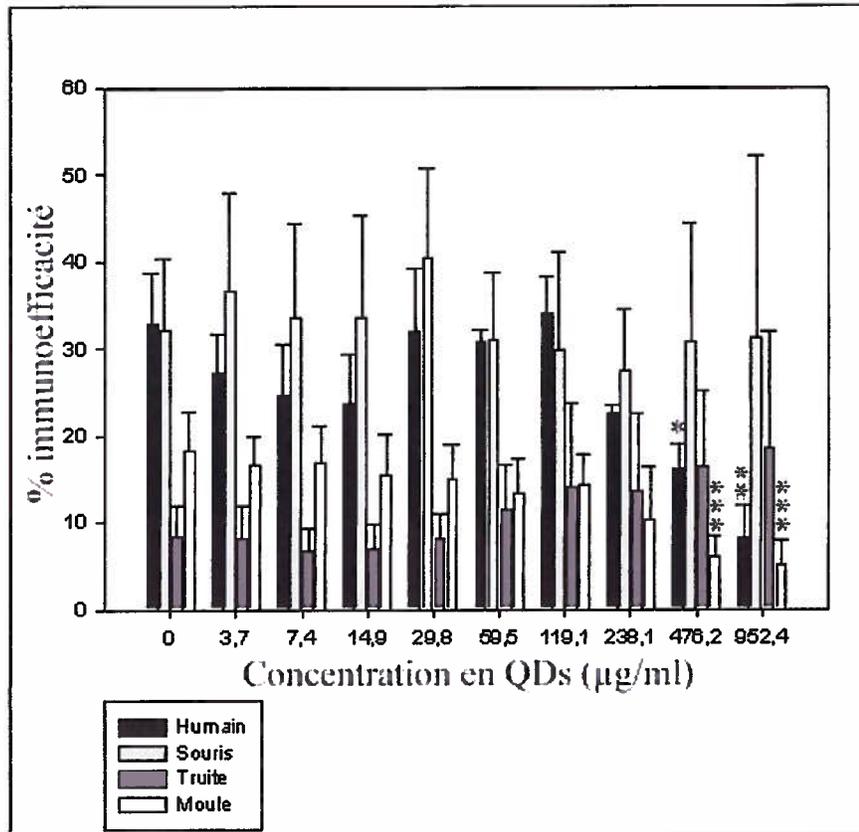


Figure 38 : Immunoefficacité des cellules immunitaires des différents modèles d'études, monocytes d'humain n=3, macrophages de souris n=10, macrophages de truites n=11, hémocytes de moules n=9. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Pour l'humain, une diminution significative de l'efficacité de phagocytose est observée pour les doses les plus fortes 476.2 ($p < 0.05$) et 952.4 µg/ml ($p < 0.001$) (Figure 38). Aucune différence significative n'est observée pour l'immunoefficacité et l'immunoactivité des macrophages de souris. L'efficacité de phagocytose de la truite arc-en-ciel est significativement stimulée pour les deux plus fortes valeurs de la gamme de QDs. Pour la

moule, l'activité et l'immunoefficacité de phagocytose sont significativement diminuées pour les plus fortes doses également (476.2 $p < 0.05$ et 952.4 $\mu\text{g/ml}$ $p < 0.001$) (Figure 38).

1.2 Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique

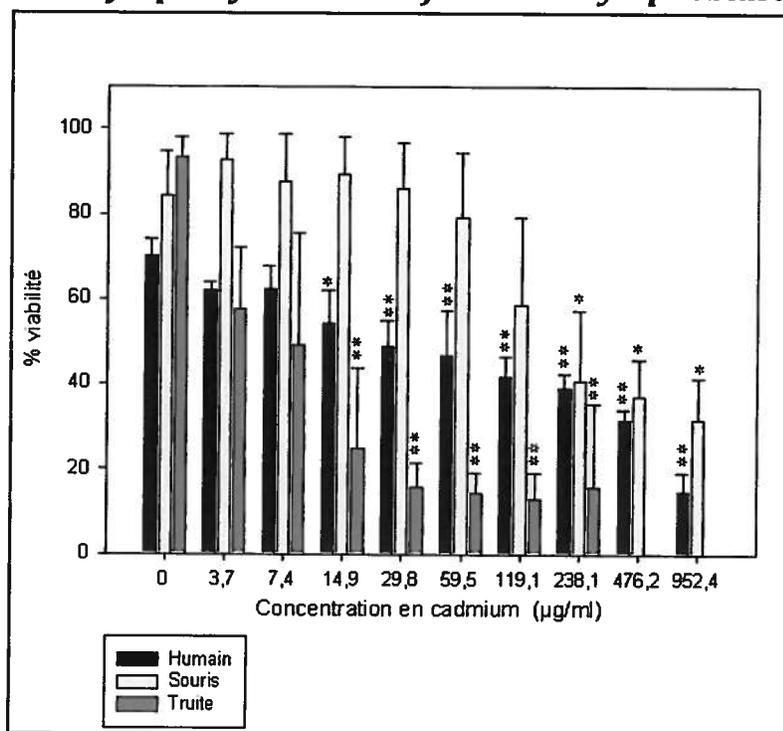


Figure 39 : Viabilité des lymphocytes des différents modèles exposés à des nanoparticules de cadmium Cd/S, Cd/Te. Les cellules ont été incubées durant 48h pour les souris $n=10$ et les humains $n=3$ et durant 72h pour les truites $n=11$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

La viabilité des lymphocytes d'humain est significativement diminuée dès 14,9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) et très significativement diminué dès 29.8 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$). Alors que celle de souris ne diminue significativement qu'à partir de 238.1 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 39). La viabilité des lymphocytes de truites est aussi très significativement diminuée dès 14,9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$).

La prolifération lymphoblastique est significativement diminuée dès 14,9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) et très significativement diminuée pour 29.8 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$). Pour la souris, la transformation lymphoblastique est très significativement diminuée dès 3.7 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) indiquant une très forte action des QDs. Pour la truite, la transformation est très significativement diminuée dès 14.9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.0001$) (Figure 40).

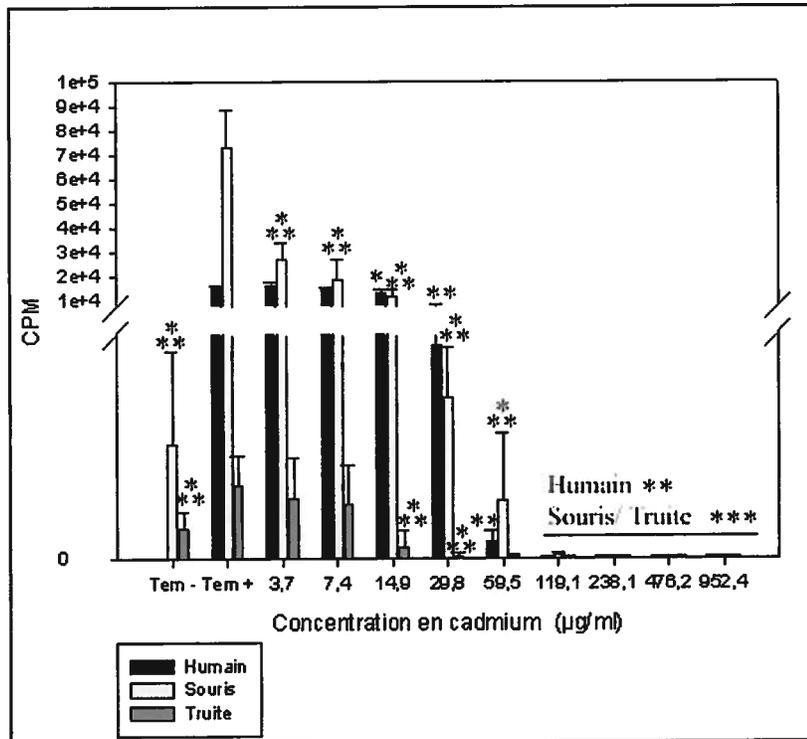


Figure 40 : Transformations lymphoblastique des lymphocytes T de différentes espèces du projet de recherche. Les cellules sont exposées avec des nanoparticules de Cd/S Cd/Te durant 48h pour les souris n=10 et les humains n=3 et durant 72h pour les truites n=11. * p< 0.05, ** p< 0.001, *** p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

1.3 Discussion sur les QDs

Les différents résultats obtenus dans cette première section indiquent une différence de réponse immunitaire selon les différents modèles d'animaux choisis pour les expériences. Selon les résultats, un gradient de la sensibilité des modèles animaux peut être défini.

Concernant la viabilité cellulaire, celle des macrophages de souris n'est pas affectée contrairement à celles des trois autres modèles. Pour les moules, seules les deux plus fortes concentrations présentent des différences significatives pour la viabilité et la phagocytose attestant que les particules sont toxiques à très fortes doses. La moule est donc un modèle sensible aux QDs pour des concentrations fortes $\leq 476,2 \mu\text{g/ml}$.

Cependant la truite et l'humain sont deux modèles sensibles au QDs. Les truites présentent une diminution significative de la viabilité dès $29,8 \mu\text{g/ml}$ de cadmium quand à la phagocytose, elle est stimulée par les QDs. Un phénomène d'immuno-stimulation est observé. Ceci est aussi observé pour les monocytes d'humain pour des valeurs moyennes (jusqu'à $119 \mu\text{g/ml}$).

En effet, la viabilité cellulaire des monocytes (humain) et des macrophages (truites) est significativement diminuée alors que la phagocytose ne l'est pas pour ces deux modèles. Ce phénomène peut être lié à une sur-activation de la réponse immunitaire. En effet, les nanoparticules sont assimilées par les macrophages, et induisent souvent une stimulation (Zolnik, Gonzalez-Fernandez et al. 2010).

Pour les poissons, des différences interindividuelles de phagocytose (immunoactivité et immunoefficacité) sont observées pour les plus hautes concentrations de QDs en raison des forts écarts types. Pour les fortes concentrations, la viabilité de macrophages de truites est significativement diminuée, ainsi les cellules sont affectées par les QDs mais celles qui restent vivantes sont sur-stimulées.

Pour le modèle murin, la phagocytose n'est pas affectée, ce modèle de mammifère est donc plus résistant que le modèle humain. Cependant, le temps d'incubation avec des nanoparticules et des billes pour les souris est inférieur à celui pour les humains (4 heures vs 21 heures). Ce temps peut donc avoir un lien avec la différence de phagocytose entre les deux modèles de mammifères. Il est possible que la voie de dégradation des QDs une fois intégrés dans la cellule immunitaire soit plus lente que pour les autres modèles. Cette théorie pourrait expliquer pourquoi les QDs sont moins toxiques pour les souris que pour les autres modèles animaux. Il a déjà été vu précédemment que les particules QDs pouvaient se dégrader dans certaines conditions, s'oxyder et donc induire une cytotoxicité (Derfus 2004). Ces conditions sont souvent oxydantes, elles vont réduire l'enrobage des nanoparticules et donc la déstabiliser. Derfus et al, (2004) et Park et al., (2010) ont démontré que la dégradation de particules par l'action des UV pouvait la rendre plus toxique.

D'autre part, il est possible que la composition du milieu puisse faire agréger les nanoparticules et donc les rendre moins disponibles pour les cellules. Des tests ont été réalisés par Koeneman et al, 2009 sur l'agrégation des QDs en fonction des milieux de cultures et ont trouvé une agrégation des nanoparticules avec du RPMI (Koeneman, Zhang et al. 2009). Ainsi les nanoparticules seraient moins disponibles pour les macrophages de souris.

Selon les résultats un gradient de phagocytose selon les espèces peut être établi : la moule est plus sensible que l'humain, lui-même plus sensible que la souris et la truite. Ainsi les résultats obtenus pour la phagocytose indiquent que les performances du système immunitaire sont différentes selon les espèces. Nos résultats indiquent aussi que les fortes doses de QDs induisent des différences de réponses entre les espèces. Pour la phagocytose, les écarts types

augmentent plus la concentration en cadmium contenue dans les QDs augmente, ceci indique des variabilités inter-individuelles.

Concernant la transformation lymphoblastique la viabilité cellulaire des poissons et des humains est altérée à de faibles concentrations ce qui est en lien direct avec la diminution de prolifération des LT. Cependant, pour la souris, l'altération de la transformation est remarquée dès les plus faibles concentrations de CdS CdTe QDs alors que la viabilité cellulaire est encore très forte (>80 %), les QDs induisent donc un effet mécanistique sur les cellules en perturbant leur prolifération et différenciation cellulaire. Ceci avait déjà été observé sur des lignée cellulaire de lymphome T de souris exposé durant 24h aucune cellule ne survivait à des doses supérieures à 400 µg/ml (Hoshino, Hanaki et al. 2004).

En effet, lors de l'activation cellulaire une acidification de pH survient dans le milieu extracellulaire et est susceptibles de dégrader la particule (De Vito 2006). Ainsi la toxicité des NPs accrue, pour les paramètres mitotiques, pourrait s'expliquer par la dégradation des nanoparticules. Lovric et al, 2005 avait étudié des QDs de première génération c'est-à-dire des points quantiques sans enrobage et avait démontré que le noyau des QDs seul pouvait être très toxiques et former des espèces oxygénées réactives (Lovric, Cho et al. 2005b; Kim, Park et al. 2010). Cette formation entraînant l'augmentation de la dégradation des QDs (sorte de phénomène cascade). Les conditions qui vont potentiellement faire varier le pH de la solution de nanoparticules sont considérées comme oxydantes et donc susceptibles de dégrader le matériau.

Cependant, les conditions internes à l'organisme peuvent aussi oxyder les nanoparticules. Lors de la phagocytose, par exemple, une grande quantité de H₂O₂ est sécrétée afin d'éliminer les particules étrangères à l'organisme, ce qui est susceptible de dégrader les QDs (Derfus 2004). Ceci a été vérifié dans l'étude de Clift et al, 2008 ; les auteurs ont démontré que des QDs incubés durant 120 min avec des macrophages de souris, présentaient une diminution de fluorescence liée à la dégradation des particules dans les lysosomes (Clift, Rothen-Rutishauser et al. 2008). Quant aux conditions environnementales, peu des données sont disponibles sur l'oxydation potentielle des nanoparticules étant donné qu'il est encore impossible de les mesurer dans le milieu.

Les résultats d'exposition, pour la réponse mitotique, aux QDs permettent de valider l'hypothèse selon laquelle la sensibilité aux QDs n'est pas la même en fonction des modèles.

En effet, les lymphocytes de souris semblent plus sensibles que ceux de truites et ceux d'humains.

Par ailleurs, nos résultats tendent à démontrer des différences de sensibilité en fonction des tests immunitaires utilisés. En effet la transformation lymphoblastique semble plus sensible que la phagocytose. Ainsi une action des nanoparticules dans le temps et une sensibilité accrue de la réponse mitotique contrairement à la réponse innée est supposée.

2. Immunotoxicité des AgNPs selon les espèces modèles du projet

2.1 Viabilité et phagocytose selon les différents modèles

Suite à l'exposition aux nanoparticules d'argent de la compagnie ViveNano[®] (AgNPs ViveNano[®]), les paramètres immunitaires suivants ont été observés chez les espèces modèles.

- La viabilité des différents types cellulaires (Figure 41)

- La phagocytose est évaluée selon deux critères, l'activité (ou capacité à phagocyter 1 bille et plus) ainsi que l'immunoefficacité (ou aptitude à phagocyter 3 billes ou plus). Ces deux paramètres ont été mesurés pour les modèles cellulaires, pour l'immunoactivité (Figure 42) ainsi que pour l'immunoefficacité (Figure 43)

- La transformation lymphoblastique (Figure 44 et Figure 45).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

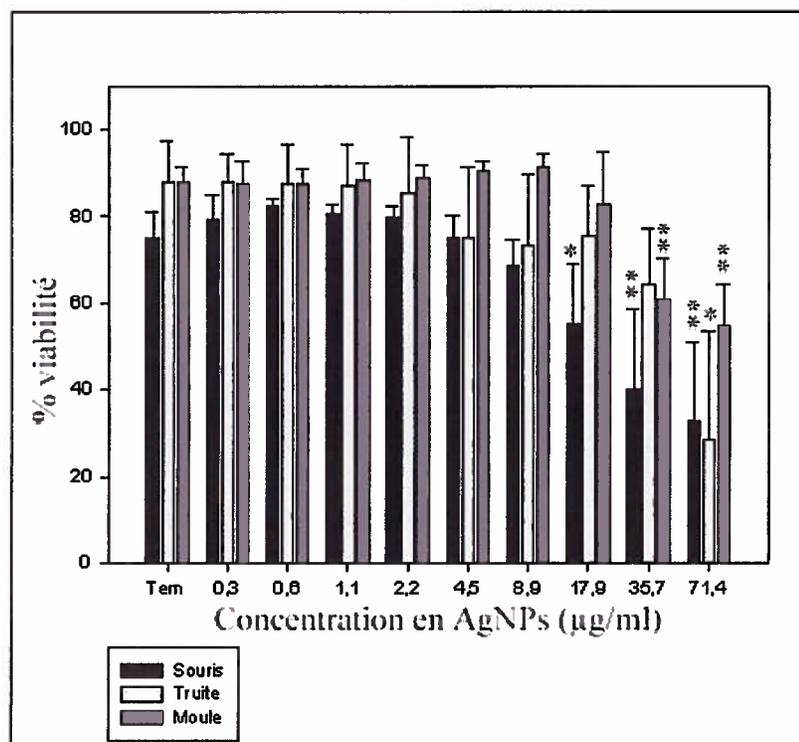


Figure 41 : Viabilité des macrophages de souris n= 6, truites n= 9 et les hémocytes de moules bleue n= 8 après exposition durant 21 heures aux nanoparticules d'argent. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Les nanoparticules d'argent vont induire à forte dose une diminution de la viabilité chez les espèces aquatiques (moules et truites). Il est à noter que les forts écarts types présents pour la truite à 71,4 µg/ml traduisent la différence interindividuelle aux fortes concentrations d'argent. La viabilité des macrophages de souris diminue significativement dès 17.9 µg/ml (p< 0.05) et très significativement diminuée dès 35.7 µg/ml (p<0.001) (Figure 41).

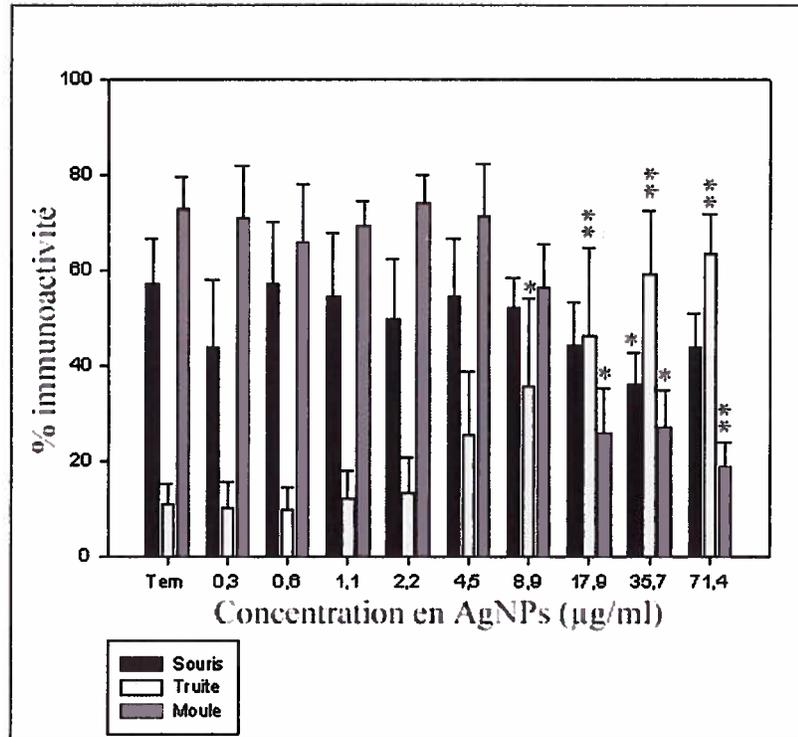


Figure 42 : Immunocapacité des macrophages de souris n= 6, truites n= 9 et les hémocytes de moules bleue n= 8 après exposition 21 heures aux nanoparticules d'argent. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

L'immunocapacité des macrophages de souris diminue significativement à 35.7 µg/ml. Une stimulation du système immunitaire est observée pour la truite arc-en-ciel, cette augmentation devient significative à partir de 8.9 µg/ml (p<0.05) et très significative à partir de 17.9 µg/ml (p<0.001). Finalement, l'activité de phagocytose pour la moule est significativement diminuée à 17.9 µg/ml et très significativement diminuée pour 71.4 µg/ml (Figure 42).

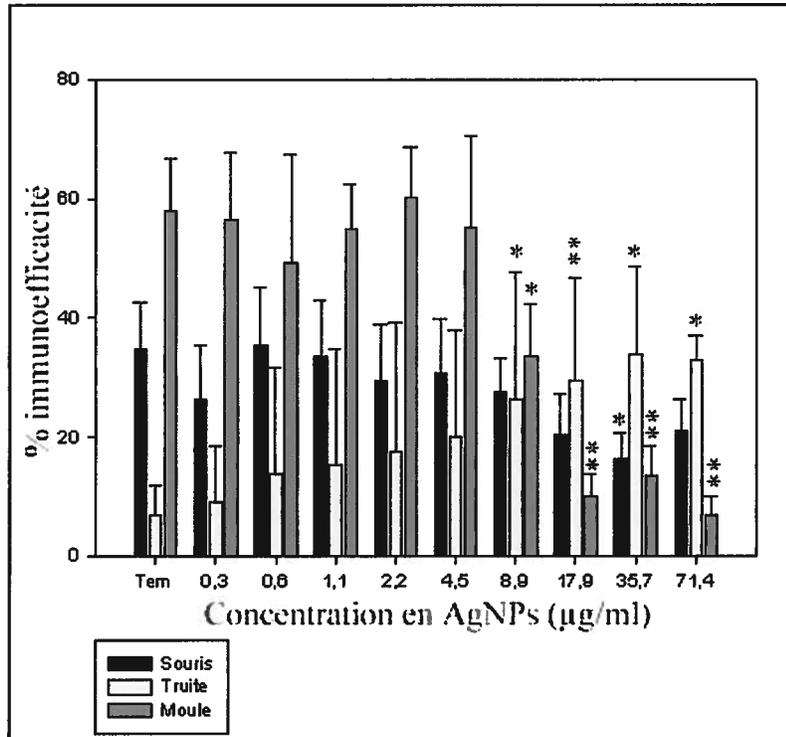


Figure 43 : Immunoefficacité des macrophages de souris n= 6, truites n= 9 et les hémocytes de moules bleues n= 8 après exposition 21 heures aux nanoparticules d'argent. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

L'immunoefficacité des macrophages de souris est significativement diminuée pour 35.7 µg/ml. Pour la truite, des patrons de réponses cellulaires identiques à ceux de l'immunoactivité, sont observés. L'efficacité phagocytaire est significativement augmentée dès 8,9 µg/ml. Finalement pour la moule, l'immunoefficacité est significativement diminuées dès 8.9 µg/ml et très significativement diminuée à partir de 17.9 µg/ml (Figure 43).

2.2 Viabilité et transformation lymphoblastique des différents modèles

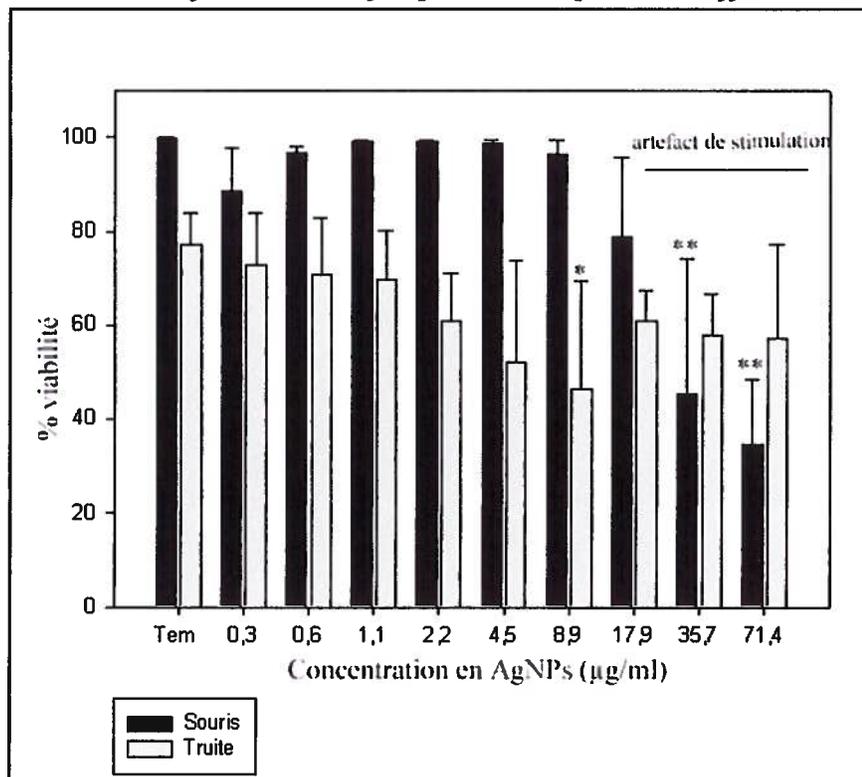


Figure 44 : Viabilité des lymphocytes de souris n= 6, truites n= 9 après exposition 48 heures et 72 heures aux nanoparticules d'argent. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

La viabilité des lymphocytes de truites est significativement diminuée pour les truites à 8.9 µg/ml (p<0.05). Pour les trois dernières fortes concentrations, la viabilité des truites augmente, ce phénomène est un artefact de stimulation due aux débris cellulaires présents dans la région d'intérêt analysé (Figure 44).

Pour la souris, la viabilité des lymphocytes à 48 heures est très significativement diminuée à partir de 35.7 µg/ml (p<0.001) (Figure 44).

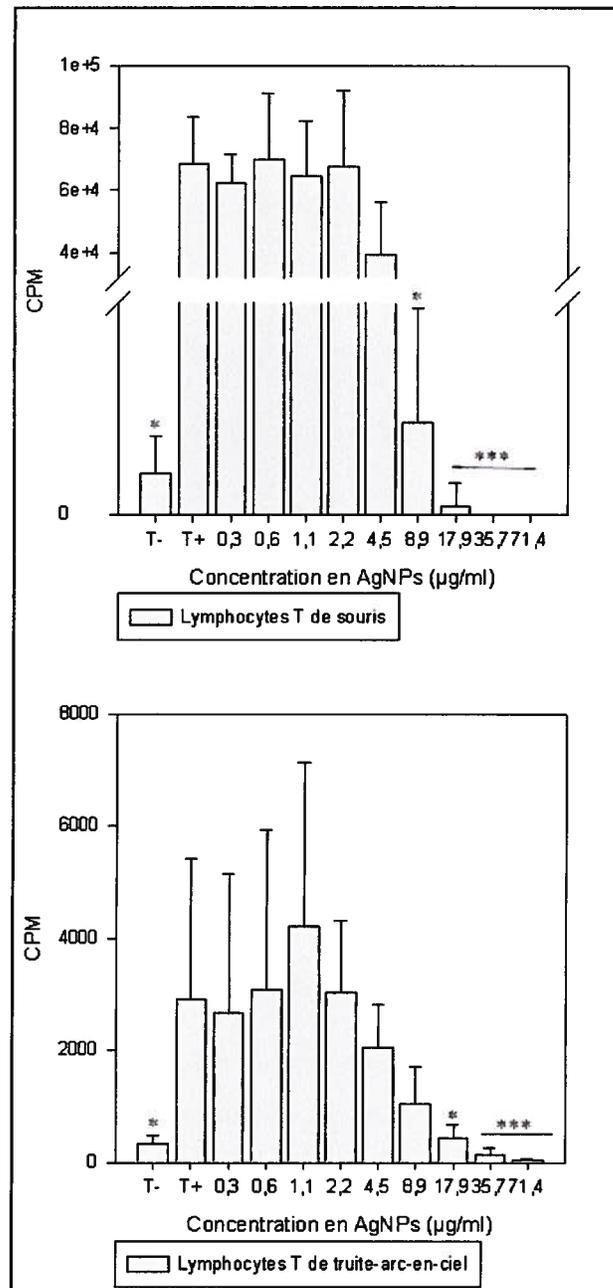


Figure 45 : Transformation lymphoblastique des lymphocytes T de différentes espèces du projet de recherche. Les cellules sont exposées avec des nanoparticules d'argent durant 48h pour les souris n=6 et durant 72h pour les truites n=5. * p< 0.05, ** p< 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.**

La transformation lymphoblastique pour la souris est significativement diminuée dès 8.9 µg/ml (p< 0.05) et très significativement diminuée à partir de 17.9 µg/ml (p< 0.001). Pour la truite, la prolifération cellulaire est stimulé pour de faibles concentrations de QDs puis elle est significativement diminuée à partir de 17.9 µg/ml (p< 0.05) et très significativement dès 35.7 µg/ml (p<0.0001) (Figure 45).

2.3 Discussion sur les AgNPs

Les différents résultats obtenus dans cette section indiquent une différence de réponse immunitaire selon les différents modèles d'animaux choisis pour les expériences. Selon les résultats des différents paramètres immunitaires, un gradient de sensibilité des modèles animaux peut être défini.

A forte concentration d'AgNPs ViveNano[®], la viabilité des trois modèles est significativement diminuée. Pour les truites, seule la dose la plus forte a une influence sur la viabilité, attestant donc d'une certaine résistance de ce modèle. Cependant, la souris présente une sensibilité accrue aux AgNPs ViveNano[®]. Ainsi, selon nos résultats pour la viabilité des cellules immunitaires un gradient peut être défini : la souris est un modèle plus sensible que la truite lui-même plus sensible que la moule. Le modèle de mammifère a donc le système immunitaire le moins résistant des trois modèles testés.

Concernant la phagocytose, l'immunoactivité et l'immunoefficacité présentent les mêmes profils de réponses. Selon les modèles, la fonction phagocytaire est plus ou moins altérée. Pour la moule bleue, la phagocytose diminue significativement avec l'augmentation de la concentration de cadmium exposée. Alors que pour les truites une stimulation de phagocytose est observée. Finalement, pour la souris, la phagocytose reste stable. Ainsi, selon les modèles, la sensibilité aux AgNPs ViveNano[®] n'est pas la même. Les macrophages de souris semblent résistants aux concentrations d'exposition, alors que les mécanismes cellulaires pour la moule sont altérés. De façon opposée, pour la truite une stimulation du système immunitaire est observée. Ces phénomènes de stimulation sont observés pour les nanoparticules, quel que soit leur type, à faible dose d'exposition (Iavicoli, Calabrese et al. 2010). Ces résultats valident l'hypothèse selon laquelle, les AgNPs ViveNano[®] agissent sur le système immunitaire des animaux. Selon le modèle d'animal choisi, ces performances vont être plus ou moins altérées. La moule est le modèle le plus sensible après la souris et la truite.

Concernant la réponse immunitaire acquise, les réponses des souris et des truites sont diminuées pour les fortes concentrations d'AgNPs ViveNano[®]. Une action mécanistique des AgNPs ViveNano[®] sur les lymphocytes de souris est observée. En effet, une altération de la transformation lymphoblastique est remarquable dès 8.9 µg/ml alors que la viabilité des lymphocytes n'est pas altérée à cette valeur. Pour les truites, des résultats identiques sont retrouvés lors de l'exposition aux AgNPs ViveNano[®]. Une légère stimulation est alors observée à faible dose. Des phénomènes semblables ont déjà été observés dans d'autres

études réalisées sur la toxicité des AgNPs à faibles doses (Shin, Ye et al. 2007; Kawata, Osawa et al. 2009). De plus, d'autres travaux ont confirmés qu'à forte concentrations d'AgNPs les fonctions cellulaires sont stoppées, et des phénomènes de cytotoxicité cellulaire, de diminution de la fonction mitochondriale et de prolifération des cellules mononucléaires du sang périphérique sont observés (Braydich-Stolle 2005; Shin, Ye et al. 2007). Ce qui concorde avec les résultats obtenus lors de nos travaux.

Selon les résultats de la réponse mitotique, les lymphocytes de truites sont plus sensibles que ceux de souris. De plus les résultats de phagocytose et de transformation lymphoblastique indiquent que ces deux biomarqueurs n'ont pas les mêmes sensibilités. Les lymphocytes T de souris et de truites sont plus affectés que les macrophages de ces mêmes espèces.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus lors des expositions aux AgNPs ViveNano[®], indiquent des changements de comportement immunitaire, dès les faibles concentrations de nanoparticules). Par contre, à forte dose d'AgNPs ViveNano[®], une toxicité sévère est observée.

3. Calcul des CI 50 pour les deux types de nanoparticules selon les modèles animaux, synthèse des résultats

3.1 Viabilité

Tableau 10 : a) Récapitulatifs des CI 50 pour les viabilités des monocytes d'humains, des macrophages de truites arc-en-ciel et de souris et des hémocytes de moules bleues. b) Récapitulatifs des CI 50 pour les viabilités des lymphocytes T d'humains, de truites arc-en-ciel et de souris. - = les tests n'ont pas été réalisés.

a)

Viabilité macrophages	QDs	AgNPs
Humain	559 µg/ml	-
Souris	> 952	36 µg/ml
Truite	716 µg/ml	55 µg/ml
Moule	582 µg/ml	> 71 µg/ml

b)

Viabilité lymphocytes	QDs	AgNPs
Humain	52 µg/ml	-
Souris	219 µg/ml	25 µg/ml
Truite	9 µg/ml	42 µg/ml

Concernant la sensibilité des espèces pour les QDs, les humains sont plus sensibles que les moules et que les truites. Aucune CI 50 n'est observée pour les souris. Pour les AgNPs ViveNano[®] la souris est le modèle le plus sensible, suivi par la truite. Aucune CI 50 n'est observée pour la moule exposée aux AgNPs ViveNano[®] (Tableau 10 Tableau 10 a). Les lymphocytes des truites sont plus sensibles que ceux d'humains et que ceux de souris (CI 50 truite > CI 50 humain > CI 50 souris). Pour l'AgNPs ViveNano[®] la souris est plus sensible que la truite (Tableau 10b)).

3.2 Phagocytose

Tableau 11 : a) et b) Récapitulatif des CI 50 pour les deux paramètres de phagocytose des monocytes d'humains, des macrophages de truites arc-en-ciel et de souris et les hémocytes de moules bleues.

a)

Immunoactivité	QDs	AgNPs
Humain	> 952 µg/ml	-
Souris	> 952 µg/ml	> 71 µg/ml
Truite	> 952 µg/ml	> 71 µg/ml
Moule	599 µg/ml	21 µg/ml

b)

Immunoefficacité	QDs	AgNPs
Humain	692 µg/ml	-
Souris	> 952 µg/ml	> 71 µg/ml
Truite	> 952 µg/ml	> 71 µg/ml
Moule	435 µg/ml	12 µg/ml

Concernant l'immunoactivité pour l'humain, la souris et la truite, aucune diminution n'est observée pour les QDs et les AgNPs. Ces résultats sont aussi retrouvés pour l'immunoefficacité des souris et des truites avec les deux NPs. Ainsi, aucune CI 50 pour ces modèles n'a pu être calculée. Pour l'humain, l'IC 50 de l'efficacité de phagocytose a été défini à 692 µg/ml. Pour la moule, des IC 50 ont été défini pour les deux paramètres de la phagocytose. Les IC 50 pour les hémocytes exposés aux QDs sont supérieurs à celles de l'AgNPs (Tableau 11 a et b)

3.3. Transformation lymphoblastique

Tableau 12 : Récapitulatifs des CI 50 pour les transformations lymphoblastiques des LT d'humains, de truites arc-en-ciel et de souris.

Transformation lymphoblastique	QDs	AgNPs ViveNano®
Humain	28.70 µg/ml	-
Souris	4.38 µg/ml	10.51 µg/ml
Truite	20.04 µg/ml	7.18 µg/ml

Pour la transformation lymphoblastique avec des QDs, la souris est un modèle plus sensible que la truite, lui-même plus sensible que l'humain. Avec des AgNPs ViveNano®, la truite est plus sensible que la souris (Tableau 12). Ainsi, selon les modèles, la sensibilité pour la transformation lymphoblastique n'est pas la même selon les nanoparticules.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU CHAPITRE 1

Selon les résultats obtenus, une perturbation des trois paramètres immunitaires principaux étudiés (la viabilité, la phagocytose et la transformation lymphoblastique) est observée lorsque les cellules sont mises en présence de nanoparticules. Ce premier chapitre valide donc la première hypothèse à savoir que les nanoparticules QDs et AgNPs ViveNano[®] ont un effet sur les cellules immunitaires. Les résultats obtenus pour les AgNPs ViveNano[®] et les QDs sont variables selon les modèles considérés, certains modèles sont immunosupprimés (humain, moule) et un autre est immunoactivé (truite). Ainsi, ces résultats valident l'hypothèse que selon les modèles expérimentaux les performances immunitaires ne sont pas identiques.

Les nanoparticules biodégradables peuvent être dirigées dans la voie classique d'élimination de pathogènes et donc stimuler le système immunitaire (Cui and Mumper 2002; Dobrovolskaia and McNeil 2007). Pour tous les modèles excepté la truite, une diminution de la phagocytose est observée, la réponse mécanistique des cellules immunitaires est donc affaiblie. La diminution de viabilité ou l'immunosuppression pourrait être liée à la libération des ions métalliques contenus dans les deux types de nanoparticules et toxiques pour les cellules (Lewinski, Colvin et al. 2008).

Selon la taille des particules, les cellules utilisent différentes voies d'incorporation. En fonction de la taille des particules certaines voies vont être favorisées, les voies d'endocytose comme la pinocytose sont favorisées pour les particules de petites tailles, la phagocytose pour les particules de plus grosses tailles comme les débris cellulaires et les bactéries (diamètre jusqu'à 150 nm) (Parak, Pellegrino et al. 2005). Selon leurs formes ; soit unitaire ou en agrégat, les nanoparticules peuvent être endocytées et vont donc être métabolisées. A faible dose, une stimulation du système immunitaire est observée dans nos résultats. Cette stimulation du système immunitaire est appelée hormèse elle est induite pour de faibles concentrations de contaminants (Iavicoli, Calabrese et al. 2010).

Une immunosuppression de la prolifération des LT est observée dans ce premier chapitre, et ce quelque soit le modèle étudié. En effet, certains agents immunosuppresseurs comme le cadmium agissent contre les lymphocytes T, perturbant leur développement et leur fonction (Zolnik, Gonzalez-Fernandez et al.). Les effets immunosuppressifs des métaux, comme le cadmium, sont connus pour agir sur le thymus (Lafuente, Gonzalez-Carracedo et al. 2003).

Cependant, dans la littérature peu de résultats concernant l'effet des nanoparticules formées de cadmium, telles que les QDs, sur le système immunitaire sont retrouvés. Notre étude indique une toxicité des nanoparticules de cadmium mais aussi de celles d'argent corrélée à une perturbation, allant jusqu'à l'immunosuppression, de la réponse immunitaire acquise.

Il est important de noter que la toxicité est dose dépendante, plus la dose en nanoparticules est forte plus la cytotoxicité est importante (Rai, Yadav et al. 2009; Maurer-Jones, Lin et al.). Ainsi, notre étude valide l'hypothèse que les QDs et les AgNPs ViveNano[®] induisent une toxicité selon la dose d'exposition. Cette relation entre la concentration et la toxicité des nouveaux matériaux s'applique donc aussi aux cellules immunitaires. Il reste à vérifier si cette toxicité peut être liée aux métaux et métalloïdes composants les QDs et les AgNPs ViveNano[®]. En effet, des études indiquent que l'instabilité des nanoparticules entraîne un relargage des ions dans le milieu qui sont reconnus pour leur toxicité cellulaire (Hardman 2006; Chan 2008; Zhang, Yu et al. 2008; Hillegass, Arti et al. 2010; Kim, Park et al. 2010).

Ce premier chapitre valide donc les différentes hypothèses évoquées en introduction. Les nanoparticules sont toxiques, selon certaines concentrations, pour les cellules immunitaires lors d'exposition in vitro. Selon les modèles d'études des phénomènes d'immunosuppression et des phénomènes d'immunostimulation sont observés. La toxicité de nanoparticules est dose dépendante. La réponse mitogénique est plus sensible que celle du système immunitaire inné.

Comme nous l'avons pu le remarquer lors de ces travaux, les perturbations immunitaires induites par une exposition aux nanoparticules (QDs et AgNPs) sont très peu documentés dans la littérature. Lors de ceux-ci nous avons pu voir que les AgNPs ont un impact certain sur la prolifération lymphocytaire. De plus, tel qu'Eom et al. (2010), l'exposent dans leurs travaux, l'exposition à des AgNPs va avoir des répercussions au niveau de certains facteurs d'expressions nucléaires et donc modifier l'expression génique des lymphocytes T. Il serait donc pertinent d'évaluer si des AgNPs, ou de d'autres formes de nanoparticules, peuvent perturber l'éducation thymique des lymphocytes T mais aussi perturber la différenciation cellulaire des lymphocytes B, leur activation, ou le taux de production d'anticorps.

Cette toxicité, quantifiée par les valeurs des CI 50, permet d'évaluer les performances du système immunitaire des différents modèles d'animaux lors d'expositions aux QDs et aux AgNPs ViveNano[®]. Selon les modèles, le système immunitaire est plus ou moins affecté par les nanoparticules (QDs et AgNPs ViveNano[®]) selon la gamme dose effet testée. Ainsi les

variations des paramètres immunitaires mesurées sont dépendantes des seuils de toxicité des particules et s'exprime selon un gradient d'espèces.

Tous les modèles animaux ne possèdent donc pas les mêmes sensibilités (Holsapple, West et al. 2003). Ces différences peuvent être attribuables au mode de vie des différents modèles mais aussi au degré de complexité du système immunitaire (Cooper 2003). Le système immunitaire est un système complexe basé sur différents types cellulaires comme les monocytes, les macrophages, les granulocytes, les lymphocytes et les cellules dendritiques aux fonctions variables (Mulcahy and Quinn 1986; Hayes 2007). Bien évidemment la complexité de ces systèmes n'est pas identique pour tous les animaux, elle varie donc selon le degré d'évolution (Nappi 2000). Cependant, certains organismes présentent des sensibilités accrues aux contaminants tels que les nanoparticules.

Pour les nanoparticules de cadmium, QDs, une gradation des performances du système immunitaire des différents modèles peut être résumée selon le Tableau 13.

Tableau 13 : Gradient de sensibilité des différents modèles animaux aux QDs selon les paramètres immunitaires.

QDS	
Paramètre immunitaire	Gradient d'espèces de plus sensible à moins sensible
Viabilité	Humain > Moule > Truite > Souris
Phagocytose	Moule ≥ Humain > Souris, Truite
Transformation lymphoblastique	Souris > Truite > Humain

En ce qui concerne la toxicité des QDs, la viabilité des monocytes du modèle humain est plus affectée que les cellules immunitaires des autres modèles. Le modèle humain est donc le plus sensible des modèles testés pour la viabilité des monocytes. Cependant la phagocytose du modèle humain n'est pas la plus sensible des modèles. Ceci s'explique par la sur-stimulation du système immunitaire soumis aux QDs.

La réponse immunitaire acquise chez la souris, autre modèle de mammifères, est le plus sensible des modèles testés. Ainsi que ce soit pour la viabilité des monocytes ou pour la transformation lymphoblastiques, les deux modèles les plus sensibles aux QDs sont les mammifères. La souris est un modèle d'étude très utilisé dans les évaluations de risques chez les humains. Ce modèle est utilisé car selon la littérature, il présente généralement des seuils de sensibilités comparables à ceux des humains (Vos and Van Loveren 1998). Cependant, selon nos résultats de viabilité et de transformation lymphoblastique, les souris ne sont pas aussi sensibles aux nanoparticules que les humains. Malgré des similarités de sensibilité entre les paramètres immunitaires, il existe donc une différence entre les deux modèles de mammifères pour un même paramètre immunitaire. En effet, les lymphocytes T de souris sont très sensibles aux QDs, davantage que ceux du modèle humain.

Pour les espèces aquatiques, comme la truite arc-en-ciel, la réponse mitotique est sensible à l'exposition aux nanoparticules. Le système de cytotoxicité chez les LT de truite étant très développé (Fischer, Utke et al. 2003). Bien que le système immunitaire inné soit conservé le long de l'évolution du système immunitaire, il subsiste des différences de réponses du système immunitaire des poissons face à un pathogène. Ceci indique donc que la réponse des mammifères ne peut être généralisée à tous les vertébrés (Klaper, Arndt et al. 2010). Les macrophages des truites sont résistants aux QDs et stimulés par leur présence. La truite arc-en-ciel est le seul modèle à présenter des stimulations de la phagocytose. Une étude précédente de Comez et al, 2007 et Mayer et al 2009 observaient aussi ce genre de phénomène qui pourrait être lié à la mise en présence de nanoparticules et l'hémolyse (Gomez, Gamazo et al. 2007; Mayer, Vadon et al. 2009). Quand à la réponse mitotique elle est de sensibilité intermédiaire à celle de mammifères.

Ainsi, les résultats obtenus dans ce chapitre permettent de confirmer l'hypothèse que la phagocytose est un paramètre immunitaire moins sensible que la transformation pour tous les modèles considérés. Pour les AgNPs ViveNano[®], une gradation de la sensibilité des espèces peut aussi être définie (Tableau 14).

Tableau 14 : Gradient de sensibilité des différents modèles animaux aux AgNPs selon les paramètres immunitaires.

AgNPs ViveNano[®]	
Paramètre immunitaire	Gradient d'espèces
de plus sensible à moins sensible	
Viabilité	Souris > Truite > Moule
Phagocytose	Moule ≥ Truite, Souris
Transformation lymphoblastique	Truite > Souris

Au regard de la viabilité, la souris est le modèle le plus sensible aux AgNPs ViveNano[®], cependant la phagocytose est relativement conservée (surstimulation de la phagocytose pour les cellules viables). Toutefois, la fonction phagocytaire de la moule est le paramètre immunitaire le plus affecté par rapport aux autres espèces. La viabilité des hémocytes étant conservée, nous pouvons affirmer que les AgNPs ViveNano[®] ont une action mécanistique sur les hémocytes. La moule est le modèle le plus résistant des différentes modèles testés, telles que l'attestent l'absence de CI 50 calculées (valeur de CI 50 supérieure à la gamme dose effet expérimentée). Ces organismes sont souvent utilisés comme espèce sentinelle lors de pollution présente dans la colonne d'eau. Ces organismes sont très adaptés à de fortes modifications des conditions environnementales (comme l'oxygène, la température et la disponibilité en nourriture) (Canesi and Viarengo 1991). Elles ont donc un fort degré de tolérance, ce qui pourrait en partie expliquer leur résistance aux nanoparticules. Les particules sont connues pour être stables dans l'eau (Zhang, Mi et al. 2009), mais leur stabilité dans un environnement marin est inconnue (voir chapitre 2). L'oxydation de nanoparticules étant déjà démontrée dans la littérature, (Andrievski 2003), les AgNPs sont donc susceptibles d'être aussi altérées en présence de sel.

Concernant la réponse immunitaire acquise, le modèle le plus sensible est la truite. Ceci est peut être imputable à la complexité du système immunitaire cytotoxique des truites. Selon les modèles la sensibilité n'est pas la même, les macrophages de souris sont les plus sensibles aux AgNPs ViveNano[®] alors que les LT de ce modèle sont les moins sensibles aux AgNPs (en

comparaison aux autres modèles). En règle générale, la sensibilité des LT exposées aux AgNPs ViveNano[®] est supérieure à celle des macrophages.

Selon nos résultats, la phagocytose semble être un test moins sensible à l'effet des nanoparticules que la transformation lymphoblastique. Le système immunitaire est continuellement en stade de renouvellement, comme la prolifération cellulaire, la différenciation, l'activation et la maturation (Holsapple, West et al. 2003). C'est donc un système fondamental de l'organisme qui réagit aux molécules du non soit comme les nanoparticules (Zolnik, Gonzalez-Fernandez et al.). Ceci est retrouvé dans nos résultats, les nanoparticules entraînent une activation ou une inhibition de la phagocytose selon les cas, mais à long terme les effets des nanoparticules sont plus délétères.

Selon les résultats, les AgNPs sont plus toxiques que les QDS, même si les deux types de nanoparticules présentent des atteintes cellulaires mécanistiques. En effet, précédemment nous évoquions la stabilité particulière et l'intégrité des nanoparticules. Il est démontré que les particules se dégradent dans certaines conditions oxydantes, tel que l'exposition à des UV et un changement de pH (Lovrić 2005a; Lovric, Cho et al. 2005b; Zhang, Zhang et al. 2006). Ainsi, la différence de toxicité observée entre les QDs et les AgNPs, peut être liée à la structure des nanoparticules. Les QDs sont enrobées de plusieurs couches dont un polymère alors que pour l'argent, le noyau métallique est seulement recouvert d'une couche de polymère. La faible épaisseur de la couche d'enrobage pourrait donc être liée à la plus forte toxicité de la particule. D'autre part, une étude de Bar-Ilan et al, 2009 ont démontré que les nanoparticules d'argent étaient plus toxiques que celles d'or, lors de leurs tests *in vivo* sur des danios (Bar-Ilan, Ralph et al. 2009). Une étude comparative réalisée par Canesi et al, (2010 b) avec différents types de nanoparticules sur des hémocytes de moules ont démontré que les nanoparticules. Bien évidemment la toxicité d'un composé plutôt qu'un autre ne peut être décidée sur un seul critère, il faut aussi considérer la taille, la concentration, la chimie et la fonctionnalisation de la particule (Oberdörster 2005; Nel, Xia et al. 2006)

D'autre part, peu d'études ont été menées sur plusieurs modèles d'études exposés *in vitro* aux QDs. Certaines études ont analysé la toxicité des QDs de la compagnie ViveNano[®] sur différents modèles d'études (moule d'eau douce, truite) (Gagné, Auclair et al. 2008a; Peyrot, Gagnon et al. 2009; Gagné, Fortier et al. 2010). Mais aucune étude n'a utilisée une solution commerciale en confrontant les performances du système immunitaire *in vitro* de différents modèles d'animaux. Ainsi ce travail est un précurseur dans l'analyse de la toxicité des

nanoparticules et la comparaison de leurs effets sur le système immunitaire de différents modèles animaux. Ceci est d'autant plus important que les nanoparticules qu'il s'agisse des QDs ou des AgNPs ViveNano[®] sont reconnus pour posséder un noyau métallique potentiellement toxique pour les cellules. En effet, pour les QDs, le cadmium contenu dans les particules est connu pour sa toxicité et des effets immunosuppresseur qu'il induit. La première source de toxicité des particules connu provient du Cd²⁺ libre présent dans les solutions de particules ou relargué dans les cellules lors d'exposition (Parak, Pellegrino et al. 2005; Rzigalinski and Strobl 2009). Les ions Ag⁺ quand à eux sont aussi reconnus pour leur toxicité chez les procaryotes, chez les poissons et les bivalves (Fabrega, Luoma et al. 2011) lors de l'oxydation des AgNPs dans l'eau (Blaser, Scheringer et al. 2008).

Les résultats de ce chapitre et la comparaison des performances des différents systèmes immunitaires sont très importants. La plupart de ces modèles sont choisis car ils représentent des espèces sentinelles ou des modèles utilisés dans des études d'impact. Elles permettent ainsi d'évaluer les risques liés aux nanoparticules (Ostiguy, Lapointe et al. 2006; SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) 2009). Dans un contexte où les nanoparticules sont déjà très médiatisées, et font l'objet de préoccupations de sécurité, ces résultats sont très importants (Balbus 2006).

Nos résultats ont démontrés que l'humain est sensible aux QDs, de même, les souris sont aussi très sensibles aux AgNPs ViveNano[®] (macrophages et lymphocytes) et aux QDs (lymphocytes). Ainsi les modèles de mammifères répondent rapidement aux nanoparticules. Ce type de résultats est très important dans les études de risques pour l'homme.

Dans ce chapitre, plusieurs hypothèses ont été validées : selon les espèces, des différences de performance du système immunitaire sont observables suite à l'exposition aux QDs ou aux AgNPs ViveNano[®]. De plus, nos résultats valident l'hypothèse que le modèle mammifère, selon les conditions, est un modèle très sensible aux QDs et aux AgNPs ViveNano[®]. Nos résultats ont aussi indiqué que selon les types cellulaires la sensibilité aux nanoparticules n'est pas identique. Par ailleurs nous avons aussi démontrés que la sensibilité du système immunitaire est plus importante lorsqu'il est exposé aux AgNPs ViveNano[®] plutôt qu'aux QDs.

CHAPITRE 2 : ÉTUDES DES FACTEURS INFLUANÇANTS LA TOXICITÉ

INTRODUCTION DU CHAPITRE 2 :

Il a été vu dans le premier chapitre que les points quantiques (QDs) et les nanoparticules d'argent (AgNPs) peuvent altérer les réponses immunitaires. Dans la littérature, il a été démontré que la toxicité des nanoparticules (NPs) est liée à la concentration des nanoparticules, mais aussi à leurs tailles, leurs formes, leurs porosités, leur charges réactives et leur chimie (Nel, Xia et al. 2006; Oberdörster 2007; Jiang, Oberdörster et al. 2009; Oberdörster 2010). Cependant, le vrai enjeu de la toxicité des nouveaux matériaux est lié à leur composition. Les études comparent donc de plus en plus l'impact des QDs et du cadmium sur différents modèles d'étude *in vivo* (Lin, Chang et al. 2009a). Ainsi, depuis les 5 années, de nombreuses études sont menées sur l'interaction des nanoparticules avec les cellules, le but étant de donner le plus d'informations possible concernant la potentielle toxicité de ces matériaux, en raison du manque d'informations à ce sujet (Braydich-Stolle 2005; Kirchner 2005).

Les nanoparticules sont connues pour avoir des propriétés spécifiques qui sont différentes de celles de leurs composants (Maysinger 2007). Les nanoparticules principalement employées dans ce projet sont basées sur du cadmium (Cd) du tellure (Te) pour les QDs et sur l'argent pour les AgNPs ViveNano[®].

Le cadmium (Cd) est bien connu pour sa toxicité, chez les mammifères terrestres et aquatiques en tant que polluant prioritaire très cytotoxique (Coles 1995; Campbell 2006; Nordberg, Fowler et al. 2008). De plus, la toxicité du cadmium est liée à un temps de résidence très long, environ 10 à 12 fois supérieur à celui du Te (Lin, Chang et al. 2009a). Le cadmium est un élément chimique qui peut perdurer longtemps dans l'organisme, par exemple chez les rongeurs (rat et souris) de 200 à 700 ans.

Les QDs (CdTe, CdS) sont constitués des métaux, plus particulièrement de cadmium dont la toxicité est reconnue (Balbus 2006; Rzigalinski and Strobl 2009). Par ailleurs, cette toxicité varie au niveau de la cellule et de ses organites selon la taille des nanoparticules (Oberdörster 2010). En effet, plus la nanoparticule est petite, plus le rapport taille surface joue un rôle important : une particule de petite taille aura une surface de contact plus grande et peut donc potentiellement être plus toxique (Oberdörster 1994; Duffin, Tran et al. 2007). Ainsi plusieurs paramètres jouent un rôle dans la toxicité des particules : la taille, la forme, le stade d'agglomération, les propriétés de surface (enrobage, charge, chimie), la solubilité, la cristallinité, la concentration en métal (Oberdörster 2010). Il est donc primordial, lors d'étude

en nanotoxicologie, de caractériser les nanoparticules, afin d'étudier les réponses cytotoxiques *in vitro* de la particule et de ses composants.

Dans le cas des QDs et des AgNPs, la particule est formée d'un noyau inorganique et d'une coquille ou enrobage, de nature organique comme du polyéthylène glycol pour les QDs (Balbus 2006) et de polyacrylate de sodium pour les AgNPs. Il est très important de noter que l'enrobage, quelle que soit la particule, vient stabiliser et solubiliser celle-ci. Il représente l'une des caractéristiques fondamentale de la nanoparticule à analyser en toxicologie (Sutherland 2002; Smith and Nie 2009; Oberdörster 2010). Une particule qui est mal enrobée ou qui n'est pas enrobée n'est pas stable et donc peut entraîner la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) (Maysinger 2007). Ces espèces étant connues pour leurs actions néfastes sur les organelles. Pour le cas des QDs, un noyau métallique dont l'enrobage est altéré va engendrer un relargage des ions Cd^{2+} entraînant une diminution de la viabilité et des fonctions cellulaires (Derfus 2004; Michalet 2005; Male, Lachance et al. 2008). Ceci est aussi observé pour les ions Ag^+ (Ahamed, Posgai et al. 2009; AshaRani, Hande et al. 2009).

La stabilité physique des nanoparticules peut être altérée par de nombreux facteurs qui vont endommager celles-ci : les UV, les changements de pH, la salinité, la dureté de l'eau, la présence de matière organique etc. (Maynard 2007; Handy, Owen et al. 2008). Il est donc très important de connaître la chimie, la structure et le comportement des nanoparticules lors d'étude en toxicologie. Dans la littérature, il a été démontré que les particules peuvent s'agglomérer en plus grosses particules (macromolécule) avec une structure complexe, et les petites particules peuvent être encapsulées dans des matériaux composites (Maynard 2007). De même, les nanoparticules peuvent exister sous plusieurs formes dans une même solution mère (formes monomérique, agrégat, fragments de nanoparticules) (Peyrot, Gagnon et al. 2009). Ces comportements physiques sont susceptibles de varier selon le milieu dans lequel les NPs sont présentent. En biologie cellulaire, différents milieux de culture sont employés, selon les espèces étudiées, chacun d'entre eux possédant sa propre composition chimique. Il est donc fondamental d'évaluer la stabilité des NPs dans les milieux de culture lors d'étude multi-espèces.

Selon l'hypothèse que les nanoparticules possèdent des caractéristiques spécifiques et variables selon le milieu dans lequel elles sont retrouvées, on peut s'attendre à observer des comportements variables pour les QDs et les AgNPs selon les milieux de culture utilisés. Ce chapitre va donc être axé sur la caractérisation des nanoparticules étudiées dans le projet. Il

s'agira d'une évaluation chimique (étude des nanoparticules dans les différents milieux de culture). De plus, selon la littérature, plusieurs paramètres peuvent influencer la toxicité des NPs. Ainsi, la deuxième partie de ce chapitre va porter sur la spéciation, c'est-à-dire l'étude de la toxicité des QDs et des AgNPs vs celle des métaux qui les composent. Comme évoqué en début de chapitre, la taille joue aussi un rôle dans la toxicité de ces nouveaux matériaux, la troisième partie de ce chapitre porte donc sur la caractérisation de la toxicité des nanoparticules de cadmium et d'argent selon leurs tailles.

1. Caractérisation des particules

La dissolution des nanoparticules dans les milieux de culture est souvent très différente de celle dans l'eau. En effet, la plupart des nanoparticules sont vendues dans des solutions de densité ≥ 1 (souvent de l'eau). Cependant, une fois exposées dans le milieu, les particules vont donc avoir des comportements différents. Il est donc fondamental de connaître la chimie des particules car leur dissolution joue un rôle sur leur toxicité. Cette dissolution varie selon la composition de la NPs et l'espèce animale choisie (Griffitt, Luo et al. 2008). La dissolution des particules dans le milieu de culture explique en partie l'augmentation de mortalité cellulaire lors d'exposition aux NPs (Griffitt, Luo et al. 2008).

De plus, la plupart des études sont basées sur la caractérisation des nanoparticules que ce soit selon leur taille, leur forme, leur niveau d'agrégation, leur charge de surface ou leur potentiel ζ (Balogh, Nigavekar et al. 2007; Jiang, Oberdörster et al. 2009). Il est donc essentiel de connaître le matériel avec lequel les expériences sont menées.

Selon l'hypothèse que les nanoparticules ont une chimie liée à leurs caractéristiques intrinsèques, nous allons tenter de démontrer que le comportement des nanoparticules est différent selon les milieux de culture. De plus, nous allons tenter d'évaluer le comportement des nanoparticules mise en présence de macrophages de souris. Les objectifs de cette section sont donc : d'étudier la taille, la forme des particules, la concentration et la dispersion des nanoparticules dans chaque milieu de culture.

1.1 Matériel et méthode

1.1.1 Visualisation des nanoparticules au microscope électronique

Les nanoparticules de cadmium QDs et d'AgNPs de la compagnie ViveNano[®] ont été dilués 1/21 avec de l'eau stérile puis les échantillons ont été conservés dans des vials à 4 °C.

Les échantillons ont été fixés sur des lamelles avec 2.5 % glutaraldéhyde dilué à 100 mM de tampon cacodylate (pH 7.4). Ils ont été alors post-fixés avec 1% de tetroxide d'osmium dilué à 100 mM dans du tampon cacodylate. La monocouche a été déshydratée par différents bains d'éthanol, les échantillons ont été inclus dans de la résine époxy et incorporés avec la résine dans des capsules Beem[®]. Puis des coupes ont été sectionnées à environ 60 nm, les sections ont été colorées avec 4% d'acétate d'uranyle pendant 40 min et fixées avec une solution de citrate de plomb durant 10 min. Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Joël 1230) opérant à 60 kV. Les nanoparticules ont été observées au microscope électronique en transmission (TEM) afin d'observer la taille, la forme et le degré d'agglomération des particules.

1.1.2 Milieux de culture et nanoparticules

Il est à noter que pour faciliter la compréhension de la thèse et des différentes nanoparticules utilisées le nom de la compagnie et le type de nanoparticules vont être cités.

Au laboratoire, les différents milieux de culture ont été testés avec différentes concentrations de QDs et d'argent (Ted Pella^{inc} et ViveNano[®]) durant 24 h. Puis les dosages d'éléments ont été réalisés avec un ICP-MS Nexion 300. Différents milieux de cultures testés :

- 1) Eau stérile (véhicule des nanoparticules).
- 2) Milieu RPMIc (souris et humain) : Milieu 1640 (Sigma Aldrich, On, Canada) complété avec 10 % de SVF désactivé, 5 % de Pen strep .
- 3) Milieu RPMI sans bicarbonate (poisson) : Milieu RPMI (Sigma Aldrich, On, Canada) complété avec 10 % SVF et 5 % Pen strep, pH ajusté à 7.4.
- 4) Eau de mer stérile : Eau distillée avec 35 ppt de sel de mer véritable (Ocean Reef) filtration sur membrane 0.22 µm pour stérilisation.

Pour ces expériences, 3 sortes de nanoparticules ont été utilisées : les points quantiques de Vive Nano[®] (QDs), les nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc} (20, 40, 60, 80 nm), et les

nanoparticules d'argent de Vive Nano[®] (AgNPs Vive Nano). Les QDs et les nanoparticules de Ted pella^{inc} ont été utilisées selon la concentration mère fournie par le distributeur. Afin de connaître la concentration massique de chaque élément contenu dans la particule, 5 ml de chaque milieu de culture évoqué précédemment ont été placés dans des Falcon 15 ml. Puis, les nanoparticules ont été mélangées au milieu de culture à raison d'une dilution 1/21 (soit 150 µl de nanoparticules dans 3 ml). Ainsi, dans le RPMIc, le RPMI sans bicarbonate, l'eau de mer et l'eau stérile, pour les différentes NPs : 6 NPs ont été analysées à savoir : les QDS, AgNPs ViveNano, Ag 20 nm, Ag 40 nm, Ag 60 nm, Ag 80 nm. Pour les QDs et les AgNPs ViveNano[®], 6 concentrations ont été testées (Tableau 16). Les 6 concentrations ont été choisies selon la gamme dose réponse réalisées dans le chapitre 1, reproduisant ainsi les conditions expérimentales. Puis, les échantillons ont été maintenus à 4°C et envoyés à Perkin Elmer[®] (Toronto) pour des expériences avec le Nexion 300.

Le Nexion 300 (Perkin Elmer[®], Toronto, On) est un ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer*), les échantillons envoyés ont été dilués 10x avec une solution de 1% d'acide nitrique avant l'analyse par ICP-MS. Comme toute torche plasma, les échantillons sont nébulisés dans une chambre de nébulisation (cyclonique) et seules les fines particules sont introduites dans le plasma. Une fois dans le plasma, les aérosols contenant les nanoparticules vont se sécher, les nanoparticules vont se volatiliser, s'atomiser et s'ioniser. Les ions formés vont être séparés et quantifiés par spectrométrie de masse. Ainsi, un ICP-MS permet d'analyser la quasi-totalité des éléments présents dans le tableau périodique. Les seuils de détection sont relativement faibles et il est possible de quantifier les ratios isotopiques d'un élément.

Le terme « isotope » est employé pour deux atomes de même nombre de protons, mais possédant un nombre de neutrons différent. Ainsi, les isotopes ont le même nombre de protons dans le noyau atomique (même numéro atomique Z) mais un nombre de masse (A) différent.

1.1.3 Caractérisation des nanoparticules

- Les nanoparticules de cadmium et d'argent de la compagnie ViveNano[®]

Les nanoparticules de Cd/S, Cd/Te (QDs) de la compagnie ViveNano[®] et les nanoparticules d'argent de cette même compagnie (AgNPs ViveNano[®]) sont identiques à celles employées dans le chapitre précédent (voir sections 5.1 et 5.2 du chapitre 1). Les gammes doses effets

utilisées sont les mêmes que celles décrites dans les voir sections 5.1 et 5.2 du chapitre 1 et Tableau 16.

- Les nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}

Une autre sorte de nanoparticules d'argent (AgNPs TP) provenant de la compagnie Ted Pella (Ted Pella^{inc} Redding, USA) a été testé. Il s'agit d'une solution commerciale vendue largement. Ces nanoparticules sont composées d'un noyau d'argent et enrobées de citrate de sodium dihydraté, ce qui permet de donner sa forme aux nanoparticules. Les nanoparticules sont fournies dans une solution aqueuse et portent à leur surface des charges négatives (données de la compagnie). Les nanoparticules de Ted Pella^{inc} se déclinent sous 4 tailles : 20 nm, 40 nm, 60 nm et 80 nm. Plus les particules sont petites plus la suspension de NPs est jaunes. Inversement plus les particules sont grosses, plus la suspension devient gris clair. Les nanoparticules d'argent on été dosées à l'aide d'un ICP-ES (gracieuseté de Patrice Turcotte, Environnement Canada) ainsi, selon les tailles, les concentrations d'argent totales dosées dans les solutions de Ted Pella^{inc} étaient légèrement variables (Tableau 15).

Tableau 15: Mesure de la concentration d'argent contenue dans les nanoparticules de Ted Pella^{inc} (AgNPs TP).

Taille des nanoparticules d'argent de Ted Pella (AgNPs TP)	Mesures de la concentration d'argent (mesure par ICP-ES)
20 nm	6.8 mg/L
40 nm	6.6 mg/L
60 nm	5.9 mg/L
80 nm	5.6 mg/L

1.1.4 Cellules et milieux de culture avec les QDs et les AgNPs ViveNano[®]

Afin de tester la quantité de nanoparticules transmise aux cellules et d'évaluer si les particules sont intégrées entièrement par les cellules immunitaires, des macrophages de C57Bl/6 ont été exposés aux QDs et au AgNPs ViveNano[®]. Les macrophages de souris ont été prélevés comme indiqué dans les sections du chapitre 1. Les cellules ont été ajustées à 1 million / ml à l'aide de RPMIc (Sigma Aldrich, On, Canada). Puis, dans des Falcon 5 ml, 3 millions de

macrophages ont été mis en présence de 142 µl de nanoparticules selon les dilutions suivantes :

Tableau 16 : Concentration des NPs testés avec les différents milieux de culture et les macrophages de souris. Les dilutions des NPs ont été réalisées dans de l'eau stérile (véhicule des NPs)

Dilution de QDs	Concentration en QDs (µg/ml)	Dilution d'AgNPs ViveNano®	Concentration en AgNPs ViveNano® (µg/ml)
0	0	0	0
1/256	3,72	1/256	0,28
1/128	7,44	1/128	0,55
1/64	59,52	1/64	1,11
1/32	119,5	1/32	2,23
1/8	238,1	1/4	17,85

L'expérience a été réalisée en triplicata. Le mélange cellules et nanoparticules a été incubé à 37 °C (5 % CO₂) durant 21h. Après l'exposition, la solution a été centrifugée durant 10 min à 2000 rpm. Ainsi, les cellules ont été séparées du surnageant. Le surnageant a été placé dans un Falcon 15 ml et les cellules ont ensuite été fixées à l'aide de 3 ml de la solution de fixation fait de 0.2 % de sodium azide et 0.5 % de formaldéhyde. Puis les cellules et les surnageants ont été conservés à 4°C avant d'être envoyé et analysé par Perkin Elmer® (Toronto) pour des expériences avec le Nexion 300.

1.2 Résultats

1.2.1 Visualisation des nanoparticules au TEM

- Les Quantum Dots

Les nanoparticules ont été observées selon une dilution 1/21 étant donné que la solution mère était trop concentrée il était donc difficile d'obtenir des images avec une bonne résolution.

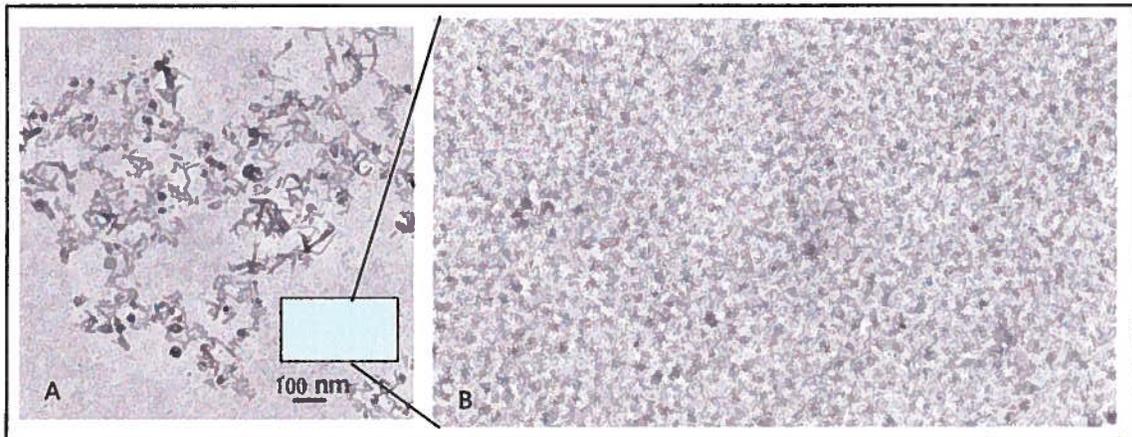


Figure 46 A et B : Images des nanoparticules de cadmium en microscopie électronique. La photo A est la solution stock diluée 1/21 dans de l'eau distillée stérile. La photo A est observée avec un grossissement $\times 20\,000$ et un haut voltage de 60 Kv. La photo B est un agrandissement 37,8 fois de la zone bleue de la photo A.

La photo de la Figure 46 A indique que les nanoparticules une fois diluées s'agglomèrent en formation ≤ 25 nm. Ses agglomérats sont probablement dus à des liaisons covalentes entre les NPs. Cependant les nanoparticules de cadmium sont aussi présentes sous forme monomérique. Les nanoparticules dans la Figure 46 B sont très concentrées et bien individualisées. Le grossissement de la zone bleue indique que les nanoparticules sont aussi présentes sous forme unitaires dans la solution. Chaque point noir représente un point quantique. Le diamètre moyen du QDS a été déterminé par TEM 14 ± 3 nm.

- les AgNPs ViveNano®

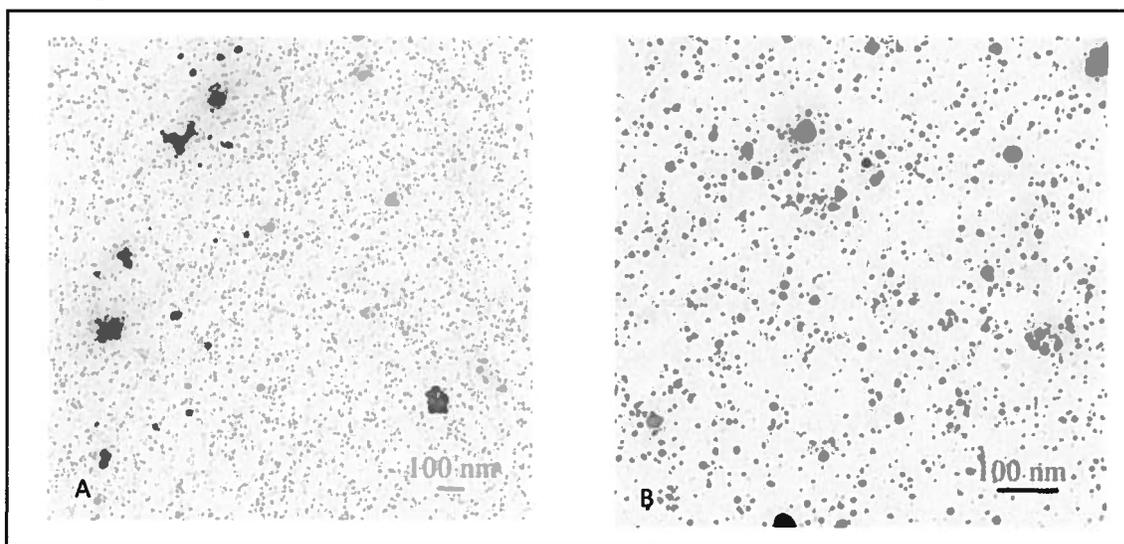


Figure 47 A et B : Images des nanoparticules de d'argent en microscopie électronique. Les deux photos sont prises à partir de la solution stock diluée 21 fois dans de l'eau distillée stérile. La photo A est observée avec un grossissement $\times 12\ 000$ et un haut voltage de 60 Kv. La photo B est observée avec un grossissement $\times 30\ 000$ et un haut voltage de 60 Kv.

Les deux photos des nanoparticules d'argent indiquent peu d'agrégat la plupart du temps les particules sont bien identifiables. Quelques agrégats sont cependant observables sur la photo de gauche. En règle générale, ces agrégats ont une taille ≤ 100 nm. Et les autres nanoparticules d'argent ont une taille < 20 nm (Figure 47).

1.2.2 Mesure des limites de détection du Nexion 300

Les données ci-dessous sont exprimées en ppb c'est-à-dire des parties par billions, soit des $\mu\text{g/L}$. Les données ci-dessous ont été fournies par Chady Stephan (Perkin Elmer®, Toronto, On).

Tableau 17 : Seuil de détection des différents isotopes mesurés par le Nexion 300

	Isotopes	LD 1-NGF (ppb)	LD 0.97-NGF (ppb)
Zn	66	0,043791	0,003415
Zn	68	0,026656	0,0178767
Ag	107	0,000182	0,0005611
Ag	109	0,000777	0,0007803
Cd	111	0,000845	0,000312
Cd	112	0,000456	0,0005469
Cd	114	0,00019	0,0003471
Te	126	0,00235	0,0027071
Te	128	0,005207	0,0050169
Te	130	0,008156	0,0020167

Comme le présente le Tableau 17, les seuils de détection sont très faibles pour les différents isotopes soit en moyenne :

Tableau 18 : Seuil de détection moyen des différents isotopes d'intérêt.

Isotope	Concentration (ppb)	Ecart type (ppb)
Argent	4.8×10^{-4}	4.21×10^{-4}
Cadmium	4.97×10^{-4}	3.30×10^{-4}
Tellure	5.24×10^{-4}	2.90×10^{-4}

Ainsi, les mesures réalisées sont fines et détectent des concentrations en éléments de l'ordre de 10^{-7} µg/ml (Tableau 17 et Tableau 18).

Les nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc} de différentes tailles

Les nanoparticules de Ted Pella^{inc} ont aussi été analysées par le Nexion 300. En fonction de la taille des particules, ce qui a permis de calibrer l'appareil pour les analyses.

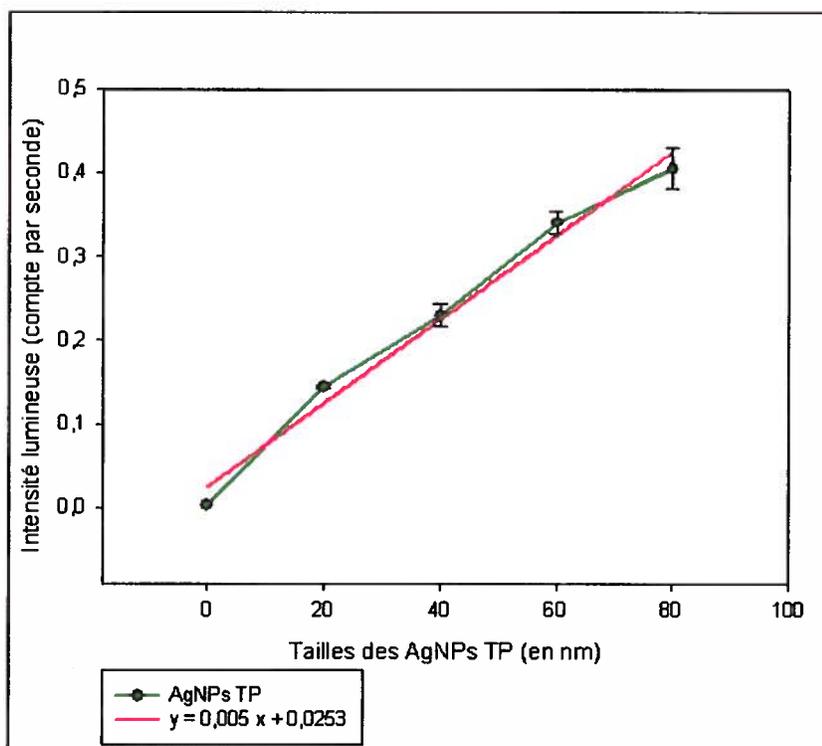


Figure 48 : Courbe de calibration réalisée avec le Nexion 300 et les différentes tailles de nanoparticules d'AgNPs TP. Afin de quantifier l'intensité lumineuse les solutions stock d'AgNPs TP ont été diluées 5000 fois.

La courbe de régression permet d'indiquer que le Nexion 300 est apte à analyser les différentes tailles de nanoparticules pour des échantillons dilués. En fonction de la taille de la particule l'intensité détectée par l'appareil est différente. Plus la taille de la particule est grosse plus l'intensité mesurée est importante (Figure 48). Les résultats permettent de tracer une droite de régression $R^2 = 0,99$, ce qui permet lors des analyses de solutions de nanoparticules d'argent de la compagnie Ted Pella^{Inc} d'extrapoler la taille de particules présentent dans l'échantillon.

1.2.3 Les nanoparticules d'argent de ViveNano® dans les différents milieux de culture

- dans l'eau stérile

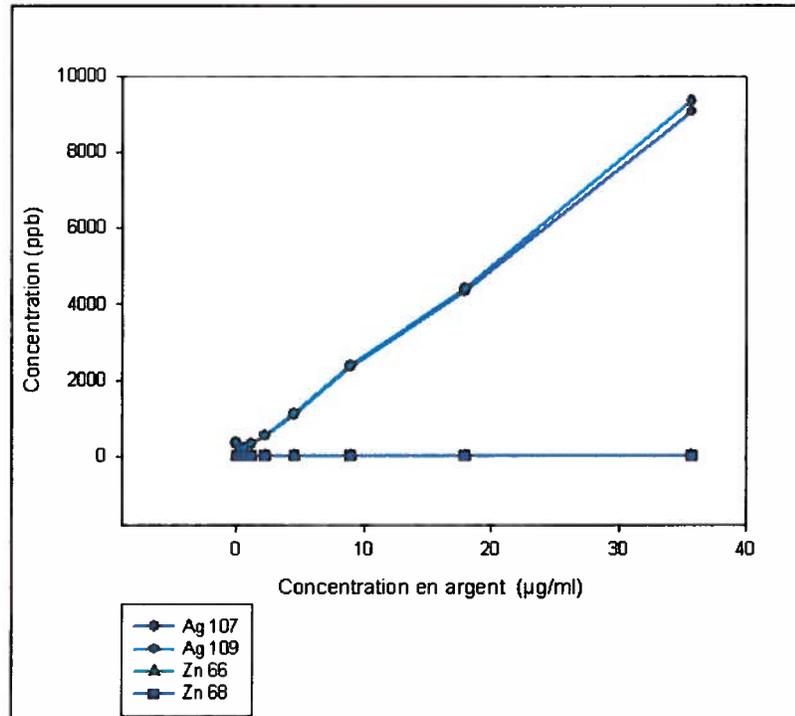


Figure 49 : Dosages des différents isotopes mesurés dans le mélange AgNP et eau stérile.

Les concentrations des différents isotopes présents dans la suspension faite de nanoparticules d'argent et d'eau présentent surtout une forte quantité des deux isotopes d'argent (Figure 49). Par ailleurs, en fonction de la diminution de la concentration d'AgNPs, une diminution de la concentration en argent est mesurée. Il est important de mentionner que les concentrations des solutions mères fournies par Vive Nano en argent sont de 1.5 mg/ml, une fois diluée, la dose d'exposition maximale est de 71.4 µg/ml d'AgNPs. La somme des différents isotopes d'argent, soit l'argent 107 et l'argent 109, pour une dose d'exposition de 35.7 µg/ml, est mesurée à 18.38 µg/ml d'argent.

- dans le RPMIc

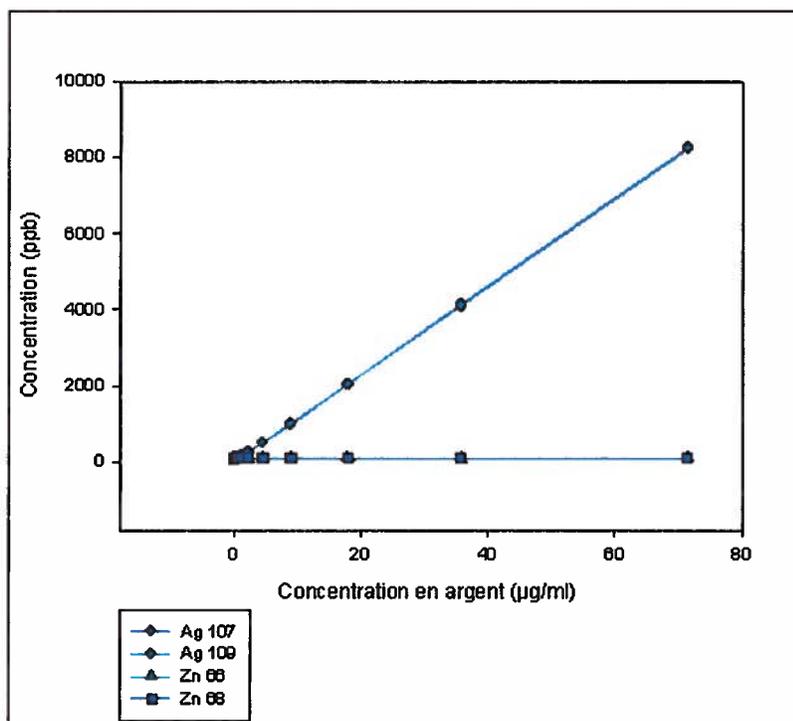


Figure 50 : Différents isotopes mesurés dans le mélange AgVivN et RPMIc (milieu de culture des souris et des humains).

Les mesures des AgNPs dans le RPMIc présentent le même patron que celui dans l'eau stérile. Cependant, la somme des isotopes est de 16.54 µg/ml pour une concentration estimée à 71.4 µg/ml. D'autre part, la somme des isotopes de Zinc (Zn) mesurée est plus forte que celle dans l'eau soit 0.26464 µg/ml vs 0.01315 µg/ml. Les fortes proportions de Zn sont présentes dès les faibles concentrations et même sans les nanoparticules d'argent. Le zinc est donc un élément présent dans le RPMI seul, d'autre part, les trois isotopes y sont présents en quantités relativement égales.

- dans le RPMI sans bicarbonate

Les mesures des AgNPs dans les milieux RPMI sans bicarbonate démontrent encore la présence majoritaire des deux isotopes, le 107 et le 109 (Figure 51). La somme de ces isotopes est de 21.57 µg/ml d'Ag et de 0.285 µg/ml de Zn. Le Zn est encore présent sous forme Zn 64, Zn 66 et Zn 68 et ce quelle que soit la concentration.

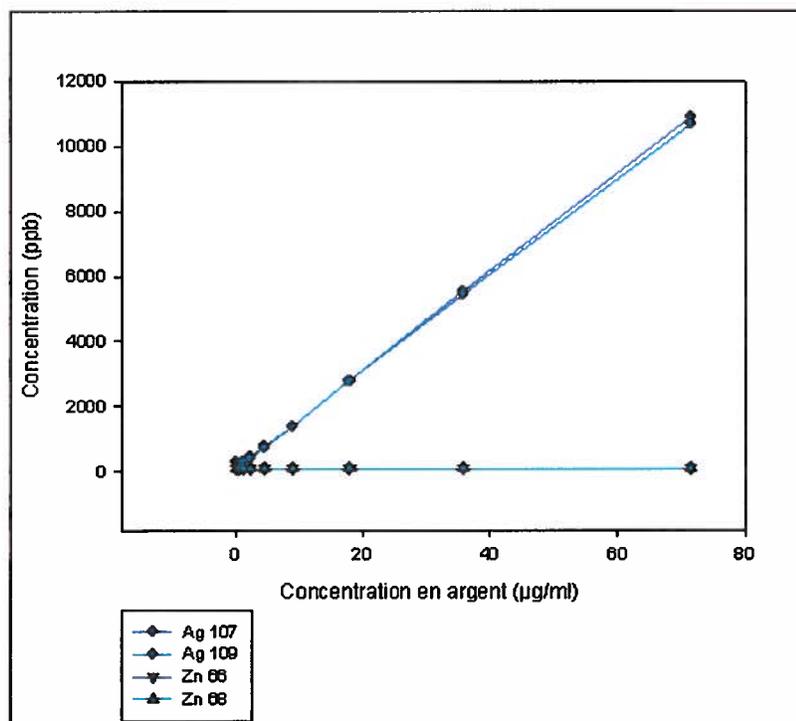


Figure 51 : Dosages des isotopes contenus dans le mélange AgVivN et RPM1c sans bicarbonate (milieu pour la truite).

- dans l'eau de mer

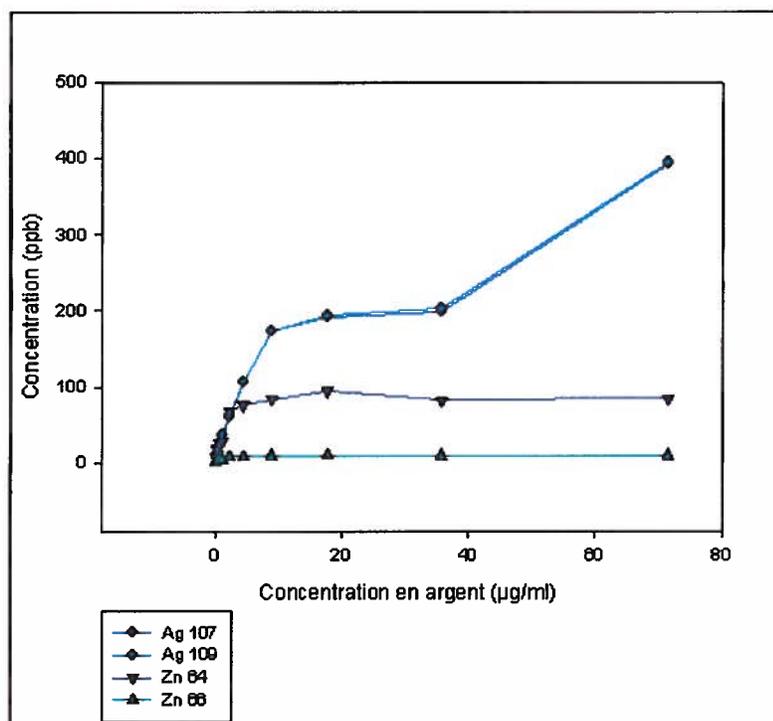


Figure 52 : Dosages des isotopes contenus dans le mélange AgVivN et eau de mer (milieu pour la moule).

Enfin, le dosage des différents isotopes présents dans la solution AgNPs, en présence d'eau de mer indique une différence de patron de mesure. En effet, la diminution de mesure des différents isotopes d'argent en fonction de la diminution en concentration en AgNPs n'est pas linéaire (Figure 52). Les entités principales mesurées dans le mélange sont les deux isotopes d'argent à savoir, l'Ag 107 et l'Ag 109. Cependant, la somme des concentrations d'isotopes mesurées est seulement de 0.787 µg/ml. En effet, le patron de la courbe peut être divisé en deux parties : de 0 à 35.7 µg/ml la courbe est de forme logarithmique (Figure 52) de 35.7 à 71.4 µg/ml la courbe est relativement linéaire à l'image des courbes obtenues avec l'eau et les RPMic.

De plus, la concentration de Zn mesurée est de 0.093 µg/ml (les deux isotopes les plus présents étant le Zn 64 et le Zn 66). La mesure des isotopes de Zn dans l'eau de mer seule indique une concentration de 0.013 µg/ml. Ainsi, l'augmentation de Zn dans les milieux, avec l'augmentation d'AgNPs, suit une distribution logarithmique atteignant un maximum selon l'équation suivante $y = 94.75 (1 - (-0.55^x))$ ($R^2 = 0.9631$ avec x la valeur mesurée de Zn et y la concentration en AgNPs).

- Les nanoparticules de Cd/S, Cd/Te dans les différents milieux de culture

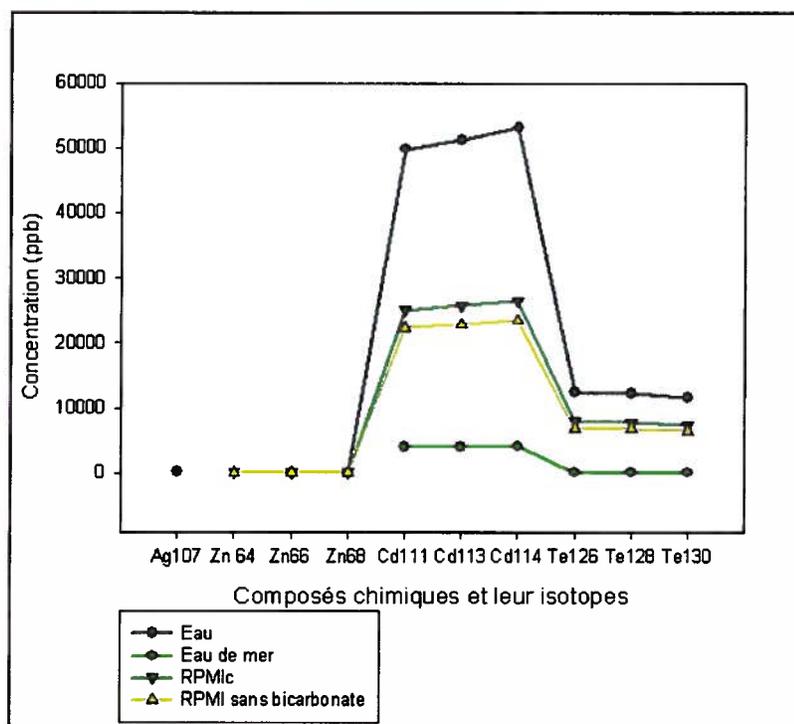


Figure 53 : Dosages des isotopes contenus dans le mélange QDs et différents milieux de culture.

Les concentrations des différents isotopes mesurées, selon les différents milieux de culture, démontrent que les QDs se comportent de diverses manières selon le véhicule (Figure 53). Ainsi, il apparaît clairement que les concentrations en Cd et en Te mesurées sont plus fortes dans l'eau stérile que dans les autres milieux de culture. La compagnie ViveNano[®] nous a indiqué, après achat des QDs, qu'elles contenaient 2.3 mg/ml de Cd, étant donné que la solution mère est diluée 21 fois, la concentration de Cd est donc de 109.53 µg/ml. La valeur ainsi mesurée par Perkin Elmer[®] est relativement proche de celle donnée par le fabricant. Les différences peuvent être liées à des variations dans les lots. Cependant, lorsqu'on mesure le Cd avec les autres milieux de culture, par exemple, les RPMI, les concentrations en Cd sont très fortement diminuées, il en est de même pour le Te (Tableau 19). De plus, le ratio Cd/Te initialement à 4.26 diminue à 3.36 et 3.41. Ceci indique une altération de la particule dans le milieu. Finalement, les plus importantes différences de mesures sont retrouvées dans l'eau de mer. Les concentrations de Cd et de Te mesurées sont très faibles. Ainsi, l'intégrité originelle de la particule ne semble plus exister. Le ratio Cd/Te est aussi très différent de celui pour l'eau stérile (Tableau 19). Ainsi, le Te semble être très peu concentré, indiquant une potentielle altération de la couche de surface enrobant le Cd. En effet, au fond des tubes un précipité était retrouvé, il se pourrait s'agir de TeCl₂.

Tableau 19 : Mesures des différents isotopes présents dans le mélange QDs et milieux de cultures. La solution stock de QDs de Vivenano[®] a été diluée 21 fois afin de reconstituer les conditions expérimentales.

Véhicule	Concentration de Cd	Concentration de Te	Ratio Cd/Te
Eau stérile	154.14	36.21	4.26
Eau de mer	12.19	0.31	39.12
RPMI sans bicarbonate	77.33	23	3.36
RPMI complet	68.64	20.1	3.41

1.2.4 Les cellules et surnageant avec les QDs et les AgNPs ViveNano®

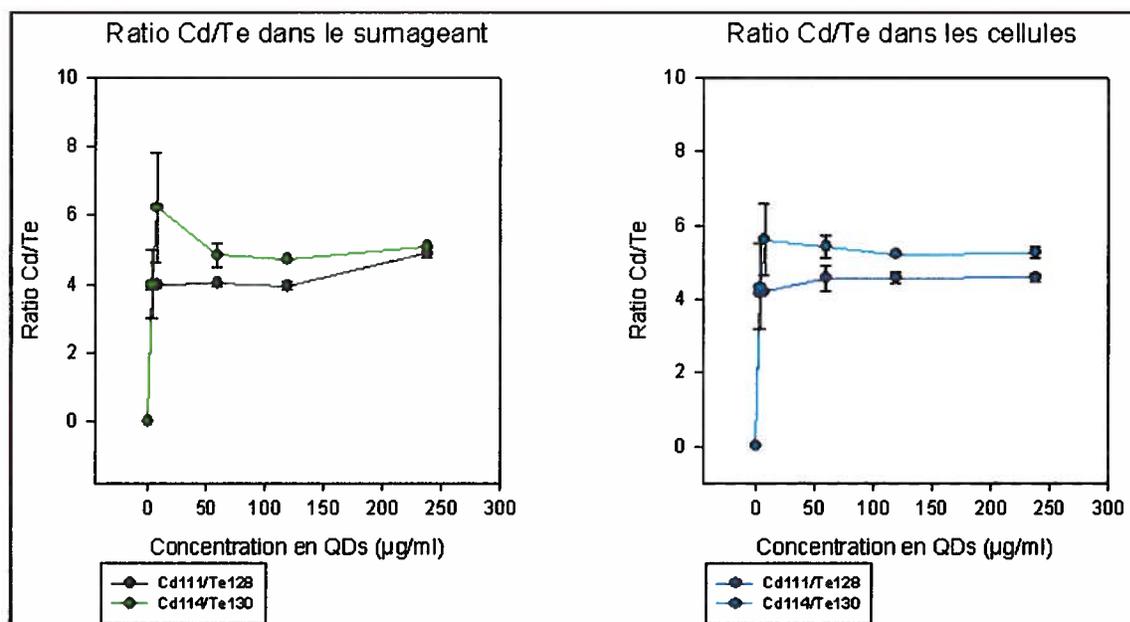


Figure 54 : Mesures des isotopes de Cd et de Te dans les macrophages de souris et dans le milieu de culture des cellules. Les ratios Cd/Te ont été définis afin d'évaluer l'intégrité de la particule dans le substrat (milieu de culture) et dans les cellules. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Selon les résultats mesurés dans les cellules et dans les surnageants avec les QDs, les ratios Cd 111/ Te 128 et Cd 114/ Te 130 sont relativement les mêmes. Les ratios oscillent entre 4 et 6 pour une moyenne de 5 dans les cellules et les surnageants.

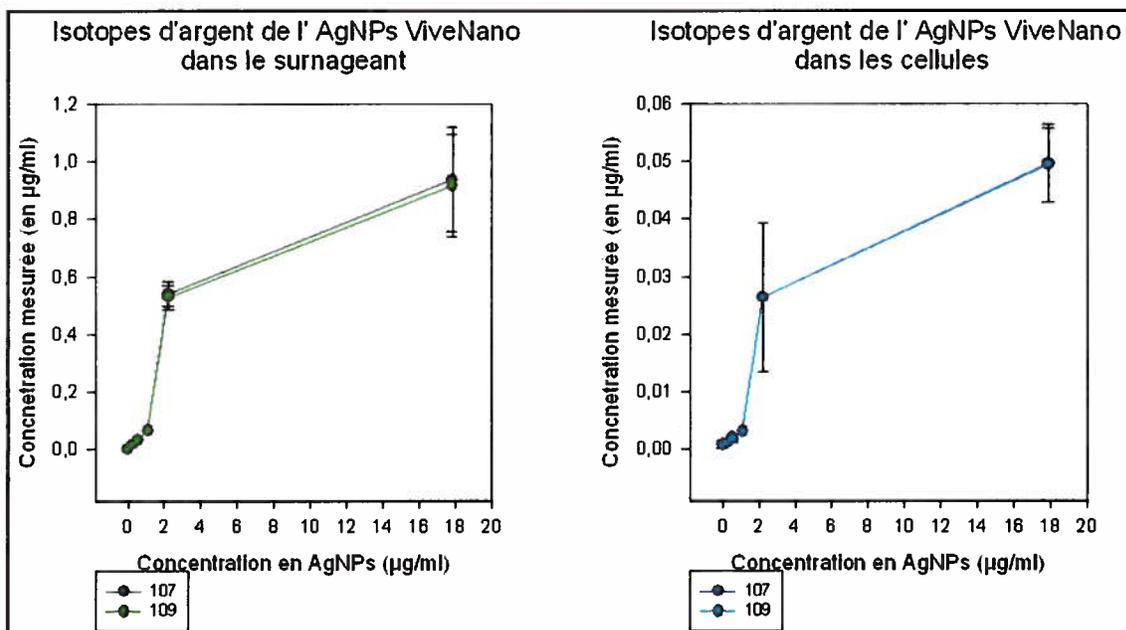


Figure 55 : Mesures des isotopes d'argent dans les macrophages de souris et dans le milieu de culture des cellules. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Selon les résultats pour les AgNPs les mêmes profils de concentrations sont observés entre les cellules et les surnageants indiquant que le comportement des AgNPs ViveNano® est le même dans les cellules et dans le surnageant. Cependant, les patrons de réponses devraient être linéaire, la concentration en Ag mesurée n'est pas celle mise initialement dans le tube.

1.3 Conclusion générale sur la chimie des nanoparticules

La chimie des particules est essentielle pour les études de toxicité impliquant ces nouveaux matériaux. Effectivement, les nanoparticules peuvent avoir des comportements très différents d'un milieu de culture à l'autre. Leur stabilité étant très dépendante du milieu, à la fois du pH, de la température, de la composition ionique. Les NPs peuvent ainsi facilement être dégradées. De plus, la grande variété d'enrobage de NPs sont tous potentiellement analysables (Biju, Itoh et al. 2008).

Dans ce chapitre, la physique et la chimie des nanoparticules sont observées. D'un point de vue physique, il est très important de connaître le statut de dispersion des nanoparticules dans les expériences en toxicité. En effet, selon leur état de stabilité et d'agglomération leur assimilation peut être très différente (Jiang, Oberdörster et al. 2009). Les QDs et les AgNPs observés au microscope électronique indiquent que les deux nanoparticules n'ont pas les mêmes comportements. Les QDs sont présents sous plusieurs états à la fois monomérique

mais aussi sous forme d'agrégat en raison des liaisons covalentes entre les QDs. Contrairement les AgNPs sont principalement sous forme monomériques (individualisées).

Précédemment, plusieurs études ont observé la dispersion des nanoparticules dans les différents milieux (Buford, Hamilton et al. 2007; Sager, Porter et al. 2007). Lorsque les particules sont dispersées dans un liquide, leur taille est souvent plus large que celle des particules initiales. Ainsi, si les particules changent de taille dans certains milieux, il est possible de les différencier selon leur état d'adhésion : elles peuvent être agglomérées (liens faibles entre les particules initiales) ou agrégées (liens forts entre les particules). Les nanoparticules peuvent être repoussées lorsque les forces répulsives sont dominantes, on obtiendra alors des nanoparticules unitaires (lorsqu'elles possèdent des hautes charges de surface, une grosse couche d'enrobage, et des forces stériques). Contrairement, les particules agrégées ou agglomérées sont le résultat de faibles forces répulsives, de faibles couches d'enrobage etc.). Les paramètres fondamentaux liés à la physique des particules entre elles sont donc dépendants de la taille initiale de la NP, de son diamètre hydrodynamique, de son potentiel ζ (mV, mesure de la charge de surface), de l'épaisseur de la couche d'enrobage et des forces stériques.

Les nanoparticules utilisées dans ce projet ont toutes les trois un noyau de nature métallique toxique (pour la plupart des organismes). Ainsi, ce noyau doit être absolument enrobé afin de stabiliser la particule et de la solubiliser. Pour les QDs il a été admis que l'enrobage protégeait le noyau de cadmium, et servait à la stabilisation physique de la particule. Ainsi cet enrobage tend à réduire la toxicité des QDs en annulant l'émission d'ions cadmium toxiques (Derfus 2004; Biju, Itoh et al. 2008). De plus, les molécules présentes dans les autres milieux de culture ou solutions peuvent entraîner la déposition de sels à la surface des particules et modifier la toxicité des NPs. En effet, lorsque les NPs sont altérées, le relargage des ions, comme les ions argent, un précipité sous la forme d'AgCl ou Ag₃PO₄ peut être formé. Les ions peuvent aussi être réduits par des sucres ou des biomolécules (comme celles présentes dans le RPMI), ou associés à des petites molécules comme des acides aminés ou des protéines (Kittler, Greulich et al. ; Liu, Sun et al. 2009).

Concernant les résultats obtenus pour le dosage des différents éléments contenus dans les NPs dans les différents milieux de cultures des différences de comportement des NPs, selon le milieu, sont observées. Ainsi, il semblerait que les nanoparticules soient stables dans l'eau stérile. De même dans les deux RPMI les nanoparticules sont stables mais les concentrations

totales mesurées sont très différentes de celles initiales. Précédemment, les études de Foldbjerg et al, 2009 ont aussi observé le comportement des nanoparticules et plus particulièrement celles d'argent, ils ont observé une agglomération des particules dans du RPMI. Les nanoparticules sont très agglomérées dès 1 h de contact avec les RPMI, cependant avec l'addition de SVF le rayon hydrodynamique des NPs varie en taille puis atteint un équilibre (Foldbjerg, Olesen et al. 2009). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Mayer et al, 2009 qui démontrait dans leur étude, que la taille dépendait du milieu de culture. En général, la taille était plus grosse dans des milieux tampon (Mayer, Vadon et al. 2009)

Pour l'eau de mer, on a une altération flagrante des particules et ce pour les QDs et les AgNPs. Une étude récente de Yang et al, 2010, ont démontré que les nanoparticules utilisées dans leur étude s'agrégeaient à des particules plus larges dans une solution saline (Yang, Zhao et al. 2010). Les nanoparticules d'argent semblent donc relâcher le contenu métallique dans la solution et les QDs semblent s'oxyder et précipiter, sous forme de sels de tellure, avec les composants déjà présents dans l'eau de mer. Ainsi, cette section valide l'hypothèse que les nanoparticules ont bien un comportement spécifique à chaque milieu de culture, elles sont influencées par les différentes matrices.

Les résultats de mesures des QDs et des AgNPs dans les cellules et dans le milieu de cultures (RPMIc) indiquent que les particules gardent le même ratio (Cd/Te) dans les cellules et dans le milieu. Les nanoparticules sont intégrées dans les cellules entièrement et sont peu dégradées, si elles n'ont pas été traitées auparavant. Le ratio Cd/ Te est sensiblement égale à 5, à l'origine il est de 6 donc, il y a une faible dégradation de la particule (dégradation de l'enrobage CdS / CdTe) mais cette perte est la même dans les cellules et dans le surnageant. Finalement, les résultats avec les AgNPs ViveNano[®] indiquent que les concentrations d'argent sont les mêmes dans les macrophages de souris et dans le milieu de culture. Donc, les AgNPs ViveNano sont retrouvées dans les mêmes proportions dans les cellules et le surnageant. Par contre, les différences de quantités d'argent mesurées dans le tube et celles initiales indiquent que les nanoparticules d'argent de la compagnie ViveNano[®] interagissent avec le milieu de culture comme il a été évoqué précédemment. Ces résultats confirment l'hypothèse que les nanoparticules ne sont pas ou peu dégradées avant l'ingestion par les cellules, cependant les nanoparticules d'argent semblent s'agréger dans le milieu (ou coller aux parois du tubes Falcon) ce qui serait responsable des différences de mesures entre ce qui est mis dans le tube et ce qui est mesuré par l'ICP- MS.

2. Etude comparative des effets des nanoparticules et des métaux-traces les composant

Les nanoparticules utilisées dans le projet sont essentiellement composées de métaux, de nombreuses études relatent la toxicité des nanoparticules en mettant l'accent sur les composés métalliques qu'elles contiennent.

2.1. Matériel et méthode-spéciation

2.1.1. Rappel sur les méthodes

L'ensemble des expériences a suivi les mêmes protocoles que ceux décrits dans le chapitre 1. La viabilité des lymphocytes a été réalisée de la même manière que celle des macrophages (voir chapitre 1 matériel et méthode section 1, 2, 3, 4). Les protocoles utilisés dans ce projet sont standards et une réponse immunitaire chez un organisme peut être comparée à celui d'un autre individu. La caractérisation et l'exposition des nanoparticules QDs et AgNPs ViveNano[®] sont similaires à celles décrites dans le chapitre 1.

2.1.2 Caractérisation des nanoparticules et choix des doses

Les nanoparticules utilisées dans ce chapitre sont les mêmes que celles du chapitre 1 à savoir les points quantiques QDs et les nanoparticules d'argent. Il est important de mentionner que les doses choisies pour ces tests répondent à des conditions de gammes doses réponses. La concentration maximale étant celle de la solution mère diluée 21 fois (afin de respecter la règle d'osmolarité du milieu).

- Rappel sur les QDs :

Les particules de Cd/S Cd/Te de ViveNano[®] sont des points quantiques dont la concentration de la solution mère en cadmium est de 20 mg/ml (le cadmium représentant 97 % du contenu métallique de la particule, données du fournisseur). Ces particules sont vendues dans une solution aqueuse de couleur ambrée, à pH de 6-8. La solution est relativement stable si elle est conservée à 4°C de plus, elle est stable durant 6 mois. Toutes les expériences qui ont été menées dans ce projet ont été réalisées avec des QDs durant les six mois de réception de la particule. La gamme dose réponse avec les QDs a été réalisée dans de l'eau stérile selon le tableau suivant :

Tableau 20 : Récapitulatif de la gamme dose réponse de QDs employés dans les expériences. Il est important de mentionner que les QDs sont stables dans l'eau, donc toutes les dilutions ont été procédées dans de l'eau stérile.

Dilution	Concentration en CdS CdTe QDs en mM	Concentration de QDs testées <i>in vitro</i> en µg/ml
Solution mère pure	20	952.4
½	10	476.2
¼	5	238.1
1/8	2.5	119.05
1/16	1.25	59.52
1/32	0.63	29.76
1/64	0.31	14.88
1/128	0.16	7.44
1/256	0.078	3.72
Témoin	eau	eau

Ainsi la concentration maximale d'exposition des points quantiques est de 952,4 µg/ml de Cd/S, Cd/Te. Selon la compagnie, la concentration de la particule est de 20 mM soit 2.23 mg/ml de Cadmium (communication personnelle). Les concentrations de la particule ont donc été vérifiées par ICP-ES pour les expositions.

2.1.3 Gammes dose réponse Cd, Te et mélange

Afin de tester la toxicité des métaux impliqués dans les nanoparticules, des gammes doses réponses équivalentes à celles des métaux contenus dans les nanoparticules ont été réalisées.

Selon les résultats, réalisés par ICP-ES (Patrice Turcotte, Centre saint Laurent, Environnement Canada, Montréal), le rapport Cd/Te dosé pour les points quantiques était de

6. Etant donné que la concentration de QDs est basée sur la concentration en équivalent de cadmium, une gamme dose réponse de CdCl₂ a été montée pour une solution maximale de 109,5 µg/ml. La dose maximale de Te était de 18,25 µg/ml et des solutions de mélange Cd/Te ont été réalisées selon le tableau suivant :

Tableau 21 : Exposition des cellules aux différentes doses de CdCl₂ et NaTeO₃ et le mélange. Les concentrations indiquées sont en µg/ml et sont les doses d'exposition contenues dans le tube. Toutes les dilutions ont été réalisées dans l'eau stérile.

Dilution	<u>CdCl₂ en µg/ml</u>	<u>NaTeO₃ en µg/ml</u>	<u>Mix Cd/Te</u>
Solution mère pure	109,5	18,25	127,78
½	54,8	9,13	63,89
¼	27,4	4,56	31,94
1/8	13,7	2,28	15,97
1/16	6,8	1,14	8
1/32	3,4	0,57	4
1/64	1,7	0,29	2
1/128	0,9	0,14	1
1/256	0,4	0,07	0,50
Témoin	0	0	0

- Rappel sur l'AgNP ViveNano[®]

Les nanoparticules d'argent de ViveNano[®] sont faites d'argent et d'un enrobage de polyacrylate de sodium. Cet enrobage sert à stabiliser la nanoparticule. Ces particules peuvent être conjuguées à des protéines et des anticorps. La suspension de nanoparticules est d'apparence noire, de pH 5-7. Le contenu métallique dosé par ICP est de > 97% d'argent. La concentration de la solution mère est de 1.5 mg/ml. La solution est relativement stable si elle est conservée à 4°C, et ce durant 6 mois. Toutes les expériences qui ont été menées dans ce projet ont été réalisées avec des AgNPs durant les six mois de réception de la particule.

2.1.4 Gamme dose réponse d'AgNP et d'AgNO3

Tableau 22 : Récapitulatif de la gamme dose réponse d'AgNP employée dans les expériences. Il est important de mentionner que les AgNPs sont stables dans l'eau, donc toutes les dilutions ont été procédées dans de l'eau stérile.

Dilution	Concentration en Argent en $\mu\text{g/ml}$	Concentration testées <i>in vitro</i> en $\mu\text{g/ml}$
Solution mère pure	1.5	71.4
1/2	0.75	35.7
1/4	0.38	17.85
1/8	0.19	8.93
1/16	0.09	4.46
1/32	0.047	2.23
1/64	0.023	1.12
1/128	0.012	0.56
1/256	0.006	0.28
Témoin	eau	eau

2.1.5 Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). La différence de viabilité, d'activité et d'efficacité de phagocytose ont été examinées en utilisant une analyse factorielle des variations à une voie (ANOVA), lorsque les résultats étaient significatifs, un test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Lorsque les données n'étaient pas normales un test non paramétrique de Kruskal et Wallis a été réalisé. Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$.

2.2 Résultats pour les nanoparticules de cadmium (QDs)

Suite à l'exposition aux nanoparticules de cadmium Cd/S Cd/Te et aux métaux composant les particules, les différents paramètres immunitaires ont été observés chez les espèces modèles.

Il est important de noter que dans cette partie, les nanoparticules sont exprimées selon leurs concentrations totales (CI 50) mais aussi selon la concentration en métal contenu dans la particule. Suite à l'exposition aux nanoparticules de cadmium, QDs de la compagnie ViveNano[®], les paramètres immunitaires suivants ont été observés chez les quatre modèles :

- Pour les humain : la viabilité des monocytes, l'activité de phagocytose (ou capacité à phagocyter 1 bille et plus) ainsi que l'immunoefficacité (ou aptitude à phagocyter 3 billes ou plus), la transformation lymphoblastique (Figure 65-Figure 68).

- Pour la souris : la viabilité des macrophages, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (Figure 61-Figure 64).

- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (Figure 58-Figure 60).

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (Figure 56 et Figure 57).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis récemment dans la revue « Journal of Toxicology ». **“Comparative in vitro toxicology of nanoparticles (CdS/CdTe) and their metallic components on immune systems of different species.”** A.Bruneau , M.Fortier, F.Gagne, C.Gagnon, C.Turcotte , A. Tayabali, T.Davis, M.Auffret, M.Fournier. L'article est retrouvé en annexe 4.

2.2.1 Cellules de moules bleues

-Viabilité et phagocytose de la moule bleue

La viabilité des hémocytes de moules bleues a été observée pour les QDs, le cadmium (Cd), le tellure (Te) et le mélange (Cd/Te) (Figure 56). La phagocytose des hémocytes de moules bleues est évaluée selon deux critères, l'activité (ou capacité à phagocyter 1 bille et plus) ainsi que l'immunoefficacité (ou aptitude à phagocyter 3 billes ou plus) (Figure 56).

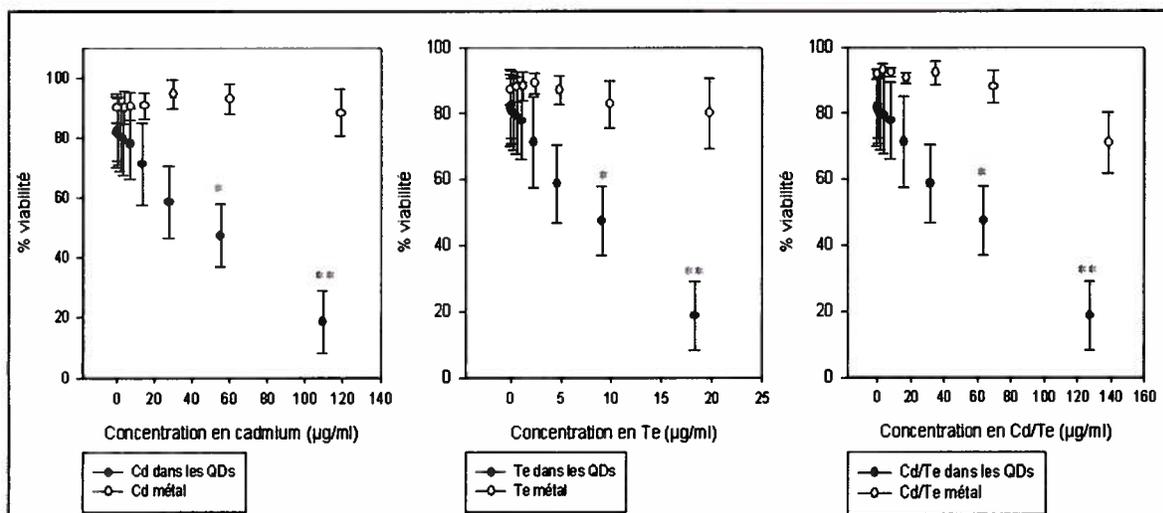


Figure 56 : Viabilité des hémocytes après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. n= 9 pour QDs, Cd et Cd/Te et n=16 pour Te. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

La viabilité des hémocytes de moules est significativement affectée par les deux plus fortes concentrations de QDs. Ceci correspond à 54,8 µg/ml et 109,5 µg/ml de Cd contenu dans les QDs, à 9,13 µg/ml et 18,25 µg/ml de Te contenu dans les QDs et 63,89 µg/ml et 127,78 µg/ml du mélange Cd/Te (p< 0.05 et p< 0.001). Alors que pour le cadmium dissous CdCl₂, aucune différence de viabilité n'est observée par rapport au témoin (Figure 56). La viabilité est significativement diminuée que pour une concentration de 952,4 µg/ml (données non présentées). Le tellure ne semble pas présenter de toxicité pour les cellules immunitaires de moules, ni le mélange de cadmium tellure (Figure 56). Pour le mélange, la viabilité est significativement diminuée pour 238 µg/ml de CdCl₂ et 39,5 µg/ml de NaTeO₃, (données non présentées).

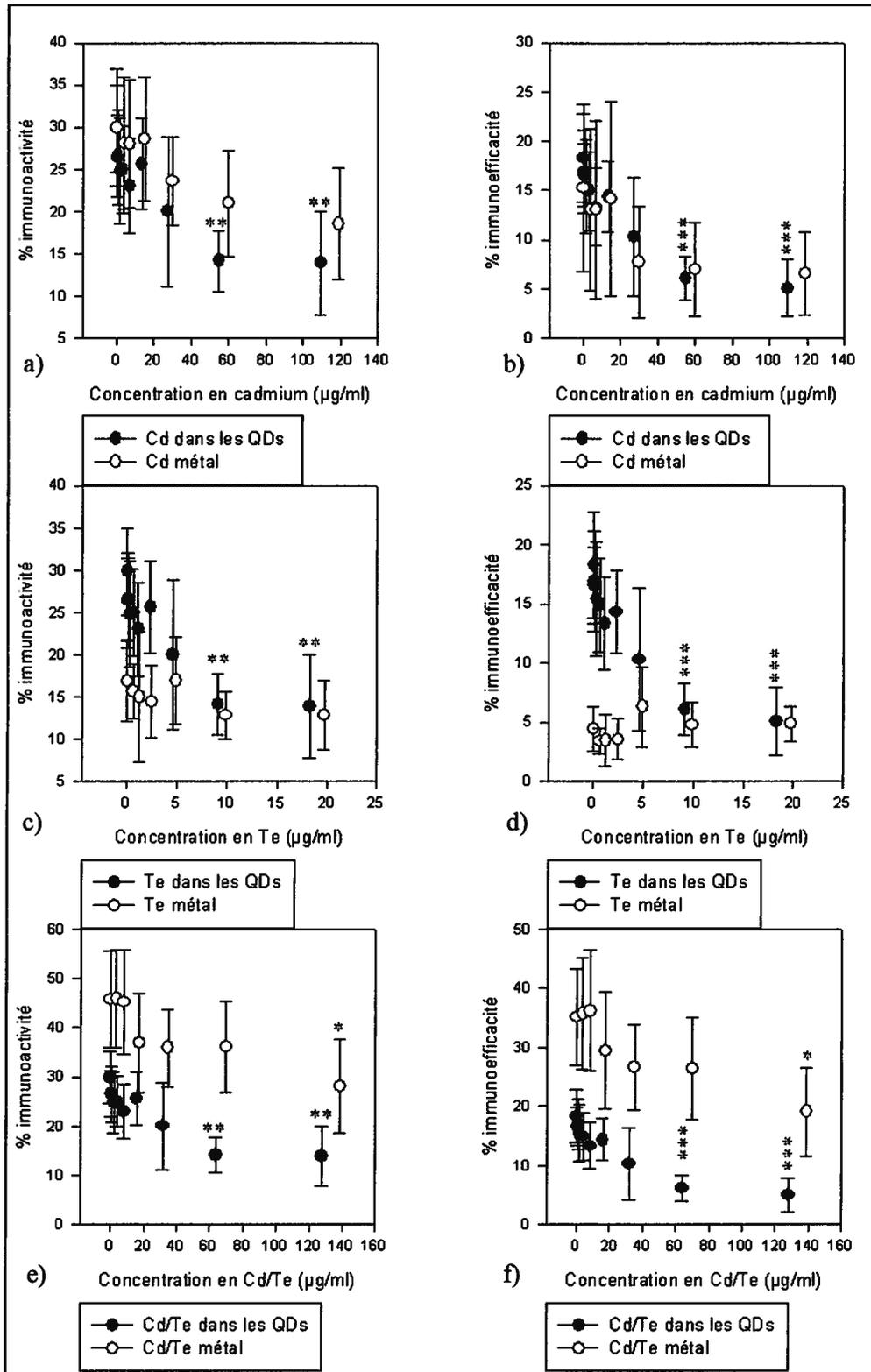


Figure 57 : Immunoactivité et immunoefficacité des hémocytes de moules exposées durant 21 h aux QDs vs les métaux qui les composent. a) et b) QDs (n=9) vs Cd contenu dans les QDs (n=6). c) et d) QDs (n=9) vs TE contenu dans les QDs (n=6). e) et f) QDs (n=9) vs Cd/Te contenu dans les QDs (n=6). * p< 0.05, ** p< 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.**

La capacité et l'efficacité de phagocytose des hémocytes après 21 h d'exposition mises en présence des QDs diminuent très significativement pour les deux plus fortes concentrations de QDs ($p < 0.001$) (Figure 57). Quand au cadmium dissous, la phagocytose est significativement diminuée dès 238 $\mu\text{g/ml}$ pour l'activité et l'efficacité phagocytaire ($p < 0.001$) (données non présentées). Le tellure ne semble pas induire d'altération de la phagocytose (Figure 57 c et d). Quand au mélange Cd/Te, l'activité et l'efficacité de phagocytose sont significativement diminuées pour des mélanges de cadmium/ tellure supérieur ou égale à 127,78 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 57 e et f).

2.2.2 Cellules de truites arc-en-ciel

- Viabilité et phagocytose de la truite arc-en-ciel

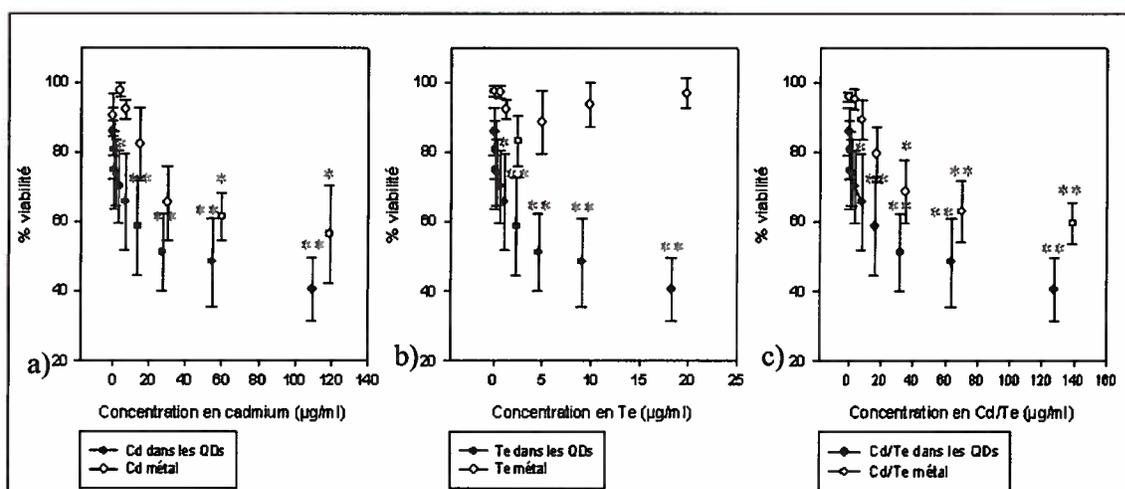


Figure 58: Viabilité des truites après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) QDs, n= 11 ; b) Cd, n=3 ; c) Cd/Te, n=3 et d) Te, n=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.0001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.**

La viabilité des macrophages de truites exposés durant 21h aux QDs est significativement diminuée pour des concentrations de 27.4 $\mu\text{g/ml}$ de Cd contenus dans la particule, 4,56 $\mu\text{g/ml}$ de Te présent dans la particule et 31.94 $\mu\text{g/ml}$ du Mélange Cd/Te ($p < 0.05$) (Figure 58 a, b) et c)). Pour le cadmium dissous, la viabilité des macrophages diminue très significativement dès 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) (très significativement diminuée pour des valeurs de 476 $\mu\text{g/ml}$ et plus, données non présentées) (Figure 58 a). Pour le Te dissous, la viabilité des macrophages est préservée (Figure 58 b), (elle est très significativement diminuée avec une exposition au Te dès

79 µg/ml, données non présentées). Finalement, la viabilité des macrophages exposés au mélange Cd/Te est significativement diminuée dès 2 µg/ml de Cd/Te ($p < 0.05$) (Figure 58 c).

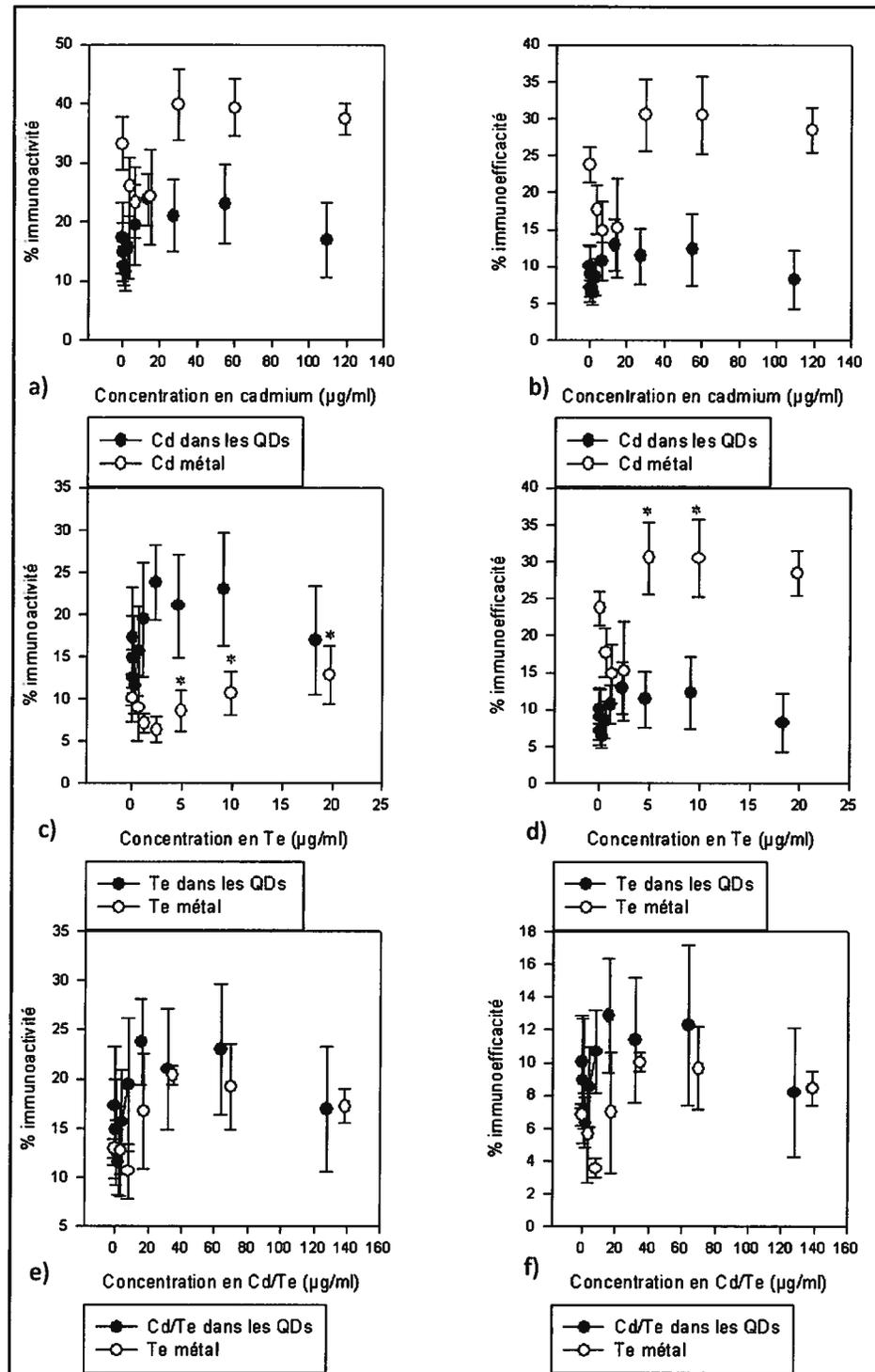


Figure 59 : Phagocytose chez la truite après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) et b) QDs, n= 11 vs Cd dissous n=3 ; c) et d) QDs vs Te n=3 ; e) et f) QDs vs Cd/Te dissous, n=3. * $p < 0.05$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

L'immunoactivité et l'immunoefficacité des macrophages de truites sont non significativement stimulées pour des concentrations supérieures ou égales à 27,4 $\mu\text{g/ml}$ de Cd contenu dans la particule (ce qui équivaut à 4,56 $\mu\text{g/ml}$ de Te et 31.94 $\mu\text{g/ml}$ du mélange Cd/Te) (Figure 59). Pour le Te une augmentation significative de l'activité et de l'efficacité phagocytaire est observée pour des concentrations de 4.9, 9.9 et 19.8 $\mu\text{g/ml}$ de Te dissous (Figure 59 d). Pour le mélange Cd/Te aucune différence significative n'est observée pour la phagocytose, cependant les droites pour le mélange Cd/Te présentent le même patron que celles de QDs (Figure 59 e et f).

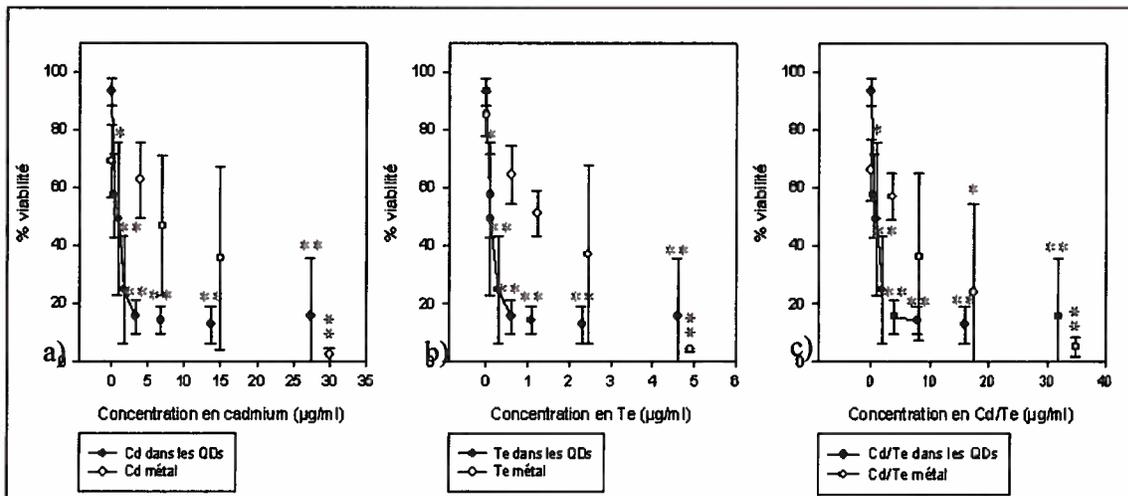


Figure 60 : Viabilité des lymphocytes de truites après exposition durant 72 h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) QDs, n= 9 vs Cd, n=3 ; b) QDs vs Te, n=3 ; c) QDs vs Cd/Te, n=3. * p< 0.05, ** p< 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.**

Après une exposition durant 72h aux QDs, la viabilité des lymphocytes de truites est significativement diminuée pour une concentration de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ de Cd contenu dans la particule (soit 0.29 $\mu\text{g/ml}$ de Te et 2 $\mu\text{g/ml}$ du mélange Cd/Te) (Figure 60). Pour le cadmium particulaire la viabilité est significativement diminuée pour des concentrations de 30 $\mu\text{g/ml}$ ou plus (Figure 60 a). Il est à noter que de fortes variations à 15 $\mu\text{g/ml}$ attestent des phénomènes de toxicité pour certains individus. La viabilité des lymphocytes exposés au tellure diminue significativement dès 4.96 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 60 b). La mortalité cellulaire totale est observée pour des concentrations supérieures à 5 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 60 b). Finalement, la viabilité des lymphocytes mis en présence du mélange Cd/Te est significativement diminuée pour 34.9 $\mu\text{g/ml}$, les lymphocytes ne sont plus viables pour des concentrations supérieures (Figure 60 c).

2.2.3 Cellules de souris

- Viabilité et phagocytose des macrophages de souris

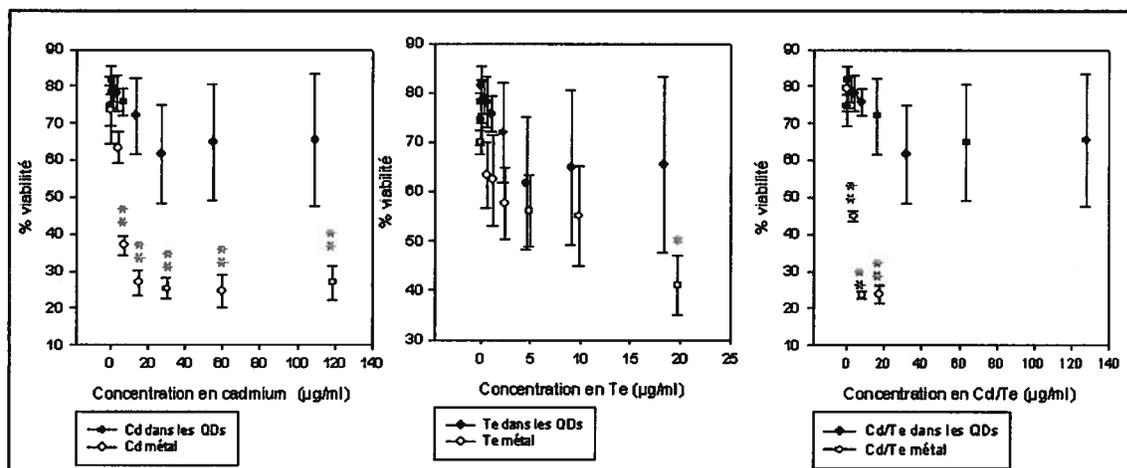


Figure 61 : Viabilité des macrophages de souris après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) QDs, n= 11 vs Cd, n=3 ; b) QDs vs Te n=3 et c) QDs vs Cd/Te, n=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité des macrophages de souris n'est pas significativement diminuée lors de l'exposition aux QDs. Cependant la viabilité est significativement diminuée dès 7.4 $\mu\text{g/ml}$ de cadmium dissous (Figure 61 a). Pour le Te dissous, la viabilité est significativement diminuée pour 19.84 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) (Figure 61 b). Enfin la viabilité des macrophages de souris est significativement diminuée pour 3.6 $\mu\text{g/ml}$ de mélange Cd/Te (Figure 61 c).

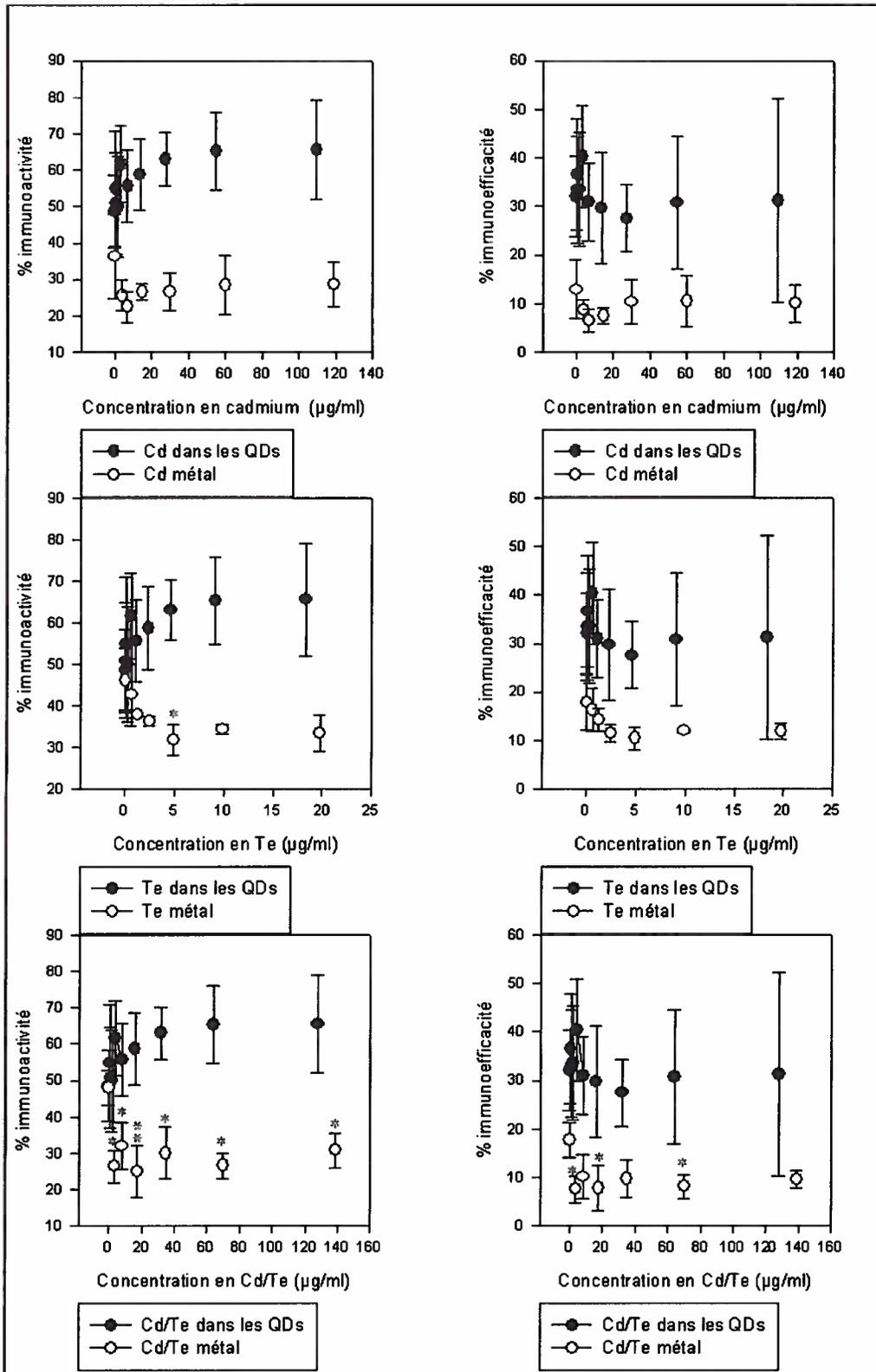


Figure 62 : Phagocytose des macrophages de souris après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) b) QDs, n= 10 vs Cd dissous n=3 ; c) et d) QDs vs Te n=3 ; e) et f) QDs vs Cd/Te dissous, n=3. * p< 0.05. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Concernant la phagocytose, l'immunoactivité et l'immunoefficacité présentent des patrons similaires. L'immunoactivité des macrophages est significativement diminuée pour 4µg/ml de Te dissous, ces résultats ne sont pas observés pour le Te contenu dans les QDs. De plus l'immunoactivité et l'immunoefficacité sont significativement diminuées (par rapport au contrôle) dès le premier mélange Cd/Te dissous ($p < 0.05$), ces résultats ne sont pas retrouvés pour le Cd/Te contenus dans les QDs.

- Viabilité et transformation des lymphocytes de souris

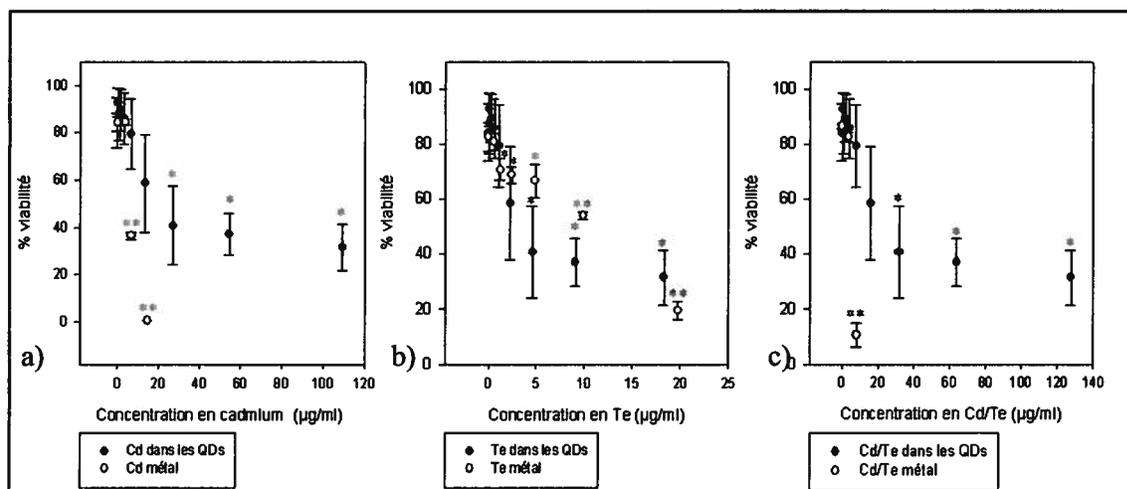


Figure 63 : Viabilité des lymphocytes après exposition durant 48 h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) QDs, n= 10 ; b) Cd, n=3 ; c) Cd/Te, n=3 et d) Te, n=3. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité des lymphocytes exposés durant 48 h aux QDs est significativement diminuée pour les trois concentrations les plus fortes de QDs, soit 27.38 µg/ml de Cd contenu dans la nanoparticule (4.56 µg/ml de Te, et 31.94 de Cd/Te). Exposés au cadmium dissous, la viabilité de lymphocytes est significativement diminuée à partir de 7.44 µg/ml ($p < 0.05$) et très significativement pour 14.88 µg/ml ($p < 0.001$). Au dessus de cette concentration la mortalité cellulaire est de 100% (Figure 63 a). La viabilité des lymphocytes exposés durant 72 h au tellure est significativement diminuée dès 1.24 µg/ml et très significativement diminuée dès 9.9 µg/ml (Figure 63 b). De même, la viabilité est significativement diminuée dès le premier mélange de Cd/Te soit 3.6 µg/ml, au delà de cette concentration la viabilité est nulle (Figure 63 c).

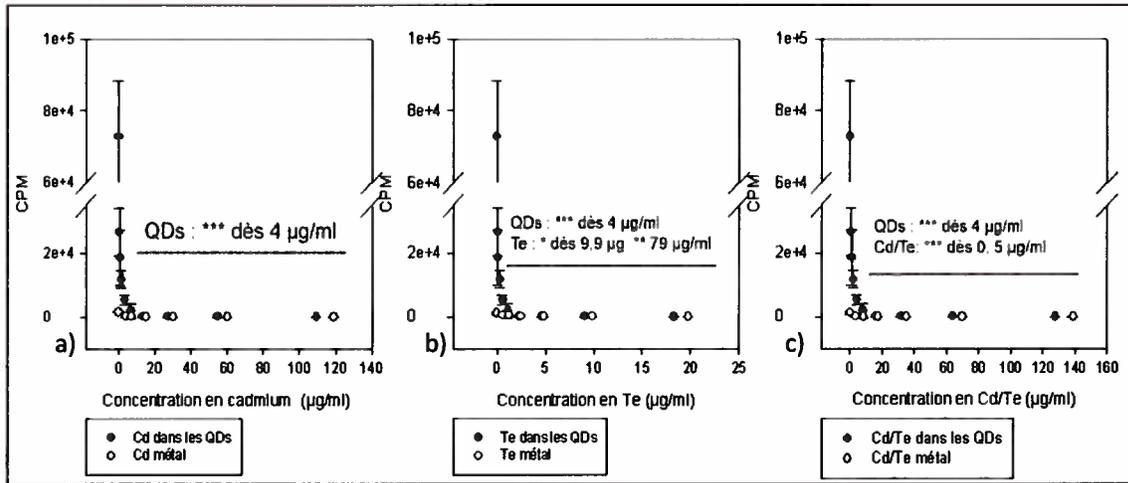


Figure 64 : Transformation lymphoblastique des souris après 48h d'exposition aux QDs et aux métaux. a) QDs, n= 10 ; b) Cd, n=6 ; c) Cd/Te, n=6 et d) Te, n=6. * p< 0.05, ** p< 0.001, *** p < 0.0001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La transformation lymphoblastique est significativement diminuée dès 4 µg/ml lorsque les cellules sont exposées au QDs (Figure 64 a). La transformation lymphoblastique est aussi significativement diminuée dès 9.9 µg/ml de Te (p < 0.05) et très significativement diminuée pour des concentrations supérieures ou égales à 79 µg/ml (Figure 64 b). La transformation est aussi significativement diminuée dès la première concentration du mélange de cadmium et de tellure (Figure 64 c).

2.2.4 Cellules d'humains

-Viabilité et phagocytose des monocytes d'humains

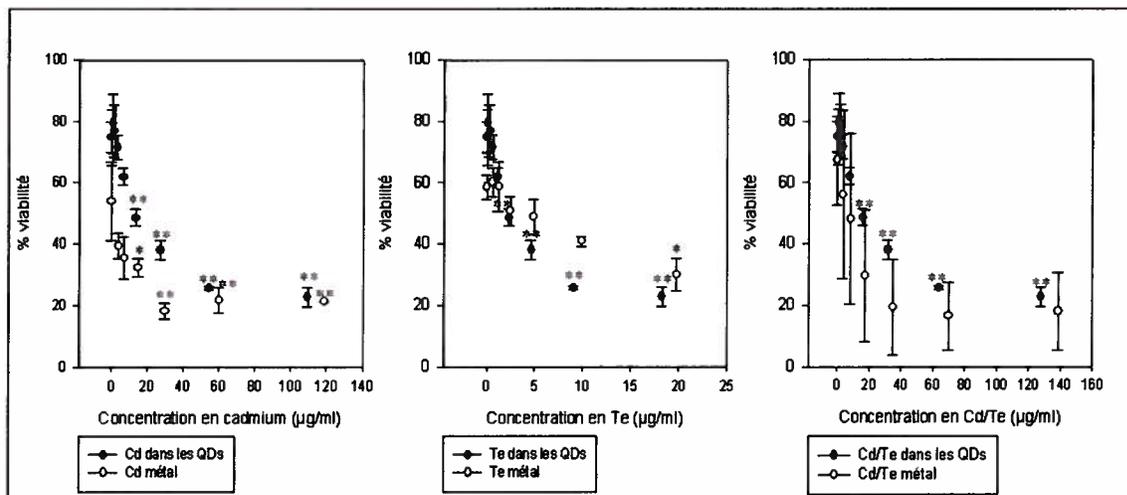


Figure 65 : Viabilité des monocytes d'humains après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) QDs, n= 3 vs Cd, n=3 ; b) QDs vs Te n=3 et c) QDs vs Cd/Te, n=3. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité des monocytes d'humains est significativement diminuée pour des valeurs de 13,7 $\mu\text{g/ml}$ de cadmium contenu dans la nanoparticule et 0,57 $\mu\text{g/ml}$ de Te et 2 $\mu\text{g/ml}$ du mélange Cd/Te contenu dans la particule (Figure 65 a, b et c). Cependant pour le tellure dissous, la viabilité des monocytes diminue significativement pour 19,84 $\mu\text{g/ml}$ (très significativement diminuée pour 39,7 $\mu\text{g/ml}$, données non présentées) (Figure 65 b). Pour le mélange Cd/Te une différence significative de viabilité des cellules par rapport au témoin est observée dès la première concentration 3,6 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 65 c).

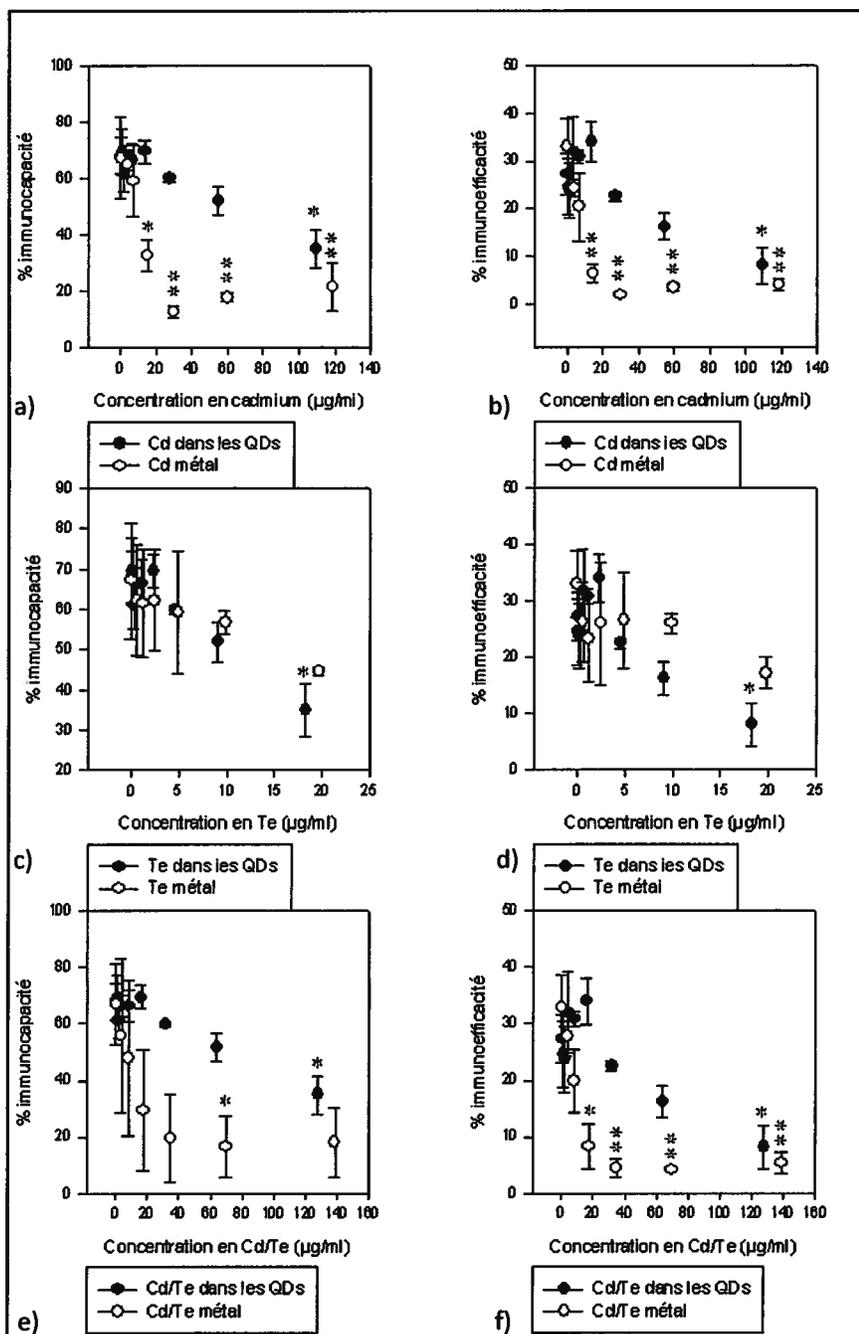


Figure 66 : Phagocytose des monocytes d'humains après exposition durant 21h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) b) QDs, n= 3 vs Cd dissous n=3 ; c) et d) QDs vs Te n=3 ; e) et f) QDs vs Cd/Te dissous, n=3. * p< 0.05, ** p< 0.001, *** p < 0.0001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

L'immunocapacité et l'immunoefficacité des monocytes d'humains sont significativement diminuées pour les dernières concentrations de QDs (soit 109.52 µg/ml de cadmium présent dans les QDs, 18.25 µg/ml de Te et 127.8 µg/ml de Cd/Te) (Figure 66). Pour le cadmium dissous, l'immunocapacité et l'immunoefficacité de phagocytose diminuent significativement et très significativement à partir de 14.88 µg/ml (Figure 66 a et b). Pour le tellure aucune

diminution significative de la phagocytose n'est observée (Figure 66 c et d). Pour le mélange de métaux, l'immunocapacité phagocytaire diminue significativement à 70 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). Pour l'immunoefficacité, elle est significativement diminuée dès 17.5 $\mu\text{g/ml}$ de Cd/Te ($p < 0.05$) et très significativement 34.9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (Figure 66 e et f).

-Viabilité et transformation lymphoblastique des lymphocytes d'humains

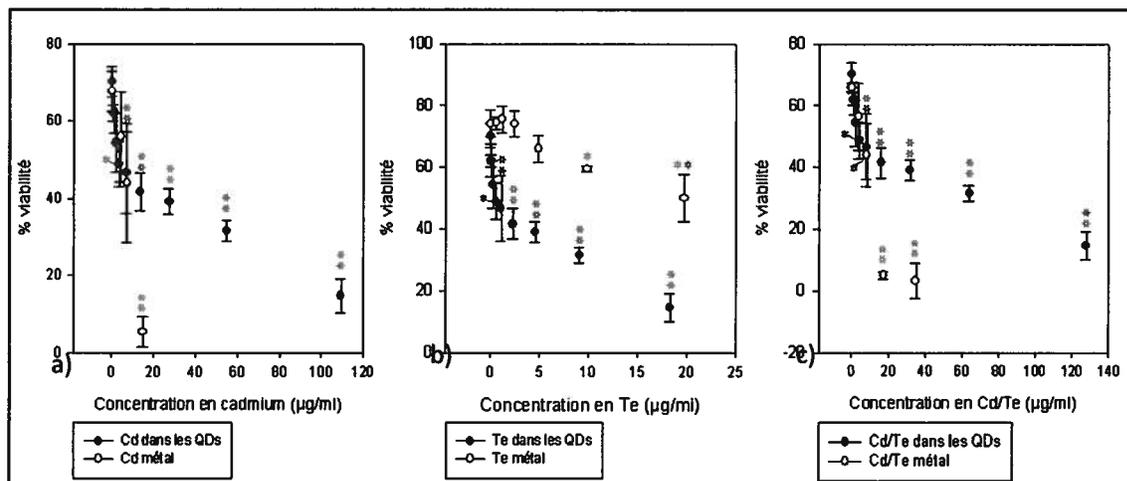


Figure 67 : Viabilité des lymphocytes après exposition durant 48 h avec les QDs et les métaux composant la particule. a) QDs, n= 3 ; b) Cd, n=3 ; c) Cd/Te, n=3 et d) Te, n=3. * p< 0.05, ** p< 0.001, * p < 0.0001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.**

La viabilité des lymphocytes d'humains diminue significativement dès 3.42 $\mu\text{g/ml}$ de Cd contenu dans les QDs (soit 0.57 $\mu\text{g/ml}$ de Te et 4 $\mu\text{g/ml}$ de Cd/Te) (Figure 68). Exposés à du cadmium dissous, la viabilité des lymphocytes est significativement diminuée pour 14.88 $\mu\text{g/ml}$. Après cette concentration la mortalité cellulaire est totale (Figure 68 a). Avec du tellure dissous une diminution significative de viabilité est observée dès 9.9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) et très significativement diminuée à 19.84 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (Figure 68 b). La viabilité des lymphocytes est aussi significativement diminuée avec le mélange Cd/Te dès 8.2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). La mortalité cellulaire est totale après 34.9 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 68 c).

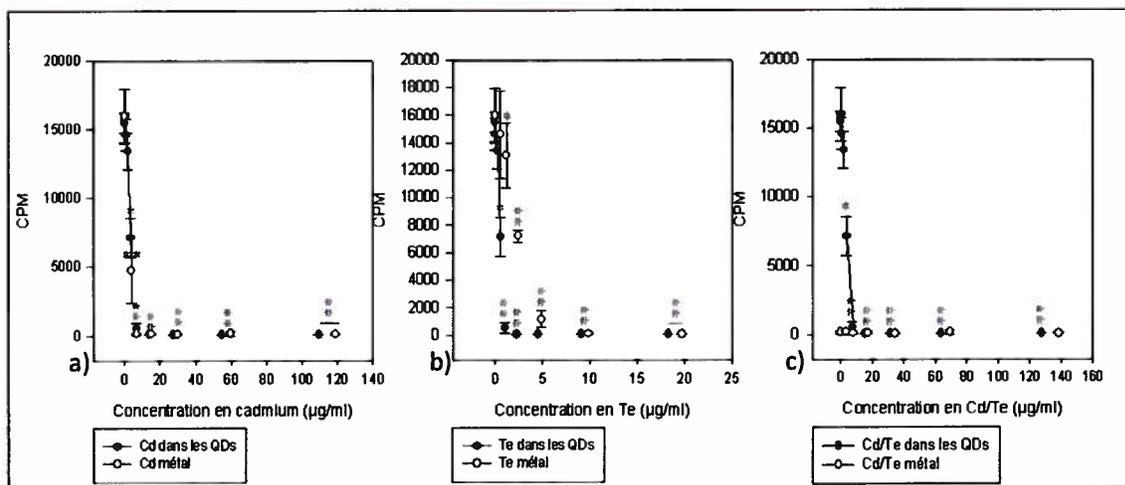


Figure 68 : Transformation lymphoblastique d'humains après 48h d'exposition aux QDs et aux métaux. a) QDs, n= 3 ; b) Cd, n=3 ; c) Cd/Te, n=3 et d) Te, n=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La transformation lymphoblastique est significativement diminuée dès 2.23 $\mu\text{g/ml}$ de QDs (soit 3.42 $\mu\text{g/ml}$ de Cd contenu dans les QDs, 0.57 $\mu\text{g/ml}$ de Te et 3.99 $\mu\text{g/ml}$ du mélange Cd/Te). Pour le cadmium, la transformation lymphoblastique est significativement diminuée dès 3.7 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 68 a). Pour le tellure, la transformation lymphoblastique est significativement diminuée dès 1.24 $\mu\text{g/ml}$ de Te (Figure 68 b). Pour le mélange Cd/Te la première concentration diminue significativement la transformation lymphoblastique (Figure 68 c).

2.2.5 Calcul des IC 50 des QDs, pour les différentes espèces modèles

De la même manière que dans le chapitre 2 les IC 50 des différents paramètres immunitaires pour les espèces modèles ont été calculés.

Tableau 23 : Récapitulatif des actions des QDs et des métaux composant la particule, sur les différents types cellulaires des modèles animaux. Toutes les données sont exprimées en µg/ml.

Viabilité Macrophages	Exposition aux QDs	Exposition au CdCl ₂	Exposition au NaTeO ₃	Exposition au mélange
Humain	216.62	19.29	18.32	31.14
Souris	> 952.4	10.21	47.46	5.30
Truite	715.39	291.39	109.83	450.12
Moule	581.92	> 952.4	> 158.7	381.39

Phagocytose 1 bille et plus	Exposition aux QDs	Exposition au CdCl ₂	Exposition au NaTeO ₃	Exposition au mélange
Humain	> 952.4	17.92	30.45	15.15
Souris	> 952.4	468.01	> 158.7	300.1
Truite	> 952.4	> 952.4	> 158.7	> 1110
Moule	598.51	> 952.4	> 158.7	194.81

Phagocytose 3 billes et plus	Exposition aux QDs	Exposition au CdCl ₂	Exposition au NaTeO ₃	Exposition au mélange
Humain	424.65	9.10	22.53	11.36
Souris	> 952.4	442.17	> 158.7	167.39
Truite	> 952.4	> 952.4	> 158.7	> 1110
Moule	435.22	42.95	> 158.7	166.57

Viabilité lymphocytes	Exposition aux QDs	Exposition au CdCl ₂	Exposition au NaTeO ₃	Exposition au mélange
Humain	52.10	9.84	22.61	12.77
Souris	218.72	7.89	12.78	5.40
Truite	8.68	15.17	1.377	15.37

Transformation lymphoblastique	Exposition aux QDs	Exposition au CdCl ₂	Exposition au NaTeO ₃	Exposition au mélange
Humain	28.70	3.29	5.29	28.70
Souris	4.38	2.86	0.78	< M1
Truite	20.04	9.81	1.44	3.03

2.3 Discussion sur les QDs selon les différentes espèces

Quelles que soit les espèces modèles étudiées les réponses du système immunitaire sont significativement affectées par les QDs et les métaux qui les composent. Selon les espèces, les réponses de toxicité face aux QDs et aux les métaux ne sont pas les mêmes. Les espèces aquatiques répondent différemment des mammifères.

Ainsi, chez les mollusques bivalves, la viabilité des hémocytes de *Mytilus edulis* est plus altérée par les QDs que par ses composants métalliques (CdCl₂, NaTeO₃ et mélange CdCl₂ et NaTeO₃). Ceci avait déjà été observé précédemment chez la moule d'eau douce, *Elliptio complanata*, mais à des concentrations moindres de 4 µg/ml (Gagné, Auclair et al. 2008a). De plus, la phagocytose, que ce soit pour l'activité (1 bille et plus) ou pour l'efficacité (3 billes et plus) est significativement diminuée, ce qui confirme les résultats obtenus dans les expériences de Gagné et al., 2008. Ces auteurs observaient une diminution de la phagocytose pour des QDs dès 4 µg/ml. Cette différence de réponse immunitaire, pour des concentrations 100 fois inférieures à celles retrouvées dans nos résultats, peut être liée à la chimie des particules, ce qui a été vu précédemment dans ce chapitre. Ces résultats attestaient que les nanoparticules ne sont pas stables dans de l'eau de mer (telle que l'atteste la courbe de distribution des isotopes dans les milieux de culture utilisés dans le projet). En effet, des phénomènes de corrosion et de précipitation du cadmium sont envisageables dans l'eau de mer (Chang and Papillon 1998) ainsi les nanoparticules seraient moins biodisponibles pour les cellules de moules bleues comparées à celles d'elliptio.

Concernant le Te, dans le cas de la moule bleue, ce metalloïde ne semble pas toxique. Il est possible que le tellure se complexe à l'eau de mer sous forme de sels de tellure (Bouroushian 2010) et ne soit donc pas disponible pour l'assimilation. Cependant, pour les autres modèles, le Te affecte significativement la viabilité des lymphocytes. De plus, nos données indiquent que le Te est très toxique pour les monocytes d'humain, il l'est moins pour les macrophages de souris. Ainsi la toxicité du tellure varie selon les modèles de mammifères. Bien que peu étudié, le tellure est connu pour être une molécule non essentielle mais dangereuse (Ogra 2009) qui se complexe souvent dans l'organisme ou dans le milieu environnant. Il n'est donc pas présent naturellement dans les organismes vivants mais peut être accumulé de la même manière que l'est l'arsenic (autre metalloïde) chez les globules rouges du rat (Shiobara, Ogra et al. 2001) et entraîner des réponses oxydatives (Nordberg, Fowler et al. 2008; Chasteen, Fuentes et al. 2009). Il est essentiel aussi de mentionner que le Te n'est pas un élément très étudié en toxicologie (Dong, Li et al. 2006; Nordberg, Fowler et al. 2008). Selon nos résultats le Te n'a pas d'effet significatif sur la phagocytose, cependant il induit une inhibition significative de la prolifération cellulaire des LT chez les trois modèles étudiés (truite arc-en-ciel, souris et humain). Selon nos résultats, le Te n'a donc pas d'effet sur la viabilité des macrophages et la phagocytose des différents modèles d'animaux étudiés (excepté l'humain) mais sur la transformation lymphoblastique et la viabilité des

lymphocytes. Ainsi la toxicité du tellure est accentuée lors de longue exposition. La toxicité du Tellure, est supposé être liée à des mécanismes de stress oxydatif. De plus, nos résultats sont en accord avec ceux de Sandoval et al, (2010) qui démontraient dans leur étude, sur des cellules HeLa, que la toxicité du tellure était augmenté par sa concentration et dans le temps (Sandoval, Levêque et al. 2010).

Chez les truites, la sensibilité du système immunitaire aux QDs est plus forte que celle liée au cadmium dissous, et ce pour les macrophages et les lymphocytes (Figure 58 et Figure 60). Ainsi les truites sont des modèles d'études sensibles au polluant de l'environnement (Bailey, Williams et al. 1996; Zelikoff 1998). Pour les lymphocytes et les macrophages de truites, la viabilité diminue plus fortement lorsqu'ils sont exposés à une source de cadmium nanoparticulaire plutôt que dissous. De plus, la CI 50 des lymphocytes exposés aux QDs est inférieure à celle des lymphocytes exposé au Cd dissous. Ses résultats sont également retrouvés chez les hémocytes de moules bleue. Pour les mammifères, (souris et humain, les résultats sont différents. Le cadmium métallique est beaucoup plus toxique qu'une dose équivalente de que les Cd contenu dans les QDs pour une quantité égale de cadmium. De même, les IC 50 des monocytes, macrophages et lymphocytes exposés au cadmium dissous sont inférieures à celles retrouvées pour les QDs.

Ces résultats sont aussi retrouvés pour la phagocytose (immunoactivité et immunoefficacité), chez la truite, des patrons similaires de stimulations sont observés pour les QDs ainsi que pour les métaux composant les NPs (Cd, Te et mélange Cd/Te). Cependant, le niveau de stimulation de la phagocytose est supérieur pour les macrophages de truites exposés au Cd et au Te dissous. Pour la moule, la phagocytose est significativement plus diminuée par l'exposition aux QDs qu'aux Cd et Te dissous. De même, chez les mammifères, la phagocytose est moins affectée par les QDs, alors qu'elle l'est significativement diminuée en présence de tellure et du mélange Cd/Te. Par ailleurs les IC 50 d'immunoefficacité et d'immunoactivité de souris sont plus faibles avec les métaux dissous qu'avec les NPs.

Concernant le mélange cadmium et tellure dissous, il représente une toxicité plus élevée pour les 4 modèles comparée à celle des QDs. Ceci pourrait s'expliquer par la biodisponibilité des métaux dissous pour les cellules. En effet, il est possible que le complexe CdCl_2 et NaTeO_3 précipite en relarguant des ions Cd^{2+} dans le milieu susceptible de précipiter avec le sodium de tellure.

Ainsi les patrons de réponses des QDs et du mélange Cd/Te pour la moule sont différents. Cependant pour la truite, les patrons de réponses de viabilité des macrophages et des lymphocytes exposés aux QDs et au mélange Cd/Te sont similaires attestant une coaction des composants de la nanoparticule sur les cellules. Pour les mammifères cependant les résultats des IC 50 indiquent que le mélange des métaux dissous est toujours plus toxique que la nanoparticule. Dans la littérature, il a déjà été démontré que le mélange CdTe était très toxique (Fthenakis, Morris et al. 1999). Une étude *in vivo* de Morgan et al, les auteurs avait démontré que le mélange Cd/Te pour une dose de 17 mg/kg testé sur des rats, induit une diminution significative du nombre de macrophages alvéolaires de poumons et une augmentation du pourcentage des leucocytes polymorphonucléaires (Morgan, Shines et al. 1995; Fthenakis, Morris et al. 1999). Nos résultats sont donc en accord avec les études toxicologiques du CdTe.

Les résultats de notre étude indiquent que la toxicité des QDs, pour les mammifères, est inférieure à celle du cadmium dissous. Une diminution significative de la viabilité des LT est observée dès 27,38 µg/ml vs 7,44 µg/ml. Ces résultats sont en accord avec les études de Lovric et al., 2005 qui observaient une toxicité des QDs sur des cellules de phéochromocytomes de rat dès 10 µg/ml (Lovric 2005a). De même nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Hoshino et al., (2004). Les auteurs observaient la toxicité des QDs, sur les cellules du Lymphome T de souris dès 200 µg/ml (Hoshino, Hanaki et al. 2004). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Chan, (2008), les auteurs mettaient en évidence une diminution de la transformation des blastocytes d'embryons de souris mis en présence de nanoparticules de CdSe.

Concernant les métaux dissous nos résultats indiquent que la viabilité des hémocytes de moules n'est pas altéré pour la dose maximale de cadmium. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Gagnaire et al, (2004), les auteurs n'observaient pas de variation significative de la viabilité des hémocytes de moules bleues suite à une exposition maximale de CdCl₂ de 54,9 µg/ml (3×10^{-4} M). Concernant le modèle de mammifère, la viabilité des macrophages et des monocytes est significativement affectée par l'augmentation en concentration de cadmium dissous (CI souris = 10,21 µg/ml et CI humain = 19,29 µg/ml). Ces résultats sont inférieurs à ceux de Waters et al, (1975). Les auteurs ont observé une diminution de 50 % de la viabilité des macrophages alvéolaire de lapin pour une exposition à 183 µg/ml de CdCl₂ (1×10^{-3} M) (Waters, Gardner et al. 1975). L'écart entre la sensibilité des macrophages de mammifères pourrait être lié à la différence d'espèces (souris vs lapin) et à la

provenance des cellules immunitaires (macrophages de rate vs macrophages de poumons). Concernant la viabilité des truites, la CI 50 des macrophages de truites est supérieure à celle des lymphocytes (291 µg/ml vs 9,8 µg/ml). Ainsi les lymphocytes sont plus sensibles que les macrophages lors d'une exposition au Cd dissous. Ces concentrations d'inhibition retrouvées dans nos résultats, pour les lymphocytes, sont semblables à celles observées dans la littérature (Babich, Shopsis et al. 1986). Effectivement, la toxicité a été définie dans des lignées cellulaires de perche soleil (*Lepomis macrochirus*) BF-2 et RTG-2, les auteurs ont démontrés une diminution de 50 % de la rétention du rouge neutre pour 0.08 mM (9 µg/ml) de Cd pour les BF-2 et pour 0.18 mM (20 µg/ml) de Cd pour les RTG-2 (Babich, Shopsis et al. 1986).

En conclusion, les résultats indiquent, pour les bivalves, que les QDs sont plus toxiques qu'une dose équivalente de Cd dissous composant la nanoparticule. En règle générale, pour les espèces animales testées, la particule est moins toxique que le cadmium, le tellure et le mélange Cd/Te dissous. Ceci atteste donc une certaine résistance de la particule due à l'enrobage, mise en présence d'eau de mer, la toxicité des QDs est exacerbée. La cytotoxicité des QDs est liée en partie à la présence de cadmium sous forme Cd²⁺, cependant nos résultats indique aussi que le tellure est toxique. Il est donc possible que la toxicité des nanoparticules soit liée aux formes ioniques du tellure et du cadmium.

Concernant les mammifères, nos données indiquent que les métaux dissous sont plus toxiques que les NPs. Ainsi les QDs Cd/S Cd/Te, sont toxiques à forte dose mais sont moins toxiques qu'une dose équivalente de cadmium, de Te ou de Cd/Te dissous. Ceci est sûrement lié à l'intégrité de la particule et à son enrobage. Afin d'être stabilisés les QDs doivent être enrobés (Maysinger 2007). Cette couche est souvent formée de ZnS tend à diminuer la réactivité de la particule et à atténuer les effets néfastes de la dégradation des QDs (Hardman 2006).

L'enrobage des QDs utilisés dans ce projet contient aussi du soufre (CdS/CdTe). Comme nous l'avons démontré la toxicité des QDs est sûrement liée aux différents composés présents dans la particule. Ainsi, il serait intéressant dans notre étude d'observer la toxicité des autres composés, présent dans l'enrobage de la nanoparticule et non testés dans ce projet.

Pour résumé, selon nos résultats, quelque soit le modèle et le type de contaminants (de nature nanoparticulaire ou dissoute), les réponses innées sont moins affectées que les réponses mitotiques. Ceci avait déjà été observé pour les nanoparticules dans le premier chapitre. Cependant les résultats des métaux dissous confirment les lymphocytes T sont plus sensibles que les macrophages et monocytes. Ceci viendrait confirmer qu'une exposition à plus long

terme serait éventuellement liée à une toxicité des QDs par le biais de processus de dégradation. Finalement, une gradation de réponse immunitaire acquise peut aussi être faite selon la sensibilité des organismes. Les cellules immunitaires de souris sont plus sensibles que les cellules de truites, elle-même plus sensible que celles de moules. Ainsi les mammifères, sont donc très sensibles au QDs et aux métaux confirmant un réel enjeu de toxicité des QDs sur le système immunitaire des animaux.

2.4 Résultats pour les nanoparticules d'argent de ViveNano®

Suite à l'exposition aux nanoparticules d'argent ViveNano® et au nitrate d'argent AgNO₃, composant principal de la particule, les différents paramètres immunitaires, viabilité, phagocytose et transformation lymphoblastique, ont été observés chez les espèces modèles.

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (Figure 69).

-Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages, la phagocytose et la transformation lymphoblastique (Figure 71).

-Pour la souris : la viabilité des macrophages, la phagocytose et la transformation lymphoblastique (Figure 72 et Figure 73).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

2.4.1 Cellules de moules bleues

-Viabilité et phagocytose de la moule bleue

La viabilité des hémocytes est très significativement diminuée pour les deux plus fortes concentrations d'AgNP pour 35.7 µg/ml et 71,4 µg/ml ($p < 0,001$). Exposés à de l'argent dissous, la viabilité des hémocytes diminue très significativement dès 4.46 µg/ml ($P < 0.001$) (Figure 69 a). Concernant la phagocytose, l'immunoactivité est significativement diminuée dès 17.85 µg/ml d'AgNPs ($p < 0.05$) et très significativement pour 71.4 µg/ml ($p < 0.001$) (Figure 69 b).

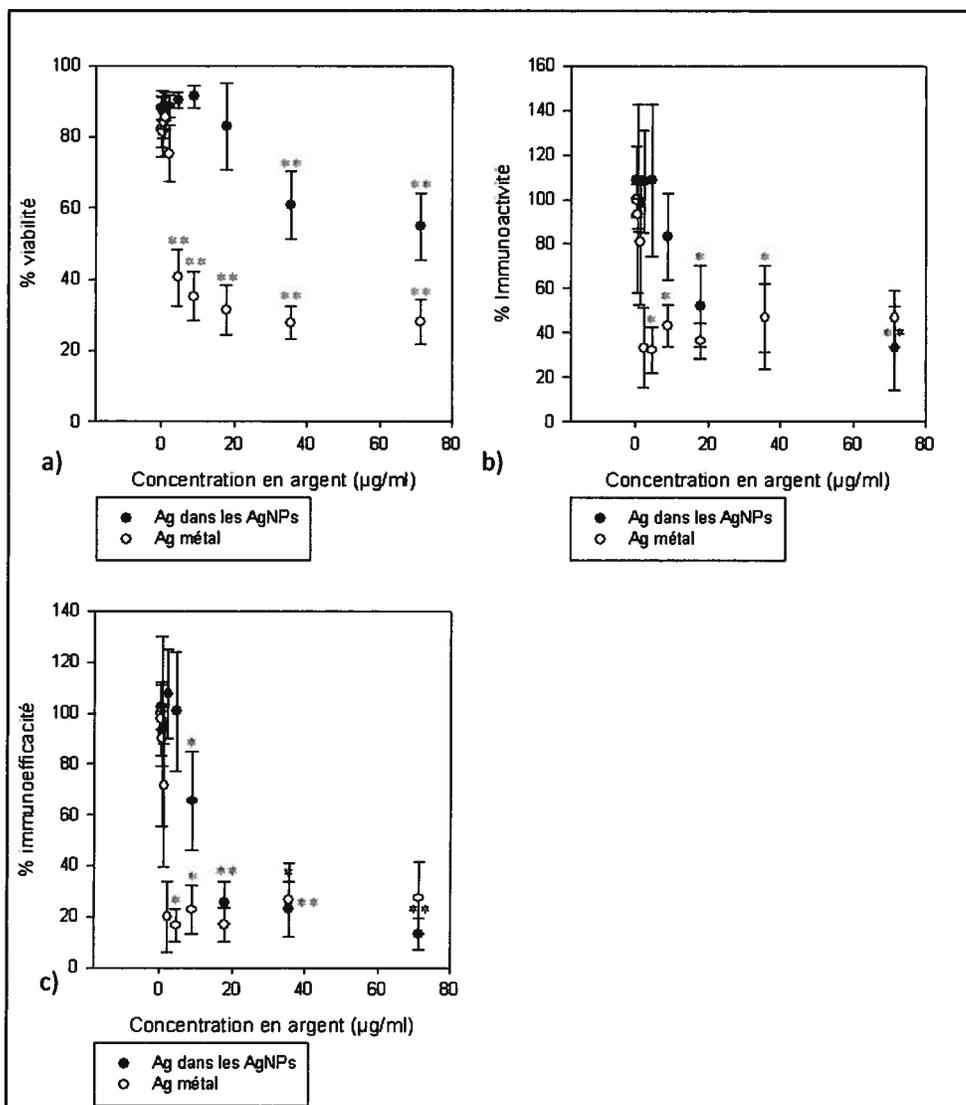


Figure 69 : Viabilité et phagocytose de moules exposées aux nanoparticules d'argent n= 8 et à l'argent dissous n=6. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Pour l'argent dissous, la phagocytose diminue significativement dès 4.46 μg/ml (p<0.05). L'immunoefficacité des hémocytes de moules est significativement diminuée dès 8.93 μg/ml (p<0.05) et très significativement diminuée dès 17.85 μg/ml (p<0.001). L'immunoefficacité des hémocytes, exposés à l'argent dissous, est significativement diminuée dès 8.93 μg/ml (p<0.05) (Figure 69 c).

2.4.2 Cellules de truites arc-en-ciel

-Viabilité et phagocytose des macrophages de truites

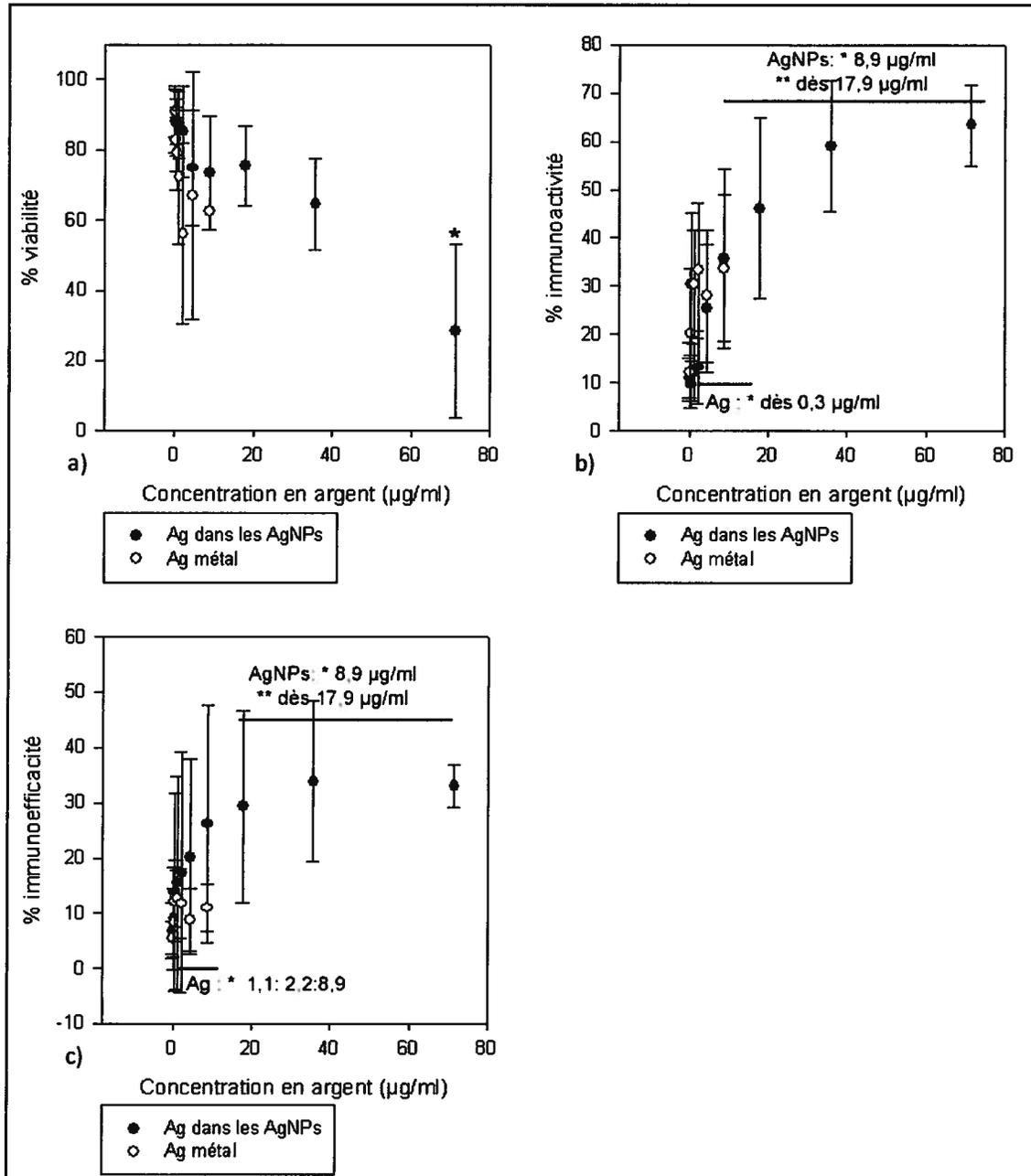


Figure 70 : Viabilité et phagocytose des macrophages de truites exposées durant 21h aux AgNPs et au nitrate d'argent. a) viabilité des macrophages avec les AgNPs n= 9 vs AgNO₃ n=8 ; b) Immunoactivité des macrophages avec les AgNPs n= 6 vs AgNO₃ n= 6 ; c) Immunoefficacité des macrophages avec les AgNPs n= 6 vs AgNO₃ n= 6. * p < 0.05, ** p < 0.001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité des macrophages de truites exposés durant 21h aux AgNP est significativement diminuée pour les doses maximales de 71.4 µg/ml (Figure 70 a). L'argent est très toxique et

aucune cellule de macrophages n'est viable au delà d'une concentration de 8.9 µg/ml d'argent (Figure 70 a). L'immunoactivité des hémocytes est significativement stimulée pour 8.9 µg/ml d'AgNPs. L'immunoefficacité est significativement stimulée dès 8.9 µg/ml ($p < 0.05$) et très significativement stimulée dès 17.9 µg/ml ($p < 0.001$). L'immunoactivité avec l'AgNO₃ est stimulée dès 0.3 µg/ml (Figure 70 b), et l'immunoefficacité est stimulée dès 1.1 µg/ml.

Pour les AgNPs la phagocytose est significativement affectée pour des concentrations entre 2.2 et 4.5 µg/ml. Il est à noter que les patrons cellulaires sont aussi très différents du témoin pour ces concentrations, une altération totale des cytogrammes est observable pour 2.2 µg/ml (Figure 70 b). L'augmentation de phagocytose est un artefact du aux billes collées aux cellules lysées (Figure 70 b et c).

-Viabilité et transformation lymphoblastique des lymphocytes de truites

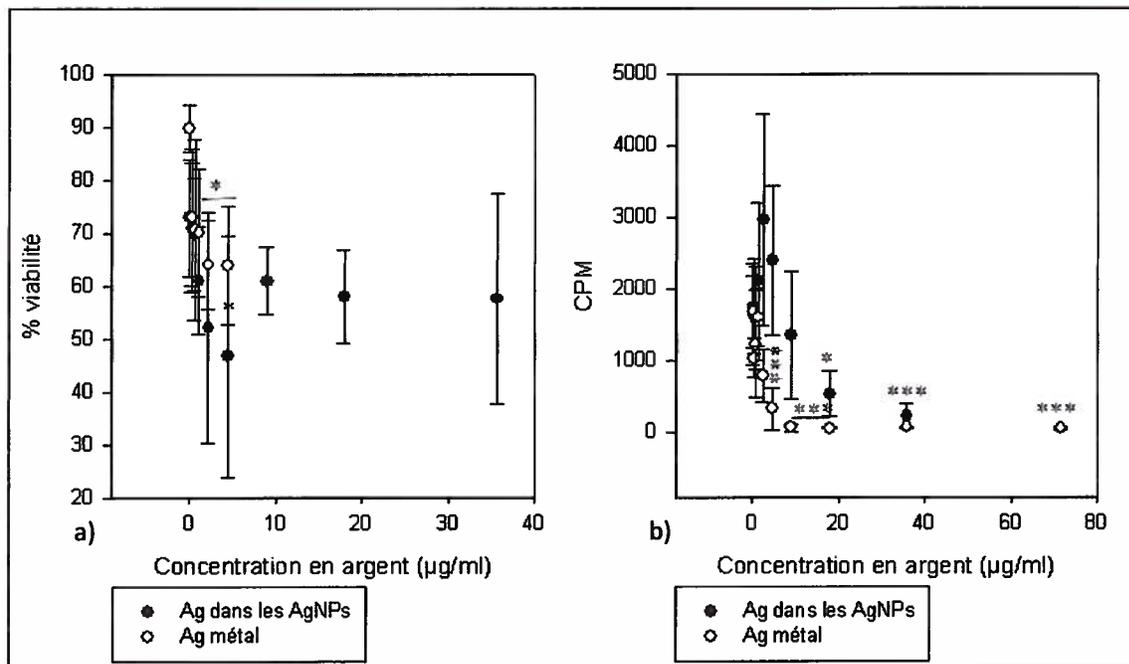


Figure 71 : Viabilité des lymphocytes exposés durant 72h avec des AgNPs = 9, et de l'argent dissous N = 5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.0001$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.**

La viabilité des lymphocytes de truites exposés aux AgNPs diminue significativement pour 8.93 µg/ml ($p < 0.05$). La mortalité cellulaire est totale pour la plus forte concentration 71,4 µg/ml). Exposés à l'argent dissous, la viabilité des lymphocytes est significativement diminuée dès 2.23 µg/ml ($p < 0.05$). Au-delà, de 4.46 µg/ml, aucun lymphocyte n'est viable (Figure 71 a). La transformation lymphoblastique des LT, exposés aux AgNPs, est

significativement diminuée dès 8.9 $\mu\text{g/ml}$ et très significativement dès 17.9 $\mu\text{g/ml}$. Pour l'argent dissous la transformation diminue significativement dès 8.9 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (bruit de fond car les cellules ne sont plus viables) (Figure 71 b). Les très forts écarts types de 0 à 4.46 $\mu\text{g/ml}$ ne permettent pas d'avoir une diminution significative de la viabilité, cependant cette forte disparité atteste une cytotoxicité des particules.

2.4.3 Cellules de souris

- Viabilité et phagocytose de macrophages de souris

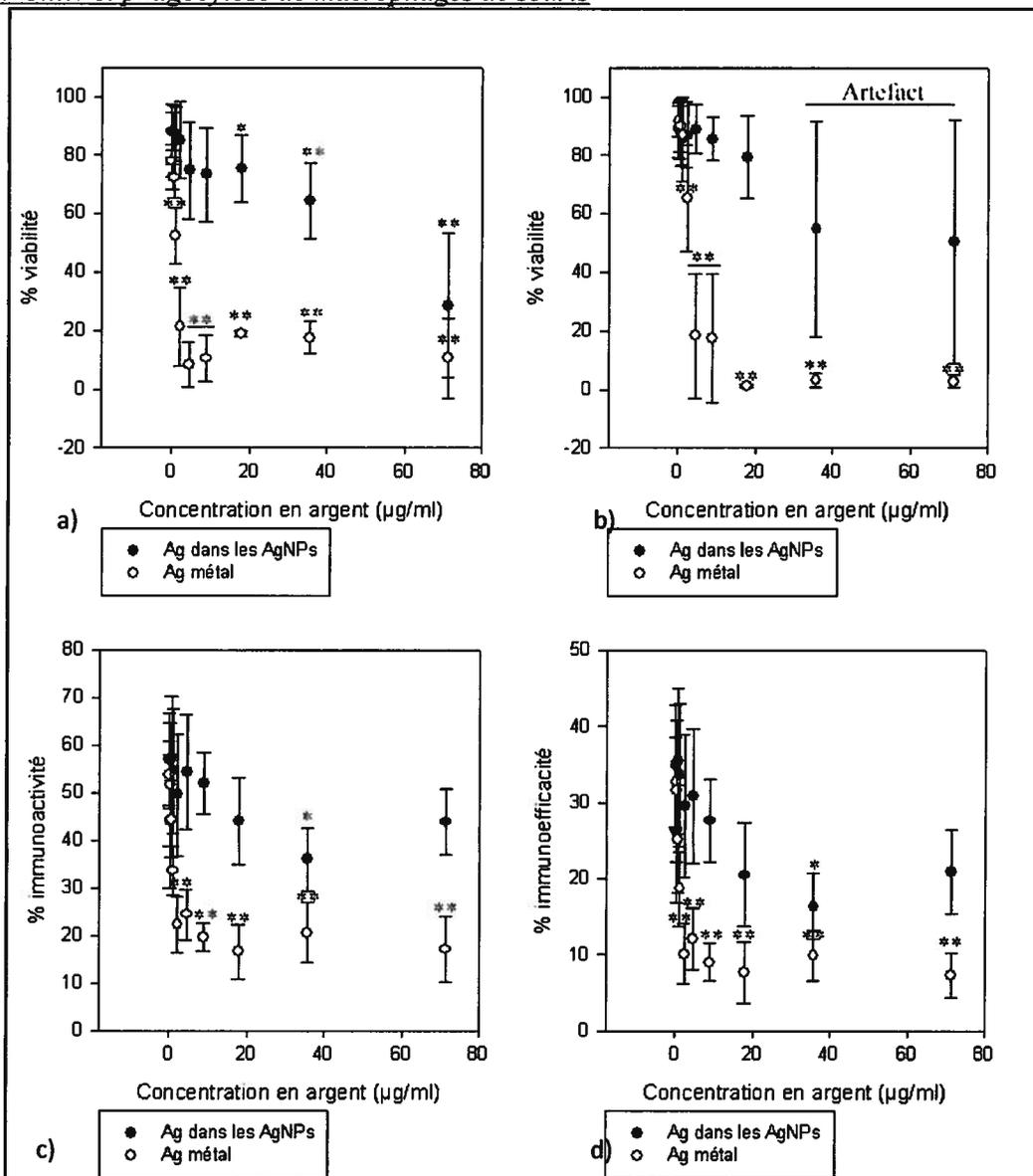


Figure 72 : Viabilité et phagocytose des macrophages de souris exposés durant 21h aux AgNP et au nitrate d'argent. a) Viabilité des macrophages avec les AgNPs n= 6 vs AgNO₃ n=6; b) Viabilité des lymphocytes T 18h n=6. c) Immunoactivité des macrophages avec les AgNPs n= 6 vs AgNO₃ n= 6 ; d) Immunoefficacité des macrophages avec les AgNPs n= 6 vs AgNO₃ n= 6 ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

La viabilité des macrophages de souris exposés aux AgNP durant 21h diminue significativement pour des concentrations de 17,9 $\mu\text{g/ml}$ ou supérieures (Figure 72 a). Cependant, pour l'argent particulaire la viabilité des macrophages est très significativement diminuée pour des concentrations de 1.1 $\mu\text{g/ml}$ et plus ($p < 0.001$) (Figure 74 a). La phagocytose (immunocapacité et immunoefficacité) diminue significativement pour une concentration de 35.7 $\mu\text{g/ml}$ d'argent contenu dans les particules ($p < 0.05$). Pour l'argent, la phagocytose est significativement diminuée dès 1.1 $\mu\text{g/ml}$ pour l'activité de phagocytose et 2.2 $\mu\text{g/ml}$ pour l'efficacité de phagocytose (Figure 72 a et b). La viabilité des LT exposés durant 18h avec les AgNPs n'est pas significativement diminuée, cependant les forts écarts types des trois plus fortes concentrations traduisent une toxicité des particules selon les individus exposés (Figure 72 d). Par contre, la viabilité des LT exposés à l'AgNO₃ est significativement diminuée dès 2.2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$).

-Viabilité et transformation lymphoblastique des lymphocytes de souris

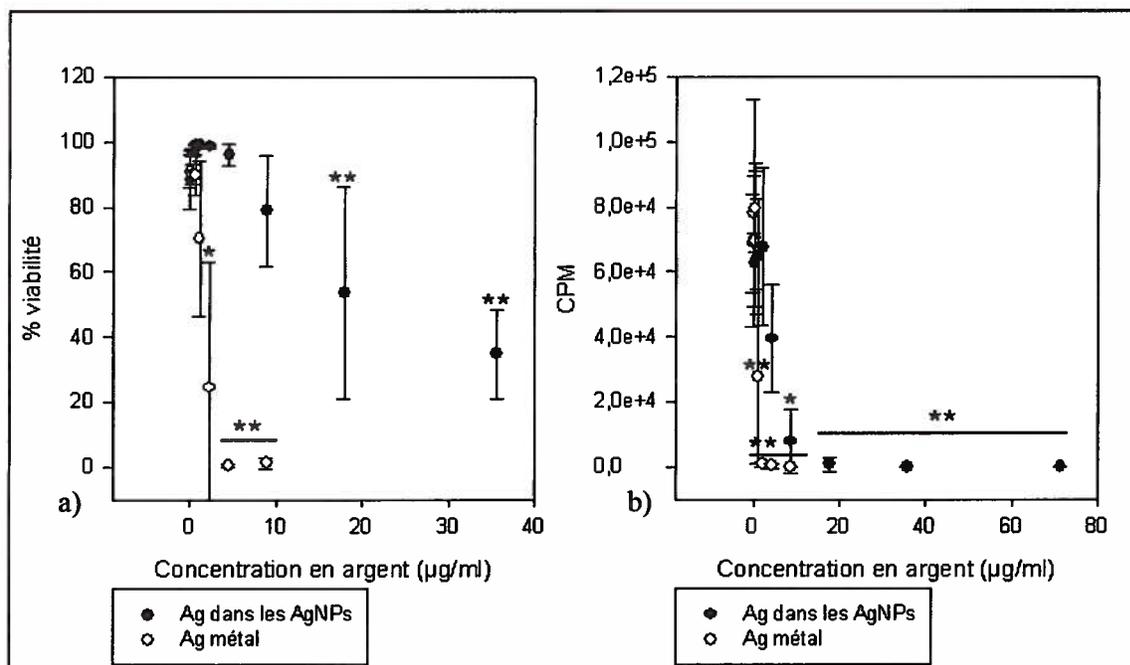


Figure 73 : Viabilité et transformation lymphoblastique des Lymphocytes T de souris exposées durant 48 h aux AgNPs et au nitrate d'argent. a) viabilité des LT avec les AgNP n= 6 vs AgNO₃ n=4; b) Transformation lymphoblastique des LT avec les AgNPs n= 6 vs AgNO₃ n= 4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Finalement l'argent particulaire est beaucoup plus toxique que les AgNP pour les LT de souris incubées durant 48h avec ces contaminants. En effet, la viabilité des LT est

significativement diminuée pour des concentrations de 2.2 µg/ml d'argent ou plus (Figure 73 a). De plus, la viabilité des LT est significativement diminuée dès 17,9 µg/ml d'AgNPs, d'autre part à cette concentration la viabilité est très altérée tels qu'en atteste le fort écart type (Figure 73 b). La transformation lymphoblastique des lymphocytes T exposés aux AgNPs est significativement diminuée pour 8.9 µg/ml (Figure 73 b). Cependant la transformation des LT exposés à l'AgNO₃ est quand à elle, très significativement diminuée dès 2.2 µg/ml (Figure 73 b).

2.4.4 Calcul des CI 50 des AgNPs ViveNano[®], pour les différentes espèces modèles

Tableau 24 : Récapitulatif des CI 50 pour les nanoparticules d'argent et le nitrate d'argent dissous. Toutes les données sont exprimées en µg/ml.

Viabilité Macrophages	Exposition aux AgNPs	Exposition à AgNO ₃	Viabilité lymphocytes	Exposition aux AgNPs	Exposition à AgNO ₃
Souris	36.39	1.63	Souris	25.01	1.67
Truite	55.08	10.03	Truite	42.42	5
Moule	>71.4	4.50			

Phagoocytose 1 bille et plus	Exposition aux AgNPs	Exposition à AgNO ₃	Phagoocytose 3 billes et plus	Exposition aux AgNPs	Exposition à AgNO ₃
Souris	>71.4	1.77	Souris	>71.4	1
Truite	>71.4	>71.4	Truite	>71.4	>71.4
Moule	20.62	1.80	Moule	11.56	1.51

Transformation lymphoblastique	Exposition aux AgNPs	Exposition à AgNO ₃
Souris	10.51	0.92
Truite	7.18	3.05

2.5 Discussion sur les AgNPs Vivenano® selon les différentes espèces

Les résultats obtenus dans cette section nous indiquent que les AgNPs et l'argent dissous ont des effets significatifs sur les différents paramètres immunitaires des modèles animaux étudiés.

Lorsque l'on compare la toxicité des nanoparticules vs le métal dissous, pour tous les résultats et quel que soit le modèle animal, le métal dissous est plus toxique que la particule. Dans la littérature, des tests sur des cellules HeLa S3 mises en présence d'AgNPs et d'argent dissous ont été réalisés par Miura et al, (2009). Les IC 50 calculés étaient de 92 µg/ml pour les AgNPs et 17 µg/ml pour l'AgNO₃. Ces données confirment que l'argent en solution est plus toxique que l'argent sous forme nanoparticulaire. De plus, les grandeurs de toxicité sont relativement semblables à celles retrouvées des macrophages et lymphocytes de rate de souris (Miura and Shinohara 2009). La différence de sensibilité cellulaire pourrait cependant être liée à l'origine des cellules, en effet nos travaux sont basés sur des cultures primaires de cellules alors que Miura et al, (2009) utilisent une lignée.

D'autres études ont confirmé que l'argent est plus toxique sous sa forme dissoute chez le poisson (Griffitt, Luo et al. 2008). Les auteurs ont définis que la concentration létale à 50% pour des Danio, exposés durant 48h aux AgNPs, était de 7.07 mg/l alors que la CL 50 avec de l'argent dissous était de 0,022 mg/l. Ainsi les résultats des auteurs correspondent avec ceux obtenus chez les macrophages et les lymphocytes de truites (Griffitt, Luo et al. 2008). Il est à noter que les concentrations retrouvées par Griffitt et al, (2008) sont similaires aux CI50 obtenues avec les lymphocytes de truites. De plus, l'étude de Carlson et al, (2008) a démontré que des macrophages alvéolaires, de souris, exposés à 50 µg/ml d'AgNO₃ n'étaient plus viables. Les gammes doses réponses des macrophages de souris présentées dans ce chapitre confirment bien ces résultats.

D'autre part, la toxicité des AgNPs a déjà été étudiée chez les modèles de poissons, en effet Asharani et al., (2008) observaient des concentrations létales à 50% entre 25-30 µg/ml d'AgNPs, selon le stade de croissance des Danio. La CI 50 dans notre étude est légèrement supérieure à cette dose, ceci peut aussi être lié au fait que les truitelles (6 mois < x < 1 an) utilisées dans notre étude ne sont pas au même stade de croissance que les Danio (Asharani, LianWu et al. 2008a) d'autre part, nos tests étaient réalisés *in vitro* et non *in vivo*. Cependant, les ordres de grandeurs de toxicité sont similaires.

Selon nos résultats, la viabilité des hémocytes de moule n'est pas affectée lors de l'exposition aux AgNPs alors qu'elle l'est pour l'argent dissous. De plus ces résultats sont retrouvés dans les deux paramètres phagocytaires (immunocapacité et immunoefficacité). Ces résultats sont en accord avec ceux de Griffitt et al, (2009). Les auteurs démontraient chez une espèce d'invertébré *Daphnia pulex*, que les AgNPs avaient une faible toxicité comparée à celles de l'argent dissous (Griffitt, Hyndman et al. 2009). Par ailleurs, il a été vu précédemment dans la première partie de ce chapitre que les AgNPs n'étaient pas stables dans l'eau de mer. Nos expériences ont été réalisées avec de l'eau de mer naturelle, qui contient probablement des concentrations élevées de matières organiques capable de complexer l'argent ionique et de réduire sa toxicité (Luoma 2008). En effet il a été démontré qu'une concentration d'eau de mer > 10 %, induit une forte présence d'ions chlorures qui peuvent se complexer aux ions Ag^+ et ainsi diminuer la disponibilité des ions argent.

Pour la truite, une diminution significative de la viabilité des macrophages est observée pour 8,9 $\mu\text{g/ml}$ d'argent dissous au-delà de cette concentration la majorité des macrophages n'était plus viable, ainsi la stimulation de l'activité de phagocytose est un artefact de stimulation. Ces résultats sont très différents de ceux des macrophages exposés aux AgNPs. En effet, selon nos résultats les AgNPs induisent une toxicité cellulaire mais à forte dose d'argent (55.08 $\mu\text{g/ml}$). D'autre part, l'activité et l'efficacité phagocytaire sont stimulées par l'augmentation de la concentration en AgNPs. Ainsi les AgNPs induisent une stimulation du système immunitaire alors que le métal dissous induit une inhibition du mécanisme de phagocytose. Cette stimulation du système, est aussi appelé hormèse. Comme il a été évoqué dans le premier chapitre ce phénomène a été observé avec des nanoparticules d'argent misent en présence de spermatogonie de rats (Braydich-Stolle 2005) et des cellules HepG2 d'humain (Kawata, Osawa et al. 2009; Iavicoli, Calabrese et al. 2010).

D'autre part, la toxicité cellulaire engendrée par les nanoparticules est souvent liée à deux phénomènes : l'apoptose et la nécrose cellulaire (Asharani, LianWu et al. 2008a; Choi, Kim et al.). Ces phénomènes peuvent apporter des agrégats et des débris dans le milieu qui seraient susceptibles de stimuler la phagocytose de truite.

Cependant nos résultats ne sont pas accord avec toutes les études. Certaines recherches, principalement menées sur des bactéries attestent que les AgNPs (forme nanoparticulaire) induisent une plus forte toxicité que l'argent dissous (formes anioniques) (Lok, Ho et al. 2006; Fent 2010). Ceci démontre qu'il subsiste encore des disparités de réponse selon les

modèles d'animaux étudiés (eucaryotes versus procaryotes). D'autre part cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les bactéries sont des organismes unicellulaires, et que les nanoparticules d'argent sont utilisées essentiellement comme antimicrobiens (Lok, Ho et al. 2007; Santoro, Duchsherer et al. 2007). Ainsi, il est possible que la sensibilité des espèces exposées au NPs soit liée à la nature de la cellule mais aussi à son métabolisme.

2.6 Conclusions générales sur les effets des nanoparticules vs leurs composés métalliques

À l'heure actuelle, il est très difficile de caractériser la toxicité des nanoparticules en générale. En effet, tout dépend de leur synthèse, de leur solubilisation, de leur fonctionnalisation, des composés qui forment la particule etc. (Michalet 2005). Il est donc très important pour les études de toxicité de tenir compte de la chimie de la particules (Kirchner 2005).

Il a été démontré que des nanoparticules d'or dont l'enrobage était très stable, présentent les mêmes niveaux de toxicité que les QDs. Il est donc possible que la toxicité ne soit pas uniquement liée au relargage des ions Cd^{2+} mais éventuellement à la précipitation des particules dans les cellules (Kirchner 2005). Ainsi les particules auraient plusieurs voies de cytotoxicité et pourraient être considérées comme des chevaux de Troie (Park, Yi et al. 2010).

De plus, le temps d'incubation pourrait influencer la toxicité des nanoparticules. En effet, un court contact avec les nanoparticules peut ne pas engendrer de changements dans la cellules (ou à sa surface) (Maysinger 2007). Cependant à long terme les nanoparticules peuvent pénétrer dans les cellules jusqu'au noyau et engendré des dommages.

De plus, l'enrobage joue un rôle fondamental avec la toxicité de la particule. Cet enrobage est connu pour se dégrader quand il est exposé à l'air ou aux ultraviolets (Balbus 2006). Cet enrobage peut donc être multicouche et augmenter la solubilité dans le milieu tels l'eau et réduire la dispersion des métaux contenus dans le noyau (Michalet 2005; Zhang and Monteiro-Riviere 2009). En effet, cet enrobage peut être altéré dans des conditions oxydatives ou de photo oxydation et rendre la particule labile et la dégrader. Ceci a déjà été observé pour des cultures primaires de cellules de rats, les cellules présentaient des mortalités liées à la photolyse et à l'oxydation de l'enrobage de la particule (Derfus 2004). L'enrobage vient donc solubiliser et stabiliser la particule, l'enrobage des QDs est relativement différent de celui des nanoparticules d'argent utilisées dans le projet. En effet, l'enrobage des QDs est plus complexe que celui des AgNPs. Ceci pourrait expliquer que les nanoparticules d'argent soient

plus toxiques car elles sont plus susceptibles de se dégrader dans le milieu. D'autre part, cette toxicité pourrait aussi être contrée, pour les nanoparticules d'argent avec un enrobage de montmorillonite, car la toxicité des nanoparticules d'argent ne s'exprime pas sur des cellules immunitaires dans cette étude (Daniel, Tharmaraj et al. 2010).

Dans ce chapitre, nos résultats ont démontré que les nanoparticules possédaient des propriétés chimiques diverses selon les milieux de culture. Les nanoparticules dissoutes dans l'eau de mer se dégradent et précipitent lorsqu'elles interagissent avec les ions de l'eau de mer. Selon les résultats observés, pour les deux types de particules, les métaux composant principalement les particules semblent plus toxiques que la nanoparticule. Cependant, les métalloïdes des QDs semblent eux aussi présenter une certaine toxicité.

La toxicité des nanoparticules peut varier selon les espèces et selon la composition de la particule (Griffitt, Luo et al. 2008). Les nanoparticules sont moins toxiques que la forme métallique soluble présente dans la particule (Griffitt, Luo et al. 2008). De plus, le tellure est un métalloïde peu connu mais très toxique. Les métalloïdes sont connus pour être des molécules appartenant aux catégories des métaux et non métaux (Ogra 2009)

D'autre part, quelles que soient les particules, une gradation en fonction des espèces testées peut être mise en place. Les animaux vertébrés étant plus sensibles que les invertébrés, les concentrations utilisées ne seront pas les mêmes. D'autre part, la sensibilité des espèces dépend des milieux de cultures d'exposition spécifiques à chacune d'entre elles. Ainsi, les deux premières parties de ce chapitre ont démontré l'importance de la chimie de la particule et de sa composition. De plus, la taille est aussi un paramètre physique tenant une place importante dans la toxicité des nanoparticules. Des études de Koeneman et al., 2009 utilisant des QDs non agréées ont montré une toxicité des particules qui semblerait liée à la taille de particules plutôt qu'au relargage de Cd^{2+} dans le milieu et qu'à l'enrobage (Koeneman, Zhang et al. 2009). En effet, la toxicité des particules est liée à leur nature, mais aussi à leur taille ce qui représente aussi un enjeu majeur d'étude.

3. Influence de la dimension des nanoparticules sur leur toxicité

La première partie va porter sur l'analyse de la viabilité, de la phagocytose, et la transformation lymphoblastique de 4 modèles d'animaux en fonction de gammes doses

réponses de points quantiques (nanoparticules de CdS/CdTe, Vivenano®), de nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc} (de tailles différentes). Les résultats utilisés dans cette section proviennent d'un article en phase de soumission : « **Size distribution of cadmium tellurium quantum dots (Cds/CdTe) and interspecies in vitro immunotoxicity** ». A.Bruneau, M.Fortier, F.Gagne, C.Gagnon, C.Turcotte, A.Tayabali, T.Davis , M.Auffret, M.Fournier.

3.1 Matériel et méthode

3.1.1 Caractérisation des nanoparticules

- Les nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}

Les nanoparticules de Ted Pella^{inc} sont basées sur de l'argent. Les particules sont enrobées de citrate de sodium dihydraté ce qui permet de donner sa forme aux nanoparticules. Les nanoparticules sont fournies dans une solution aqueuse et portent à leur surface des charges négatives. Les nanoparticules de Ted Pella^{inc} se déclinent sous 4 tailles : 20 nm, 40 nm, 60 nm et 80 nm. Les petites particules sont contenues dans une solution jaune, quand aux grosses elles sont présentes dans une solution gris clair. Les nanoparticules d'argent ont été dosées à l'aide d'un ICP-MS (gracieuseté de Patrice Turcotte, Environnement Canada, Montréal) ainsi selon les tailles les concentrations d'argent total dans les solutions de Ted Pella^{inc} étaient de :

Taille des particules	Nombre de particules (données de la compagnie Ted Pella^{inc}) (par ml)	Mesure de la concentration en argent (mg/L)
20 nm	7.0×10^{10}	6.8
40 nm	9.0×10^9	6.6
60 nm	2.6×10^9	5.9
80 nm	1.1×10^9	5.6

- Préparation des fractions de CdTe Qdots dans eau

Les points quantiques qui ont été utilisés pour cette étude viennent de la Société ViveNano® (Canada, On). Ils sont faits de cœur CdTe/CdS entourée par une couche polymérique pour empêcher l'accumulation dans la solution. Ils sont 8-10 nm et sont synthétisés dans l'eau. La concentration de la solution de stock (d'actions) était 20 mg/ml. Les nanoparticules étaient le magasin (dépôt) à 4°C et était stable au moins 6 mois.

QDs ont été préparés comme le protocole Gagné et al, 2008 (Gagné, Auclair et al. 2008a). Brièvement, une solution de QDs (1 L) a été réalisée selon la dilution 1:1000 (v : v) de la solution de stock. La solution a été analysée par ICP-ES. Deux types de filtrations ont été réalisées : une filtration classique et une ultrafiltration. Pour les deux types de filtrations les différents constituants (Cd et Te) de la solution ont été mesurés. Tout d'abord, la solution a été filtrée, une membrane de filtration (la taille de pore : 0.45 μm , FHLC04700 de Millipore) et 50mL a été utilisée pour la détermination du Cd total. Les solutions traitées (50-150 ml) ont été alors filtrées sur des membranes de trois tailles de pores différentes : 0.1 μm (VCTP04700, Millipore), 0.05 μm (VMWP04700, Millipore) et 0.025 μm (VSWP04700, Millipore). Les ultrafiltrations ont été exécutées avec un Amicon 400 (Millipore) et les membranes de cellulose régénérées de raccourcis divers : 100 KDa (YM100 76mm diamètre.), 30 KDa (YM30 76 mm diamètre), 10 KDa (YM10 76 mm diamètre) et 1 KDa (YM1 76mm diamètre). La pression au système d'ultrafiltration a été gardée à 60 psi pour les membranes de 1 KDa, à 32 psi pour les membranes de 30 et 10 KDa et 5 psi pour les membranes de 100 KDa. Les analyses de Cd et Te dans les solutions filtrées (50 ml) ont été effectuées par ICP-ES (des Optimums 5300 DV, Perkin Elmer®).

- Principe de la méthode d'ultrafiltration

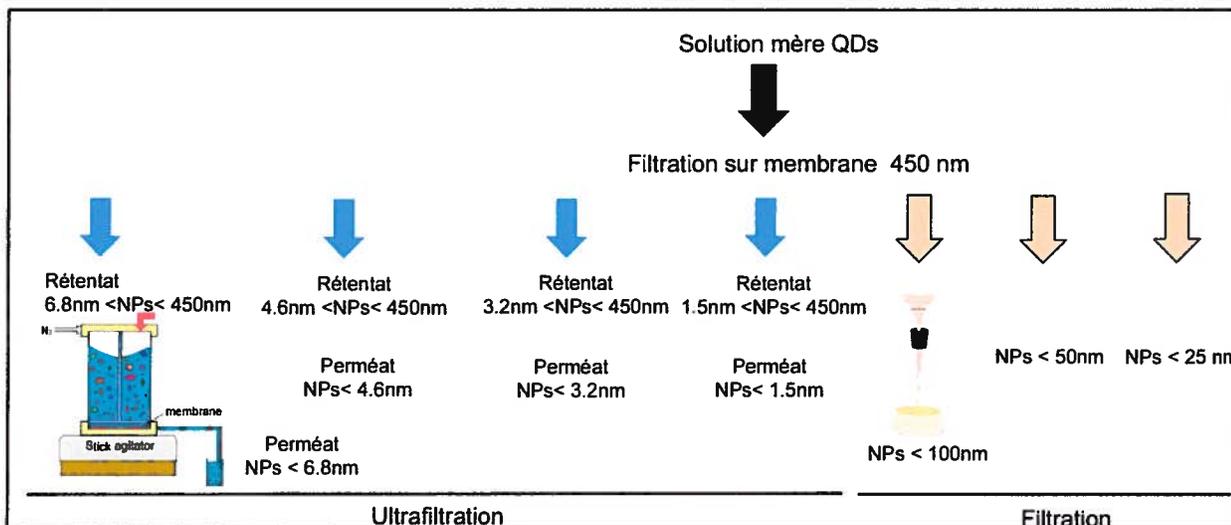


Figure 74 : Principe de la méthode d'ultrafiltration et de filtration réalisées avec l'appareil de P. Turcotte.

Schéma modifié de P. Turcotte.

L'ultrafiltration est une méthode de filtration sur membrane permettant, à l'aide d'une pression gazeuse, de filtrer des particules et de les séparer selon leur poids moléculaire (Figure 74). Les particules, de petits poids moléculaires, qui vont passer la membrane aussi appelée

perméat. Les particules ne passant pas la membrane, de hauts poids moléculaires, sont aussi nommées rétentat. Ce processus est souvent utilisé pour purifier ou concentrer des solutions protéiniques. En effet, contrairement à une filtration standard, l'ultrafiltration permet la séparation des particules mais aussi la rétention (concentration) des particules avant le filtre. Techniquement la rétentat contient donc aussi les particules du perméat qui ne passent pas la membrane (du à un colmatage de la membrane de filtration). Ainsi l'ultrafiltration permet de séparer les nanoparticules selon leurs poids moléculaires (Tableau 25).

Tableau 25 : Fractions de QDS nanoparticules et la taille associée. Le retentat est plus concentré que le perméat (facteur de concentration = 1.5).

Membranes	Eluat
Total	Toutes les particules
0.45 µm	Particules < 450 nm
0.1 µm	Particules < 100 nm
0.05 µm	Particules < 50 nm
0.025 µm	Particules < 25 nm
Per 100	Particules < 100 KDa
Ret 100	100 KDa < Particules < 450 nm
Per 30	Particules < 30 KDa
Ret 30	30 KDa < Particules < 450 nm
Per 10	Particules < 10 KDa
Ret 10	Particules < 10 KDa < Particules < 450 nm
Per 1	Particules < 1 KDa
Ret 1	1 KDa < Particules < 450 nm

La solution a été analysée par ICP-ES réalisé par Environnement Canada (comme expliqué précédemment) a permis de quantifier les concentrations en cadmium contenues dans les particules et les différentes fractions. Une gamme dose effet a été réalisée à partir de chaque fraction (Tableau 25 et Tableau 26).

Tableau 26 : Fractions des QDs et différentes concentrations de cadmium. Les dilutions de chaque fraction ont été exécutées dans l'eau déminéralisée stérile. Les moyennes pour chaque fraction ont été calculées afin de faciliter la représentation graphique des résultats.

Poids KDa / taille	Concentration en cadmium			
	µg/ml			
	Pure	1/2	1/4	Témoin
Total	1,800	0,900	0,450	0
0,45 µm	1,786	0,893	0,447	0
0,1 µm	1,729	0,865	0,432	0
0,05 µm	1,764	0,882	0,441	0
0,025 µm	1,504	0,752	0,376	0
Moyenne	1,717	0,858	0,429	0
per 100 Kda	0,610	0,305	0,153	0
per 30 Kda	0,102	0,051	0,026	0
per 10 Kda	0,014	0,007	0,003	0
per 1 Kda	0,003	0,001	0,001	0
Moyenne	0,182	0,091	0,046	0
ret 100 Kda	2,380	1,190	0,595	0
ret 30 Kda	2,754	1,377	0,688	0
ret 10 Kda	2,811	1,405	0,703	0
ret 1 Kda	2,853	1,426	0,713	0
Moyenne	2,699	1,350	0,675	0

Afin de faciliter la représentation graphique des données, des moyennes ont été calculées comme il est décrit dans le Tableau 26. Ainsi les concentrations d'exposition pour les différentes expériences étaient celles notées dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Comportement de fractionnement de taille de CdTe pour les différentes dilutions des fractions de Qdots. Les dilutions de chaque fraction ont été exécutées dans l'eau déminéralisée stérile.

Dilution	Concentration dans l'échantillon (mg/ml) ^a		
	Filtration	Perméat	Rétentat
Pas de dilution	1.717	0.182	2.699
1/2	0.858	0.091	1.350
1/4	0.429	0.046	0.675
Témoin	0	0	0

a : les niveaux de cadmium ont été détectés par ICP-spectromètre d'émission

3.1.2 Exposition des cellules aux NPs

Les mêmes protocoles d'exposition de cellules et d'analyses de paramètres immunitaires ont été utilisés que ceux présentés dans les sections 1, 2, 3 et 4 du matériel et méthode du chapitre 1. Trois types d'expositions vont être réalisés avec les QDs (différentes fractions) et les AgNPs TP :

-Exposition des cellules immunitaires des 4 modèles d'animaux aux QDs et fractions (voir section 3.2 Résultats sur l'influence de la dimension des QDs). Les résultats présentés sont extraits de l'article « **Size distribution of cadmium tellurium quantum dots (CdS/CdTe) and interspecies in vitro immunotoxicity** » en phase de soumission.

-Exposition des cellules immunitaires des 4 modèles d'animaux aux QDs et fractions lors d'un suivi temporel (voir section 3.3 Résultats sur l'influence de la dimension des particules dans le temps). Une semaine d'écart entre les deux analyses de paramètres immunitaires s'est écoulée. Autrement dit, les nanoparticules vont être filtrées, la première série d'analyse va avoir lieu le jour suivant la filtration, puis la deuxième série d'expérience va avoir lieu avec les mêmes nanoparticules une semaine après.

-Exposition des cellules immunitaires des 4 modèles animaux aux AgNPs TP (voir section 3.4 Résultats sur l'influence de la taille des nanoparticules de Ted pella ^{inc}).

3.1.3 Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). La différence de viabilité, l'activité et l'efficacité de phagocytose ont été examinées

utilisant une analyse factorielle des variations à une voie (ANOVA), lorsque les résultats étaient significatifs, un test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Lorsque les données n'étaient pas normales un test non paramétrique de Kruskal et Wallis avec mise en rang a été réalisé. Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

3.2 Résultats sur l'influence de la dimension des QDs

Les différents modèles d'animaux ont été exposés aux nanoparticules de cadmium de la compagnie ViveNano® selon la gamme de concentration présentée dans le Tableau 27. Puis les différents paramètres immunitaires ont été mesurés selon les modèles :

- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages et des lymphocytes, la phagocytose (Figure 75, Figure 76 et Figure 77).

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose.

- Pour la moule d'eau douce : la viabilité des hémocytes et la phagocytose.

3.2.1 Distribution de taille de CdTe

Suite à l'ultrafiltration, deux types de fractions sont retrouvées : les fractions du perméat (particules qui passent à travers le filtre) et les fractions du rétentat (particules qui sont retenus par le filtre). Les données des Tableau 28 et Tableau 27 indiquent les concentrations de cadmium utilisées lors des expositions. Avant d'être exposés aux cellules les fractions ont été analysées selon une série de membranes d'ultrafiltration dans le but de caractériser la composition en Cd et en Te de chaque fraction (Tableau 28).

Tableau 28 : Concentrations en Cd and Te mesurées dans chaque fraction. En bleu les fractions filtrées, En rouge avec les fractions du perméat, en vert les fractions du rétentat. Le ratio Cd/Te indique que les fractions du rétentat sont plus concentrées que les fractions filtrées et du perméat.

	<i>Fractions</i>	<i>Concentration en ppm (mg/L)</i>		<i>Ratio Cd/Te</i>
		<i>Cd</i>	<i>Te</i>	
<i>Filtrées</i>	Total	37,81	8,62	4,39
	450 nm	37,51	8,26	4,54
	100 nm	36,31	8,10	4,48
	50 nm	37,05	7,90	4,69
	25 nm	31,59	6,28	5,03
	Moyenne	36,06	7,83	4,63
<i>Perméat</i>	100 Kda (6.8 nm)	12,82	2,22	5,78
	30 Kda (4.6 nm)	2,15	1,24	1,74
	10 Kda (3.2 nm)	0,291	1,23	0,24
	1 Kda (1.5 nm)	0,064	0,67	0,10
	Moyenne	3,83	1,34	1,96
<i>Rétentat</i>	100 Kda (6.8 nm)	49,98	11,29	4,43
	30 Kda (4.6 nm)	57,83	12,39	4,67
	10 Kda (3.2 nm)	59,03	12,13	4,87
	1 Kda (1.5 nm)	59,91	12,88	4,65
	Moyenne	56,69	12,17	4,65

Les QDs (1–10 nm) ont été filtrés à travers des membranes de différentes tailles de pores : 0.45 µm, 100, 50, 25 nm, 100 KDa (6.8 nm), 30 KDa (4.6 nm), 10 KDa (3.2 nm) and 1 KDa (1.5 nm). Les résultats de l'ICP-ES indiquent que les fractions filtrées et les fractions du rétentat contiennent plus de cadmium que les fractions du perméat (Tableau 28). Des études précédentes ont démontrées que la concentration de cadmium était hautement corrélée à la concentration de Te suggérant une association forte entre le Cd et le Te (Louis, Gagné et al. 2010). Cependant la forme des nanomatériaux change avec la taille des particules. Les fractions filtrées indiquent un ratio moyenne Cd/Te de 4,63 ce qui correspond aux particules

qui ne sont pas ultrafiltrées (particules Totale, 450 nm, 100 nm, 30 nm and 10 nm). Pour les fractions du perméat ce ratio est de 1,96 ce qui correspond aux particules de tailles inférieures à 6,8 nm. Cette fraction est composée de QDs Cd/Te monomériques et des sous produits de dégradation des QDs. Les particules de 30 KDa ont un ratio Cd/Te de 1,74 ce qui correspond au ratio d'un QD. Finalement pour le troisième groupe le ratio Cd/Te moyen est de 4,68 ce qui correspond aux particules plus large que le perméat. Le ratio Cd/Te indique que les fractions filtrées et les particules ultrafiltrées du rétentat contiennent plus de cadmium que les particules du perméat. Ceci explique que l'enrobage de CdS est maintenu car le ratio d'un QD monomérique est de 0,3). D'autre part, le ratio Cd/Te est d'environ 5 cadmium pour 1 tellurium pour les fractions filtrées et du rétentat. Pour le perméat ce ratio est de 2 indiquant que l'enrobage de CdS est maintenu (Tableau 28). Afin de simplifier la représentation graphique, les moyennes de concentration ont été calculé (Tableau 27).

3.2.2 Cellules de truites arc-en-ciel

Les cellules immunitaires de truite arc-en-ciel ont été exposées à la concentration croissante de points quantiques CdS/CdTe. La viabilité des macrophages a été déterminée par cytométrie en flux. Une diminution de la viabilité pour les fractions filtrées pour les fractions totale, < 450 nm et < 50 nm, est observée avec l'augmentation de la concentration en QDs (Figure 75) Pour les fractions du perméat et du rétentat aucun effet sur la viabilité des macrophages de truite après 18 hrs d'exposition n'est observé (Figure 75).

Après 21 h d'exposition une stimulation de l'activité des macrophages (ingestion d'une bille et plus) par rapport au contrôle est observée pour les fractions filtrées de 450 nm (0.86 µg/ml) et pour les fractions de 50 nm (0.43 µg/ml) (

Figure 76). Pour des fractions ultrafiltrées (perméat et rétentat), aucune variation significative n'est observée.

En outre, la capacité phagocytaire est légèrement stimulée pour les fractions pénétrant à travers le filtre (perméat). L'activité phagocytaire pour rétentat était significativement augmentée pour toutes les fractions comparée au contrôle (

Figure 76). Pour l'efficacité de phagocytose (trois billes ou plus) de macrophages de truites, après les 21 heures d'exposition, présentent les mêmes profils de réponses que ceux de l'activité de phagocytose (Figure 77).

Une stimulation non significative de l'efficacité de phagocytose est observée avec les fractions filtrées (pour 450 nm, l'efficacité de phagocytose comparée au témoin, est augmentée de 154.09 % et pour 50 nm = 181.8 %, pour 100 nm la stimulation était seulement de 83.4 %). Il est remarquable que l'efficacité de phagocytose pour les cellules exposées au perméat augmente en moyenne de 34.7 %. Aussi cette stimulation semble être plus importante pour 450 nm, 100 nm, 50 nm et 25 nm comparée à la fraction totale. Au contraire, le rétentat conservé sur 100 KDa (stimulation de 100.13 % par rapport au témoin), sur 30 KDa (stimulation de 101.59 % par rapport au témoin) et sur 10 KDa (stimulation de 119.06 % par rapport au témoin) induisent plus fortement la phagocytose comparé aux nanoparticules d'1 KDa.

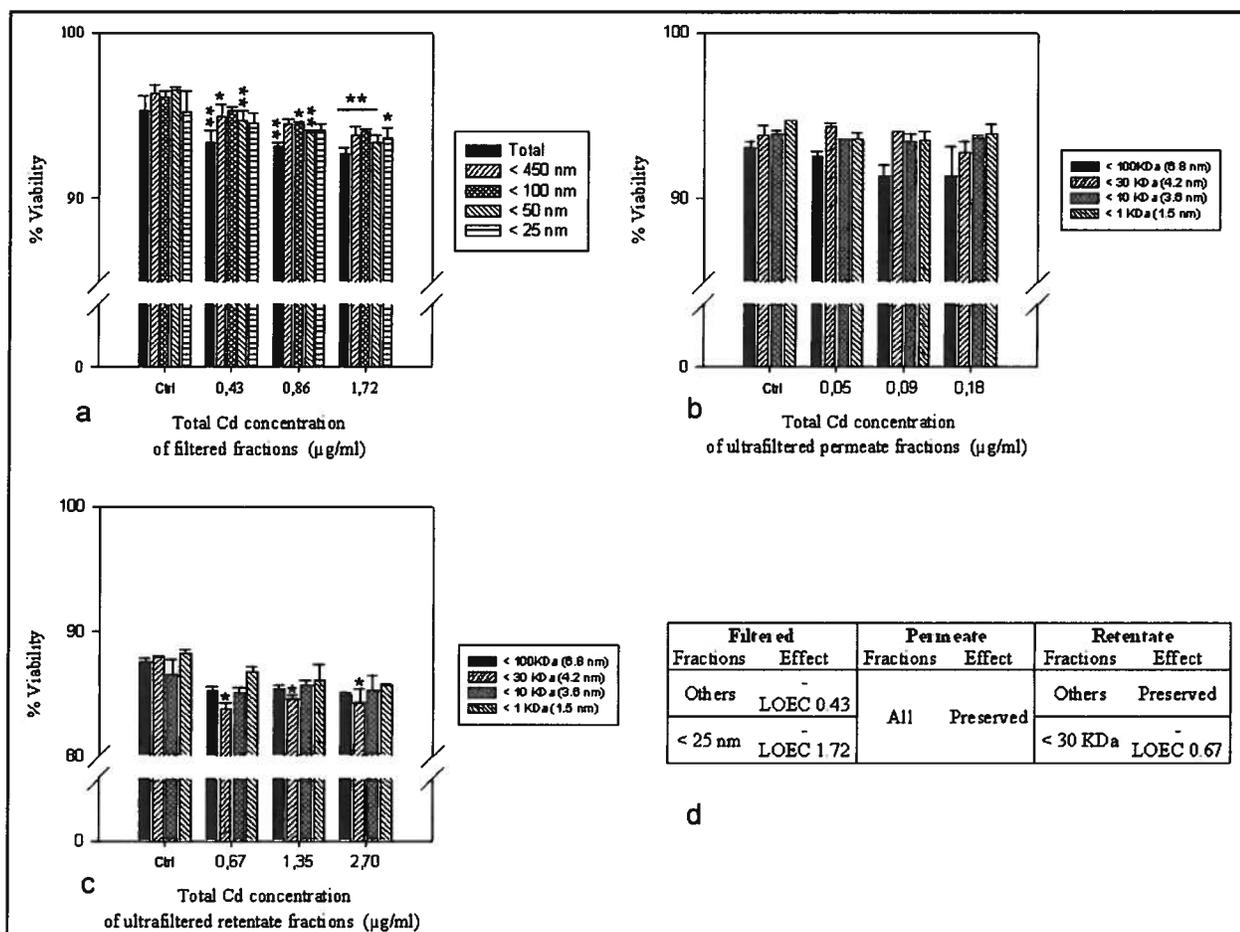


Figure 75 : Viabilité des macrophages d'O. mykiss. N= 4. % viabilité est observée après 21 h d'incubation avec différentes concentrations de Cd/S, Cd/Te QDs. L'axe des x correspond à la quantité totale de cadmium déterminé par ICP-MS. a) fractions filtrées : une diminution de la viabilité est observée avec l'augmentation de la concentration en Cd b) fractions du perméat: Aucune variation de la viabilité observée c) fractions du rétentat: une diminution de la viabilité est observé < 30 KDa à 0.67 $\mu\text{g/ml}$. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.0001$. d) résumé de la table de LOEC.**

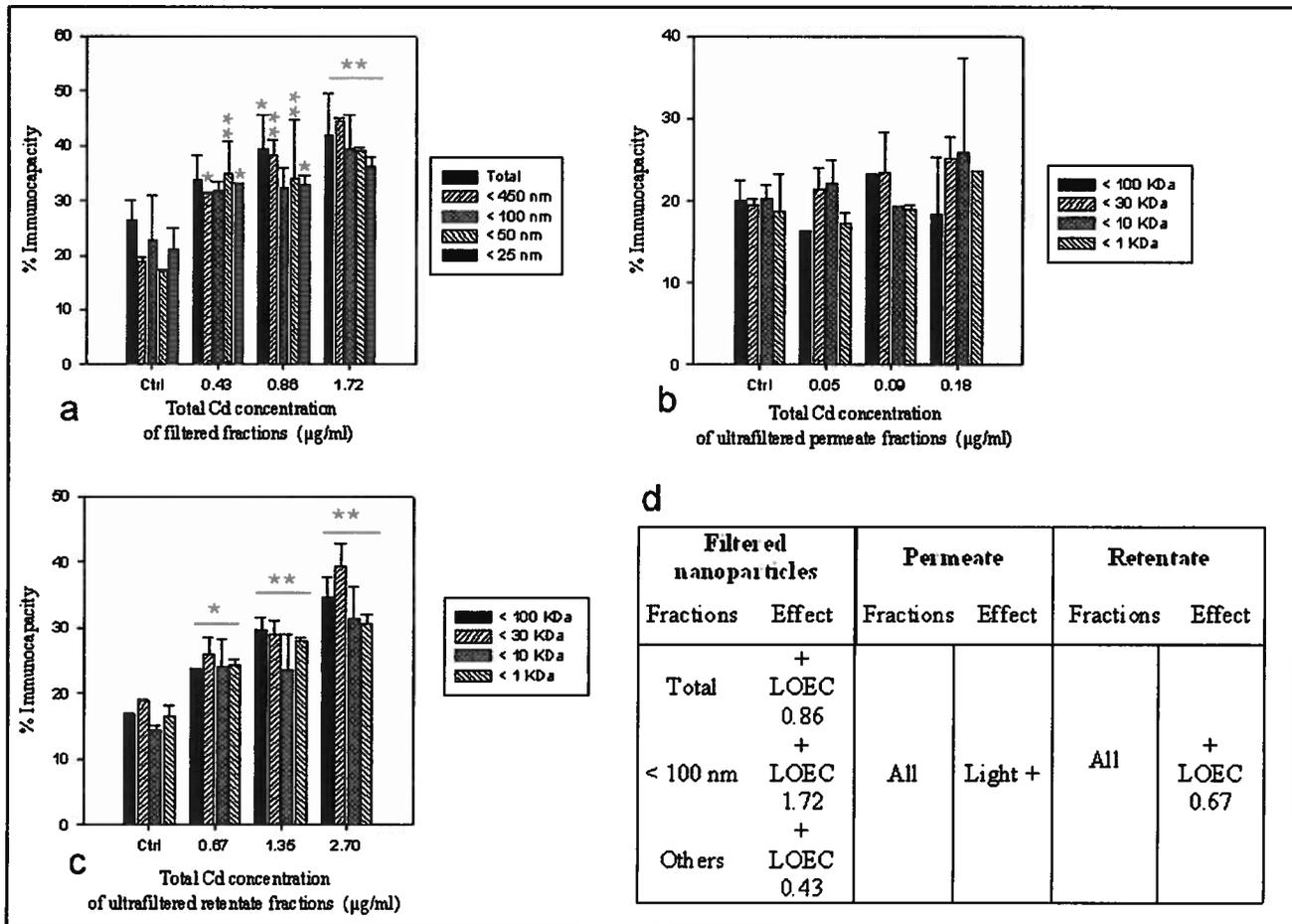


Figure 76 : Immunocapacité, phagocytose d'une bille et plus pour *O. mykiss* a) Fractions filtrées N=4. Une stimulation de la phagocytose est observée avec l'augmentation de la concentration en Cd. Pour la fraction totale : + 59.9 %, pour 450 nm + 135.3 % et pour 100 nm + 73.8 %. b) Fractions du perméat c) Fractions du rétentat Une stimulation de la phagocytose est observée pour toutes les fractions à 0.67 µg/ml. Pour < 30 kDa + 109.42 %, pour < 10 kDa + 118.52 %. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types. * p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001. d) résumé de la table de LOEC.

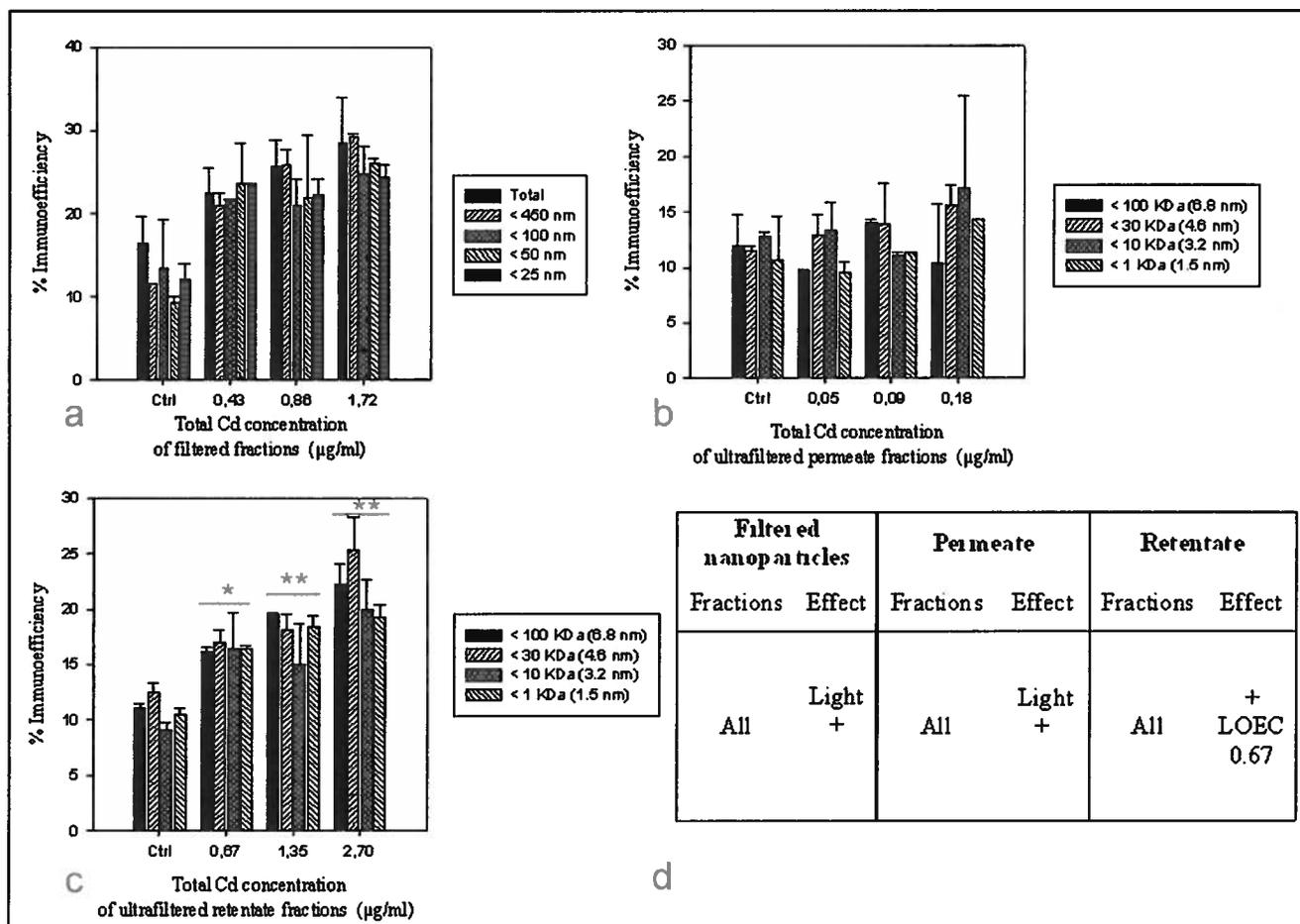


Figure 77 : Immunoefficacité, phagocytose de 3 billes et plus pour d'O. mykiss a) Fractions filtrées N=4. Pour la fraction totale une augmentation de 59.9 % est observée comparé au contrôle, pour 450 nm + 135.3 % et pour 100 nm = 73.8 %. b) Fractions du perméat c) Fractions du rétentat: stimulation significative est observée à 0.67 µg/ml pour toutes les tailles de particules. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types. * p < 0.05, ** p < 0.001, * p < 0.0001. d) résumé de la table de LOEC.**

3.2.3 Cellules de moules bleues

Les hémocytes de moules bleues ont été mis en présence des différentes fractions de QDs. Les différents paramètres immunitaires ont été analysés : la viabilité avec les fractions filtrées et les fractions ultrafiltrées et l'activité de phagocytose.

La viabilité des hémocytes de moules bleues varie selon les tailles diverses de particules. Une réponse biphasique a été observée pour les particules de tailles 25 nm stimulés jusqu'à 0.42 µg/ml, suivi par une diminution de la viabilité est observée. Pour la fraction totale la viabilité est stimulée par rapport au contrôle (LOEC = 0.86 µg/ml). Aucune variation de la viabilité n'est observé pour les fractions du perméat exceptée pour la fraction 100 KDa (6.8 nm) and 30 KDa (4.6 nm), une diminution significative est observée (p < 0.05). Pour < 100 KDa une

diminution significative est observée à 0.18 µg/ml (LOEC = 0.18 µg/ml) ($p < 0.05$). Pour < 30 KDa une augmentation significative est observée à 0.18 µg/ml (LOEC = 0.18 µg/ml) ($p < 0.05$). Pour le rétentat une diminution significative de la viabilité est observée pour < 30KDa (4.6 nm) à 1.35 µg/ml (LOEC = 1.35 µg/ml).

Les données pour les fractions filtrées < 100 nm ont révélé que l'activité de phagocytose diminuait plus fortement que les autres fractions filtrées (LOEC = 1.72 µg/ml). Aussi pour des particules ultrafiltrées, les résultats présentent de faibles changements de phagocytose comparé aux fractions filtrées (diminution de phagocytose comparée au témoin pour < 10 KDa = 27.6 % et pour 1 KDa = 28.2 %) (LOEC = 1.35 µg/ml). Une augmentation significative est observée pour les particules < 30 KDa à 0.67 µg/ml.

Des résultats semblables entre l'immunoactivité et l'immunoefficacité ont été observés. La diminution significative de la phagocytose est observée pour la fraction totale (- 43.79 % comparés au témoin) (LOEC = 0.86 µg/ml) et < 100 nm (- 63.68% comparé au contrôle) (LOEC = 0.43 µg/ml). Une diminution de l'efficacité de phagocytose est supérieure pour les fractions filtrées que pour les fractions du rétentat. Pour les fractions perméat aucune variations n'est observée, excepté pour les fractions < 10 KDa une augmentation significative de la phagocytose est observée à 0.09 µg/ml (LOEC = 0.09 µg/ml). Pour le rétentat une stimulation est observée à 0.67 µg/ml pour < 30 KDa (4.6 nm) et une diminution significative de l'immunoefficacité est observée pour < 1 KDa à 2.7 µg/ml (LOEC = 2.7 µg/ml).

3.2.4 Cellules d'*Elliptio complanata*

Les hémocytes d'*Elliptio* ont été utilisés pour examiner les effets de QDs et ses fractions sur la viabilité pour les fractions filtrées et ultrafiltrées, et sur l'activité phagocytose et l'efficacité phagocytose. Une diminution significative de la viabilité est observée pour les fractions < 100 nm (LOEC = 1.72 µg/ml). Pour le perméat une stimulation est observée pour les fractions de 100 KDa (6.8 nm) à 0.09 µg/ml. Pour le rétentat une diminution est observée pour les fractions < 100 KDa (6.8 nm) à 2.69 µg/ml.

Une stimulation significative de la phagocytose est observée pour les fractions filtrées < 25 nm à 0.042 µg/mL. Une stimulation constante (+ 63.1%) de la phagocytose est observée pour la fraction < 100 KDa (6.8 nm) du perméat à 0.09 µg/ml (LOEC = 0.09 µg/ml). Cependant pour les fractions ultrafiltrées du perméat < 30 KDa (4.6 nm), une diminution significative est observée à 0.05 µg/ml (LOEC = 0.05 µg/ml). Pour les fractions du rétentat, une diminution

significative est observée < 100 KDa fraction (6.8 nm) à 1.35 µg/ml (LOEC = 1.35 µg/ml), et pour < 10 KDa (3.2 nm) à 2.7 µg/ml (LOEC= 2.7 µg/ml).

L'immunoefficacité présente des profils de réponse différents. Une diminution de l'efficacité de phagocytose est observée pour les fractions < 450 nm à 0.86 µg/ml (LOEC = 0.86 µg/ml). Pour le perméat, l'immunoefficacité est préservée. Pour le rétentat, une stimulation significative est observée pour les fractions < 30 KDa et < 10 KDa à 1.3 µg/ml (LOEC= 1.3 µg/ml).

3.3 Résultats sur l'influence de la dimension des particules dans le temps

Les différents modèles d'animaux ont été exposés aux nanoparticules de cadmium de la compagnie ViveNano® selon la gamme de concentration présentée dans le Tableau 27. Les différents types cellulaires des modèles d'animaux ont été exposés à T1 soit 1 jour après la filtration et l'ultrafiltration des particules, puis les paramètres immunitaires ont été mesurés selon les modèles. Les cellules ont aussi été exposées à T2, autrement dit une semaine après la filtration des nanoparticules, de nouveaux tests *in vitro* ont été réalisés sur les cellules immunitaires des différents modèles. Les paramètres immunitaires suivants ont été analysés :

- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages et des lymphocytes, la phagocytose (Figure 78, Figure 79, et Figure 80).

- Pour la moule d'eau douce : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (Figure 81, Figure 82).

- Pour l'humain : la viabilité des macrophages et des lymphocytes, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (Figure 83, Figure 84, Figure 85).

3.3.1 Cellules de truite arc-en-ciel

- Viabilité des macrophages de truite arc-en-ciel

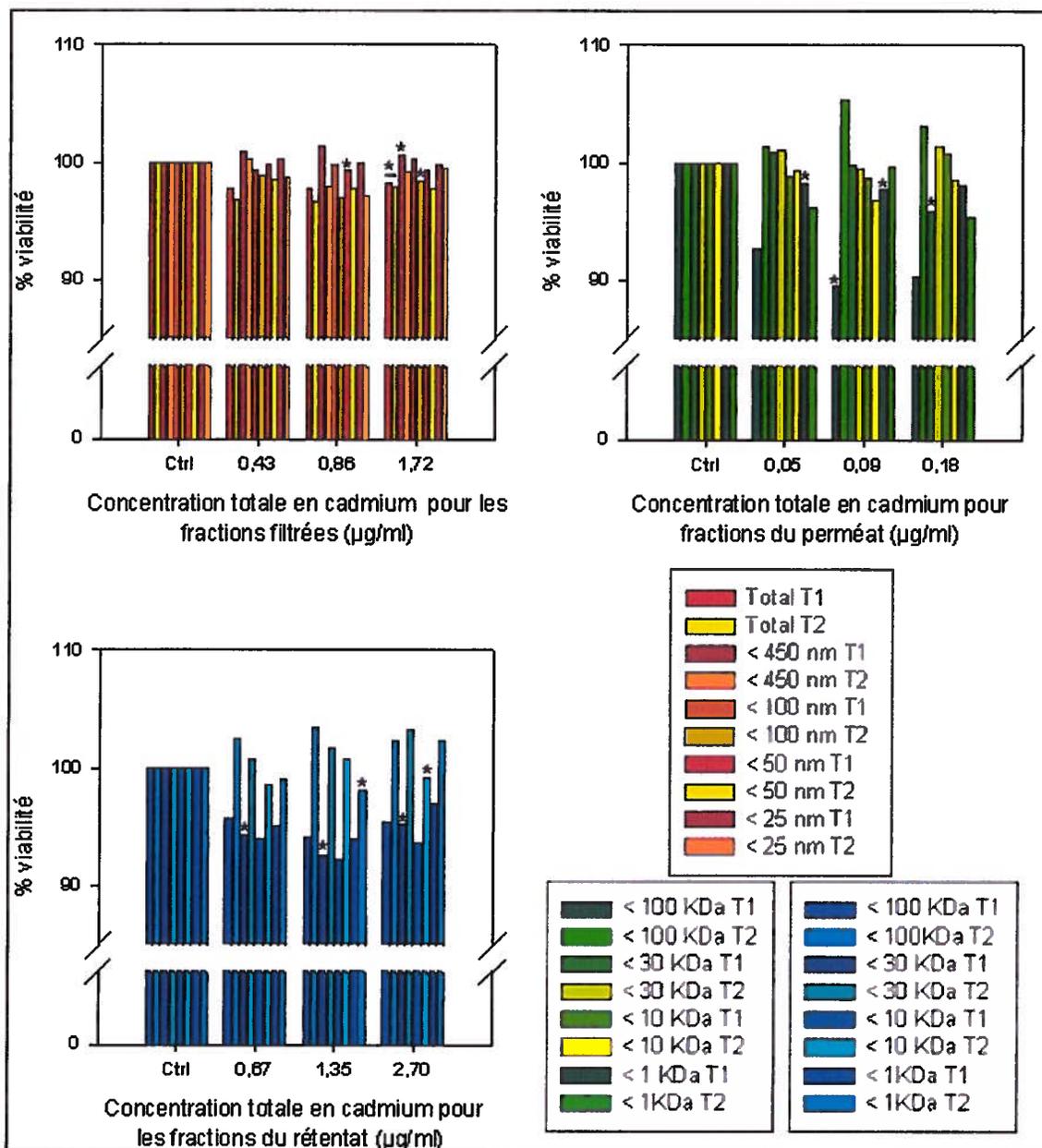


Figure 78 : Suivi temporel de la viabilité des macrophages de truites mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n = 2.

La viabilité des macrophages de truites exposés aux différentes fractions filtrées, à T1 et T2 semble conservée (Figure 78). Pour le perméat la viabilité à T1 des particules < 100 KDa diminue avec l'augmentation de la concentration de cadmium ce qui n'est pas retrouvé à T2. La viabilité des macrophages à T1 exposés au rétentat diminue dès 0,67 µg/ml de cadmium pour toutes les fractions, cette diminution est significative pour les particules < 30 KDa ce qui

n'est pas retrouvé à T2 (Figure 78). A T2, pour les fractions du rétentat, la viabilité est conservée.

- Viabilité des lymphocytes de truites arc-en-ciel

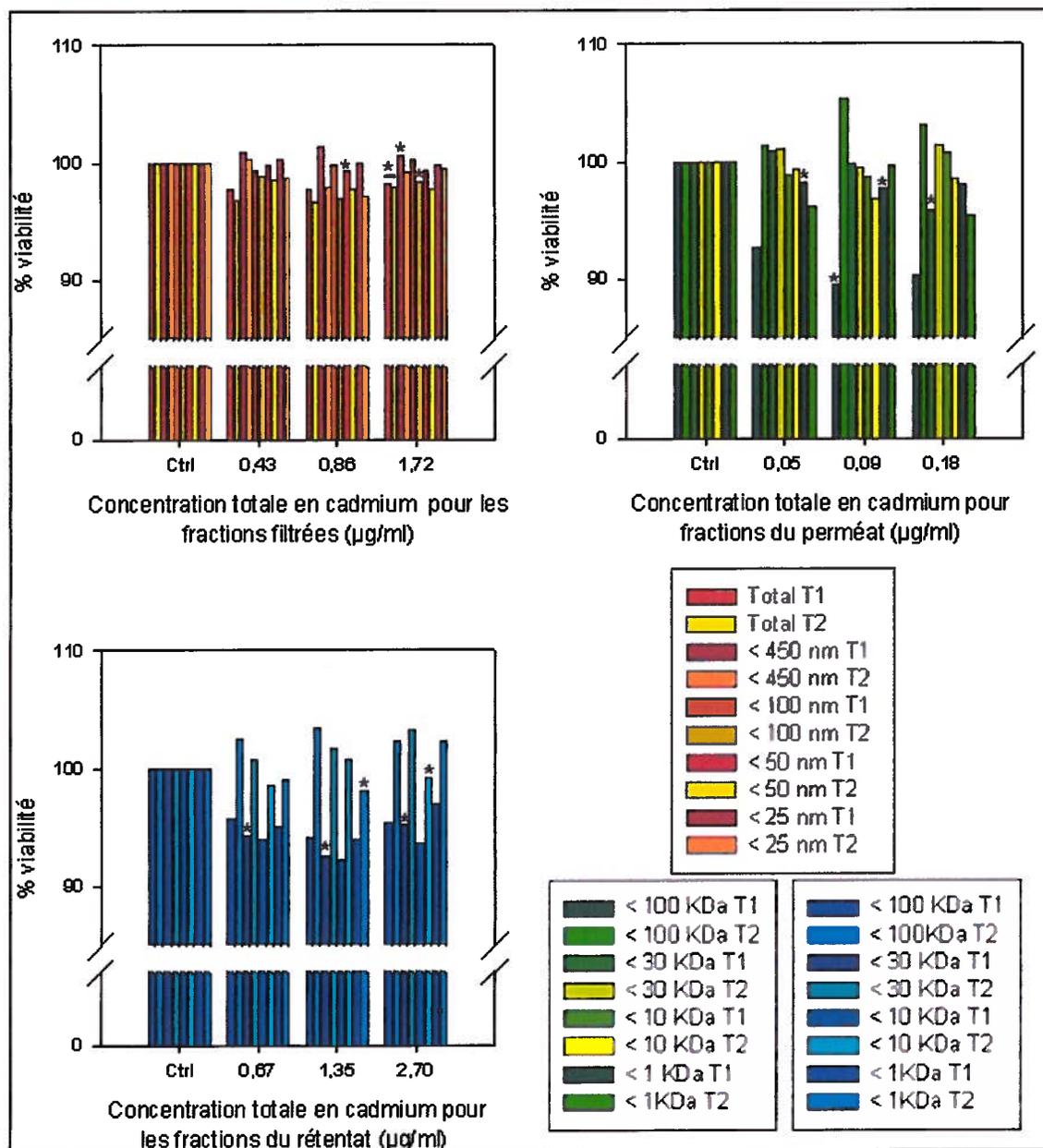


Figure 79 : Suivi temporel de la viabilité des lymphocytes de truites arc-en-ciel mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 4.

Une diminution non significative de la viabilité des lymphocytes, à T1, est observée pour la fraction filtrée totale. Pour le perméat la viabilité est diminuée pour la fraction < 100 kDa à T1 ceci n'est pas observé à T2 (Figure 79). Pour le rétentat la viabilité des lymphocytes de

truites est diminuée dès 0,67 µg/ml pour toutes les fractions, Plus la fraction est petite plus cette diminution tend à s'atténuer (Figure 79). A T2 une diminution significative de la viabilité est observée pour la fraction < 30 KDa à 2,7 µg/ml.

- Immunoactivité des macrophages de truites arc-en-ciel

La stimulation de la phagocytose pour les macrophages, de truites arc-en-ciel, exposées aux nanoparticules filtrées et au rétentat est observée à T1 et à T2. La phagocytose à T1 est plus stimulée qu'à T2 surtout pour < 450 nm et < 50 nm pour les particules filtrées. La stimulation augmente significativement avec la concentration en cadmium. L'immunocapacité des macrophages de truites exposés au perméat semble légèrement stimulée à T1. Cette stimulation est observée aussi à T2, elle est beaucoup plus forte avec l'augmentation en concentration de cadmium. Cette stimulation est significative pour les fractions < 30 KDa, 10 KDa et 1 KDa.

- Immunoefficacité des macrophages de truites arc-en-ciel

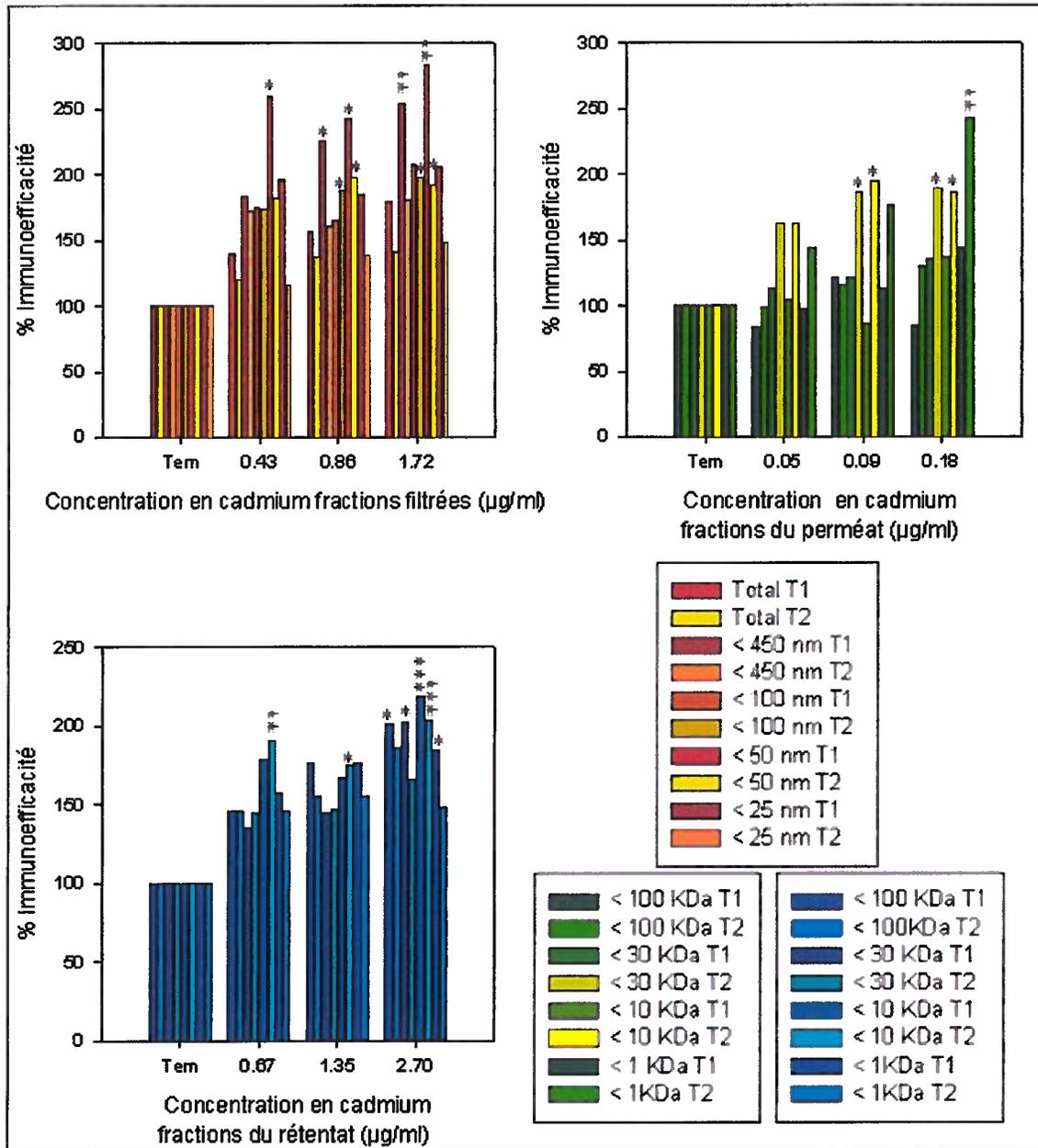


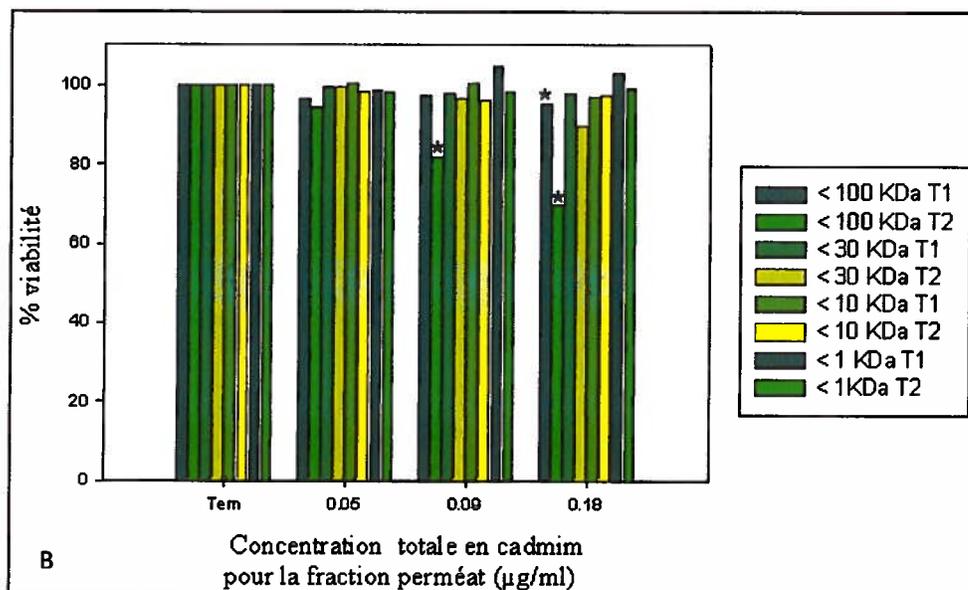
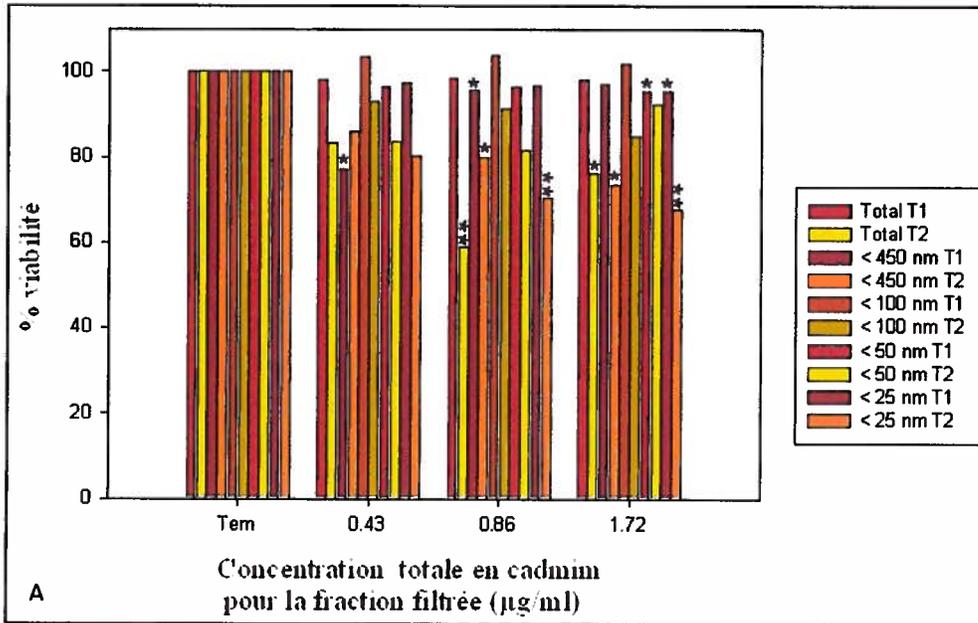
Figure 80 : Suivi temporel de l'immunoefficacité des macrophages de truites arc-en-ciel mises en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 4.

Une stimulation de l'immunoefficacité pour les fractions : filtrées et du rétentat est observée pour les macrophages de truites à T1 (Figure 80). Plus les concentrations en cadmium augmentent plus l'immunoefficacité est stimulée. La stimulation de phagocytoses est plus forte à T1 pour les fractions filtrées et du rétentat. A T2, la phagocytose est diminuée pour la fraction filtrée totale, pour les autres fractions la phagocytose est conservée. A T2, pour le

perméat une stimulation significative de la phagocytose est observée pour les fractions < 30 KDa, cette stimulation est très significative pour la fraction < 10 KDa. Pour le rétentat, la phagocytose est stimulée pour 2.70 µg/ml à T1 et T2. De plus l'immunoefficacité est significativement augmentée dès 0,67 pour la fraction < 10 KDa (Figure 80).

3.3.2 Cellules de moules d'eau douce, *Elliptio complanata*

- *Viabilité des hémocytes d'elliptio*



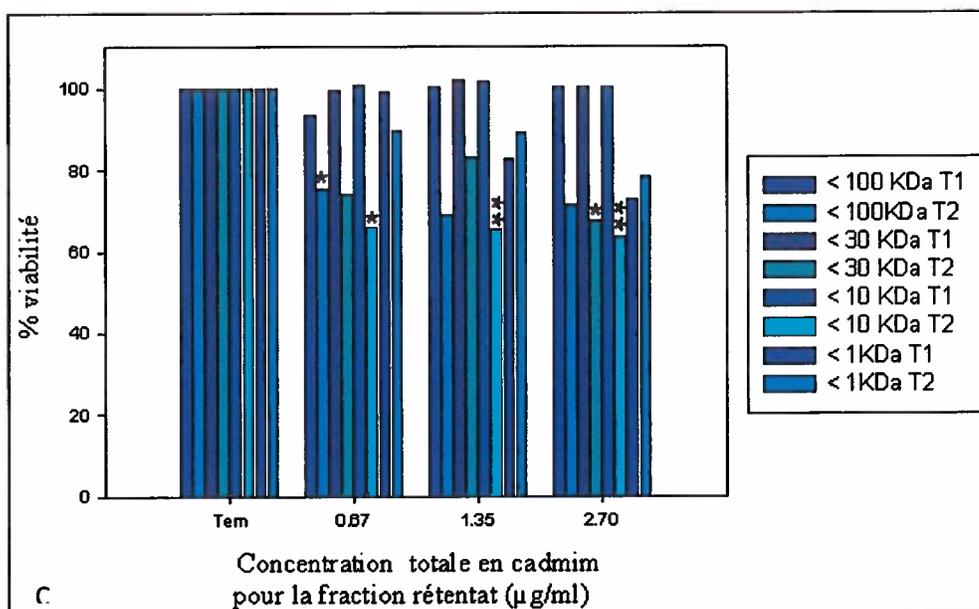


Figure 81 : Suivi temporel de la viabilité des hémocytes de moule d'eau douce mises en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 4.

A T1, la viabilité des hémocytes d'elliptio est stable pour la fraction filtrée, du perméat et du retentat. Ces résultats sont différents à T2. A T2, une diminution significative de la viabilité principalement pour la fraction totale filtrée, pour les particules < 450 nm et < 25 nm est observable (Figure 81). Cette diminution est plus croissante avec l'augmentation en Cd. Une diminution significative de la viabilité pour les fractions < 100 KDa du perméat est aussi observé dès 0,09 µg/ml. Pour le rétentat, à T2, la viabilité diminue pour toutes les fractions. Cette diminution est significative pour les fractions < 100 KDa et celles < 10 KDa dès 0,67 µg/ml (Figure 81).

- Immunoactivité des hémocytes d'elliptio

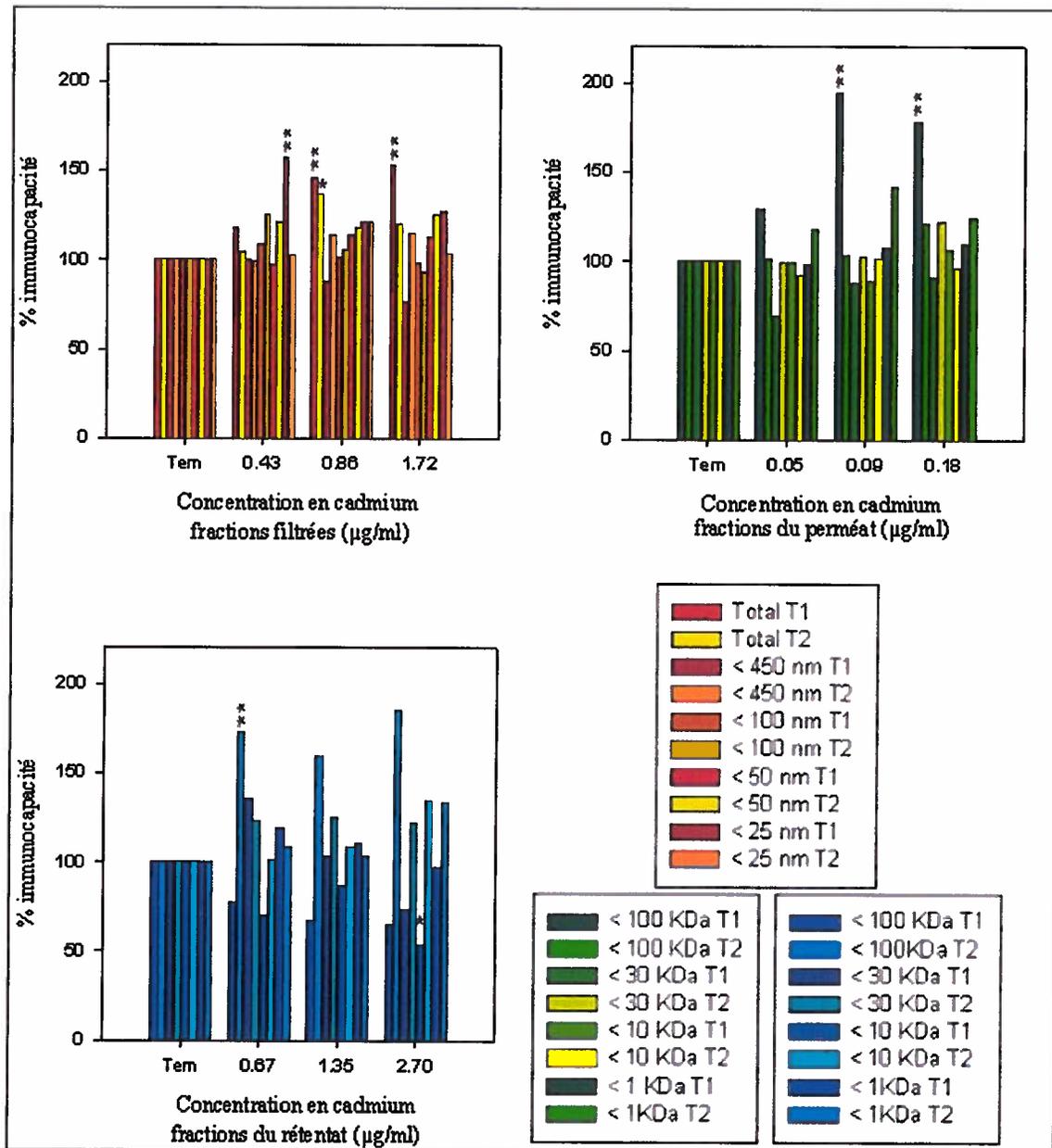


Figure 82 : Suivi temporel de l'immunoactivité des hémocytes de moules d'eau douce mises en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 2.

L'immunoactivité des hémocytes exposés aux nanoparticules filtrées à T1 est significativement stimulée pour la fraction totale. A T2, l'immunoactivité des hémocytes est stable pour les différentes fractions filtrées, une stimulation significative est observée pour la fraction totale à 0,86 µg/ml. Pour le perméat, à T1 une stimulation significative de l'immunoactivité est observée pour la fraction < 100 KDa dès 0,09 µg/ml. A T2, l'immunocapacité est relativement stable pour toutes les fractions. Pour le rétentat, une

diminution de la phagocytose est remarquée pour toutes les tailles à T1. Contrairement à T2 une stimulation de l'immunoefficacité est observée avec l'augmentation de la dose en Cd pour les particules < 100 KDa (Figure 82).

- Immunoefficacité des hémocytes d'elliptio

Pour les fractions filtrées, à T1 l'immunoefficacité est stimulée pour la fraction totale, elle est diminuée pour la fraction < 450 nm. Elle est conservée pour les autres fractions. Les résultats à T2 sont différents, l'immunoefficacité présente une réponse biphasique pour la fraction totale (stimulation jusqu'à 0,86 µg/ml puis diminution) et pour celle < 450 nm une légère stimulation est observée, pour les fractions < 100 nm et 50 nm une diminution est observée. Pour le perméat à T1 une stimulation de la phagocytose est observée pour les fractions < 100 KDa. Cela n'est pas retrouvé à T2, une stimulation des poids < 1KDa est observée dès 0,05 µg/ml, cette stimulation a tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration de cadmium. Finalement pour le rétentat, à T1 une diminution de l'immunoefficacité est observée pour toutes les fractions, elle est plus important pour les fractions < 30 KDa. A T2 la phagocytose est biphasique : elle est stimulée dès la plus faible concentration (0,67 µg/ml) pour les nanoparticules < 100 KDa puis elle est diminuée. Pour les autres fractions l'immunoefficacité est stable.

3.3.3 Cellules d'humains

- Viabilité des macrophages d'humain

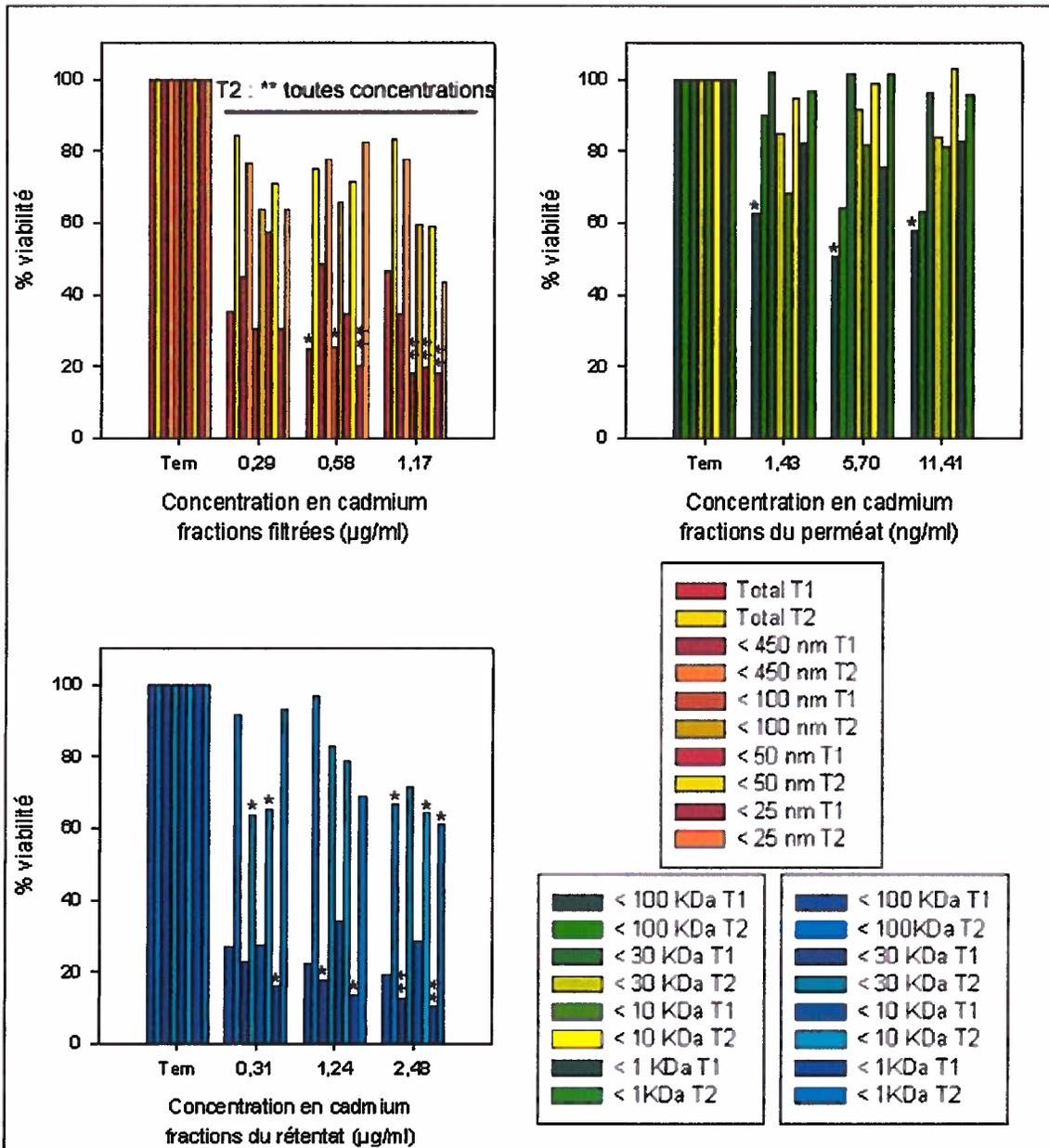


Figure 83 : Suivi temporel de la viabilité des monocytes d'humain mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 2.

La viabilité des macrophages du modèle humain diminue pour la fraction filtrée à T1 avec l'augmentation en Cd (Figure 83). Cette diminution est significative dès 0,58 µg/ml. A T2 la viabilité est moins diminuée qu'à T1. Pour le perméat à T1, la viabilité diminue dès la première concentration de cadmium pour la fraction < 100 KDa. Pour les autres fractions, la viabilité est légèrement diminuée. A T2, la viabilité est conservée pour la plupart des poids.

Enfin pour le rétentat, la viabilité à T1 est très fortement diminuée pour toutes les tailles de particules. A T2 une diminution est aussi observée. Elle est moins forte que celle à T1. Cette diminution est observable dès 0,31 µg/ml (Figure 83).

- Immunocapacité des macrophages d'humain

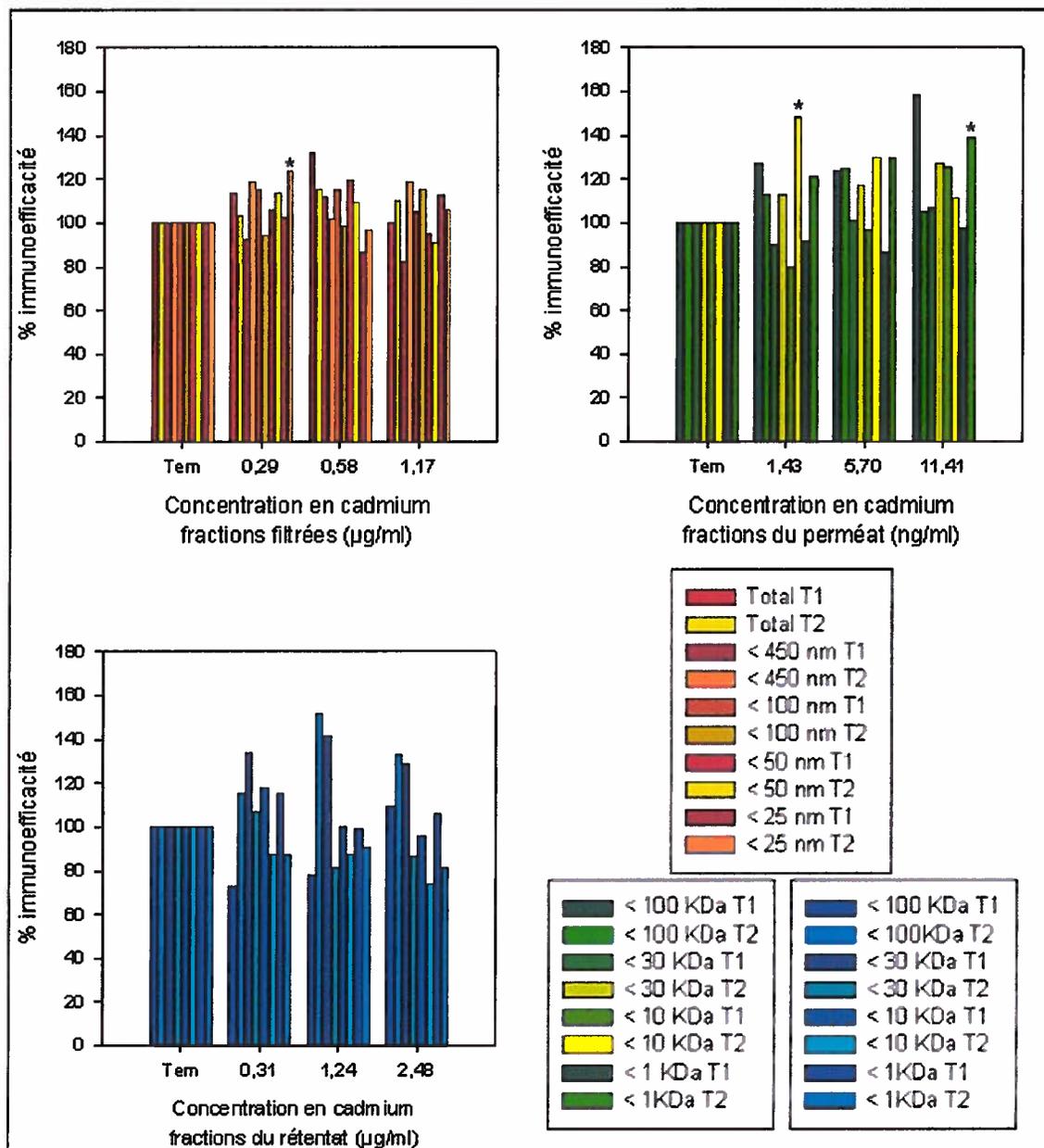


Figure 84 : Suivi temporel de l'immunocapacité des macrophages d'humain mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 4.

L'immunoactivité des macrophages d'humain exposés aux fractions filtrées est conservée à T1 et à T2 quelle que soit la concentration en Cd (Figure 84). Une stimulation de l'immunocapacité pour la fraction totale à T1 est notée, ceci n'est retrouvé à T2.

Pour les macrophages exposés au perméat une stimulation de l'immunoactivité est observée à T1 (elle est plus important pour la fraction < 100 KDa). A T2, une stimulation est remarquée pour les fractions < 10 KDa et < 1KDa dès 1,4 ng/ml. Pour les fractions < 100 KDa et < 30 KDa cette stimulation est notable dès 5,7 ng/ml. (Figure 84). A T1 l'immunoactivité est stimulée pour < 100 KDa et 30 KDa jusqu'à 1,24 µg/ml puis après elle diminue. Pour les autres tailles l'immunoactivité est diminuée dès 0,3 µg/ml. Cependant à T2, l'immunoactivité pour toutes les tailles est diminuée dès la première concentration de Cd excepté pour < 100 KDa. Pour 100 KDa le profil de réponse de l'immunoactivité des macrophages d'humain est biphasique, la phagocytose est stimulée jusqu'à 1,24 µg/ml puis après elle diminue (Figure 84).

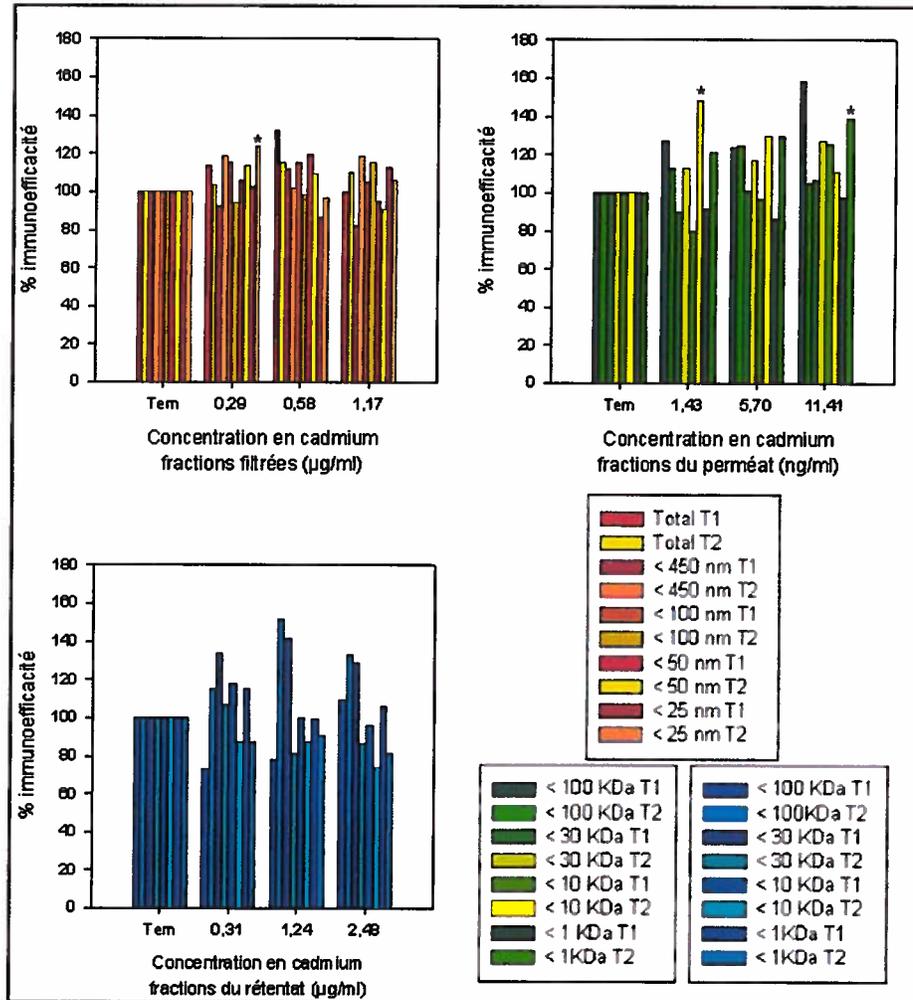


Figure 85 : Suivi temporel de l'immunoefficacité des macrophages d'humain mis en contact avec les fractions de nanoparticules à différentes concentrations. n= 4. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts type.

L'immunoefficacité des macrophages à T1 est relativement stable excepté pour la fraction totale et les nanoparticules < 450 nm de diamètre. Pour ces particules une réponse biphasique est observée : stimulation jusqu'à 0,58 µg/ml puis diminution (Figure 85). A T2 l'immunoefficacité est stimulée en fonction de l'augmentation de la gamme dose effet de Cd. Pour le perméat, seul une stimulation non significative de l'immunoefficacité pour les particules < 100 KDa est observée à T1. Cependant à T2 une stimulation significative est notée pour tous les poids moléculaires et plus particulièrement pour < 10 KDa et < 1 KDa (Figure 85). Pour le rétentat, l'immunoefficacité est diminuée pour la fraction dès 0,3 µg/ml, elle est stimulée pour les nanoparticules < 30 KDa. A T2, l'immunoefficacité est stimulée non significativement pour la fraction < 100 KDa jusqu'à 1,24 µg/ml. Pour les autres fractions l'immunoefficacité est diminuée (Figure 85).

3.4 Résultats sur l'influence de la taille des nanoparticules de Ted pella inc

Les différents modèles d'animaux ont été exposés aux nanoparticules de la compagnie Ted Pella^{inc} selon la gamme de concentration présentée ci-dessus.

- Pour la souris : la viabilité des macrophages, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (voir résultats en Annexe 1).

- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (voir résultats en Annexe 1).

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (voir résultats en Annexe 1).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

Les résultats ne sont pas présentés dans cette section mais tous les graphiques sont disponibles en annexes. (Voir annexe 1). Aucun des résultats pour tous les modèles ne s'est révélé significatif que ce soit pour la viabilité, la phagocytose et la transformation lymphoblastique.

3.5 Discussion et conclusions générales sur l'influence de la taille des NPs

Afin d'évaluer si la taille des particules jouent un rôle sur la réponse immunitaire des différents modèles animaux choisis pour le projet, la technique d'ultrafiltration a été sélectionnée, elle permet de séparer les particules selon leurs tailles via une membrane filtrante. De plus, des expériences avec des nanoparticules d'argent de la compagnie Ted Pella^{Inc} de différentes tailles ont été réalisées afin de comparer l'effet des tailles des QDs et des AgNPs TP sur le système immunitaire.

La toxicité des nanoparticules est liée à un facteur important qui est l'internalisation de celles-ci. En effet, il a été démontré que la taille des particules jouait un rôle sur les voies de phagocytose en influençant l'adhésion des particules et modifiant leur interaction avec les cellules (Lu, Wu et al. 2009). Cette section est d'autant plus fondamentale que les cellules immunitaires dont les macrophages sont des cellules ayant un rôle clé dans la réponse immunitaire, ils sont impliqués en tant que cellules présentatrices d'antigène, cellules sécrétrices de molécules signalétiques, régulatrices de la réponse immunitaire (Yue, Wei et al. 2010). Il est important de mentionner que la taille et la forme vont initier la phagocytose (Champion and Mitragotri 2006; Dobrovolskaia and McNeil 2007) quel que soit le type de cellules. En générale, les particules anioniques ou cationiques et les grosses particules sont plus rapidement internalisées que les petites particules ou les particules neutres. Mais que la taille n'est pas le seul élément influençant la toxicité. La forme et l'enrobage jouent aussi un rôle dans la toxicité des NPs (Zhang and Monteiro-Riviere 2009).

Les résultats sur les différentes tailles de nanoparticules filtrées et ultrafiltrées indiquent que selon les modèles animaux étudiés la réponse phagocytaire varie. Cependant, pour tous les modèles la viabilité des cellules immunitaires, est conservée qu'il s'agisse des particules filtrées, ou ultrafiltrées (perméat et rétentat). Les concentrations utilisées dans cette section de la thèse sont inférieures à celles retrouvées dans le reste du projet. L'intérêt est d'observer les réponses phagocytaires alors que la viabilité est conservée et pouvoir ainsi déterminer l'effet mécanistique des particules.

Précédemment, des études sur les mêmes QDs ont démontré que les 80 % de nanoparticules filtrée étaient retenues par le filtre 450 nm et 72 % passaient à travers le filtre de 1KDa, ce qui impliquait la présence de gros agrégats formés rapidement dans l'eau. De plus environ 14 %

de la solution stock originelle était retrouvée sous forme dissoute (< 1 KDa) (Peyrot, Gagnon et al. 2009). Les nanoparticules sont présentes sous trois types de formes dans le milieu d'exposition : 1- sous la forme monomérique, 2- sous la forme d'agrégats de QDs et 3- sous la forme de produits de dégradation de QDs de faible poids moléculaire en Cd (Peyrot, Gagnon et al. 2009). Ainsi les tests réalisés *in vitro* permettent de cerner la biodisponibilité des composés pour les différents types cellulaires. Les cellules immunitaires étaient donc exposées à des composés sous les 3 formes. Ceci est souvent le cas, les nanoparticules sont sous différentes tailles dans une solution originale (Dagtepe and Chikan 2008).

En règle générale, les cellules exposées à la fraction du rétentat réagissent plus que la fraction du perméat, ce qui est normal étant donné que le rétentat est la somme des particules de grosses tailles retenues par le filtre et des particules plus petites que la maille du filtre, mais qui ne passent pas en raison du colmatage de la membrane filtrante (voir principe d'ultrafiltration). De plus, la concentration en Cd contenu dans le rétentat est supérieure à celle du perméat. Dans les chapitres précédents, il a été démontré que l'effet des nanoparticules est lié à la concentration de celles-ci (indirectement la concentration de Cd). Selon les trois modèles étudiés à T1, les fractions induisent différentes réponses du système immunitaire. Pour la truite arc-en-ciel, les petites particules contenues dans la fraction du perméat, induisent des phénomènes d'hormèse. Les profils de réponses phagocytaires avec les particules filtrées et le rétentat induisent une stimulation (à la fois de l'immunoactivité et de l'immunoefficacité).

Cependant, pour les fractions filtrées des différences sont observées selon les tailles de particules. La phagocytose est stimulée pour une taille préférentielle, par exemple pour les truites nos résultats indiquaient que la phagocytose était plus stimulée pour des particules < 50 nm, contrairement à celles de < 450 nm et < 100 nm. Dans la littérature, la taille de particules de 50 nm semble être un optimum pour l'absorption de celles-ci (Osaki, Kanamori et al. 2004; Chithrani, Ghazani et al. 2006; Lu, Wu et al. 2009). L'assimilation des nanoparticules par les cellules semble être privilégiée pour une taille de 50 nm, de même Chithrani et al, (2006) rapportaient que l'assimilation cellulaire était maximale pour les nanoparticules d'or de 50 nm.

Pour les moules, une différence de réponse immunitaire selon les poids moléculaires est observée, pour le perméat la phagocytose est stimulée pour les petites particules < 1 KDa elle est diminuée pour les grosses particules < 100 KDa, alors que les autres poids n'entraînent pas

de modifications. Cette diminution de phagocytose est à mettre en parallèle avec la diminution de viabilité des hémocytes exposés aux particules < 100 KDa du perméat.

Pour *elliptio*, la viabilité est relativement conservée cependant la phagocytose varie selon la taille des particules, pour les particules filtrées de grosses tailles une stimulation est observée alors que pour les particules de 50 nm et 25 une diminution est observée. Ceci confirme que la taille des particules a une influence sur les paramètres immunitaires des bivalves.

Ces résultats confirment l'hypothèse que la taille des particules a une influence sur la réponse immunitaire des différents modèles d'animaux (truites et bivalves). Les petites particules du perméat semblent ne pas induire de réaction ou selon le cas une stimulation du système. Ainsi, les particules dissoutes ont un faible effet sur le système immunitaire. Contrairement les particules de grosses tailles engendrent des phénomènes d'hormèse ou une diminution de la phagocytose.

Lovric et al, 2005 ont démontré que les Cd/Te QDs pouvaient entrer dans la cellule, dans les compartiments subcellulaires et causer des phénomènes de cytotoxicité sur le noyau. Les études de Aaron et al, 2011 (2011a) quand à eux ont démontré que les nanoparticules étaient préférentiellement liées à certains domaines de la membrane cellulaires (lignée de basophiles de rats) et étaient lentement internalisées. Actuellement la théorie de Chang et al, (2006) suggérant l'assimilation des particules, puis leur dégradation dans les lysosomes, relayant de ce fait les composés métalliques induisant la mort cellulaire, est la seule connue (Aaron, Greene et al. 2011a). En fait, le problème de la toxicité des QDs réside dans l'oxydation de la particule, que ce soit avant sa mise en contact avec la cellule dans le milieu ou alors une fois phagocytée par celles-ci. L'enrobage peut normalement protéger et limiter l'oxydation de la particule et donc repousser cette dégradation. Le fait est que le métal contenu dans les nanoparticules principalement du cadmium est toxique. La toxicité du cadmium dissous est bien connue, plus que celle des nanoparticules de cadmium (Fowler 2009). Le cadmium dissous et les QDs ont la particularité commune d'induire la production de thiols comme les métallothionéines et la production d'espèces oxygénées réactives (Roesijadi, Brubacher et al. 1997; Rikans and Yamano 2000; Klaassen, Liu et al. 2009). Cependant, quelques études ont été réalisées sur la cytotoxicité des Cd/S, Cd/Te, Lovric et al, 2005 ont démontré que les QDs entraînaient une diminution de la viabilité cellulaire et une induction des EOR (Lovric, Cho et al. 2005b). Les nanoparticules sont susceptibles de subir une réduction métabolique ou de s'oxyder. Les processus endogènes générés par cette oxydation peuvent attaquer la

machinerie cellulaire, les protéines, les organelles et les acides nucléiques (Di Gioacchino, Petrarca et al. 2008). Au final, le cadmium peut entraîner des dommages sur les mitochondries, la production de superoxydes, et induire la production d'EOR et l'apoptose (Klaassen and Liu 1998; Golstein and Kroemer 2007; Huff, Lunn et al. 2007). Ainsi, le cadmium est connu comme un métal lourd causant des phénomènes de flambées oxydatives accompagnée de production d'EOR qui vont activées le système immunitaire à faible dose et perturbées les fonctions cellulaires telles que la viabilité et la phagocytose de cellules immunitaires à fortes doses (Sauve, Brousseau et al. 2002; Di Gioacchino, Petrarca et al. 2008; Fowler 2009).

La stabilité des particules est fondamentale (Wang, Zheng et al. 2009), les études de Lovric et al., 2005 et de Maysinger et al., 2007 ont étudié l'effet des particules non enrobées et ont démontré que celles-ci pouvaient causer de multiples dommages intracellulaires, et ont observé des phénomènes d'apoptose et de nécrose (Maysinger 2007). Ainsi les nanoparticules peuvent avoir des effets directs à court terme (après 21h d'exposition) mais pourraient aussi présenter un danger pour le long terme.

Nos résultats des différents paramètres immunitaires dans le temps, exposés aux trois fractions de nanoparticules apportent des informations complémentaires sur le comportement des nanoparticules. Pour la truite, la viabilité des macrophages exposés aux trois fractions est relativement conservée, ce qui indique que les cellules sont résistantes à des nanoparticules qui ont été filtrées une semaine auparavant. Néanmoins, il est intéressant de remarquer que la viabilité diminue pour les fractions du rétentat et pour les particules du perméat < 100 KDa mais seulement à T1. Ceci indique que les nanoparticules ont un effet cytotoxique sur les macrophages seulement à T1 et non une semaine après filtration des particules. Ces résultats permettent donc de valider l'hypothèse que les nanoparticules ont un effet dans le temps sur les macrophages et les lymphocytes de truites. Ceci est confirmé par les résultats de phagocytose. Pour l'immunoactivité, une stimulation de la phagocytose, avec les particules filtrées et du rétentat, est observé à T1, ce phénomène est plus important qu'à T2. Pour les macrophages exposés au perméat la stimulation est plus forte à T2 qu'à T1. Les résultats de l'immunoefficacité sont souvent similaires à ceux de l'immunoactivité, ainsi pour la phagocytose de 3 billes et plus la même stimulation est observée. Cependant pour l'immunoefficacité, la stimulation est un peu plus forte pour les macrophages de truites à T1 qu'à T2. Les grosses particules semblent induire une stimulation du système immunitaire plus forte à T1 qu'à T2. Pour le perméat, les résultats sont un peu différents : l'immunoactivité est

plus forte à T2 qu'à T1 alors que l'immunoefficacité est plus forte à T1 qu'à T2. Ainsi l'action des particules varie dans le temps. Ceci est probablement lié à la chimie de la particule et à son assimilation

La cellule peut utiliser 5 voies différentes d'assimilation (exemple chez l'humain) : la phagocytose (via les récepteurs à mannose, les récepteurs Fcγ, les récepteurs du complément, les récepteurs scavengers), la macropinocytose, la réponse via les voie des clathrines, via la voie des calvéolines, et via la voie d'endocytose indépendante des clathrines et calvéolines (Dobrovolskaia and McNeil 2007). Selon la taille des particules, la phagocytose n'est pas la même (Dobrovolskaia and McNeil 2007). Nos résultats confirment que la taille des particules a une influence sur la réponse immunitaire de macrophages d'humain. Vallhov et al, 2006 avaient démontré que la taille des particules pouvait avoir une influence sur la réponse immunitaire des cellules dendritiques d'humains (Vallhov, Qin et al. 2006). Les études de Yue et al, 2010 ont démontré que les nanoparticules d'une taille de 430 nm pénètrent facilement dans la lignée de macrophages. Ces mêmes auteurs ont démontré que la phagocytose est un moyen indispensable pour l'internalisation des particules (Yue, Wei et al. 2010).

D'autre part, il est aussi prouvé que les petites particules peuvent être assimilées par des voies non spécifiques (Shortkroff, Turell et al. 2002; Chithrani, Ghazani et al. 2006). De plus Jiang et al, 2006 ont démontré que des particules de tailles définies peuvent interagir passivement et activer la mécanique moléculaire régissant les fonctions cellulaires (Jiang, KimBetty et al. 2008). Ainsi, même de faibles doses peuvent instiguer la réponse immunitaire via la stimulation de phagocytose ceci avait déjà été démontré par Sauvé et al, 2002 pour des espèces de bivalves (Sauve, Brousseau et al. 2002). Les phénomènes de stimulation des nanoparticules à faible dose sont connus et validés par nos résultats (Iavicoli, Calabrese et al. 2010). Ce phénomène déjà expliqué dans les chapitres précédent est aussi appelé hormèse. Il est intéressant de remarquer qu'il est aussi observé à faible dose avec des nanoparticules ultrafiltrées. Dans les premiers chapitres les nanoparticules ne l'étaient pas. En accord, avec Stebbing et al, 1998, le phénomène d'hormèse est une réponse adaptative de l'organisme afin de compenser la rupture de l'homéostasie causée par les contaminants (Stebbing 1998).

Pour le modèle elliptio, la viabilité est diminuée dans le temps. En effet, à T2 la viabilité diminue pour les hémocytes exposés à des particules filtrées et du rétentat et également pour les grosses particules du perméat < 100 KDa. Cette diminution est plus forte qu'à T1. De plus,

la différence de résultats entre T1 et T2 confirme l'hypothèse que les nanoparticules ont un effet dans le temps sur les hémocytes d'*Elliptio complanata*. Une diminution plus faible est observée pour les petites nanoparticules (petits poids moléculaires du perméat). La diminution de la viabilité lors d'exposition aux grosses particules indique que la taille des particules a un effet sur les paramètres immunitaires d'*Elliptio complanata*. Ces résultats sont aussi retrouvés avec la phagocytose. La phagocytose à T1 est diminuée pour les hémocytes exposés aux particules filtrées et du rétentat, ceci est intéressant d'autant plus que la viabilité est conservée à T1. Ainsi les nanoparticules ont un effet mécanistique sur les hémocytes de moules d'eau douce, les nanoparticules de grosse taille ont un effet immunosuppresseur plus fort que les nanoparticules de petite taille. A T2, la phagocytose est relativement stable voir légèrement stimulée. Ce phénomène est aussi observé pour les hémocytes exposés au perméat, la phagocytose est diminuée à T1 pour tous les poids moléculaire excepté le plus petit < 1KDa, ces résultats ne sont pas retrouvés à T2. Les grosses nanoparticules ont donc un effet différent à T1 qu'à T2. Ces résultats confirment l'hypothèse que la taille des particules et le temps jouent un rôle dans la toxicité des particules sur les hémocytes d'*elliptio*. Cette affirmation est aussi validée par les résultats de l'immunoefficacité une diminution de la phagocytose est remarquée à T2 pour les particules < 100 nm et < 50 nm (fraction filtrée) mais pas à T1. Cependant, une diminution de la phagocytose pour les grosses fractions < 450 nm est observée à T1 et non à T2. De même la stimulation des phagocytoses pour les fractions < 100 KDa et < 1KDa du perméat à T1 indique que les nanoparticules de petites tailles et de grosses tailles ont un effet immédiat de stimulation du système immunitaire. Les particules de tailles moyennes ont un effet à plus long terme.

Pour l'humain, les profils de réponses sont différents des deux autres modèles. Une diminution de la viabilité est observée entre T1 et T2 pour les fractions du rétentat. Selon les particules la diminution de viabilité entre T1 et T2 est plus ou moins importante. Effectivement, pour les particules du rétentat la diminution est très forte, pour les particules filtrées elle est forte et pour les particules du perméat elle est moyenne. Selon les fractions des particules la cytotoxicité des particules n'est pas la même ; les plus grosses sont plus cytotoxiques que les petites particules. Ces résultats sont aussi retrouvés avec la viabilité des macrophages à T2, une diminution moindre de la viabilité est observée pour le perméat de < 10 KDa et < 1 KDa. Ces résultats valident donc l'hypothèse que les nanoparticules, selon leur taille, n'ont pas les mêmes effets sur les macrophages d'humains. Les particules de grosses tailles sont plus cytotoxiques que les petites particules. De même, les particules ont aussi une

action dans le temps sur les cellules immunitaires d'humains. La fraction totale des particules filtrées, ou les grosses particules du perméat et du rétentat, induisent une cytotoxicité des monocytes d'humain. Ces postulats sont aussi retrouvés dans les résultats de phagocytose. En effet, pour les particules filtrées la phagocytose n'est pas changée cependant une diminution de l'activité phagocytaire est observée pour les particules du rétentat à T2 et une stimulation à T1. Selon la taille des particules une stimulation ou une inhibition de la phagocytose est notée. Une stimulation des macrophages exposés au perméat à T2 ainsi que pour les grosses particules du perméat et du rétentat < 100KDa. Ces résultats indiquent donc que le système immunitaire est stimulé dans le temps ceci est sûrement lié aux paramètres physico-chimiques de la particule.

Osaki et al, 2004 ont démontré que l'assimilation cellulaires des QDs était dépendante de la taille de la nanoparticule (Osaki, Kanamori et al. 2004). Zhang et al, ont trouvé que les QDs rouge, les plus gros QDs, seraient moins toxiques que les verts, les plus petits (Zhang and Monteiro-Riviere 2009). Les particules utilisées dans notre projet sont toutes des QDs verts de petites tailles soit 4 nm cependant l'affirmation de Zhang et Monteiro-Riviere, 2009 concorde avec nos résultats, les nanoparticules de grosses tailles sont plus toxiques que les particules de petites tailles.

Cependant, les nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc} ne semblent pas avoir d'effet sur la viabilité et la phagocytose des différents types cellulaires. Ceci pourrait être aussi lié à l'emploi et au type de nanoparticules (enrobage et concentration en argent différents). Par ailleurs, dans le chapitre 1, nous avons vu que la concentration en métal influait sur la toxicité des particules, ce qui expliquerait que les particules d'argent de Ted pella^{inc} ne soient pas toxiques en raison de leur faible dosage. Nos résultats n'indiquent pas de stimulation de changement d'activité de la phagocytose, il est possible que les nanoparticules d'argent de Ted Pella diffusent simplement dans les cellules sans induire de stimulation. Dans l'étude de Carlson et al, 2008, les réponses pro inflammatoires des macrophages alvéolaires de rats variaient selon la taille des particules d'argent (15,30 et 55 nm de diamètre), cependant la gamme dose effet utilisée était de 0-25 µg/ml soit 100 fois la gamme utilisée pour les AgNPs TP (Carlson, Hussain et al. 2008). Les auteurs démontraient que les nanoparticules d'argent peuvent être phagocytées en tant qu'agglomérat, mais aussi diffusées passivement dans la cellule, lorsque les nanoparticules sont individualisées (Carlson, Hussain et al. 2008). Ainsi, les AgNPs TP utilisées pénètrent sûrement dans les cellules immunitaires cependant, leur concentration est trop faible pour induire une réponse immunitaire.

Enfin, la morphologie des nanoparticules est changée lors de la mise en présence d'eau, les études de Min et al, 2008 avec des particules ZnS ont démontré que les nanoparticules mises en présence d'eau pouvaient adhérer à des surfaces de mica et former des agglomérats dans le temps (Min, Akbulut et al. 2008). La concentration des nanoparticules joue un rôle fondamental dans les forces internanoparticulaires. Effectivement, plus les nanoparticules sont concentrées, plus elles ont tendance à s'agréger, à précipiter dans la solution et à s'adsorber sur les surfaces (Min, Akbulut et al. 2008).

Une étude de Buford et al, 2007 a testé des nanotubes de carbone dans différents milieux de culture, selon les matrices, les nanoparticules s'aggloméraient plus ou moins (Buford, Hamilton et al. 2007), ainsi la chimie des particules est essentielle à leur dispersion dans le milieu et à leur biodisponibilité. Les différences en taille et en agrégation sont responsables de la toxicité des nanoparticules (Ispas, Andreescu et al. 2009). Il est essentiel de rappeler que les nanoparticules peuvent se lier selon des agglomérats ou des agrégats (Jiang, Oberdörster et al. 2009). Les études ont démontré que les points quantiques CdTe existent plutôt sous leur forme agrégée que sous la forme monodispersée (Peyrot, Gagnon et al. 2009). Cela peut modifier l'assimilation cellulaire des nanoparticules et leur biodisponibilité dans le temps.

Peu d'étude de cinétique de nanoparticules ont été réalisées, la plupart des études sont menées *in vivo*. Ainsi, aucune étude n'a été menée sur des particules filtrées et ultrafiltrées après une semaine, notre étude est donc précurseur dans le domaine du suivi *in vitro* de la toxicité nanoparticulaire.

Dans cette section, plusieurs hypothèses ont été validées : quel que soit le modèle, la taille des particules joue un rôle sur les cellules du système immunitaire. D'autre part, selon leur taille les QDs influencent la réponse immunitaire, soit elles l'inhibent soit elles la stimulent. Selon les espèces, la toxicité et les performances du système immunitaire sont différentes. Les nanoparticules de tailles différentes ont une action dans le temps.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU CHAPITRE 2

Selon nos résultats, les particules, n'ont pas les mêmes comportements selon les matrices dans lesquelles elles sont retrouvées. Dans le sel, une dégradation des particules est observée ce qui a un impact lors des expositions avec des cellules immunitaires. Cependant, les résultats de chimie, ont démontré que les nanoparticules sont stables et intègres, elles pénètrent dans les cellules sans être endommagées si elles ne sont pas mises en présence d'un agent oxydant ou dégradant (sel, changement de pH, filtration sur membrane etc.). Une fois filtrées les

nanoparticules n'induisent pas la même toxicité, lors d'un suivi temporel les paramètres immunitaires semblent plus affectés à court terme qu'à long terme. Les résultats des tailles de particules ont démontré que des effets sur les paramètres immunitaires, même à de faibles doses, sont observables sur les différents modèles. Les grosses particules sont souvent plus toxiques que les petites particules, de même des phénomènes d'hormèse sont aussi observés pour les plus petites nanoparticules.

**CHAPITRE 3 : ATTEINTES
MÉCANISTIQUES DE LA RÉPONSE
IMMUNITAIRE ET ANALYSES DE
BIOMARQUEURS CHEZ LA SOURIS ET LA
MOULE BLEUE**

INTRODUCTION DU CHAPITRE 3

Il a été vu dans les chapitres précédents, que les nanoparticules (NPs) de cadmium et d'argent ont un effet sur le système immunitaire des différents organismes testés. Ainsi les NPs peuvent engendrer des perturbations des mécanismes de phagocytose et de proliférations cellulaires. Nos précédents résultats ont démontré que selon les espèces, les NPs pouvaient engendrer une stimulation ou une inhibition des paramètres immunitaires lors de leur exposition. En effet, lorsque les NPs pénètrent dans un organisme, elles peuvent être prises en charge par le système immunitaire et entraîner sa réponse (Zolnik, Gonzalez-Fernandez et al. 2010).

Cependant, l'action des nanoparticules ne se limite pas à une stimulation ou inhibition du système. En effet, des études précédentes ont démontré que la toxicité des QDs, pouvait être liée à des phénomènes de stress oxydatif (Cho, Maysinger et al. 2007). Ces phénomènes ont été mis en évidence sur différents modèles animaux : l'humain (Lovric, Cho et al. 2005b), le hamster (Li, Chen et al. 2009), la truite arc-en-ciel (Gagné, Fortier et al. 2010) et les daphnies (Kim, Park et al. 2010) etc. Les QDs de CdTe sont capables d'induire la production d'espèces oxygénées réactives (EOR), comme du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydro peroxydés (Cho, Maysinger et al. 2007). La production d'EOR induit des dommages sur les protéines, l'ADN, les lipides et peut entraîner des altérations du fonctionnement cellulaire induisant parfois la mort des cellules. Ainsi, sous des conditions oxydatives ou photolytiques, l'enrobage des QDs peut se dégrader et donc exposer le contenu métallique toxique de la nanoparticule au milieu environnant (exemple Cd, Te ...) (Male, Lachance et al. 2008). Rappelons que la cytotoxicité des ions Cd^{2+} est due à la liaison de ceux-ci aux groupes sulfhydriles des protéines mitochondriales (Lovrić 2005a). Cependant, la toxicité des particules ne serait induite qu'en partie par les ions Cd^{2+} . En effet, lors de cette dégradation la nanoparticule produit aussi elle-même des EOR (Mancini, Kairdolf et al. 2008). Cette génération pourrait être liée aux propriétés intrinsèques de la particule (taille et composition) (Cho, Maysinger et al. 2007). Ainsi le mécanisme d'oxydation des QDs serait lié à la production d'acide hydrochloré (HOCl) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces espèces oxygénées réactives seraient susceptibles de diffuser à travers des couches d'enrobage de la particule et d'induire sa dégradation chimique. Ce processus produit des « trous » dans l'enrobage, diminuant la fluorescence de la particule (phénomène de quenching) et produisant des molécules solubles de Cd, de Te de S etc. (Mancini, Kairdolf et al. 2008). Ces molécules

sous formes ioniques vont être diffusées directement dans le milieu de culture avant même un contact cellulaire.

La production d'EOR a cependant des effets néfastes sur les cellules (Nel, Xia et al. 2006). Les études de Lovric et al, (2005b) ont démontré que les CdTe non enrobés pouvaient induire des phénomènes d'apoptose sur une lignée cellulaire de rats, PC 12 (condensation de la chromatine, désorganisation de la membrane cellulaire). De même, les études de Ballou et al, (2004) sur des cellules de souris démontraient que les CdTe enrobés de PEG induisaient des phénomènes de nécrose dans les tissus injectés par les NPs. Une étude de Gagné et al, (2008a) a aussi démontré qu'une concentration croissante de Cd/Te Cd/S pouvait induire des dommages sur l'ADN dans les branchies de moules (*Elliptio complanata*) et une peroxydation lipidique dans les tissus de ces mêmes organismes. Enfin les études de Zhang et al, (2006) sur des fibroblastes humains ont observé la surexpression de gènes codant pour le transport vacuolaire et l'apoptose de la cellule. De plus, ces auteurs ont observé une sous expression des gènes codant pour la phase M et la formation de fuseaux mitotiques (Zhang, Stilwell et al. 2006).

Ainsi les QDs sont responsables de la production d'EOR induisant des dommages sur l'ADN, sur les protéines et sur les mitochondries. Cette production d'EOR induit un stress oxydatif agissant sur l'intégrité de la membrane mitochondriale, sur les enzymes de phase II et provoquant des phénomènes inflammatoires. Finalement cette cascade de réactions entraîne des dommages membranaires internes à la cellule, augmente la perméabilité de celle-ci (et donc la perte d'énergie), et induit des phénomènes d'apoptose et de nécrose (Nel, Xia et al. 2006).

D'autre part, les nanoparticules d'argent sont elles aussi connues pour engendrer des effets néfastes sur les cellules et ses composés. En effet les AgNPs sont étudiées pour leurs effets néfastes sur les membranes cellulaires, principalement chez les bactéries (Morones, Elechiguerra et al. 2005). Une étude de Lok et al, (2007) a démontré que les AgNPs pouvaient désorganiser les composants de la membrane cellulaire des bactéries tels que les lipopolysaccharides et les porines. Les AgNPs induisent aussi une altération de la pompe à proton, une perte du potassium intracellulaire et diminuent le niveau d'ATP cellulaire. De plus, les AgNPs peuvent aussi être transportés à l'intérieur de la cellule et atteindre des organites cellulaires, comme la mitochondrie. Il a été démontré sur plusieurs modèles d'études que les AgNPs pouvaient induire une rupture de la membrane mitochondriale

entraînant, entre autre, une diminution de la production d'ATP et l'initiation de phénomènes apoptotiques (Teodoro, Simões et al. 2011). En effet, l'étude d'Hussain et al, (2005) ont démontré, sur une lignée cellulaire, BRL 3A, de foie de rat, une rupture de la membrane mitochondriale et une inhibition de son activité lors d'une exposition à une gamme croissante d'AgNPs. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont observé des phénomènes de stress oxydatif, liés aux AgNPs. Ces phénomènes de stress oxydatif ont aussi été observé chez l'humain (Kim, Choi et al. 2009) chez le poisson (Choi, Kim et al. 2010) et chez les bivalves .

Dans leur étude, Hussain et al, (2005) ont aussi observé une diminution significative de la production de Glutathion. Cette diminution de la production de GSH est corrélée avec la forte production d'EOR sécrétées lors du fonctionnement naturel d'une cellule. En effet, les AgNPs sont susceptibles de faire varier le production de Glutathion, et de malondialdéhyde, sous produit de la peroxydation lipidique, lors d'une exposition à des concentrations croissantes d'AgNPs chez une espèce de poissons (*Danio rerio*) (Choi, Kim et al. 2010). De plus, les AgNPs peuvent aussi entraîner la surexpression ou la sous expression de certains gènes. Par exemple, une exposition à des concentrations croissantes d'AgNPs induit l'expression du gène MT-2 (sur des hépatocytes de poissons) confirmant l'action d'ions Ag^+ sur l'expression génique, ces ions étant potentiellement relargués par les NPs (Choi, Kim et al. 2010). De même, Choi et al, (2010) ont aussi démontré que les AgNPs pouvaient induire la suppression de l'expression des gènes CAT et GPX-1, deux enzymes antioxydantes, ce qui pourrait être le résultat de l'accumulation de peroxyde d'hydrogène et des d'autres radicaux. Les AgNPs sont aussi responsables du relargage de cytokines et chémokines par les macrophages alvéolaires de rats, lors d'une exposition croissance de nanoparticules. Ces molécules incluent le facteur de nécrose tumoral TNF-R, la protéine inhibitrice des macrophages MIP-2 et l'interleukine and IL-1 (Carlson, Hussain et al. 2008). Une étude de Chae et al, (2009) ont démontré que l'induction du gène codant pour la sécrétion des métallothionéines ont montré que ces protéines étaient sécrétées dans le but d'éliminer les EOR générées par les AgNPs.

Ainsi, au regard de la littérature et de nos précédents résultats, nous avons émis l'hypothèse des QDs et les AgNPs, utilisés dans notre projet, pourraient induire des phénomènes de stress oxydatifs selon les modèles d'animaux. Les objectifs de cette section ont été l'évaluation de cette toxicité à l'aide de biomarqueurs spécifiques de la réponse oxydative, mais aussi, de la sécrétion de métallothionéines et de l'apoptose chez deux modèles choisis, soit la souris et la moule bleue. De plus, nous avons tenté de caractériser par imagerie confocale l'action des NPs sur les macrophages de souris. Ce troisième chapitre vient compléter les notions de

toxicité induite par les QDs Cd/S, Cd/Te et d'AgNPs via l'usage d'autres biomarqueurs du système immunitaire. Une visualisation de la toxicité des QDs et des AgNPs nous permet également de considérer l'action physique des nanoparticules sur les cellules (phénomène d'apoptose, dégradation cellulaire des filaments d'actine).

1. MATÉRIEL ET METHODE

1.1 Obtention des cellules de souris et de moules

Les isolations cellulaires et purifications ont été effectuées de la même manière que décrite dans le chapitre 1 (section matériel et méthode 2 et 4). Les comptages cellulaires et les viabilités ont été réalisées également dans les mêmes conditions qu'énoncées dans le chapitre 1 (section matériel et méthode 6 et 7). Cependant, les protocoles de thiols, de flambée oxydative ou production de ROS, d'apoptose, de sécrétion de métallothionéines, et de cycle cellulaire ont été réalisés comme mentionné ci-dessous.

1.2 Exposition aux nanoparticules

Les expositions aux QDs et aux AgNPs ont été réalisées selon les protocoles indiqués dans le premier chapitre (section matériel et méthode 5.1 et 5.2). Cependant, pour les doses d'exposition des nanoparticules et principalement celles des QDs, une gamme plus faible de concentrations a été établie afin d'observer les variations des biomarqueurs à faibles doses. Pour des fins de comparaison, les tests ont été réalisés sur des QDs et du CdCl₂. Les doses d'exposition sont les suivantes :

Tableau 29 : Gamme de contaminations testées pour les expériences avec les QDs. Les QDs étant stables dans l'eau, toutes les dilutions ont été effectuées dans de l'eau stérile. La concentration de la solution mère est notée simplement à titre d'indication.

Dilution des NPs	Concentration en QDs en µg/ml	Concentrations de QDs testées <i>in vitro</i> en µg/ml	Concentrations de CdCl₂ testées <i>in vitro</i> en µg/ml
Solution mère pure	20 * 10 ³	952.4	
1/25	800	38	38
1/50	400	19	
1/100	200	9.5	
1/200	100	4.8	
1/400	50	2.4	2.4
1/600	25	1.2	
1/1200	12,5	0.6	
1/2400	6,75	0.3	
1/5200	3,38	0.2	
Témoin	0	0	0

1.3 Protocole des Métallothionéines (MT)

Après l'exposition aux métaux, les cellules ont été centrifugées et reprises dans 1 ml de solution de fixation. Ce mélange peut être gardé plusieurs jours au frigo en attendant le dosage. Le jour du dosage, la solution de fixation a été enlevée par une centrifugation à 2300 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été décanté ou aspiré, puis les cellules ont été décollées du culot et 0,5 ml de tampon de perméabilisation sera ajouté durant 30 minutes à température ambiante. Après le 30 minutes, les cellules ont été centrifugées à 2300 rpm, 5 minutes, le surnageant a été vidé et les cellules décollées du culot et 0,5 ml de tampon de coloration (staining buffer) sera ajouté, enfin les tubes ont été centrifugés à 2300 rpm, 5 minutes. Le surnageant a été décanté et le culot repris avec l'anticorps primaire (8.7 µl) ou avec le témoin

isotypique, puis le mélange a été incubé à température ambiante durant 30 minutes. Ensuite 500 µl de tampon de coloration (staining buffer) ont été ajoutés et le mélange sera centrifugé à 2300 rpm, 5 minutes. Le surnageant a été décanté et le culot repris dans 0,5 ml de tampon de coloration (staining buffer), le tout a été centrifugé à 2300 rpm, 5 minutes. Puis l'anticorps secondaire a été ajouté dans le tampon de coloration (staining buffer), et incubé 30 minutes à température ambiante. Le mélange a été ensuite centrifugé à 2300 rpm, 5 minutes, puis 0,5 ml de tampon de coloration (staining buffer) seront ajoutés. Une nouvelle centrifugation à 2300 rpm, 5 minutes et le culot a été resuspendu dans 0,5 ml de PBS. Les intensités de fluorescence du conjugué FITC (de l'anticorps secondaire), la complexité (SSC) et la taille (FSC) des hémocytes ont été mesurées à l'aide du FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry System™, BDIS). L'excitation des FITC a été mesurée par le laser argon à 488 nm (15mW) et détectée par le canal FL1 avec le filtre bande passante 530 nm-42 nm. Un marqueur M1 (= 5%) a été placé sur l'histogramme de comptage. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules présentant une fluorescence avec le FITC. Les expériences ont été répétées 3 fois.

Solutions mère:

Solution de fixation : 0.3% de paraformaldéhyde dans du PBS. Le paraformaldéhyde se dissout très mal dans le PBS. Mettre 0.3 gramme de paraformaldéhyde dans 100 ml de PBS, ajouter 15 ml de NaOH 1 M ; la solution deviendra claire. Réajuster le PH avec HCl à 7.4.

Solution de perméabilisation : PBS pH 7.4 ; 3% SVF ; 0.1% de sodium azide ; 0.1% de saponine

Tampon de coloration (Staining buffer): PBS pH 7.4; 3% SVF; 0.1% de sodium azide

Les anticorps ont été utilisés selon les concentrations suivantes : 1 µg d'anticorps pour 1 x10⁶ cellules dans 100 microlitres.

Anticorps spécifique primaire

Anticorps monoclonal de souris anti-MT (DAKO-MT-E9)

8.7µl (pour avoir 1 µg) pour 1 million de cellules.

Anticorps isotypique : Becton Dickinson, Biosciences témoin isotypique clone x40 (IgG1) Cat 349040

20 µl (pour avoir 1 µg) pour 1 million de cellules.

Deuxième anticorps-FITC: Sigma-Aldrich™ Anti-mouse IgG (Fab specific F(ab')₂ Fragment –FITC Cat F2653.

5 µl d'une dilution 1:200 pour 1 million de cellules

1.4 Protocole de la production EOR

La flambée oxydative a été mesurée à partir du protocole de Bass et al. 1983 et utilise du 2'7'-diacétate de dichlorofluorescine (DCFH-DA). Tout d'abord, 500µl d'hémocytes ont été préalablement incubés avec 25 µl de toxiques, et simultanément 500µl d'hémocytes ont été préalablement incubés avec 25 µl de toxiques et du PMA (concentration finale de 2 mg/ml) durant 21h. Ensuite, du DCFH-DA (concentration finale 1 mmol/L) a été ajouté dans chacun des deux tubes et maintenu sur de la glace pilée. Les tubes ont été incubés durant 3 heures à 18°C et à l'obscurité. Les intensités de fluorescence du DCF, la complexité (SSC) et la taille (FSC) des hémocytes ont été mesurées à l'aide du FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry System™, BDIS). L'excitation de la sonde a été mesurée par le laser argon à 488 nm (15mW) et détectée par le canal FL1 avec le filtre bande passante 530 nm-42 nm. Un marqueur M1 (= 5%) a été placé sur l'histogramme de comptage. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules avec du DCF. L'activité oxydative correspond à la différence moyenne entre le pourcentage de cellules fluorescentes avec le PMA et sans le PMA. Les expériences ont été répétées 3 fois.

Solution mère:

Phorbol myristate acétate (PMA; Sigma-Aldrich™): 1mg PMA est dissout dans 1ml de diméthylsulfoxyde (DMSO; 99.5% min), et repartit en aliquot stockés à -20°C.

2'7'-diacétate de dichlorofluorescine (DCFH-DA; Sigma-Aldrich™): solution mère à 10mmol/L de DCFH-DA préparé dans du DMSO et dilué dans 10% d'eau de mer filtrée (solution mère à 1 mmol/L).

1.5 Protocole de la production de thiols

La concentration des cellules immunitaires a été ajustée à 1×10^6 cellules/ml. Dans chaque tube Falcon, 25 µl de toxiques à la concentration souhaitée, puis 500 µl de solution ont été placés. Puis le mélange a été incubé durant 3 heures à température ambiante, au noir (sous agitation de préférence). Pour doser les thiols, 10 µl de solution CMF-DA (5mM dilué à 1/10) ont été ajoutés dans chaque tube Falcon. Le CMF-DA est un dérivé chlorométhylé fluorescent et pénètre dans les membranes puis à l'intérieur des cellules vivantes (Zurgil *et al.*, 1999). Les

tubes ont ensuite été incubés 2 heures à température ambiante. Dans le cytosol des cellules immunitaires se trouve des lysosomes contenant des enzymes (parmi elles les estérases). Ces dernières vont hydroxyler la sonde et la transformer en CMF. Les cystéines (thiols) sont souvent présentes dans le milieu intracellulaire à l'état libre (-SH) (McDonagh et Sheehan, 2007). C'est donc par le biais d'une réaction redox, que la sonde va se lier aux thiols et devenir le CMF-SH. Les intensités de fluorescence du CMF-SH, la complexité (SSC) et la taille (FSC) des hémocytes ont été mesurées à l'aide du FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry System™, BDIS). L'excitation du CMF-SH a été mesurée par le laser argon à 488 nm (15mW) et détectée par le canal FL1 avec le filtre bande passante 530 nm-42 nm. L'activité oxydative correspond à la différence moyenne entre le pourcentage de cellules fluorescentes avec le PMA et sans le PMA. Un marqueur M1 (= 5%) a été placé sur l'histogramme de comptage. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules avec du CMF-SH. Chaque expérience a été répétée trois fois.

Solution mère:

5-chloromethylfluoresceine.diacétate (CMF-DA; Sigma-Aldrich™): solution mère 1/100 de CMF-DA (5mM) dilué dans 10ml d'eau de mer filtrée et 0.1g de glucose (solution conservée à -20°C pour un maximum de 2 mois).

1.6 Protocole d'apoptose

Une fois les cellules extraites, 500 µl de la suspension cellulaire ont été exposées à 25 µl de QDs selon les différentes dilutions évoquées précédemment durant 21h. Afin de mesurer l'apoptose, un tube témoin a été réalisé en incubant des cellules en absence d'agent induisant l'apoptose (25 µl d'eau stérile). Pour la détection de l'apoptose, par cytométrie en flux, une trousse commerciale a été utilisée, Vybrant Apoptosis Assay, Kit #4 (Molecular Probes™) et adaptée. Brièvement, les cellules ont été exposées aux solutions du kit. La plupart de temps nous avons dilué les solutions mères d'Yo-Pro et d'IP du kit. Pour 250 000 cellules présentes dans chaque tube (lorsque les cellules étaient ajustée à 0.5×10^6 cellules /ml), 2,5 µL d'Yo-Pro (à 0,1 mg/ml) et 2,5 µL de IP (à 0,1 mg/ml) ont été ajouté à chaque tube. Les cellules ont été incubées par la suite sur glace pendant 20-30 min. Les résultats de fluorescence des sondes ont été détectés suite à une excitation par le laser argon à 488 nm (15mW) et lus par le canal FL1 de bande passante 530 nm-42 nm et en FL3 de bande passante 610 ± 20 nm (Figure 86). Les expériences ont été répétées 5 fois.

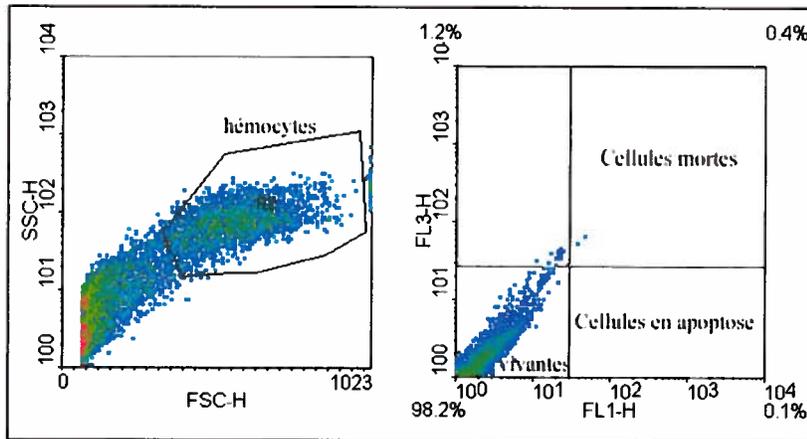


Figure 86 : Induction d'apoptose et nécrose suite à l'exposition aux QDS des hémocytes de moule bleue.

Les cellules vivantes apparaissent dans le quartier en bas à gauche indiquant une faible fluorescence en IP (FL3) et en Yo-Pro (FL1). Les cellules apoptotiques sont localisées dans le quart inférieur droit, elles sont caractérisées par une fluorescence d'IP basse, relative à l'intégrité de la membrane cellulaire, mais une fluorescence FITC haute en raison de la translocation de phosphatidylsérine. Les cellules nécrotiques sont localisées dans le quartier supérieur droit, elles sont caractérisées par une fluorescence d'IP haute et une fluorescence FITC haute.

1.7 Protocole pour l'imagerie confocale et électronique

Afin de réaliser des images au confocal et au microscope électronique, des cellules primaires de rates de C57BL6 ont été ajustées à 5×10^6 cellules/ml et mises en présence des QDs selon la gamme définie précédemment. Des lamelles autoclavées ont été placées dans le fond de plaques 6 puits à fond ronds, puis 125 μ l de QDs (selon les dilutions) et 2.5 ml de cellules ont donc été placées dans chaque puit. Les cellules ont été incubées avec les QDs durant 4h. Puis les cellules ont été fixées, et colorées selon les méthodes suivantes.

- Imagerie avec le microscope confocal

Les cellules ont été fixées avec 4 % de paraformaldéhyde, additionné de 0.1% Triton X-100 dilué dans du PBS durant 10-15 min. Les lamelles ont été rincées avec du PBS, deux fois durant 5 min à chaque rinçage. Les cellules vont être bloquées avec une solution de 1% de BSA durant 10-15 min. Les échantillons ont été rincés avec du PBS deux fois durant 5 min pour chaque rinçage. Après fixation, la coloration a été réalisée avec 5 unités/ml de rhodamine phalloïdine (Invitrogen) dilués dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont été rincé deux fois dans du PBS pendant 5 min. Puis les cellules ont

été colorées avec 5 nM Sytox™ blue (Invitrogen) dilué dans du PBS pendant 5 min. Puis les lamelles ont été montées avec du Prolong™ (Invitrogen). Les lamelles ont ensuite été observées avec un microscope inversé à épifluorescence Nikon TE2000. Les cellules ont été observées avec Nikon Eclipse C1 Plus Confocal Microscope System à 3 canaux de balayage.

-Imagerie avec le microscope électronique

Après le traitement aux nanoparticules, le milieu va être enlevé et les cellules vont être lavées une fois au PBS. Puis, les cellules vont être fixées dans une solution préparée fraîchement de 66.7 mM de tampon cacodylate (pH 7.4) avec 2.5 % de glutaraldéhyde durant 1 heure à température pièce. Après l'incubation, les cellules vont être lavées trois fois avec du PBS durant 10 min à chaque fois. Les échantillons vont être par la suite conservés dans du PBS à 4°C.

La monocouche cellulaire a été post fixée avec 1% de tetroxide d'osmium dilué à 100 mM dans du tampon cacodylate. Puis elles ont été colorées avec 1% d'acétate d'uranyle et lavées avec le tampon. Puis la monocouche cellulaire a été déshydratée selon différents bains d'éthanol, puis les échantillons ont été incorporés dans de la résine époxy et sectionnés à environ 60 nm. Puis les sections ont été colorées avec 4% d'acétate d'uranyle pendant 40 min et fixées avec une solution de citrate de plomb durant 10 min. Les préparations ont été observées avec un microscope électronique en transmission Joël 1230 à 60 kV.

1.8 Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). La différence de viabilité, d'activité et d'efficacité de phagocytose ont été examinées utilisant une analyse factorielle des variations à une voie (ANOVA), lorsque les résultats étaient significatifs, un test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Lorsque les données n'étaient pas normales, un test non paramétrique de Kruskal et Wallis avec mise en rang a été réalisé. Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

2. RÉSULTATS

2.1 Chez le modèle murin C57BL/6

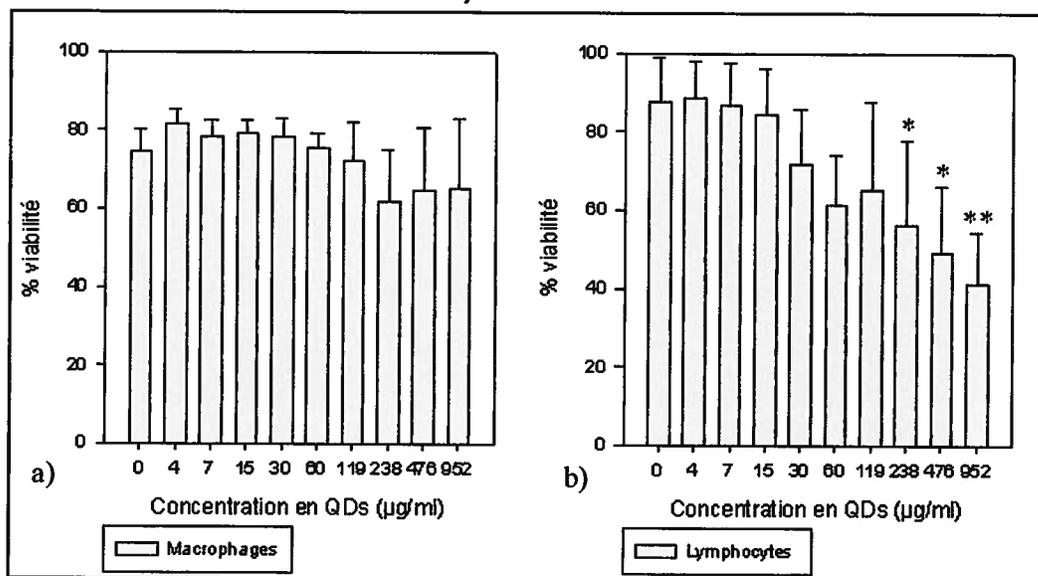


Figure 87 : Résultats liés à l'activité immunitaire chez la souris pour les différents biomarqueurs considérés. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Après 4 heures d'exposition au QDs, les macrophages ne semblent pas affectés par la dose de nanoparticules. Cependant, une faible diminution non significative de la viabilité, pour les concentrations supérieures ou égales à 238 µg/ml est observée. Contrairement pour les lymphocytes, la viabilité est significativement diminuée pour des doses supérieures à 238 µg/ml ($p < 0.05$). D'ailleurs, cette réponse est relativement conservée dans le temps, étant donné la diminution significative de viabilité des lymphocytes à 48h.

Concernant la réponse oxydative, elle est stimulée chez la souris pour les doses de 30 à 60 µg/ml de QDs. La production de thiols est significativement diminuée pour les concentrations supérieures ou égales à 238 µg/ml ($p < 0.05$) (Figure 88). Cependant, si on observe plus en détails la production de thiols, selon une faible gamme de cadmium de QDs (Figure 88 b), une induction de thiols est observée à de faibles concentrations (2.4 µg/ml $p < 0.05$) jusqu'à 19 µg/ml. Les doses de cadmium particulière utilisées comme concentrations de référence diminuent significativement la production de thiols, des macrophages, pour 2.4 µg/ml ($p < 0.05$) et 38 µg/ml ($p < 0.001$) ce qui n'est pas retrouvé avec les QDs (Figure 88 b). De plus, il est à noter que le cadmium des QDs n'a pas d'effet significatif sur la production de thiols par les lymphocytes, contrairement au cadmium particulaire. La flambée oxydative est

significativement diminuée pour une concentration de 38 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) avec les QDs mais aussi avec le cadmium particulaire (Figure 88 c). Il est à noter qu'une augmentation, non significative, de la flambée oxydative est observable dès les premières concentrations de la gamme soit 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 88 c).

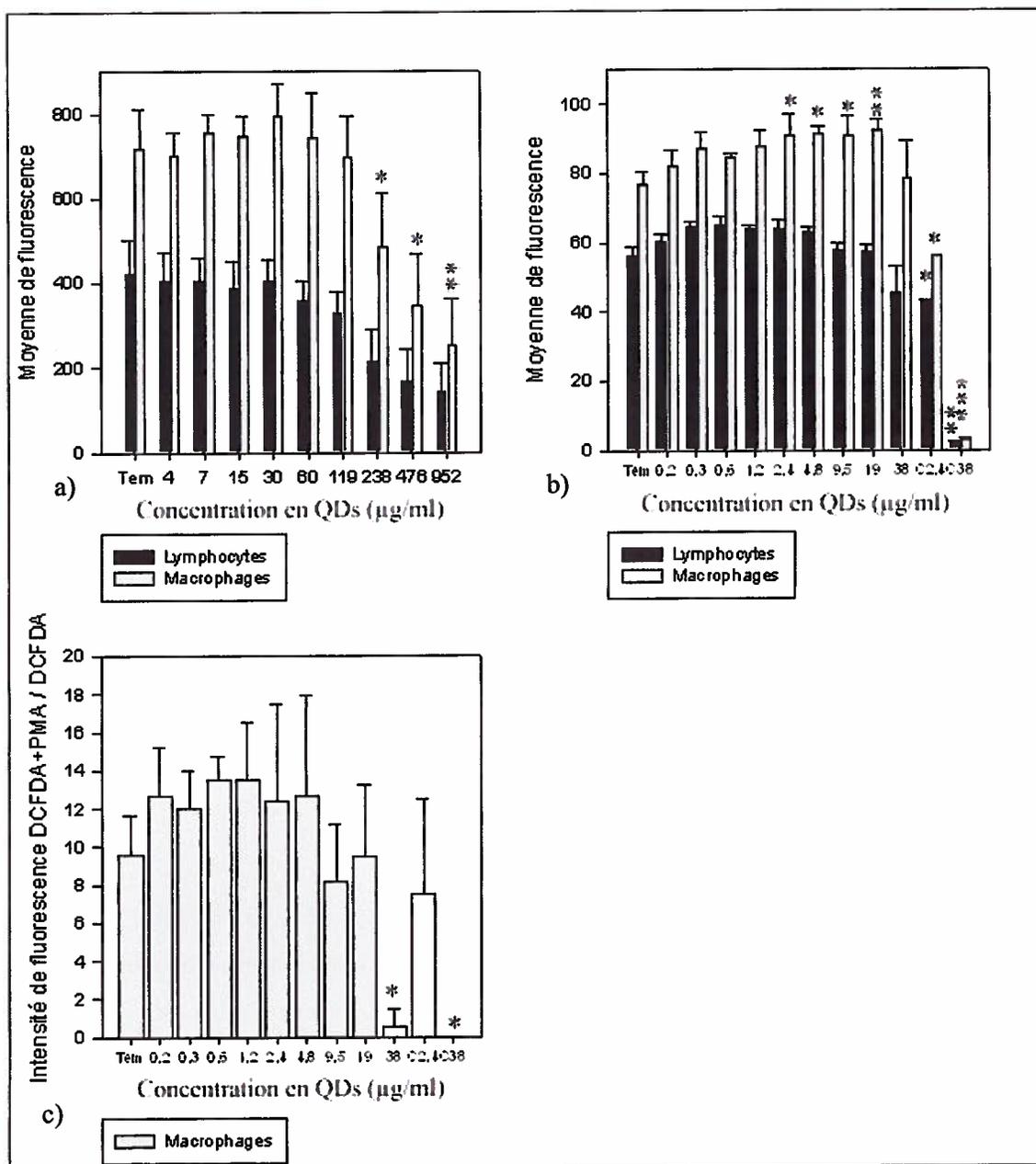


Figure 88 : Réaction oxydative chez la souris exposée aux nanoparticules de cadmium Cd/s Cd/te et au CdCl₂ durant 21h. Les concentrations de CdCl₂ sont annotées avec un C devant la concentration. a) Thiols grande gamme n=3, b) Thiols faible gamme n=4, c) flambée oxydative n=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

2.2 Chez le modèle de bivalve, la moule bleue

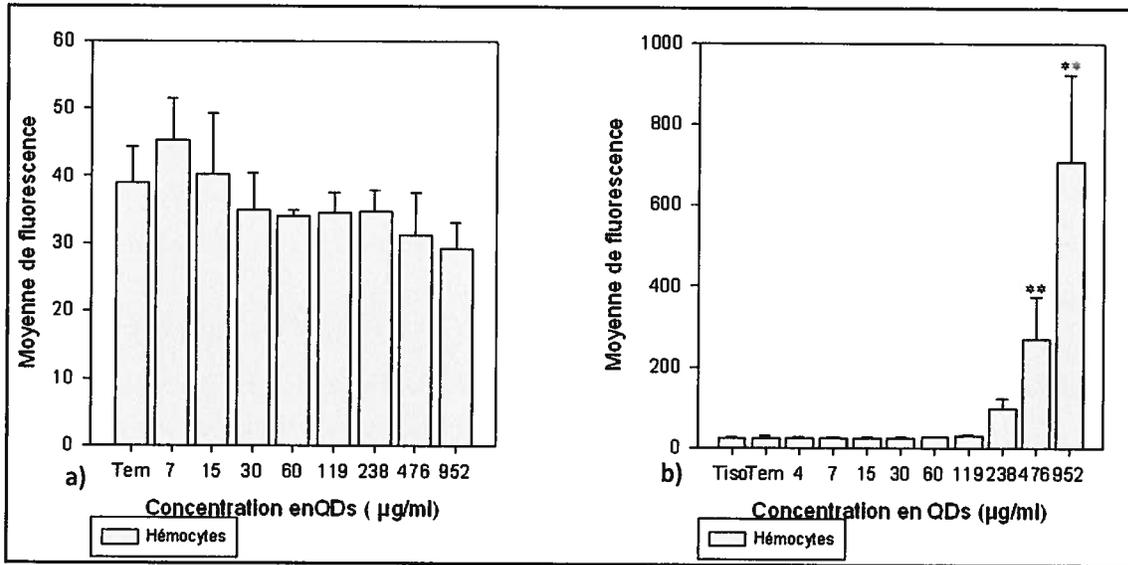


Figure 89 : Réponse immunitaire chez la moule bleue exposée aux nanoparticules de Cd/Te, Cd/S durant 21h. a) Production de thiols n=4. b) Sécrétion de métallothionéines n= 5. * p< 0.05, ** p< 0.001, *** p< 0.0001. T iso = Témoin isotypique. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La production de thiols ne semble pas affectée de façon significative. Cependant, une tendance à la diminution de production est observée pour les deux plus fortes concentrations. De même, une stimulation, non significative de la production de thiols est aussi observable pour 7 et 15 µg/ml (Figure 89 a). En observant la sécrétion de métallothionéines, il apparait en effet, que les trois concentrations les plus fortes soient 238, 476 µg/ml et 952 µg/ml de QDs induisent une sécrétion de métallothionéines, elle est significativement très différente du témoin uniquement pour les deux concentrations les plus fortes (Figure 89b).

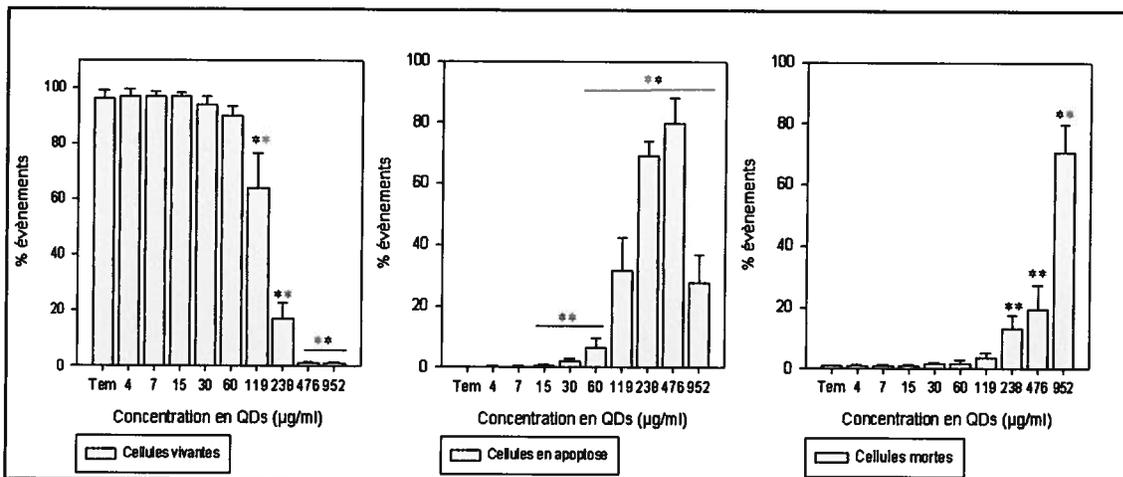


Figure 90: Apoptose pour la moule bleue exposée aux QDs. Pourcentage de cellules viables, mortes et en apoptose. n=5. * p< 0.05, ** p< 0.001. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Les résultats d'apoptose cellulaire chez la moule sont observés à l'aide de deux marquages (Figure 86). Les résultats indiquent une diminution significative de la viabilité des cellules dès 119 $\mu\text{g/ml}$. En parallèle une augmentation significative du nombre de cellules apoptotique est observée dès 15 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 476 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 90). Cependant le pourcentage de cellules apoptotiques diminue à 952 $\mu\text{g/ml}$. Finalement, le pourcentage de cellules nécrotiques augmente significativement dès 238 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 90).

2.3 Altération cellulaire

Afin de mieux cerner l'action des nanoparticules sur les cellules immunitaires, des images au confocal et au microscope électronique en transmission ont été réalisées avec la collaboration de Santé Canada (Ottawa). Il est très important de caractériser l'action des nanoparticules et de plus en plus d'études s'intéressent à la localisation, à la mobilisation et à l'élimination de nanoparticules une fois entrée dans le système sanguin.

Selon le marquage des cellules, la phalloïdine marque les filaments d'actine et la rhodamine le noyau (Figure 91). Les résultats du microscope confocal, sur les macrophages de souris indiquent que les cellules témoins sont bien homogènes, la membrane cellulaire est bien différenciable du noyau. Cependant, dès 7,42 $\mu\text{g/ml}$ les images au confocal indiquent un remaniement des filaments d'actine. Ce remaniement est aussi visible à 14,84 $\mu\text{g/ml}$ et 118,75 $\mu\text{g/ml}$ de QDs. De même, selon les images, l'intégrité du contenu cellulaire et du noyau semble détérioré. À 237,50 $\mu\text{g/ml}$, la membrane cellulaire semble granuleuse et un remaniement complet des filament d'actine est aussi observable (Figure 91).

-Au confocal

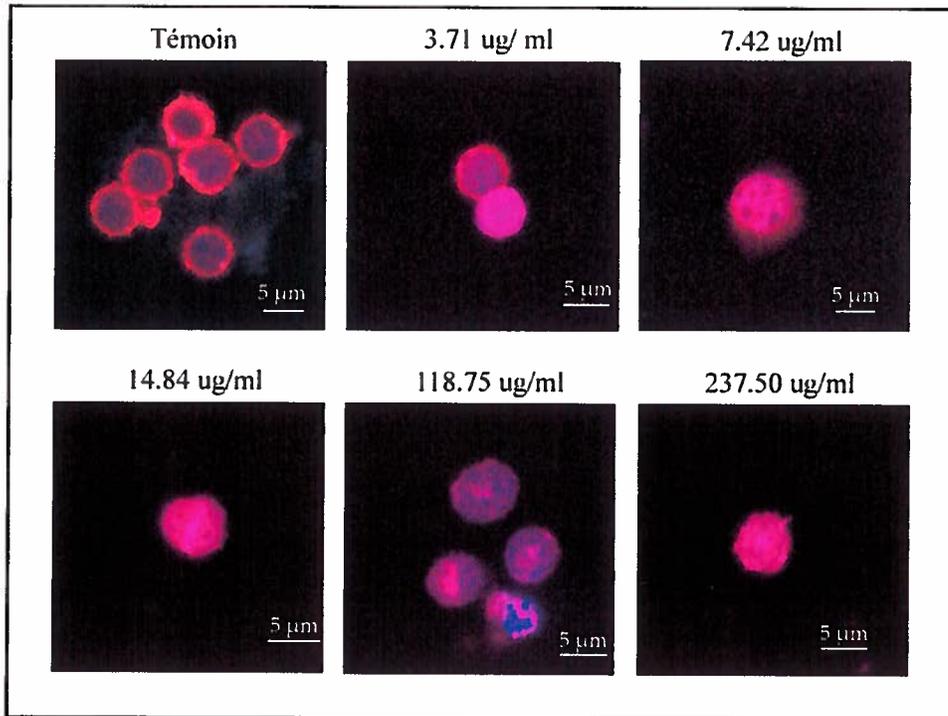


Figure 91 : Marquages de phalloïdine et de rhodamine sur des macrophages de souris. Les cellules ont été exposées durant 3 heures aux différentes concentrations. Des altérations des filaments d'actine sont observables au fur et à mesure de l'augmentation de concentration.

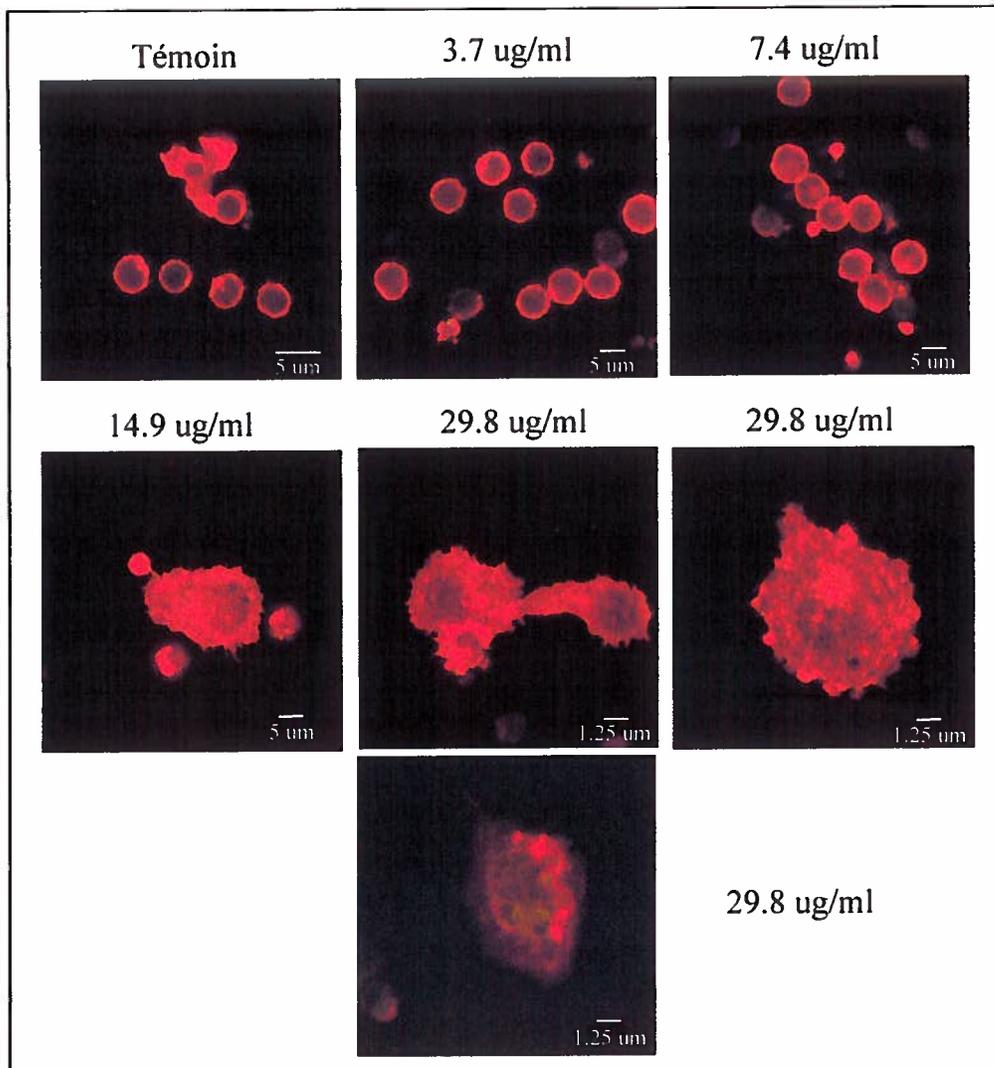


Figure 92 : Macrophages de souris exposés aux différentes concentrations de QDs durant 3h. Les cellules sont marquées avec de la phalloïdine et de la rhodamine. L'internalisation des QDs, fluorescents en vert est remarquée pour les cellules. L'intégrité cellulaire est altérée dès 14.84 µg/ml.

Les cellules témoins (incubées sans QDs) présentent une forme bien ronde et ont une bonne intégrité membranaire (Figure 92). À 3,7 µg/ml et 7,4 µg/ml aucun changement majeur n'est noté dans l'intégrité membranaire des cellules. Les nanoparticules sont visibles dans la cellule dès 3,7 µg/ml de QDs. À 14,9 µg/ml, la cellule présente une altération de sa membrane, le contour de la cellule semble moins lisse, de même des phénomènes de bourgeonnements sont observables avec un détachement du contenu cellulaire dans le milieu de culture. À 29.68 µg/ml, des altérations de la membrane cellulaire avec présence de vacuoles attestent un remaniement du cytosquelette et des phénomènes apoptotiques (Figure 92).

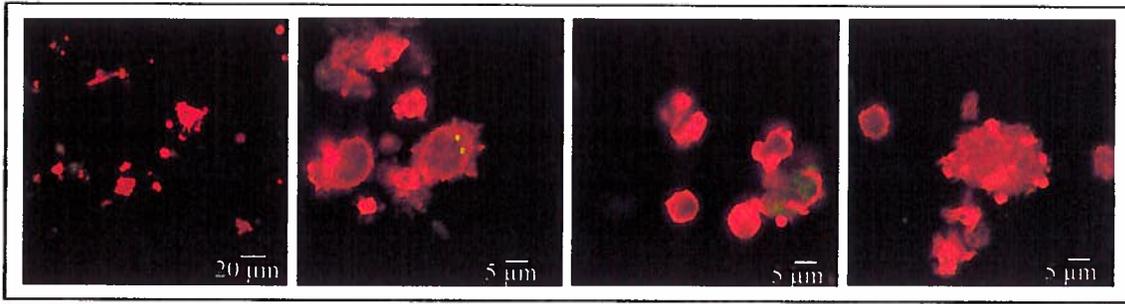


Figure 93 : Macrophages de souris exposés à 118.75 µg/ml de cadmium contenu dans les QDs.

L'intégrité cellulaire des macrophages de souris est très altérée pour 118.75 µg/ml (Figure 93). Sur les différentes images on peut remarquer que l'intégrité membranaire est rompue, de plus les cellules présentent des bourgeonnements à leur surface. Les différentes images indiquent aussi la présence de nanoparticules dans les macrophages de souris et leur exocytose lors du relargage du contenu cellulaire.

-au TEM

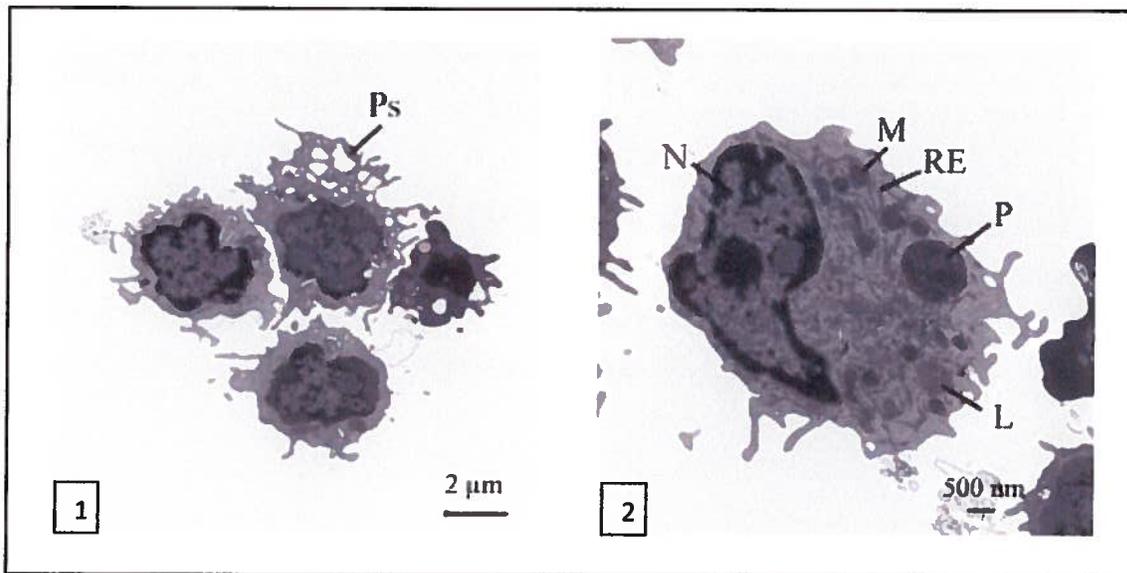


Figure 94 : Visualisation des cellules de macrophages de souris non exposés aux nanoparticules d'argent. Grossissement 1 × 1500 et 2 × 2500. N = Noyau, Ps= Pseudopodes, P= Phagolysosome, M= Mitochondrie, RE= Réticulum endoplasmique, L= Lysosome.

Les cellules témoins sont homogènes et présentent une activité phagocytaire, sur la photo de gauche des pseudopodes sont identifiables. Les organites cellulaires sont bien définis (Figure 94). Les macrophages exposés à 4,46 µg/ml d'AgNPs indiquent une grande activité phagocytaire, de nombreux pseudopodes sont visibles à la surfaces des cellules (images 1 et

2). De plus, de nombreux pseudopodes sont observables lorsque les cellules sont mises en contact les unes des autres. L'image 1 montre que le nucléole est visible dans le noyau cellulaire (Figure 95).

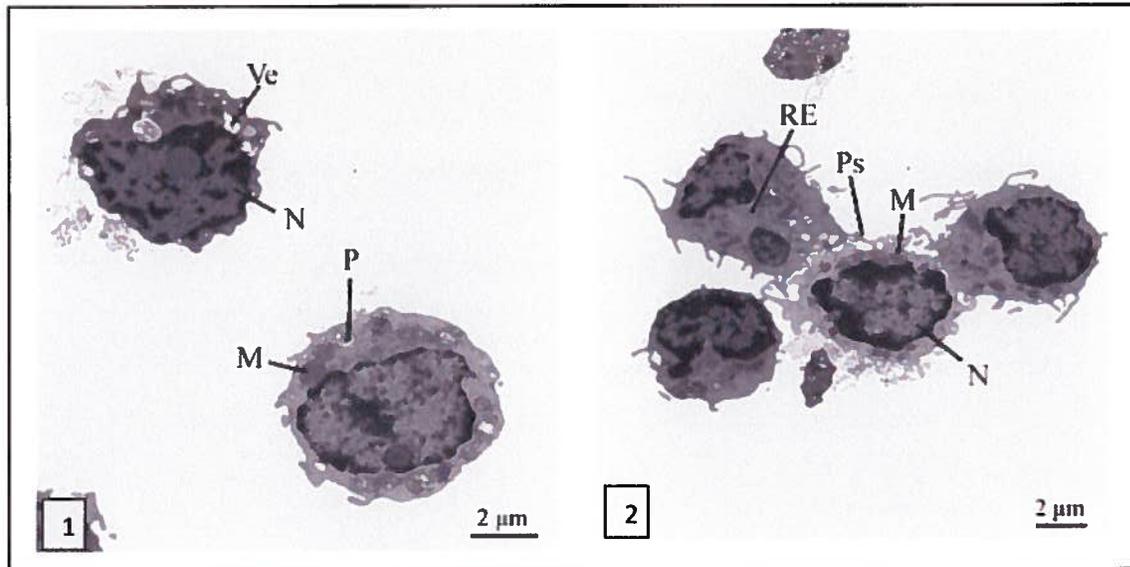


Figure 95 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 4,46 µg/ml de nanoparticules. Grossissement 1 × 1500 et 2 × 1200. N = Noyau, Ps= Pseudopodes, P= Phagolysosome, M= Mitochondrie, RE= Réticulum endoplasmique, L= Lysosome, Ve= Vésicule d'endocytose.

Les macrophages exposés à 8,9 µg/ml d'AgNPs (Figure 96), présentent au niveau du noyau des phénomènes de condensation de la chromatine. De nombreux pseudopodes sont visibles à la surface de la cellule. Des vésicules d'endocytose sont aussi visibles (images 1 et 2). Sur certaines cellules le nucléole est encore visible (image 1)

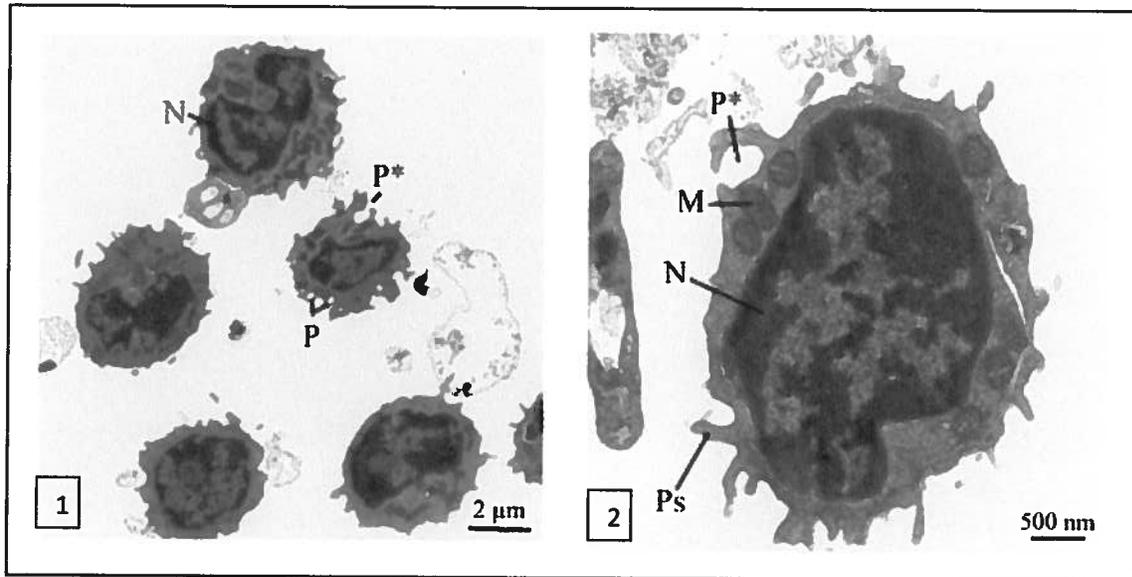


Figure 96 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 8,93 $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticules. Grossissement 1 \times 1500 et 2 \times 5000. N = Noyau, Ps= Pseudopode, P*= Phagosome en formation, P= Phagolysosome, M= Mitochondrie.

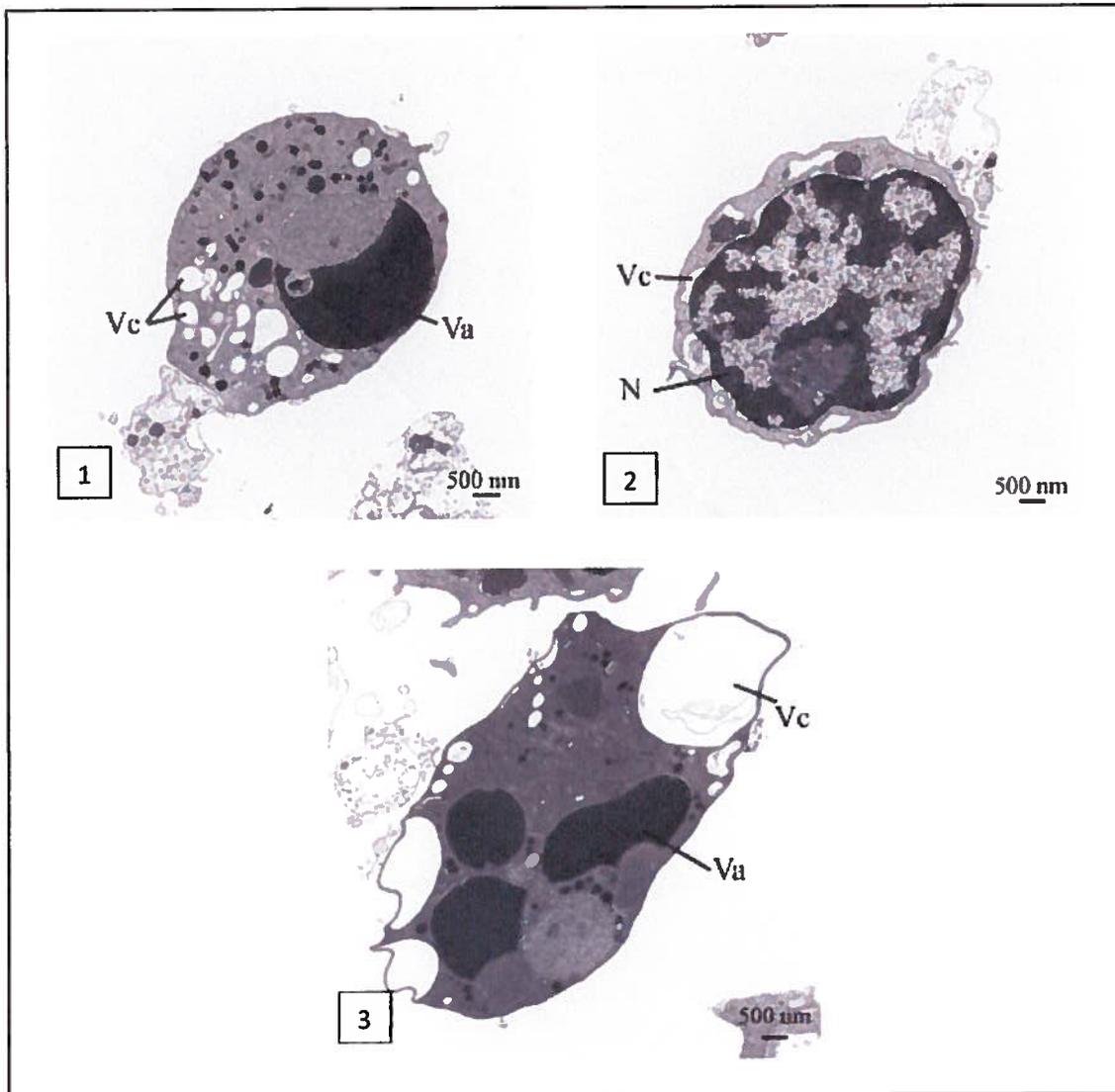


Figure 97 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 17,85 µg/ml de nanoparticules. Grossissement 1, 2 et 3 × 2500. N = Noyau, Vc = Vacuole cytosolique, Va = Vacuole autophagique.

À 17,85 µg/ml d'AgNPs une condensation de la chromatine est observée (image 2). Le nucléole présent dans le noyau cellulaire n'est plus visible. Des vacuoles sont aussi visibles dans la cellule (images 1 et 2). De plus, dans la figure 1 aucune mitochondrie n'est visible dans la cellule indiquant un phénomène de rupture des mitochondries (Figure 97).

En observant les photos des macrophages exposés aux concentrations les plus fortes, un phénomène d'apoptose est observé. En effet, des vacuoles sont formées dans les cellules, ces vésicules contiennent du matériel cellulaire. La première photo indique le résultat d'une

cellule apoptotique. Les autres images montrent que les cellules se fragmentent et que le noyau cellulaire est aussi fragmenté (Figure 98).

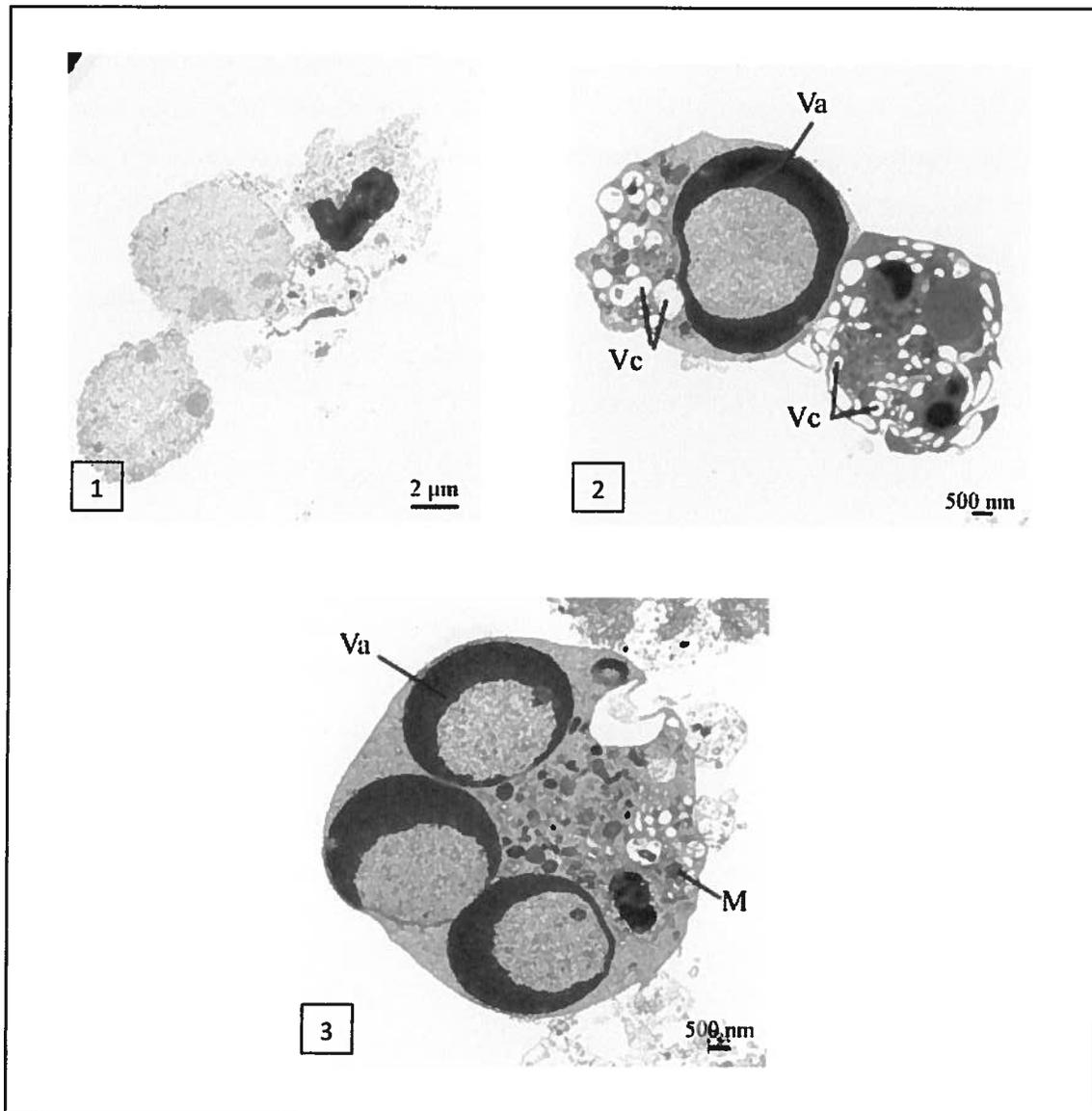


Figure 98 : Visualisation des cellules de macrophages de souris exposés aux AgNPs à 35,7 µg/ml de nanoparticules. Grossissement 1 × 1200 ; 2 × 2000 et 3 × 2500. N = Noyau, Vc = Vacuole cytosolique, Va = Vacuole autophagique, M= Mitochondrie.

3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS SUR LES ALTÉRATIONS CELLULAIRES

Les résultats obtenus dans ce chapitre, pour les QDs et les AGNPs selon les différents modèles d'étude indiquent que les NPs induisent une perturbation des mécanismes cellulaires. Selon nos résultats, la viabilité des lymphocytes de souris est significativement diminuée après 4 heures d'incubation avec les QDs. Ces résultats ne sont pas retrouvés pour les macrophages dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi nos résultats démontrent que selon les types cellulaires les nanoparticules ont des actions mécanistiques différentes. Ainsi, les nanoparticules de cadmium sont susceptibles d'induire une plus forte toxicité chez les lymphocytes T que chez les macrophages.

De plus nos résultats démontrent que les macrophages de souris mis en présence de QDs induisent la production d'espèces oxygénées réactives. Cette production d'EOR ne diminue significativement qu'à partir de 38 µg/ml. Ainsi les macrophages de souris sont capables d'induire un stress oxydatif. D'autre part, selon nos résultats cette production et diminution d'EOR est similaire à celle induite par du cadmium dissous. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lovric et al, 2005 ont démontré que les QDs induisaient la production d'EOR dans le milieu de culture par les cellules (cancer de sein humain). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Park et al, (2009). Ces auteurs ont observé une production d'EOR une lignée des macrophages de souris activées lors de la mise en contact avec des nanoparticules de silice (Park and Park 2009).

Rappelons que les nanoparticules sont bien connues pour induire des phénomènes de stress oxydatif (Hardman 2006; Nel, Xia et al. 2006; Oberdörster 2007). La réduction de l'oxygène a lieu dans la cellule au niveau de la mitochondrie, ce qui génère la production d'espèces oxygénées réactives, comme les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, des radicaux oxygène seuls, des ions hydroxyles, hyperoxydes phospholipidiques qui s'accumulent lors d'un phénomène d'auto-oxydation (Latinwo, Badisa et al. 2006). Ces oxydants étant néfastes à la cellule lorsqu'ils sont produits en grande quantité, des antioxydants sont aussi produits par la cellule. Les meilleurs éliminateurs d'O₂ sont superoxydes dismutases microbiennes, la catalase, le glutathion, les peroxyrédoxines (Romeo, Bennani et al. 2000; Orbea, Ortiz-Zarragoitia et al. 2002; Prevodnik 2007). Quand les cellules sont sous stress oxydatif, la catalase, le glutathion réductase et la peroxydase sont altérées. Les espèces oxygénées réactives jouent à la fois deux rôles : bénéfiques et délétères. Les EOR peuvent être générés

de manière exogène (mise en présence de cadmium par exemple) ou endogène (Latinwo, Badisa et al. 2006). Il est important de noter que la production d'EOR peut se faire selon différentes voies : lors d'une excitation lumineuse, le QDs peut perdre un électron et le transférer à un oxygène (Cho, Maysinger et al. 2007), d'autre part les antioxydants naturels peuvent endommager directement les QDs. Ces dommages sur la particules entraînent de ce fait la présence de Cd^{2+} dans le milieu qui peuvent engendrer la production de EOR (Li, Chen et al. 2009). Ainsi l'un des premiers mécanismes de toxicité des nanoparticules est la formation de radicaux libres (Green 2005; Rzigalinski and Strobl 2009).

En réponse au phénomène de stress oxydatif observé précédemment, nos résultats indiquent que les macrophages de souris sont capables de sécréter des thiols à faible doses (2.4 $\mu\text{g/ml}$ de QDs). À forte concentration la production de thiols est inhibée (38 $\mu\text{g/ml}$ de QDs). Il est essentiel de rappeler que le glutathion (GSH) est aussi un thiol. Les thiols sont des petites protéines responsables de contrer les effets néfastes du stress oxydatif, ces anti-oxydants sont capables de se lier à environ 50-70 % des EOR comme les groupements -OH produits par la cellule (McDonagh 2007). Les résultats obtenus avec les macrophages de souris sont en accord avec ceux de Li et al, (2009) qui avait observé une stimulation de la production de thiols chez une lignée cellulaires de poumons de hamster (Li, Chen et al. 2009). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Park et al, (2009), les auteurs observaient une diminution de la production de thiols (GSH) en fonction de l'augmentation de la production de EOR (Park and Park 2009). Ainsi ces résultats confirment que les performances du système immunitaire peuvent être diminuées à fortes dose de contaminants. Principalement le relargage des ions comme les ions cadmium, est lié à la production d'EOR et peut induire, à de fortes doses, une diminution de la production d'antioxydants.

Afin de contrer les effets néfastes des ions cadmium, des cystéines sont souvent produites afin de séquestrer les métaux. Les métallothionéines sont des protéines riches en cystéines, le test des métallothionéines est très utilisé comme biomarqueur des expositions métalliques, il est très spécifique et sensible aux métaux, il est induit en réponse à des fortes concentrations en métaux (Chae, Pham et al. 2009). Son rôle est très important dans la séquestration de composants inorganiques. Nos résultats indiquent que les fortes concentrations de QDs induisent une sécrétion de MTs chez les hémocytes de moules. L'induction des métallothionéines protège les cellules contre la toxicité du métal, ils agissent dans la protection contre les dommages liés au stress oxydatif (Klaassen and Liu 1998). Les métallothionéines sont donc un moyen de protection de l'organisme lorsqu'il est mis en

présence de métal. Les métallothionéines sont bien connues pour être sécrétées surtout dans les épisodes de contaminations au cadmium. La tolérance aux fortes concentrations en cadmium pourrait être attribuable aux métallothionéines. En effet, il est connu qu'une mole de thionéines peut se lier à 7 moles de Cadmium (Swiergosz-Kowalewska 2001). Ceci est retrouvé avec les résultats de production de thiols chez les moules. Selon nos résultats, la production de thiols diminue de façon non significatives indiquant que les organismes sont encore adapte à séquestrer des ions cadmium via les métallothionéines. L'induction de métallothionéines par les ions Cd^{2+} a déjà été observé chez la moule bleue dans des études précédentes (Dailianis and Kaloyianni 2007). Cependant, selon les études de Scholtz et al, (1980), un phénomène de saturation des métallothionéines pour des concentrations de 1.5 $\mu g/ml$ de cadmium est observé. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés dans ce chapitre, ce qui démontre une différence de comportement des métallothionéines avec des QDs et du Cd dissous. Il est intéressant de rappeler que dans le deuxième chapitre, les hémocytes de moules étaient moins sensibles aux QDs qu'au cadmium dissous. Ainsi nos résultats mécanistiques concernant la production de métallothionéines sont en accord avec les paramètres immunitaires observés dans les chapitres précédent. De plus, selon nos résultats, la production de thiols semble diminuer alors que la production de métallothionéines augmente significativement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zaroogian et al, (2000), ces auteurs suggéraient que la production de métallothionéines intervenait lorsque les concentrations interne de GSH n'étaient plus aptes a contrôler les ions métalliques libres (Zaroogian and Jackim 2000; Ciocan and Rotchell 2004).

Par ailleurs, il a été démontré dans la littérature que la production d'EOR induite par les QDs pourrait agir sur l'intégrité de la membrane mitochondriale, sur les enzymes de phase II et provoquant des phénomènes inflammatoires. Finalement cette cascade de réactions entraine des dommages membranaires internes à la cellule, augmente la perméabilité de celle-ci (et donc la perte d'énergie), et induit des phénomènes d'apoptose et de nécrose (Nel, Xia et al. 2006). Afin d'observer ces phénomènes nous avons utilisé dans notre projet les propriétés spécifiques des nanoparticules. Les points quantiques sont de très bonnes sondes utilisées en imagerie confocale en raison de leurs fluorescences (Sutherland 2002; Wu 2003). Ainsi il est donc possible d'observer différentes types cellulaires et incuber avec des QDs (Chan 2008). Selon nos résultats de confocal, les QDs pénètrent dans la cellule dès les plus faibles concentrations d'exposition, après 24h d'exposition, cependant il ne nous ait malheureusement pas possible d'identifier précisément dans quel compartiment cellulaire les

QDs sont retrouvés. Selon nos images, les nanoparticules sont principalement présentes dans le cytoplasme cellulaire. Nos résultats concernant l'assimilation nanoparticulaire sont en accord avec les résultats de Ryman Rasmussen et al., (2006) qui observait aussi une internalisation des QDs après 24h d'exposition (Ryman-Rasmussen, Riviere et al. 2006). Selon les études de Aaron et al, (2011) les nanoparticules QDs se localisent surtout dans la membrane et rentraient lentement dans le cytoplasme (Aaron, Greene et al. 2011a). D'autre part, nos résultats indiquent que l'intégrité membranaire des macrophages de souris diminue avec l'augmentation en concentration des QDs. En effet dès 14,9 µg/ml les cellules présentent des altérations de la membrane et des phénomènes de bourgeonnements sont observables avec un détachement du contenu cellulaire dans le milieu de culture. De plus, à 29.68 µg/ml, la présence de vacuoles atteste un remaniement du cytosquelette et des phénomènes apoptotiques des phénomènes nécrotiques sont aussi observables à 118,75 µg/ml. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui indiquent que les mécanismes de mort cellulaire les plus communs, associés aux QDs sont l'apoptose et la nécrose (Maysinger 2007). Les études de Lovric et al, 2005 ont démontrées qu'en présence de QDs les cellules de cancer du sein humaines n'exprimaient pas les caspases-3 mais doivent exprimer des protéines membres de la famille des caspases (Lovric, Cho et al. 2005b). L'activation des caspases est le phénomène classique se produisant dans le déclenchement de l'apoptose. Elle repose sur l'activation successive des caspases-9, -7 et -6. L'apoptose est un phénomène cellulaire considéré naturel, il permet à l'organisme d'éliminer les cellules qui seraient endommagées (matériel génétique par exemple) (Waalkes 2003). L'apoptose présente les caractéristiques suivantes : bourgeonnement de la membrane plasmique, diminution du volume de la cellule, formation de corps apoptotiques, préservation du contenu lysosomal, fragmentation internucléosomale de l'ADN. Contrairement, la nécrose présente les caractéristiques suivantes : perte de l'intégrité membranaire, gonflement de la cellule, lyse de la cellule, libération du contenu lysosomal ; digestion aléatoire de l'ADN (Mohamad, Gutiérrez et al. 2005).

Selon nos résultats, suite à la coloration à la phalloïdine, les macrophages subissent des remaniements du cytosquelette, une vacuolisation du contenu cellulaire, une évacuation du contenu cellulaire via un phénomène de nécrose et une fragmentation de la cellule, lyse via un phénomène d'apoptose. Les cellules sont formées de filaments d'actines arrangés selon un réseau complexe formant le cytosquelette. Il est donc aisé, à l'aide de fluorescéines isothiocyanate phalloïdine, de visualiser les filaments d'actine de cellules. La phalloïdine est

un petit composé stable qui va se lier au complexe F de l'actine (Verderame, Alcorta et al. 1980). Selon nos résultats, l'intégrité cellulaire des macrophages de souris est très altérée pour 118,75 µg/ml de QDs. Les particules exposées à une forte dose de QDs présentent beaucoup de nanoparticules dans leur cytoplasme indiquant une saturation de celui-ci en QDs, sûrement à l'origine des phénomènes de nécrose observés. D'autre part, la structure membranaire des cellules sur les photos semble très altérée. En réalité les nanoparticules changent la morphologie cellulaire, ceci avait déjà été observé par Lovric et al, 2005 sur des cellules de rats (PC 12) (Lovric 2005a). Il a été démontré que les altérations cellulaires portaient principalement sur les filaments d'actine. On sait que ces filaments sont très utilisés pour la phagocytose chez le macrophage (Dobrovol'skaia and McNeil 2007). D'autre part, le premier chapitre présentait une altération de la réponse immunitaire innée lors de l'augmentation de la dose de QDs (augmentation de la dose de cadmium). Ainsi, nous avons une confirmation visuelle de la perturbation de la fonction phagocytaire des macrophages (ou des monocytes) lors d'une exposition aux QDs. De plus, la diminution de phagocytose pourrait être liée à la cytotoxicité (lyse cellulaire ou mort cellulaire) mais aussi à la perturbation de récepteur de surface de la membrane des cellules immunitaires perturbant ainsi l'assimilation des QDs. L'apoptose et la nécrose sont donc observables sur les résultats du confocal, ces résultats viennent confirmer visuellement les résultats obtenus par les biomarqueurs d'apoptose chez les moules bleues. En effet à forte concentration une augmentation des cellules apoptotiques est observée. Cette observation serait liée à la toxicité des nanoparticules et des ions Cd²⁺ (potentiellement relargué suite à l'oxydation de la particule). En effet il a été démontré par que le cadmium agit comme un agent induisant l'apoptose (Rana 2008). D'autre part nos résultats indiquent que la concentration en cadmium induit, à dose moyenne, des phénomènes d'apoptose (dès 15 µg/ml à 476 µg/ml) et, à forte dose, des phénomènes de nécrose (dès 238 µg/ml à 952 µg/ml). Ces résultats sont en accord avec ceux de Sokola et al, (2004) chez les hémocytes d'huitres, les auteurs avaient aussi remarqué à forte concentration de cadmium une diminution de l'apoptose au profit d'une augmentation en nécrose (Sokolova, Evans et al. 2004). Ce changement de mécanisme est confirmé par nos résultats, il est spécifique à une exposition au cadmium. Cependant selon ses mêmes auteurs l'IC 50 des hémocytes d'huitre était de 50 µmol/l de Cd (soit 5,62 µg/ml), ce résultat est bien inférieur à ceux retrouvés dans notre étude. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que Sokolova et al, (2004) avaient exposé les cellules durant 72 heures, cette durée est bien supérieure à notre temps d'incubation et donc est susceptible d'augmenter la toxicité du Cd dans le temps. De plus,

cette différence de résultats confirme que les QDs et le Cd^{2+} ont les mêmes mécanismes de toxicité mais pas les mêmes seuils d'action.

Concernant les résultats au microscope électronique des nanoparticules d'argent, ceux-ci démontrent que les atteintes cellulaires sont variables selon les doses d'AgNPs. En effet dès 4.46 $\mu\text{g/ml}$ des phénomènes de stimulation phagocytaires sont observés. En fonction d'une dose croissante en AgNPs on observe une gradation des effets néfastes des nanoparticules sur les macrophages de souris (condensation de la chromatine < lyse mitochondriale < vacuolisation du contenu cellulaire < fragmentation de l'ADN et du contenu cellulaire). Nos résultats sont en accord avec ceux de Miura et al, (2009), les auteurs ont démontrés que les AgNPs étaient capable d'induire de l'apoptose sur une lignées de cellules humaines (HeLa S3) dès 60 $\mu\text{g/ml}$ (Miura and Shinohara 2009). Cependant selon nos résultats les premiers signes d'apoptose (condensation de la chromatine) sont observés dès 8,9 $\mu\text{g/ml}$ et s'intensifie à 17,85 $\mu\text{g/ml}$ (lyse des mitochondries). Ces différences de réponses pourraient être liées à la nature des cellules. Cependant nos résultats sont en accord avec l'étude de Braydich-Stolle et al, (2005), ces auteurs observent des phénomènes d'apoptose sur des cellules C18-4 d'humain entre 5 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$ d'AgNPs (Braydich-Stolle 2005). Les doses retrouvées sont identiques à celles retrouvés dans nos résultats.

4. Conclusions sur les actions mécanistiques

Les différentes sections de ce chapitre ont permis de valider plusieurs hypothèses et de mieux interpréter la toxicité des QDs et des AgNPs. Nos résultats indiquent que le cadmium contenu dans les QDs et la dégradation des NPs dans le temps induisent des réponses immunitaires. En effet, les nanoparticules peuvent se dégrader et donc induire une toxicité liée aux métaux qu'elles contiennent (Derfus 2004; Kirchner 2005; Li, Chen et al. 2009). Ceci est d'autant plus inquiétant que le cadmium possède un temps de résidence long dans l'organisme (15 ans). De plus cette durée est accrue par la présence des métallothionéines (Waalkes 2003). En raison de leur forte affinité pour les groupements SH^- , les Cd^{2+} posent donc une menace pour la santé humaine. Ainsi nos résultats indiquent que les QDs sont susceptibles de causer les mêmes perturbations que le cadmium dissous (Joseph 2009) mais à des doses différentes.

De plus, les nanoparticules peuvent générer des EOR (Lovric, Cho et al. 2005b; Cho, Maysinger et al. 2007). Selon nos résultats, les QDs induisent un stress oxydatif lorsqu'ils sont mis en présence de macrophages de souris ou d'hémocytes de moules. En effet, les

nanoparticules sont connues pour induire des phénomènes de stress oxydatif (Hardman 2006; Nel, Xia et al. 2006; Oberdörster 2007). Cette production d'EOR est liée à l'oxydation de la particule elle-même ou à sa dégradation dans le milieu et/ou dans la cellule (Derfus 2004). D'autre part, l'activation de la phagocytose par les macrophages, mis en présence et de QDs, suggère aussi le déclenchement de la production d'EOR.

Les résultats de ce chapitre nous indiquent aussi que les nanoparticules sont internalisées dans les cellules immunitaires et peuvent induire des phénomènes de mort cellulaire à fortes doses. Les mécanismes de mort cellulaire les plus communs, associés avec les nanoparticules sont l'apoptose et la nécrose (Maysinger 2007) Ceci qui est retrouvé dans nos résultats d'imagerie confocale et électronique, mais aussi pour les biomarqueurs d'apoptose.

Ainsi, les nanoparticules, que ce soient les QDs ou les AgNPs présentent des risques de toxicité, selon les concentrations, pour les mammifères et les bivalves. Elles déclenchent pour ces cellules une cascade de mécanismes de cytotoxicité relative aux métaux contenus dans les particules et à la particule elle-même.

CHAPITRE 4 : TOXICITÉ DES NANOPARTICULES EN FONCTION DES STRESS ENVIRONNEMENTAUX

INTRODUCTION DU CHAPITRE 4

Les chapitres précédents ont permis de démontrer une toxicité des nanoparticules (NPs) selon la dose, la taille, la forme des particules. Ce chapitre quatre sera axé sur des cas pratiques de contaminations aux NPs avec des organismes provenant directement de multiples milieu de vie, soumis à des pollutions chimiques ou non. En effet, dans la nature la plupart des organismes sont exposés à divers contaminants. Qu'ils soient une source de contaminations chroniques ou aiguës, les polluants peuvent donc influencer les conditions de vie des organismes présents dans le milieu environnant. Tout au long de la thèse nous nous sommes intéressées à différents modèles d'études, dans le milieu marin les bivalves filtreurs sont reconnus pour leur utilisation afin d'évaluer la toxicité de produits chimiques qui y sont présents (Domart-Coulon, Auzoux-Bordenave et al. 2000). Ainsi les bivalves sont souvent considérés comme de très bon bioindicateurs de la qualité de l'eau (Phillips 1976; Brousseau, Pellerin et al. 2000; Mubiana 2006). Cependant, du fait de leur mode de vie sessile et de leur capacité à filtrer la colonne d'eau, ces organismes sont les premiers à être exposés aux polluants de l'eau.

Il existe beaucoup de zones marines contaminées dans le monde, ces zones sont souvent situées proches des zones urbaines, industrielles ou portuaires. De nombreux contaminants chimiques présents dans l'eau sont considérés comme des immunosuppresseurs (Krzystyniak, Tryphonas et al. 1995; Auffret, Mujdzic et al. 2002). Ainsi les organismes sont souvent stressés par leur milieu de vie et il est donc important de réaliser des suivis de terrain afin de pouvoir évaluer la santé des espèces de bivalves et ce d'autant plus que certaines d'entre elles sont des espèces commerciales telles que *Mytilus edulis* (Ross and Nisbet 1990; Koehn 1991).

Afin d'évaluer le statut d'espèce sentinelle, des suivis de terrain sont menés dans les zones les plus « à risques ». Au Québec et plus particulièrement dans le fjord du Saguenay, des missions sont organisées afin d'évaluer la condition de vie des moules et des myes selon différents sites d'échantillonnage. Les sites du Saguenay sont situés le long des voies maritimes commerciales, entre les industries du fjord et le fleuve Saint Laurent.

D'autre part, en France, le port de Brest est bien connu pour sa base militaire, les sédiments du port de Brest sont aussi reconnus pour leur contamination au TBT (Michel and Averty 1997). Ainsi, selon Michel et al, 1997 les plus fortes concentrations de TBT sont retrouvées près des chantiers navals dans le port militaire et de commerce mais aussi et malheureusement au niveau du port de plaisance (malgré l'interdiction d'usage de TBT pour

les bateaux de moins de 25 mètres). D'autre part, des études de Guillou et al, 2000 ont déjà démontré une accumulation de différents métaux dans les tissus des oursins en rade de Brest (Guillou, Quiniou et al. 2000).

Afin d'étudier l'effet des composés chimiques toxiques sur le système immunitaire des bivalves, des biomarqueurs vont être utilisés. Les biomarqueurs sont de plus en plus utilisés. La phagocytose des hémocytes de bivalves, par exemple, est reconnue comme un très bon biomarqueur pour les contaminations chimiques (Fournier, Cyr et al. 2000; Fournier and De Guise 2004; Perceval, Couillard et al. 2004; Lemaire and S. Cartier 2006). Il est donc très important de pouvoir utiliser ces outils à la fois dans les études *in vitro* au laboratoire, mais aussi de l'appliquer en pratique en *in situ*. En effet, il est important de considérer l'environnement des bivalves, ce qui ne peut être considéré dans une étude *in vitro* en laboratoire. Il est important de mentionner que d'autres paramètres environnementaux influencent les conditions de vie des bivalves (Thorarinsdottir 2003; Norkko 2005). Lors des périodes d'exposition à l'air, les moules sont susceptibles de réduire leur métabolisme de 5% environ (Demers and Guderley 1993). Les conditions d'hypoxie et de disponibilité de la nourriture sont aussi deux facteurs essentiels à la santé des espèces marines (Norkko 2005).

Ainsi, le but de ce chapitre va être de combiner l'étude des populations de moules sélectionnées selon leur différents habitats et l'action des NPs. Actuellement, aucune étude n'a été menée sur des individus de terrain soumis à des conditions de vie hostiles et à d'autres contaminants tel que les NPs. A partir de l'hypothèse que les perturbations environnementales dont notamment les contaminations chimiques peuvent altérer le fonctionnement du système immunitaire, nous allons vérifier que cette situation peut accentuer la sensibilité des hémocytes à une contamination expérimentale par des NPs. Ainsi nous pourrons démontrer la vulnérabilité des populations naturelles de milieux anthropisés à des stress chimiques additionnels.

Il est très intéressant d'évaluer le comportement des hémocytes de moules bleues dans des conditions de *stress on stress*, ou double stress (stress causé par un organisme déjà stressé par son milieu ou par une pollution environnementale), et de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus dans le laboratoire. En effet, les altérations du système immunitaire le prédispose aux infections virales, bactériennes, aux cancers (Krzystyniak, Tryphonas et al. 1995) mais les rend aussi plus vulnérables à des contaminants chimiques comme les NPs.

Mise en contexte du site du Saguenay

Le fjord du Saguenay est considéré comme un estuaire profond creusé par le retrait d'anciens glaciers (Tremblay 1971; Gilbert 2000). À l'époque Quaternaire, des glaciers ont façonné le fjord du Saguenay lui donnant ainsi le relief de la vallée glaciaire et l'aspect d'un fjord. Le fjord du Saguenay, situé sur une ancienne dépression tectonique, s'étend sur une longueur de 65 kilomètres et sur une largeur variant de 1 à 6 km (Côté 1981). Le fjord possède des caractéristiques spécifiques, sa topographie présente trois seuils : un seuil de faible profondeur à l'embouchure (20 m) (en aval) et de deux seuils internes de 65 et 130 mètres (Syvitski and Schafer 1996). Ces seuils séparent ainsi le fjord en 3 bassins : un bassin externe, un bassin intermédiaire et un bassin interne (Bélanger 2003).

D'un point de vue géographique, le fjord prend sa source dans le lac Saint-Jean au nord du Québec, à la latitude 48° 35' N et à la longitude 71° 45' W (Drainville 1968). Il se mélange aux eaux marines de l'estuaire à partir de Saint-Fulgence (Côté 1981). De plus, le fjord du Saguenay draine les eaux d'un bassin hydrographique de 88 000 km² imposant un débit moyen d'environ 1600 m³/s (Côté, Bussièrès et al. 2002). Le fjord présente donc des caractéristiques de circulation d'eau spécifique permettant le mélange des eaux salées provenant de l'estuaire et des eaux douces provenant des rivières. Ainsi, une mince couche de surface est entraînée vers l'aval, tandis que l'eau salée de l'estuaire pénètre dans le fjord avec la marée montante. Les eaux du Fjord sont donc stratifiées, ceci a beaucoup été décrit par des auteurs tels que Drainville (1968), on parle alors de thermo-halocline permanente.

Outre ses attraits géographiques, topographiques, et physiques, le fjord présente aussi un intérêt scientifique lié aux sédiments. Historiquement, un déluge catastrophique a eu lieu dans le Saguenay en 1996. Ce déluge a mobilisé plus de 20 millions de tonnes de sédiments dans la portion amont du Fjord (Tremblay, Locat et al. 2001). Des observations préliminaires indiquent que cette couche varie en épaisseur de 10 à 50 cm (Pelletier 1998). Cette couche a permis de recouvrir des sédiments qui étaient pollués par des HAP.

Depuis de nombreuses études se sont intéressées aux sédiments du fjord afin de dater les couches sédimentaires et retracer l'histoire du Fjord. Cependant, de nombreuses études portent sur la présence de substances chimiques présentes dans les sédiments qui sont des contaminants potentiels de la faune du fjord (Martel, Gagnon et al. 1986; Brochu, Moore et al. 1995; Saulnier and Mucci 2000; Michaud and Pelletier 2006). En effet, le Saguenay est le siège d'une région industrialisée (aluminerie, papeterie). Les sédiments du fjord présentent

une forte concentration de métaux traces (Saulnier and Mucci 2000) en dibenzodioxines polychlorures et dibenzofuranes (Brochu, Moore et al. 1995). De plus, le fjord du saguenay représente une zone de fort trafic maritime autant pour le commerce, que pour le tourisme.

En effet, de nombreuses études attestent la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les tissus des bivalves, véritables espèces sentinelles du milieu. Des teneurs de Benzo 3,4 pyrène ont été mesurées dans les moules bleues du fjord à de fortes concentrations (Picard- Bérubé and Cossa 1983). Des traces de butylétain et de ces composés ont aussi été mesurées chez les buccins (Viglino, Pelletier et al. 2006) et chez les myes (Gagné, Blaise et al. 2008d). Le TBT est un biocide utilisé dans les peintures antisalissures, il est à l'origine des pollutions au butylétain. Certains sites du fjord du Saguenay sont donc contaminés par des composés organo-étain (Gagné, Blaise et al. 2006).

La mission réalisée dans la Saguenay est réalisée depuis de nombreuses années (Figure 99). Cette mission s'est beaucoup axée sur l'étude de la mye, *Mya arenaria* (Blaise, Gagne et al. 2002; Gagné 2002; Gauthier-Clerc, Pellerin et al. 2002; Gagné, Blaise et al. 2006; Gagné, Blaise et al. 2008d; Gagné, Blaise et al. 2009).

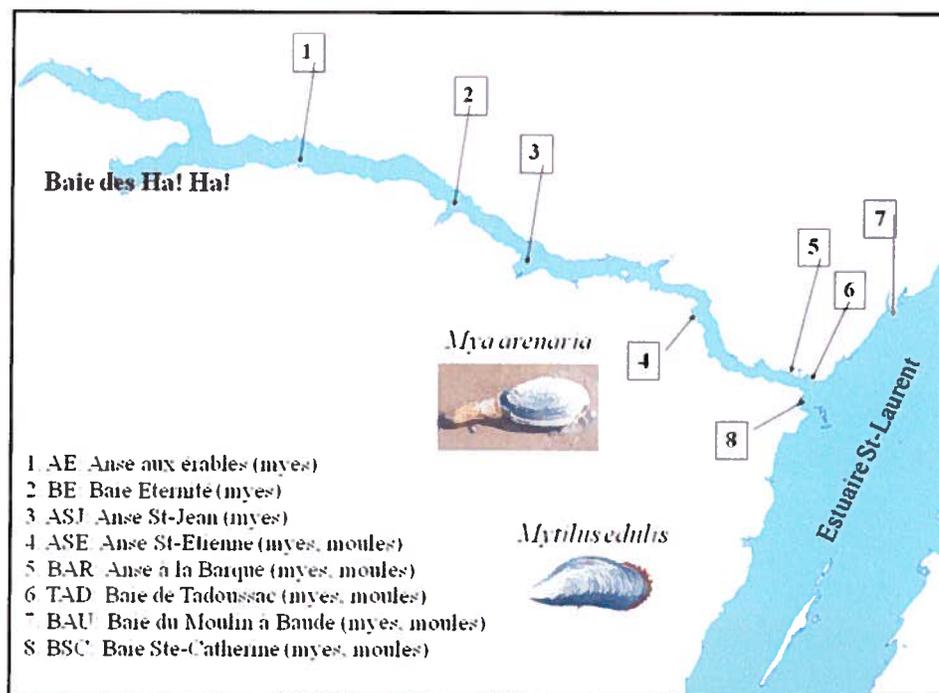


Figure 99: Carte des différents sites échantillonnés, dans la région de Fjord Saguenay. Tous les sites ne présentent pas des moules

Selon la carte ci-dessus, tous les sites échantillonnés dans la Saguenay chaque année ne présentent pas des moules. En effet, passée une certaine hauteur dans le fjord, les conditions de salinité ne permettent plus aux moules de subsister. Ainsi, le site d'ASE est le site le plus haut dans le fjord dont la salinité est acceptable pour les moules bleues (Figure 99). Les différents sites échantillonnés ne présentent pas les mêmes toxicités potentielles. Dans une étude précédente, les niveaux d'induction des TBT et DBT mesurés dans les sites étaient les suivants (Gagné, Blaise et al. 2008d) (Tableau 30):

Tableau 30 : Facteur d'induction de DBT/TBT présent aux différents sites d'échantillonnage présents dans le Saguenay.

Échantillons	Facteur d'induction DBT/TBT
Eau de mer	1 ± 0.05
ASE	1.47 ± 0.09
BAR	3.2 ± 0.2
BSC	3 ± 0.09
BAU	2.7 ± 0.025

En fonction de la localisation des sites de pollutions, des qualités d'environnement peuvent être définis. Le site de BAU n'est pas soumis aux pollutions directes (il peut être considéré aussi comme un site de référence (Gagné, Blaise et al. 2009). Le site de référence pour les myes est le site ASE. Le site de BAR étant situé à proximité de l'estuaire du fjord et très proche de la zone de passage du traversier, ce site est considéré comme potentiellement contaminé. Ainsi le site de BSC situé au niveau de l'estuaire est en contact direct avec les pollutions au TBT/DBT.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES-SAGUENAY

1.1 Échantillonnage des sites, collecte des données et transport de bivalves

Pendant trois années de suite 2008, 2009 et 2010 des myes (*Mya arenaria*) ont été échantillonnées des six sites présents dans le Fjord Saguenay et du site adjacent dans le fleuve Saint Laurent. Une autre espèce de bivalves, la moule bleue (*Mytilus edulis*) a été collectée dans les 4 sites localisés dans le fjord et au même site présent dans le Fleuve Saint-Laurent (Figure 99). Les différents points échantillonnés pour les moules bleues sont : Anse Saint-Etienne (ASE), Anse à Barque la (BAR), Baie Sainte Catherine (BSC) et Baie du Moulin à Baude (BAU). Les premières stations sont situées dans le fjord Saguenay. Cependant BAU est situé dans le Fleuve Saint-Laurent, au niveau du Nord-est de l'estuaire du fjord. Les sites sont choisis pour leur grande distribution le long du Fjord du Saguenay et pour leur variété de pollutions. La liste des contaminations avérées des sites est répertoriée dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Caractéristiques des différents sites d'échantillonnages et des contaminations potentielles (adapté de Blaise et al, 2002). n.o = non observé.

<u>Sites</u>	<u>Localisation dans le Fjord du Saguenay</u>	<u>Toxicité potentielle *</u>	<u>Caractéristiques</u>
<u>AE</u> : Anse aux Erables	70 kms au dessus de l'estuaire du Saint Laurent Site situé proche de la zone critique de l'habitat des bivalves marins	Industrielle et domestique	Beaucoup d'alumineries et d'usines de pâte et papier dans les villes d'Alma, Jonquière, Chicoutimi et La Baie qui déchargent leurs effluents dans le fjord du Saguenay. 15 cottages occupent saisonnièrement les criques → potentiellement des effluents urbains
<u>BE</u> : Baie Eternité	50 kms au dessus de l'estuaire du Saint Laurent	Portuaire	Quais pour amarrer les bateaux est saisonnièrement exploités, bateaux d'excursion de 20m de long, marina avec des bateaux de plaisance
<u>ASJ</u> : Anse Saint Jean	40 kms au dessus de l'estuaire du Saint Laurent	Domestique et portuaire	Rejets de décharge provenant de la ville d'ASJ (2000 habitants) Beaucoup de quais et une grande marina pour les bateaux de pêches et les petits

			bateaux de plaisance
<u>ASE:</u> Anse Saint Etienne	20 kms au dessus de l'estuaire du Saint Laurent	n.o	Aucune source de contamination directe recensée à ce site
<u>BAR :</u> Anse à la Barque	5 kms au dessus de l'estuaire du Saint Laurent	Portuaire	Beaucoup de quais et une grosse marina pour les bateaux de pêches et les bateaux de plaisance de Tadoussac (5 kms) Traversier durant toute l'année reliant Baie Sainte Catherine à Tadoussac
<u>BSC :</u> Baie Sainte Catherine	Site localisé au niveau de l'embouchure du Fjord du Saguenay	Portuaire	Traversier durant toute l'année reliant Baie Sainte Catherine à Tadoussac
<u>BAU :</u> Baie du moulin à Baude	5 kms au Nord Est de l'embouchure du Fjord du Saguenay Site localisé dans le Saint Laurent	n.o	Aucune source de contamination directe recensée à ce site

* Tous les sites sont aussi potentiellement soumis aux retombées d'émission aéroportées de HAP dans les bassins de drainage respectifs à cause des décennies d'activités de fonderie d'aluminium (Smith and Levy 1990).

1.2 Obtention des tissus et analyses

Lors des 3 années d'échantillonnages, des données de biométrie des bivalves ont été prises. Ainsi la taille a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse, le poids à l'aide d'une balance de précision et l'indice de condition, IC AFNOR (NF V 45056, sept85) a été mesuré selon la formule suivante :

$$IC = \frac{\text{Poids des tissus mous sans l'eau palléale}(g)}{\text{Poids total de l'organisme}(g)}$$

1.3 Obtention et préparation de l'hémolymphe

Des bivalves adultes (*Mya arenaria* et *Mytilus edulis*) ont été récoltés dans tous les sites cités précédemment (voir Tableau 31). Seuls les résultats des moules bleues sont présentés dans la

chapitre 4. L'hémolymphe des moules a été ponctionnée dans le muscle d'adducteur postérieur à l'aide d'une seringue 23G puis immédiatement transférée individuellement sur la glace pour éviter l'aggrégation des hémocytes (Auffret and Oubella 1997; Brousseau, Pellerin et al. 2000; Araya, Siah et al. 2008). Puis un compte initial d'hémocytes des moules individuelles (cellularité) et une viabilité individuelle initiale ont été déterminés à l'aide d'une trousse ViaCount (Guava des Technologies, CA, USA), avant les expériences d'exposition. Les résultats ont été lus avec un cytomètre en flux (Guava PCA Cytometer). Cette étape a permis de sélectionner les individus en excluant ceux dont les prélèvements présentaient des gamètes (événements facilement identifiables avec le cytomètre car ils sont de petites tailles et petites complexités). De même, les prélèvements qui présentaient trop de débris ont été filtrés sur une membrane de nylon 80 µm. En plus, des deux critères précédents, seuls les individus dont les viabilités étaient > 80% ont été conservés et ceci afin d'optimiser et de standardiser les tests. Deux types d'expérience ont été réalisés :

- Afin de réaliser un suivi annuel des individus de terrain, quinze individus par site vont être utilisés afin d'évaluer la viabilité et la phagocytose.

- Les autres moules ont été utilisées pour des tests de viabilité et de phagocytose avec les NPs (tests réalisés sur des pools d'hémocytes). Les « pools » d'hémocytes (n= 9) ont été réalisés avec les individus sélectionnés, afin d'avoir un volume cellulaire suffisant pour évaluer toutes les conditions d'exposition. Finalement, les cellules ont été exposées à une gamme dose effets de nanoparticules.

1.4 Caractérisation des nanoparticules utilisées dans le projet de recherche

Les hémocytes vont être exposés à 3 types de NPs déjà présentées dans les chapitres précédents. Les NPs de cadmium QDs et les NPs d'argent de la compagnie ViveNano® (tel que présenté dans la section 5, 5.1 et 5.2 du chapitre 1). Les hémocytes vont aussi être exposés aux NPs d'argent de la compagnie Ted Pella^{inc} (AgNPs TP) qui sont décrites dans la section 1.1.3 du chapitre 3.

1.5 Détermination de viabilité, cellularité des moules exposées aux nanoparticules

La viabilité de hémocytes, après l'exposition de 21 h à température pièce, avec les NPs a été évaluée par cytométrie en flux (Guava PCA Cytometer). Une cellularité et une viabilité des hémocytes de moules ont été déterminés à l'aide d'une trousse ViaCount (Guava Technologies, Milipore™, USA). Brièvement, 50 µl de la suspension cellules et NPs ont été placés dans un tube 1,5 ml avec 150 µl de Guava ViaCount®. Les tubes vont être incubés 1 min, au noir, avant la lecture. Les échantillons ont été analysés avec un cytomètre de flux par excitation avec un laser bleu, possédant une longueur d'émission de 532 nm (Guava, PCA, Milipore™, USA). L'excitation de l'IP est détectée par les canaux FL1 et FL2 avec les filtres de bande passante 580 ± 20 nm et 675 ± 20 nm. Un marqueur (= 5%) sera placé sur l'histogramme de comptage et 1000 événements ont été enregistrés.

1.6 Détermination de la phagocytose pour les moule de terrain

Deux cent microlitres de la suspension cellulaire d'hémolymphe et ont été mis dans une plaque 96 puits en polypropylène à fond plat. Après trois heures d'incubation à température pièce durant 3 heures, 7,2 µl de billes de carboxylate rouge diluée 1:10 (FluoSpheres, Invitrogen™, USA) ont été ajoutées à la suspension. Le mélange de cellules et de billes va être incubé 18 heures à température pièce. Puis les billes vont être éliminées en retournant vigoureusement les plaques. Les hémocytes ayant phagocytés des billes vont ensuite être remis en suspension dans le puit puis fixés avec une solution de 3.5 % d'eau de mer stérile additionnée de 0.5% formaldéhyde and 0.2% sodium azide (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un laser argon (λ d'excitation = $488 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) (Facs Calibur, Becton Dickinson, CA, USA). L'excitation des billes est détectée par le canal FL2 avec le filtre bande passante 585 ± 42 nm. Environ 10 000 événements ont été acquis. Les analyses ont permis de discriminer deux paramètres, l'activité de phagocytose ou phagocytose de 1 bille et plus (M1) et l'immunoefficacité ou capacité de phagocyter 3 billes et plus (M2).

1.7 Détermination de la phagocytose pour les moules exposées aux nanoparticules

Deux cent microlitres de chaque pool d'hémolymphe et ont été mis dans une plaque 96 puits en polypropylène à fond plat avec 10 µl de NPs (le témoin est un puit avec 1 à µl d'eau stérile). Après trois heures d'incubation à température pièce durant 3 heures, 7,2 µl de billes de carboxylate rouge diluée 1 :10 (FluoSpheres, Invitrogen™, USA) ont été ajoutées à la suspension. Le mélange de cellules et de billes va être incubé 18 heures à température pièce. Puis les billes vont être éliminées en retournant vigoureusement les plaques. Les hémocytes ayant phagocytés des billes vont ensuite être remis en suspension dans le puit puis fixés avec une solution de 3.5 % d'eau de mer stérile additionnée de 0.5% formaldéhyde and 0.2% sodium azide (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un laser argon (λ d'excitation = 488 nm \pm 10 nm) (Facs Calibur, Becton Dickinson, CA, USA). L'excitation des billes est détectée par le canal FL2 avec le filtre bande passante 585 \pm 42 nm. Environ 10 000 évènements ont été acquis. Les analyses ont permis de discriminer deux paramètres, l'activité de phagocytose ou phagocytose de 1 bille et plus (M1) et l'immunoefficacité ou capacité de phagocyter 3 billes et plus (M2).

1.8 Essai du Cycle cellulaire pour les moules de terrain

En 2009, des essais sur les cycles cellulaires ont permis d'analyser le contenu génétique des moules de terrain. Le cycle cellulaire a été mesuré dans les hémocytes. Cette procédure est réalisée en deux temps. La première est l'étape de fixation, 200 µl de culture cellulaire (ou des cellules fraîches) vont être placés dans un tube et centrifugés pendant 5 minute à 450 g (avec le frein sur 1). Par la suite, le surnageant va être vidé et les cellules vont être lavées avec 400 µl de PBS (1X). Le tube va être centrifugé pendant 5 minutes à 450 g (frein sur 1). Par la suite, le surnageant va être vidé ajoutez 400 µL de 70 % l'éthanol (conservé à -20°C) vont être ajouté au goutte à goutte en vortexant doucement le tube. Les échantillons vont être conservés au moins pendant au moins 12 heures dans EtOH à 4°C.

La deuxième étape est la coloration des cellules, le protocole de la compagnie Guava est utilisé pour les cellules de moules bleues. Les cellules vont être centrifugées dans l'EtOH pendant 5 min à 450g sur 1. Puis les cellules vont être resuspendues dans 1 ml de PBS. Les tubes vont être centrifugés Durant 5 min à 450 g sur 1. Finalement les cellules vont être

resuspendues dans 200 μ l de *Guava cell cycle reagent* et incubées à température pièce pendant 30 min. Après coloration les cellules colorées vont être analysées au cytomètre en flux. Les échantillons vont être lus avec le canal FL2 au filtre bande passante 585 ± 42 nm (Figure 100).

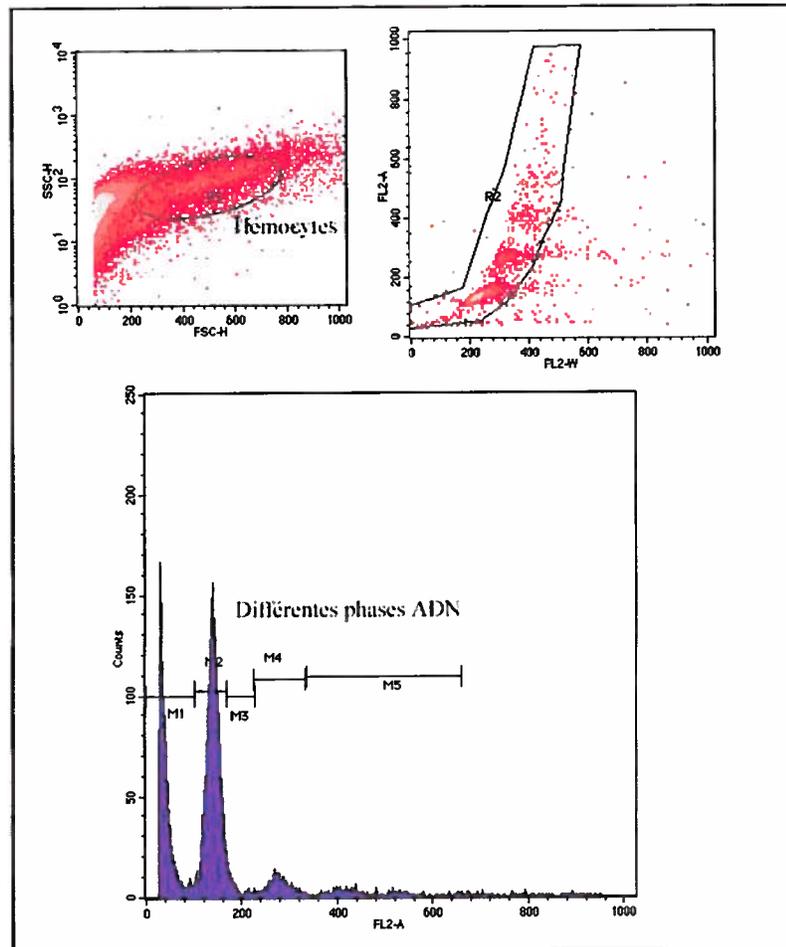


Figure 100 : Cytogrammes de cycle cellulaire chez les moules bleues.

1.9 Analyse de la fraction humorale de l'hémolymphe

Cette partie des tests a été réalisée par l'équipe du Dr. Sophie Gauthier Clerc (Professeur chercheur sous octroi en conchyliculture à l'ISMER, Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière, Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec).

Une partie de l'hémolymphe récoltée individuellement a été aliquotée selon les tests :

- Un aliquot de 500 μ l pour les dosages de la prophénoloxydase (ProPO).
- Un aliquot de 400 μ l pour les dosages de la phosphatase acide (Pac).

Puis les aliquots ont été centrifugés à 400 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été récolté (plasma, fraction acellulaire) puis congelé à -80°C. Puis, pour préparer les lysats d'hémocytes (à faire juste avant les dosages). Les aliquots ont été resuspendus dans le tampon approprié au dosage. L'ensemble a été vortexé et mis dans un sonicateur rempli d'eau et de glace pour 30 minutes à 35 KHz (sonicateur ELMA, LC 30 H, d'une fréquence non ajustable de 35 KHz). Par la suite, les échantillons ont été centrifugés durant 10 min à 12000g (4°C) et le surnageant (lysats d'hémocytes) a été récupéré. En fonction des deux analyses précédées les volumes suivant ont été utilisés.

Volume de plasma et nombre d'hémocytes nécessaires au dosage :

Essais	Plasma
Phosphatase acide	50 µl
Phénoloxydase	10 µl

1.9.1 Dosage de l'activité de la pro-phénoloxydase (pro-PO) Protocole modifié de (Coles and Pipe 1994) et (Muñoz, Meseguer et al. 2006)

Afin de doser l'activation de prophénoloxydase (ProPO), il faut préparer une solution de SDS à température pièce à 1 mg/ml (pH 7.4). Pour le dosage vont être ajouté, en duplicat, 10 µl de plasma et 40 µl de PBS. Pour le contrôle négatif, seul 50 µl de tampon seront ajoutés. Puis 50 µL de SDS vont être mis dans chacun des puits à l'aide d'une pipette à répétition (ou par pipetage inversé, une pipette ordinaire est utilisée pour éviter que le SDS ne forme des bulles qui pourraient fausser les lectures). Puis les échantillons vont être incubés durant 30 minutes à 37°C avec agitation.

Durant l'incubation, le substrat va être préparé, soit une solution de L-DOPA (3 mg/ml) avec 10 mM calcium et 0.2 M HCl. Cette dernière va être conservée à température pièce. Après l'incubation, 50 µl de L-DOPA vont être ajoutés à chacun des puits à l'aide d'une pipette à répétition (ou par pipetage inversé si une pipette ordinaire est utilisée pour éviter que le SDS ne forme des bulles qui fausseront les lectures). Puis, chaque puit va être lu à 492 nm pendant 15 minutes (1 lecture/min). Afin de calculer l'activation de la ProPO, une unité est définie comme l'augmentation de la densité optique de 0.001/min selon le rapport :

$$\left(\frac{\text{Absorbance échantillon 15 min} - \text{Absorbance contrôle négatif 15 min}}{15} \right) \times 1000 = \text{Unités}$$

1.9.2 Dosage de l'activité de la phosphatase acide (Pac) Modifié de (Hong, Xiang et al. 2006; Jing, Li et al. 2006).

Afin de doser la production de phosphatase acide, une courbe étalon doit être réalisée. La solution mère est faite de p-nitrophénol (2.5 mM) soit 0.0035 g p-nitrophénol + 10 ml de tampon acétate. Puis des dilutions sériées vont être mises en place telle que :

Concentration (nmol/50 µl)	Volume (µL)	Quantité tampon acétate (µL)
S5= 5	40 µl de solution mère	960
S4= 2.5	500 µl de S5	500
S3= 1.25	500 µl de S4	500
S2= 0.75	500 µl de S3	500
S1= 0.3785	500 µl de S2	500
S0= 0	0	1000

Afin de doser la production de phosphatase acide, 50 µL de standard ou d'échantillon (dans notre cas le plasma) vont être ajoutés dans chaque puit d'une microplaque en duplicat. Par la suite, à l'aide d'une pipette à répétition, 150 µL de la solution de pNPP seront ajoutés. Puis, le mélange va être incubé durant 60 min à 37°C avec agitation. Finalement, 75 µl de NaOH seront ajoutés afin de développer la coloration de la réaction. Ainsi, la fluorescence va être lue dans chaque puit à une longueur de 405 nm. Afin de calculer la concentration de nitrophénol produit dans chaque puit avec la courbe standard (Concentration (nmol/puit) en fonction de l'absorbance) il faut diviser cette concentration par le volume d'échantillon ajouté aux puits selon la formule :

$$\frac{\text{Concentration (nmol / puit)}}{50\mu\text{l}} \times 1000 = \text{Concentration de l'échantillon (nmol nitrophénol / ml plasma)}$$

1.9.3 Dosage des protéines globales dans le plasma (Bradford 1976)

Cet essai permet le dosage des protéines à l'aide d'un colorant le bleu de Coomassie et du dosage de l'absorbance à 595 nm (Bradford 1976). Brièvement, une gamme étalon de protéines extraites de BSA va être préparée dans 0.15 M NaCl (Muñoz, Meseguer et al. 2006). Le bleu de Coomassie va être dilué dans 50 ml d'éthanol à 95 %.

À cette solution vont être ajoutée 100 ml d'acide phosphorique à 85 % (v : v). La solution finale obtenue va être diluée dans un volume final d'un litre. La concentration finale du réactif est de 0.01% (w/v) de bleu de Coomassie G-250, 4.7% (v : v) d'éthanol, and 8.5% (w/v) d'acide phosphorique. La solution de protéines contenant de 10 à 100 pg de protéines dans un volume de 0.1 ml est pipetée dans un tube. Cinq millilitres de la solution de réactif à protéines (bleu de Coomassie) vont être ajoutés et mixés (ou vortexés).

L'absorbance de la suspension va être mesurée à 595 nm après 2 min d'incubation. Un blanc sera aussi mesuré, il contient simplement 0,1 ml du tampon et 5 ml de la solution de réactifs à protéines. Les poids en protéines des échantillons à mesurer vont être calculés en fonction de l'absorbance mesurée à l'aide de la courbe standard de BSA.

1.10 Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). La différence de viabilité, de l'activité et de l'efficacité de phagocytose ont été examinées utilisant une analyse factorielle des variations à une voie (ANOVA), lorsque les résultats étaient significatifs, un test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Lorsque les données n'étaient pas normales un test non paramétrique de Kruskal et Wallis avec mise en rang a été réalisé. Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$. Afin de calculer les concentrations d'inhibition à 50%, des courbes doses réponses ont été réalisées en utilisant Microsoft® office Excel 2007. Les CI 50 ont ensuite été calculées à l'aide de droites de régressions linéaires.

2. RÉSULTATS POUR LES ÉCHANTILLONNAGES RÉALISÉS DANS LE SAGUENAY

2.1 Les paramètres physico-chimiques

L'analyse des différents sites échantillonnés montre des différences de paramètres chimiques. Le site de l'ASE, considéré comme le site de référence pour les myes, présente des caractéristiques différentes des autres sites échantillonnés (Figure 101). La température à ASE est plus forte que celle des autres sites. De même, la densité d'oxygène et sa concentration est plus faible que celle des autres sites et est comparable aux données de BAU (14,675 mg/l vs 14,31 mg/l d'oxygène). Ce dernier est considéré comme le site de référence.

Cependant le site ASE présente la conductivité, relié à la salinité, la plus faible des 4 sites et BAU la plus forte. D'autre part, le pH d'ASE est dans la zone de neutralité contrairement aux autres sites dont le pH est plutôt alcalin, voir très alcalin pour BAR (pH= 8,33) (Figure 101). Les sites de BSC et de BAU présentent un pH semblable à celui mesuré dans de l'eau de mer.

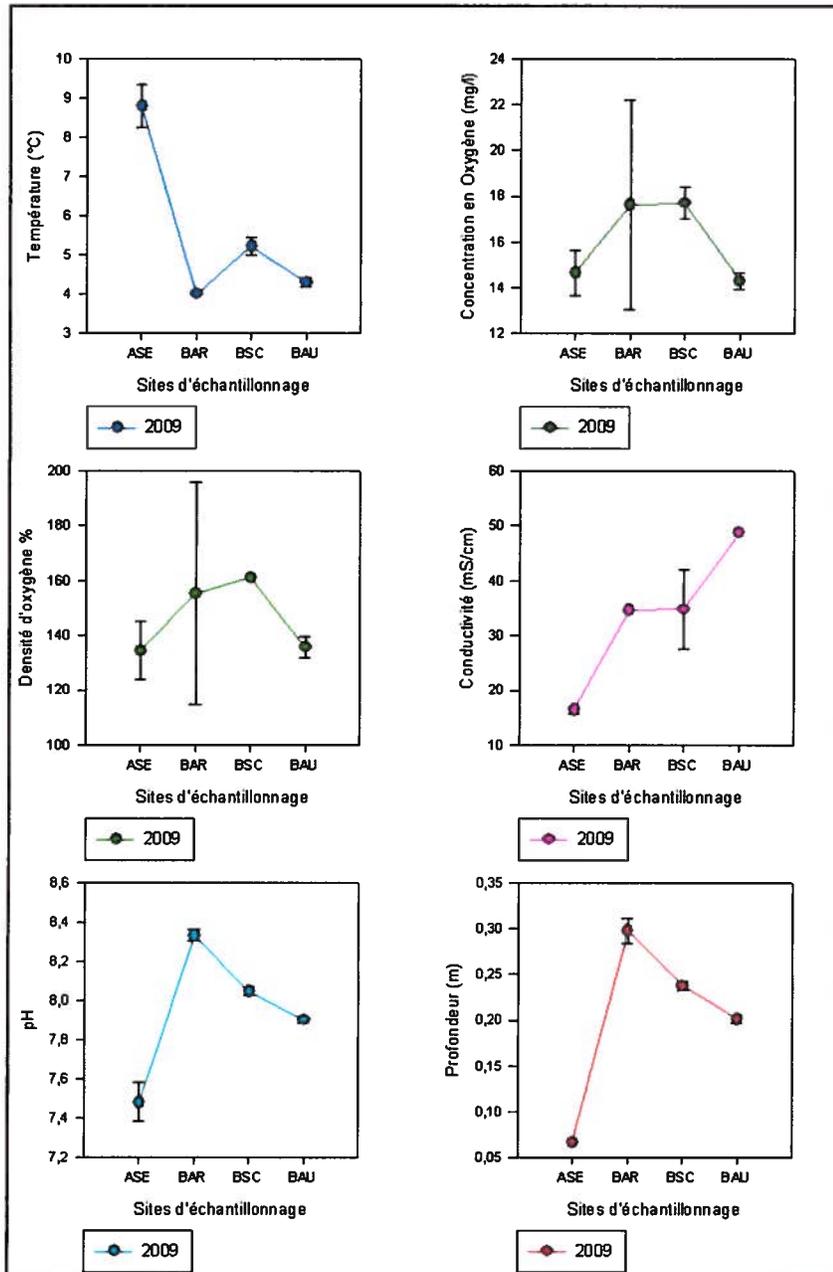


Figure 101 : Paramètres chimiques prélevés lors de la campagne d'échantillonnage 2009. Pour chaque site deux mesures ont été réalisées.

2.2 Données morphométriques des moules bleues

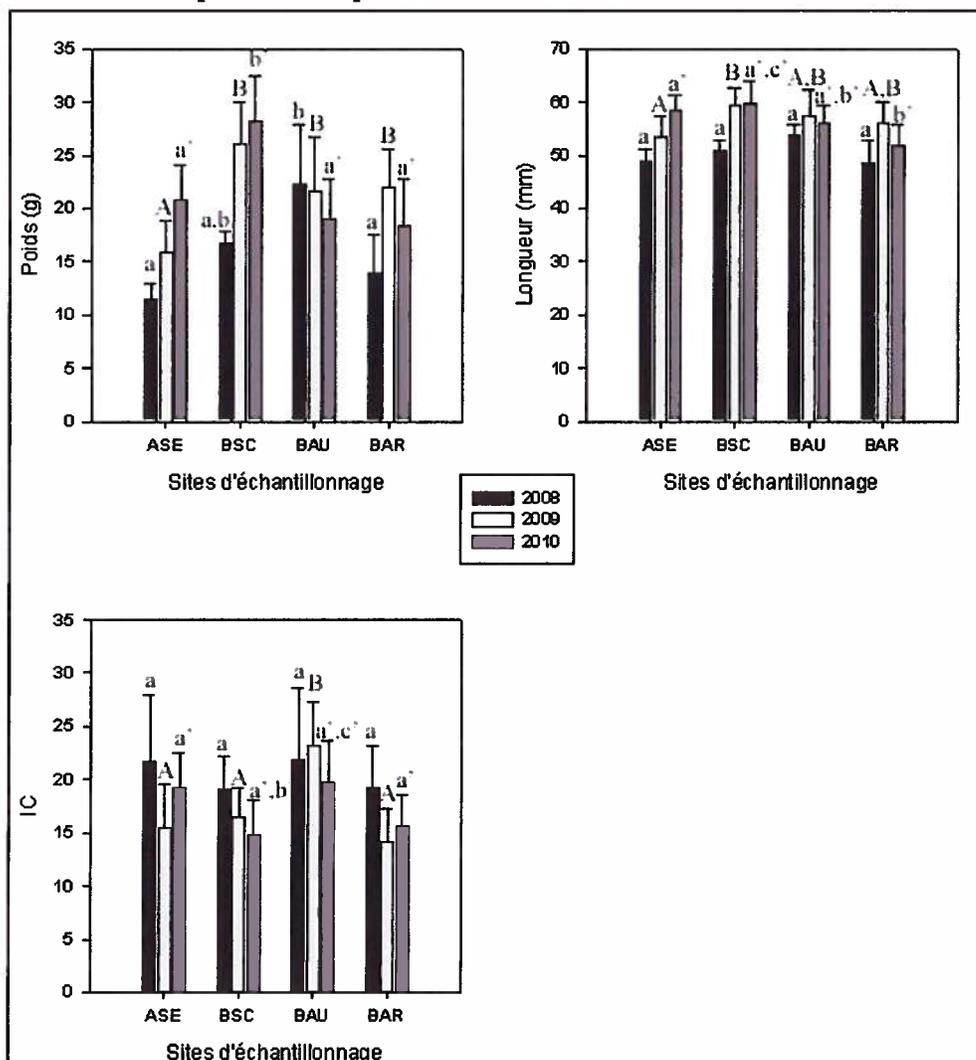


Figure 102 : Données sur les tissus prises durant les trois campagnes de terrain dans le fjord du Saguenay. Il existe des différences entre les sites pour une même année d'échantillonnage. a, b, c pour l'année 2008 n=6, A, B, C pour l'année 2009 n= 15 et a', b', c' pour l'année 2010 n= 15.

Pour les 3 années d'échantillonnages des paramètres biologiques ont été prélevés pour les moules bleues, les données de tailles poids et Indice de Condition (IC). En 2008, le poids des moules échantillonné à BSC n'était pas différent des autres sites cependant, les moules échantillonnées à BAU étaient plus grosses que celles échantillonnées à ASE et à BAR. En 2009, les moules de l'ASE était significativement plus petites que celles des trois autres sites. En 2010, le poids des moules échantillonnées à ASE était semblable à celui de BAR et de BAU, mais très différent de celui de BSC (Figure 102). Concernant la taille des bivalves, elle est semblable en 2008 pour les 4 sites d'échantillonnage. En 2009, la taille des moules de

BSC est significativement différente de celle d'ASE mais pas des autres sites. En 2010, la taille des moules de BSC n'est pas différente de celles d'ASE mais de celle de BAR. Si on résume selon l'indice de condition (voir formule dans le matériel et méthode). En 2008 l'indice de condition selon les différents sites est relativement comparable. En 2009, l'IC de BAU est significativement supérieur de celui des trois autres sites. En 2010, l'IC est aussi relativement conservé. Cependant l'IC du site de BSC est significativement différents de celui de BAU (l'IC de BAU est plus fort que ceux des autres sites) (Figure 102).

2.3 Paramètres immunologiques pour les moules de terrain

2.3.1 Sites échantillonnés

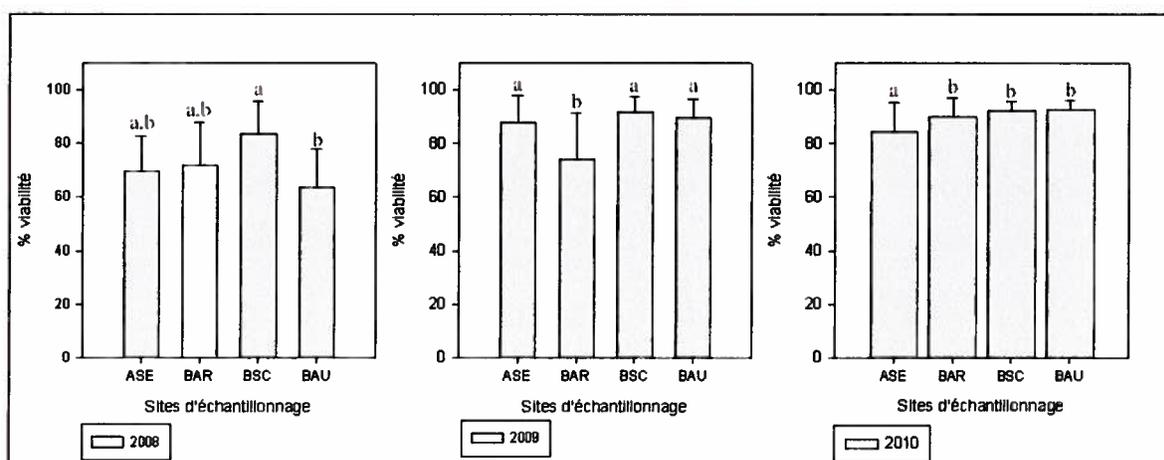


Figure 103 : Viabilité des hémocytes de moules bleues prises selon différents sites d'échantillonnage. 2008, 2009, 2010 n=15.

En 2008, la viabilité des hémocytes de BSC est significativement différente de celle de BAU ($p < 0.001$). En 2009, BAR est différent de ASE et BAU ($p < 0.01$) et très significativement différent d'BSC ($p < 0.001$) (Figure 103). En 2010, la viabilité des hémocytes pour le site ASE est très significativement différente de celle des trois autres sites ($p < 0.001$) (Figure 103).

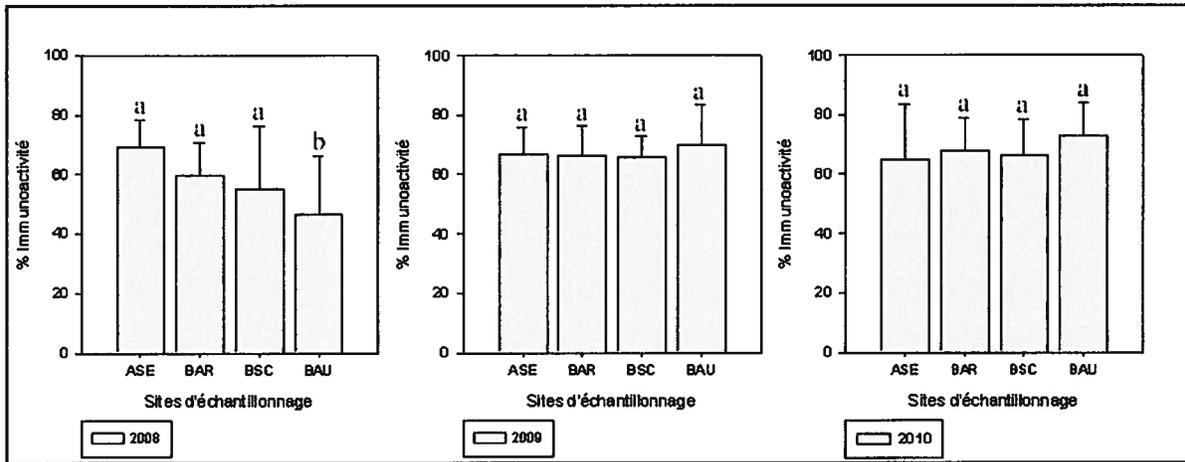


Figure 104 : Immunocapacité des hémocytes de moules bleues prises selon différents sites d'échantillonnage. 2008, 2009 n= 9 et 2010 n= 15.

Pour l'immunoactivité de la phagocytose, seule en 2008 une différence significativement est observée parmi les 4 sites d'échantillonnage, BAU est très significativement différent des trois autres sites échantillonnés ($p < 0.001$) (Figure 104). Aucune différence significative n'est observée pour les années 2009 et 2010.

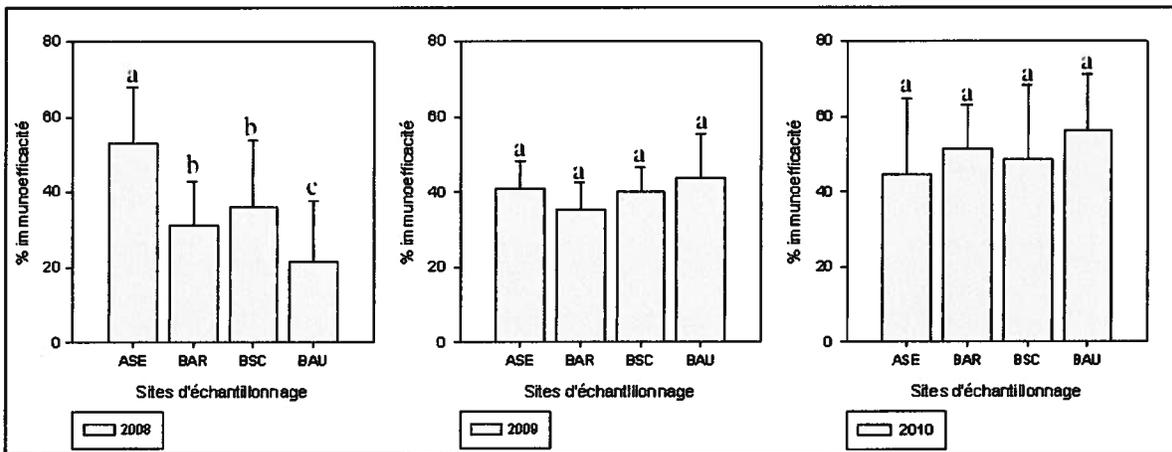


Figure 105 : Immunoeffacité des hémocytes de moules bleues prises selon différents sites d'échantillonnage. 2008, 2009 n= 9 et 2010 n= 15.

Concernant les résultats pour l'immunoeffacité, les histogrammes sont similaires à ceux de l'immunoactivité. Seules des différences significatives entre les sites sont observées pour l'année 2008. ASE est très significativement différent de BAU ($p < 0.01$) et significativement différent de BAR et BSC ($p < 0.05$). BAU est significativement différent de BAR et BSC ($p < 0.05$) (Figure 105).

2.3.2 Évolution temporelle des sites

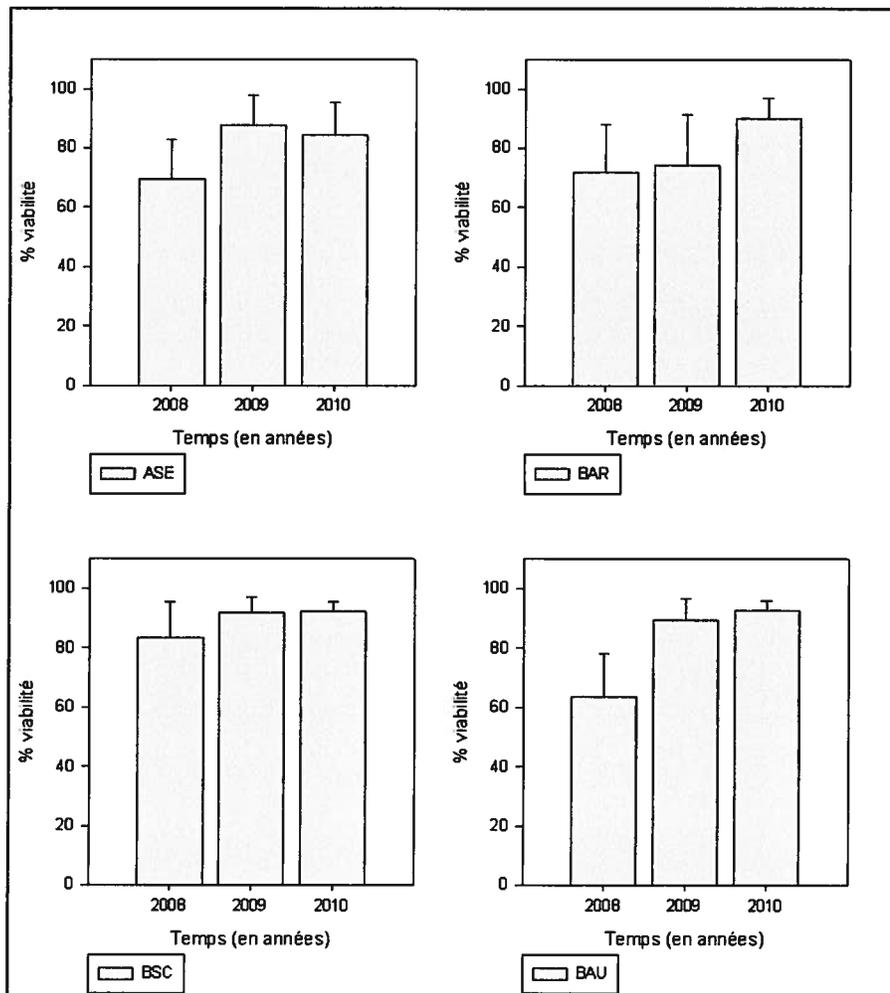


Figure 106 : Suivi temporel de la viabilité des hémocytes de moules bleues durant les 3 années de campagne d'échantillonnage dans le Saguenay. n=15. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

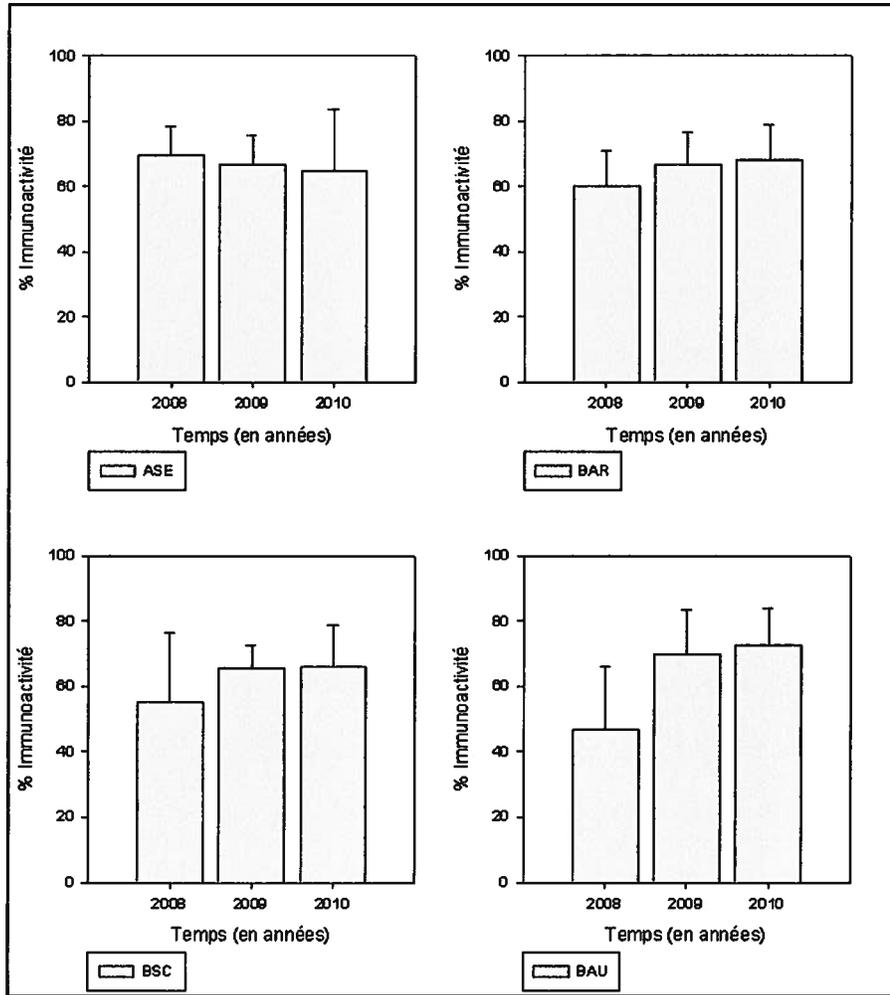


Figure 107 : Suivi temporel de l'immunoactivité des hémocytes de moules bleues durant les 3 années de campagne d'échantillonnage dans le Saguenay. n=15. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

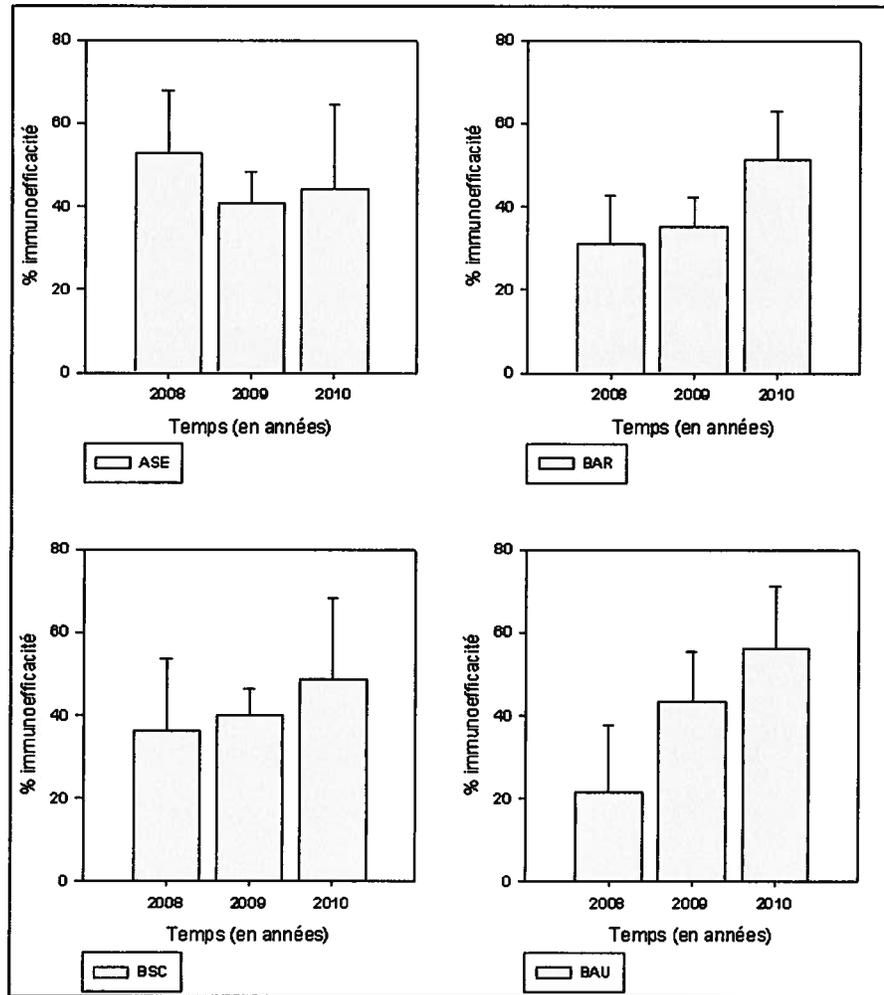


Figure 108 : Suivi temporel de l'immunoefficacité des hémocytes de moules bleues durant les 3 années de campagne d'échantillonnage dans le Saguenay. n=15. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

2.3.3 Cycle cellulaire-échantillonnage 2009

L'analyse des cycles cellulaires a permis de séparer 5 stades liés au contenu génétique des cellules (Tableau 32). Selon le pourcentage des événements comptabilisés, nous pouvons définir à quels stades sont les hémocytes des moules de chaque site. Ainsi des forts comptes en phase M1 indiqueront que les cellules sont en phase apoptotiques. D'autre part, les événements en phase M5 sont liés à des anomalies de la composition génétique cellulaire (anomalie dans le cycle de multiplication et division cellulaire). En observant les résultats des cycles cellulaires en 2009, on constate que la plupart des moules des différents sites échantillonnés sont au stade G0 soit N (selon le Tableau 32). Cependant les moules de BAR et BSC présentent un plus fort pourcentage de cellules en apoptose que les deux autres sites (Figure 109).

Tableau 32 : Différents stades de maturation de l'ADN pour les moules bleues de terrain. n=15

Phase	Stade de maturation de l'ADN	Contenu génétique
M 1	Apoptose	-
M 2	G 0-G1	N
M 3	S	-
M 4	G 2	2 N
M 5	G N	X N

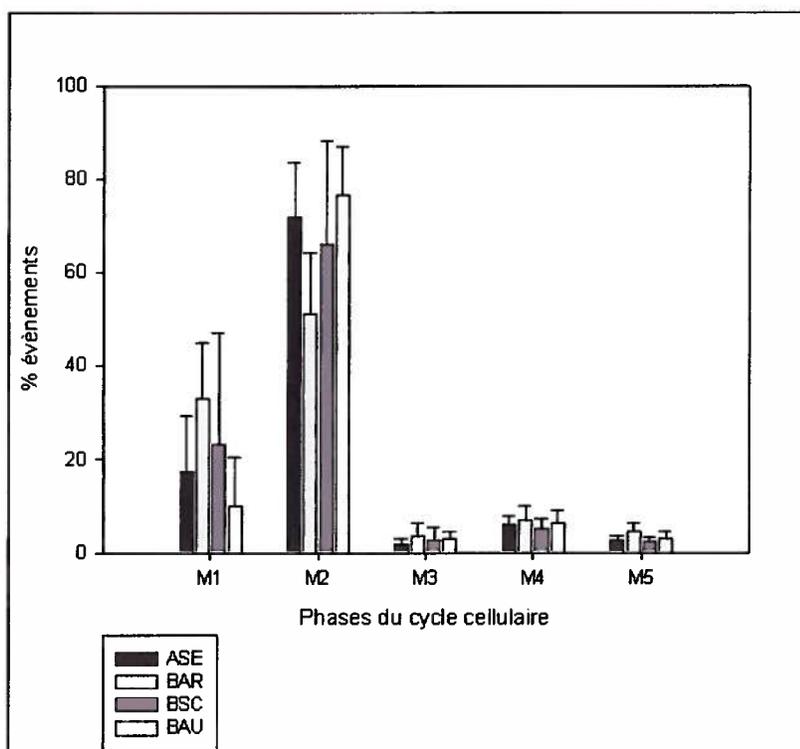


Figure 109 : Différentes phase du cycle cellulaire mesuré pour les moules bleues de terrain lors de la campagne d'échantillonnage 2009 n=15.

2.4 Paramètres immunitaires obtenus des pools d'hémocytes exposés à des nanoparticules

2.4.1 La viabilité

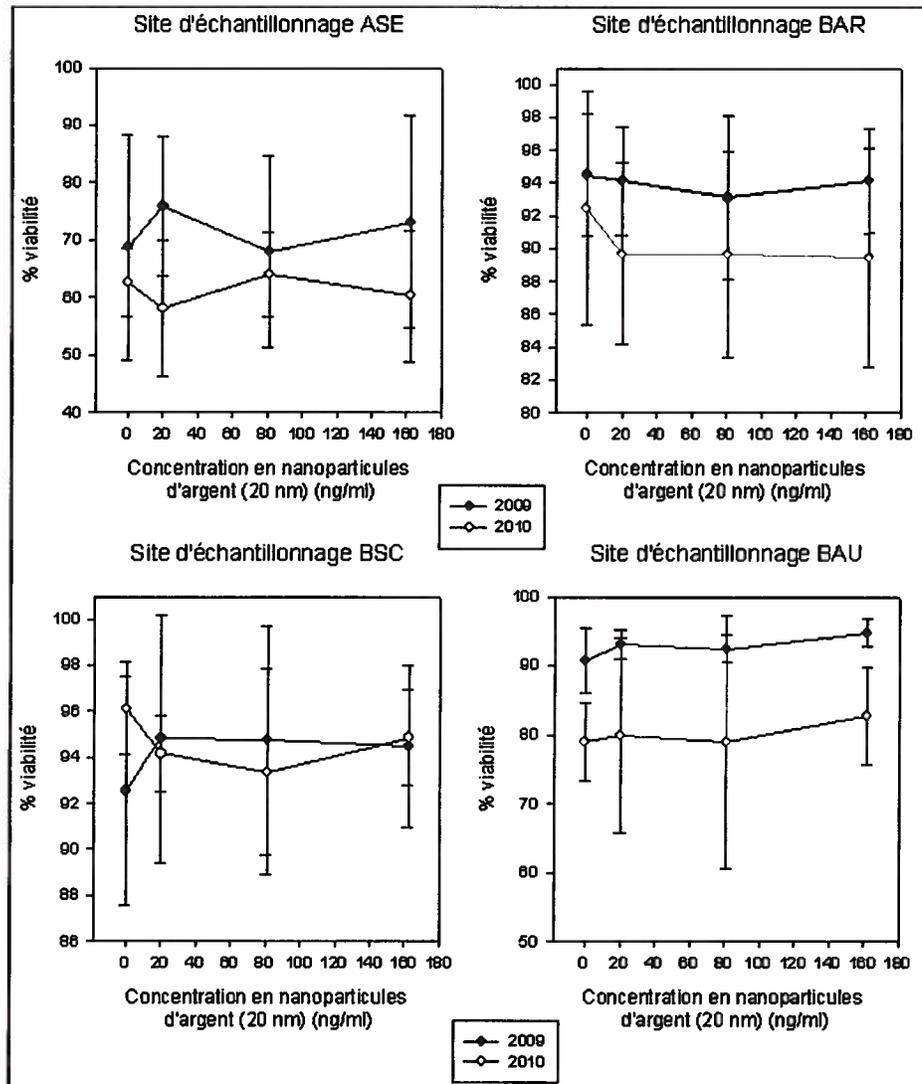


Figure 110 : Viabilité moyenne des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en nanoparticules d'argent (AgNPs TP) de 20 nm de diamètre Pools d'hémocytes n=6.

La viabilité des hémocytes de moules exposées aux NPs d'argent de 20 nm de Ted Pella^{Inc} (AgNPs TP) n'est pas significativement affectée quel que soit la concentration en NPs (Figure 110). Pour les 3 sites ; ASE, BAR et BAU, la viabilité pour l'année 2009 est supérieure à celle de 2010. Les viabilités sont relativement fortes, même après une exposition de 21 h aux les NPs d'argent, (> 80 %) excepté pour le site de l'Anse Saint Etienne.

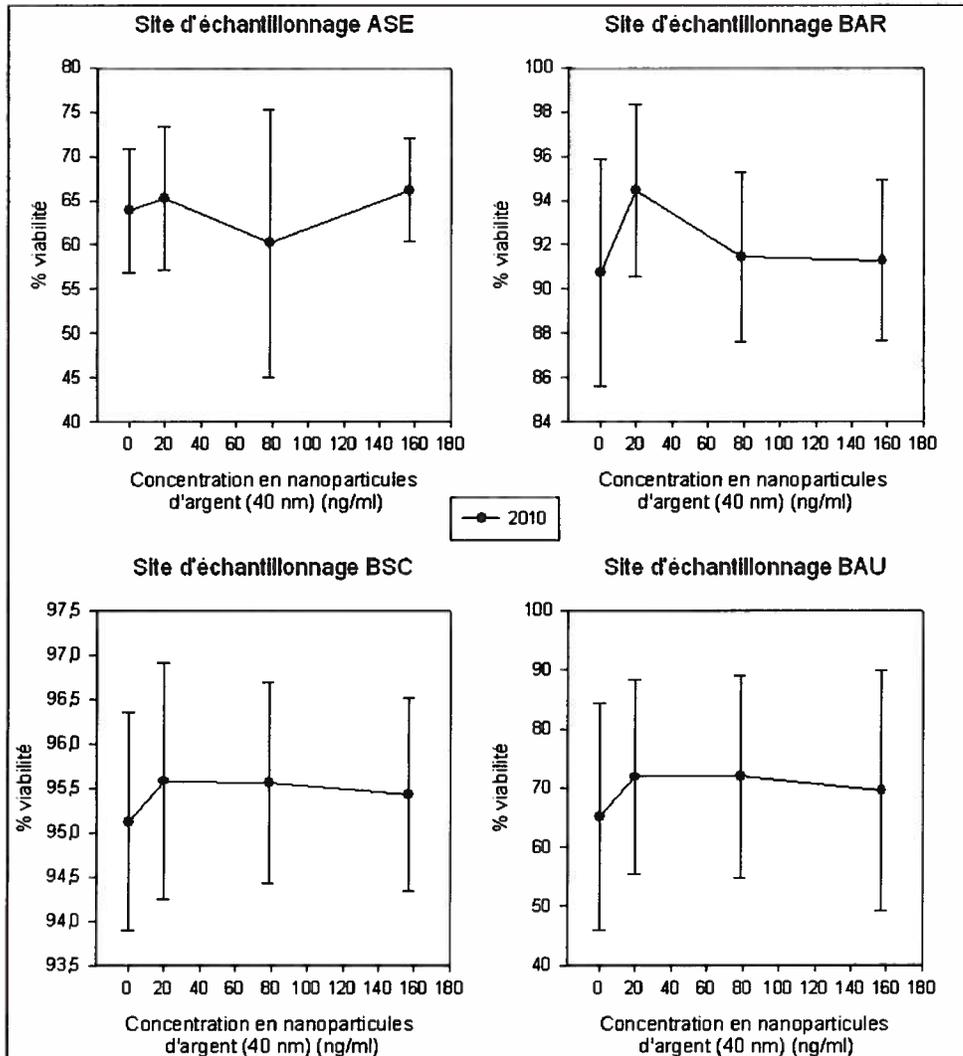


Figure 111 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en AgNPs TP de 40 nm de diamètre. Pools d'hémocytes n=6.

La viabilité des hémocytes de moules bleue n'est pas non plus affectée significativement par les NPs d'argent de 40 nm de diamètre. La viabilité des moules de l'Anse Saint Etienne est beaucoup plus faible que celle des autres sites (Figure 111).

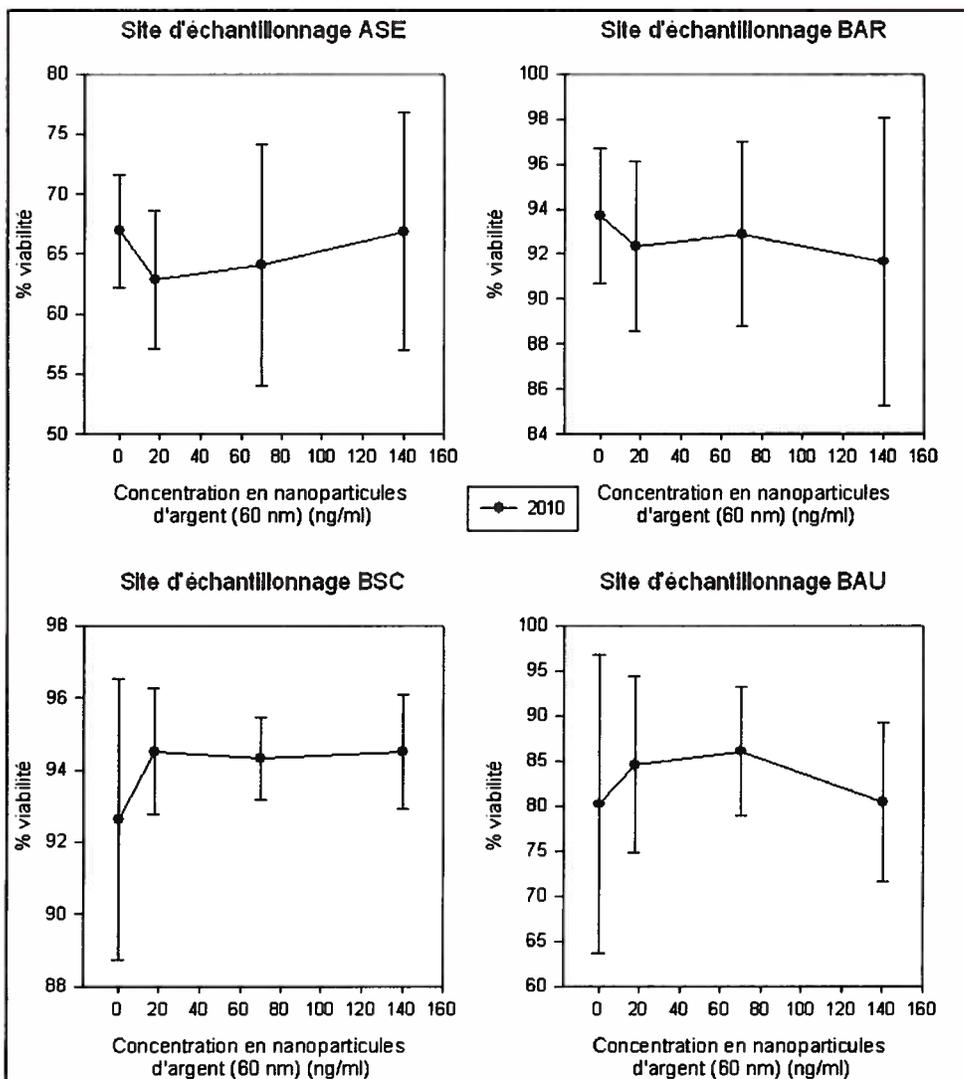


Figure 112 : Viabilité des hématocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en AgNPs TP de 60 nm de diamètre. Pools d'hématocytes n=6.

Comme pour les précédents résultats, les NPs de 60 nm de diamètre ne semblent pas présenter de diminution significative de la viabilité quel que soit la dose de particules utilisée pour l'exposition (Figure 112).

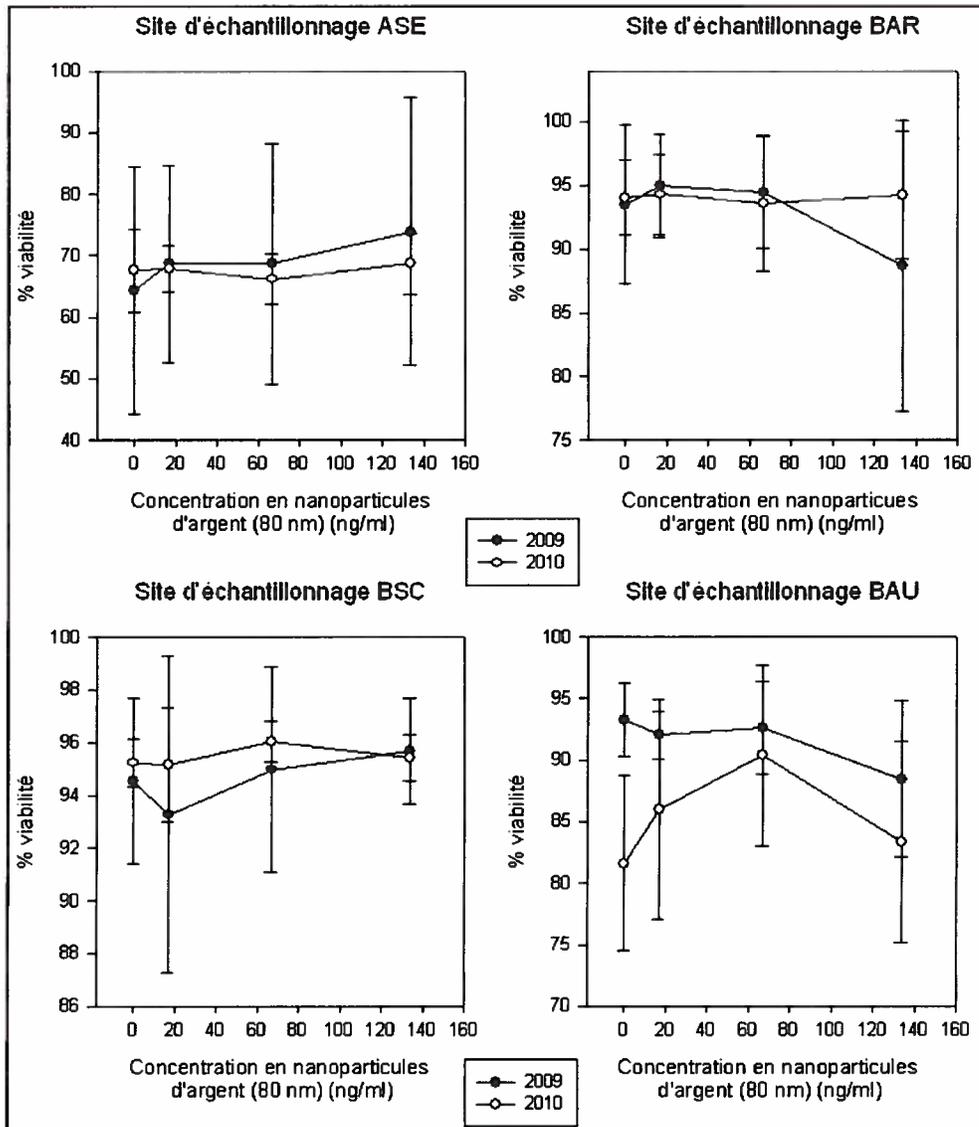


Figure 113 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en AgNPs TP de 80 nm de diamètre. Pools d'hémocytes n=6.

Lorsque l'on compare la viabilité des hémocytes selon les différents sites d'échantillonnage en 2009 et en 2010, aucune différence de viabilité n'est observée pour chaque concentration de NPs en fonction du contrôle (Figure 113). Les profils de viabilité entre 2009 et 2010 sont semblables excepté pour le site de BAU, la viabilité pour 2009 présente une légère diminution alors qu'en 2010, la viabilité est stimulée jusqu'à une concentration moyenne d'AgNPs TP puis elle diminue pour la plus forte valeur de la gamme (133,5 ng/ml).

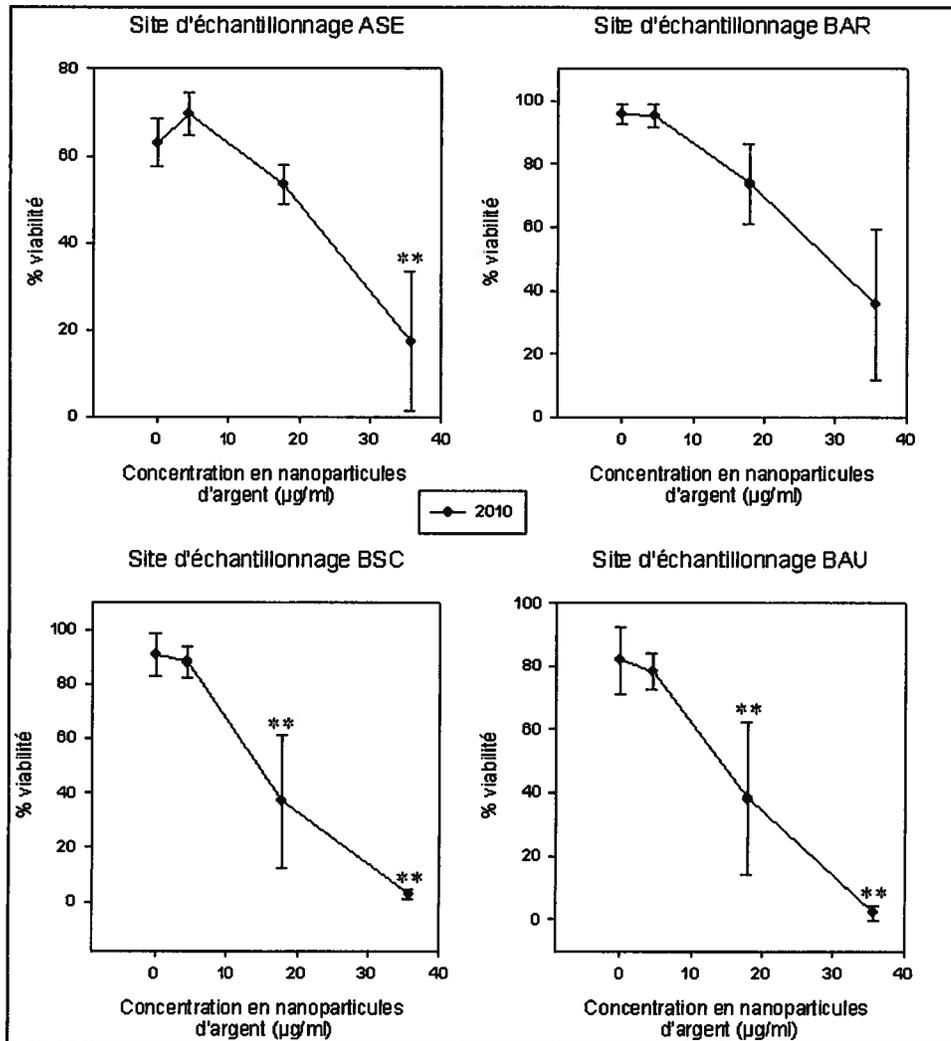


Figure 114 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en nanoparticules d'argent de la compagnie ViveNano® (AgNPs ViveNano). Pools d'hémocytes n=6.

Pour les 4 sites d'échantillonnages, la viabilité des hémocytes exposées aux NPs d'argent diminue en fonction de la dose d'exposition. La viabilité pour la dose maximale d'exposition, soit 35 µg/ml, est significativement différente des contrôles pour les sites. D'autre part, pour les sites de BSC et de BAU la viabilité très significativement diminuée dès 15,5 µg/ml de NPs (Figure 114). Les CI 50 calculées sont celles du Tableau 33.

Tableau 33 : Valeurs des CI 50 de viabilité pour les hémocytes de moules bleues selon les différents sites échantillonnés.

Sites d'échantillonnage	Valeur de la CI 50 ($\mu\text{g/ml}$)
ASE	28
BAR	33
BSC	18
BAU	18

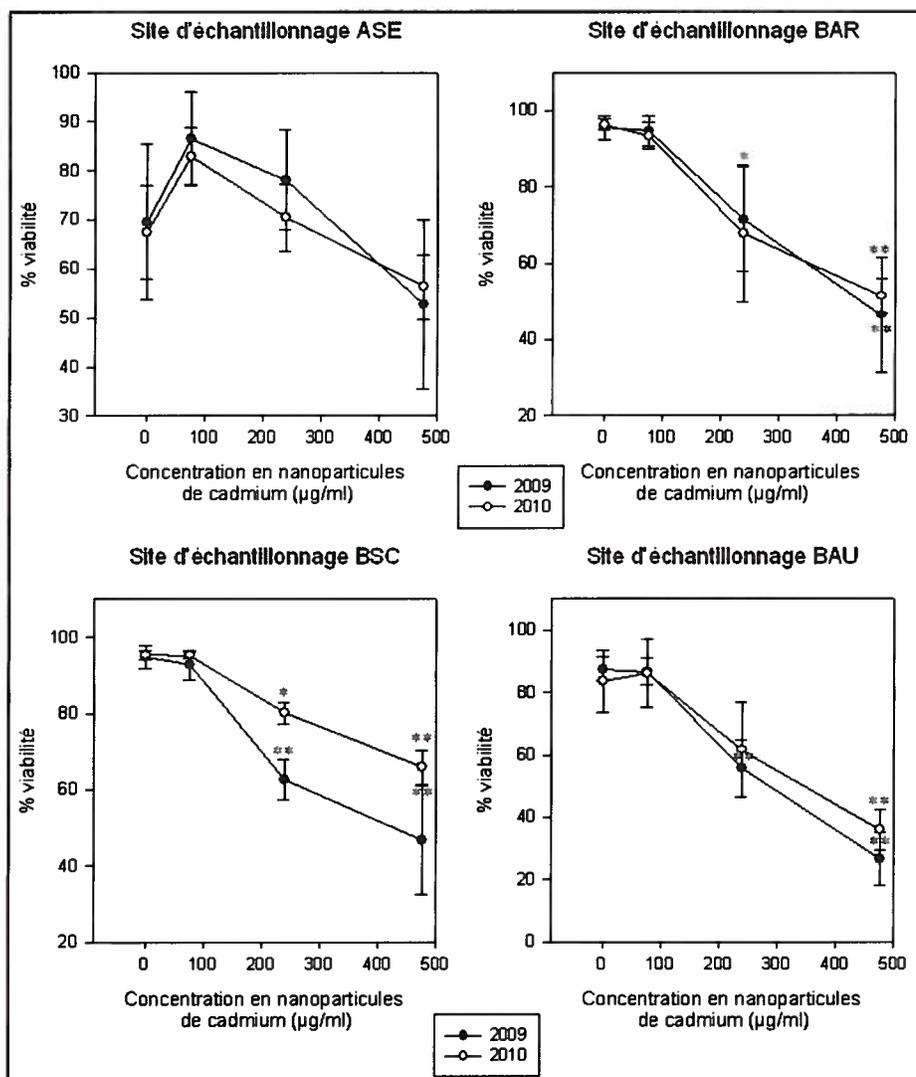


Figure 115 : Viabilité des hémocytes des différents sites d'échantillonnage exposés durant 21h en fonction de la concentration en nanoparticules de cadmium(QDs). Pools d'hémocytes n=6.

Exposées aux NPs de cadmium, la viabilité des hémocytes de moules bleues est significativement diminuée pour les sites de Barque, de Baie Sainte Catherine et de Baude et ce, pour les années 2009 et 2010 (Figure 115). En 2009, la viabilité des hémocytes est significativement diminuée ($p < 0.05$) dès 238 $\mu\text{g/ml}$ pour les sites de BAR de BSC. Elle est très significativement diminuée pour les trois sites en 2009 à 476 $\mu\text{g/ml}$. En 2010, la viabilité des hémocytes est très significativement diminuée dès 238 $\mu\text{g/ml}$ pour les sites de BSC et de BAU. Pour BAR la viabilité diminue significativement à 238 $\mu\text{g/ml}$ est très significativement à 476 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (Figure 115). Les CI 50 calculées à l'aide de droite de régression sont ceux du Tableau 34.

Tableau 34 : Valeurs de CI50 pour les hémocytes de moules bleues en fonctions des différents sites échantillonnés en 2009 et en 2010.

Années	Sites d'échantillonnage	Valeur de la CI 50 ($\mu\text{g/ml}$)
2009	BAR	454
	BSC	432
	BAU	344
2010	BAU	420

Selon nos résultats, le site d'ASE ne présente pas une diminution de viabilité suffisante pour calculer un CI 50, en 2009 il s'agit du seul site où la CI 50 ne peut être calculée. En 2010 Seul BAU présente une CI 50 et celle-ci est plus élevée qu'en 2009.

2.4.2 La phagocytose

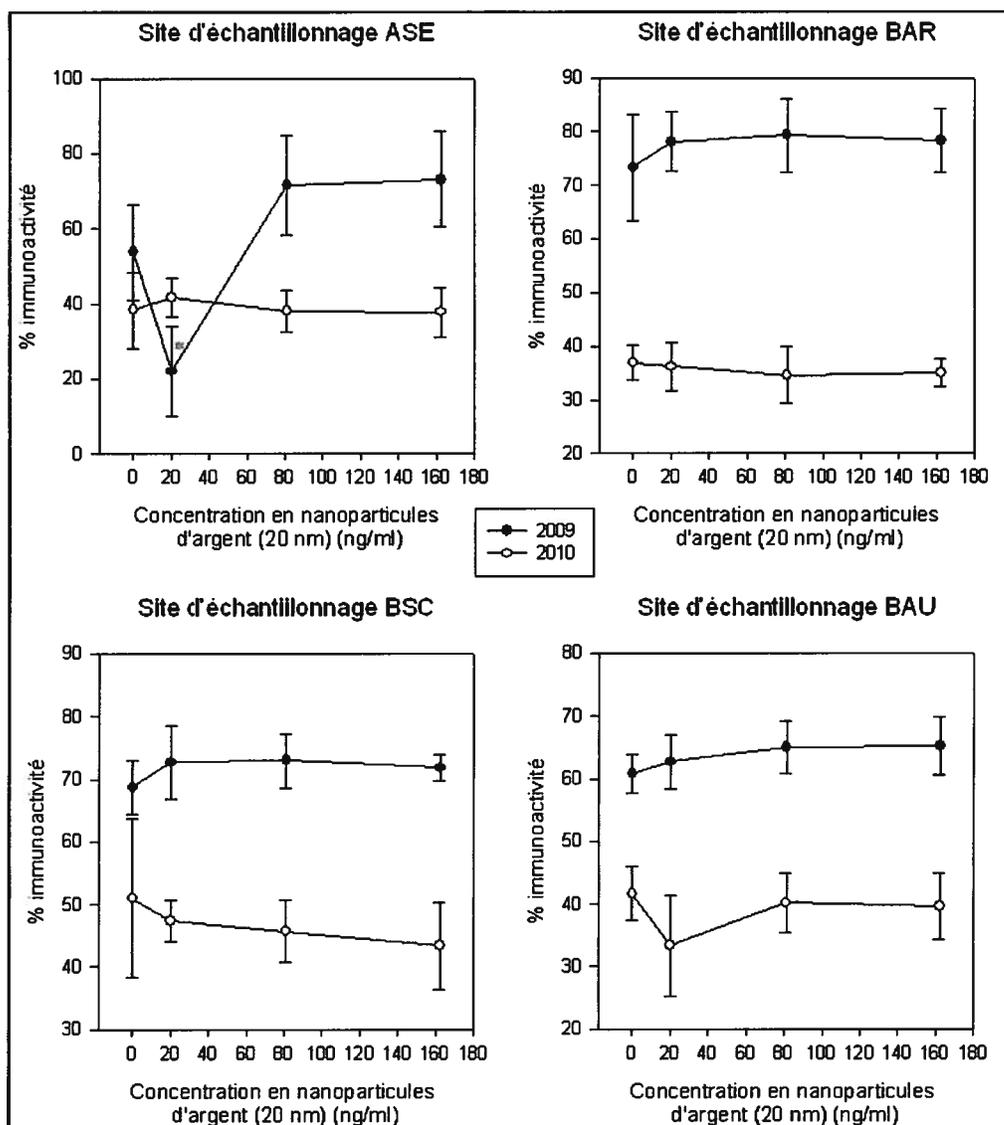


Figure 116 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés aux AgNPs TP de 20 nm de diamètre en 2009 et en 2010. Pool de n= 6

Aucune variation, de l'immunoactivité des hémocytes mis en présence de NPs d'argent de 20 nm de diamètre, n'est observée quel que soit le site d'étude (Figure 116). Il est à noter que les patrons de réponses entre les deux années sont similaires.

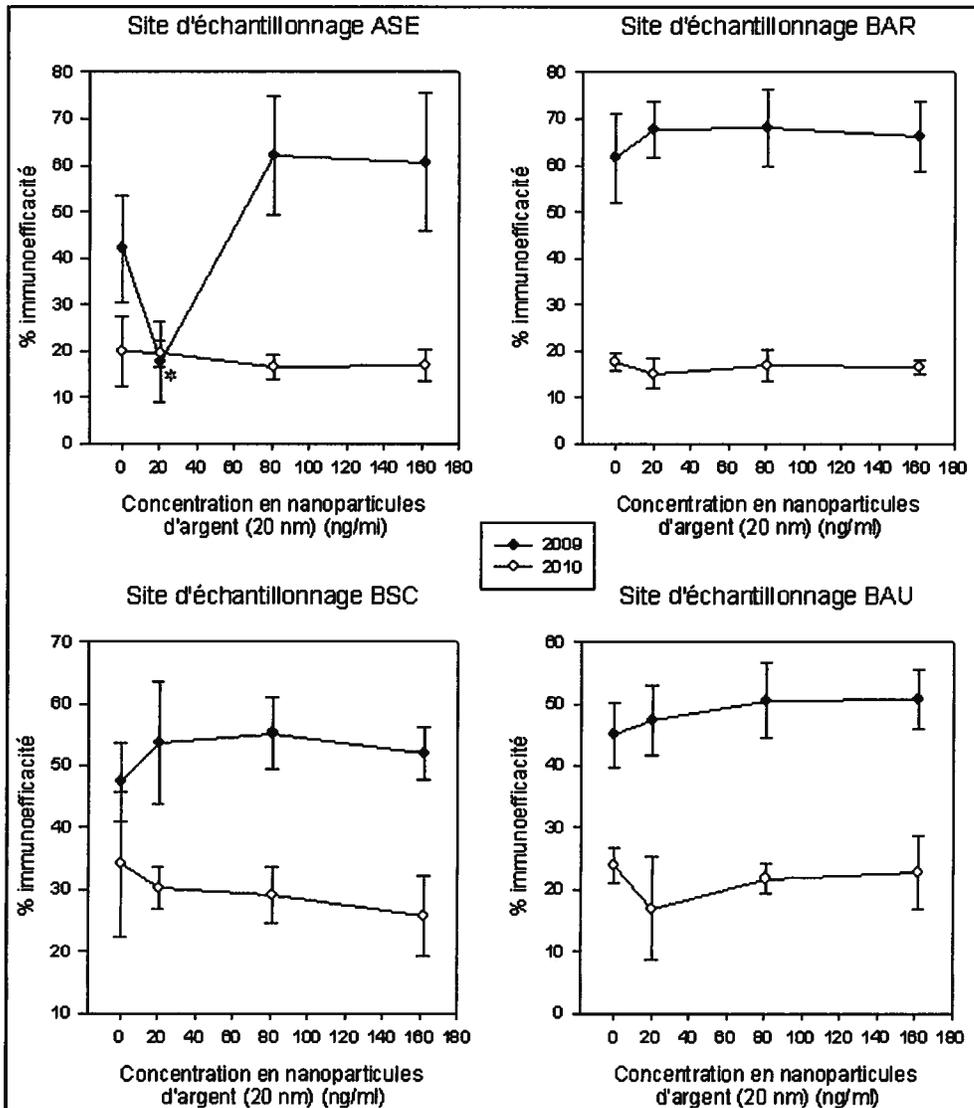


Figure 117 : Phagocytoses des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs TP de 20 nm de diamètre. Deux paramètres ont été observés l'activité phagocytaire M1 ou la capacité des cellules immunitaires de phagocyter une bille et plus. L'efficacité phagocytaire M2 ou la capacité des cellules immunitaires à phagocyter trois billes et plus, a aussi été étudiée. Des pools d'hémocytes ont été analysés, n=6.

Aucune variation, de l'immunoefficacité des hémocytes mis en présence de NPs d'argent de 20 nm de diamètre n'est observée quel que soit le site d'étude (Figure 117). Pour le site d'ASE, l'immunoactivité et l'immunoefficacité sont altérée pour la plus faible concentration

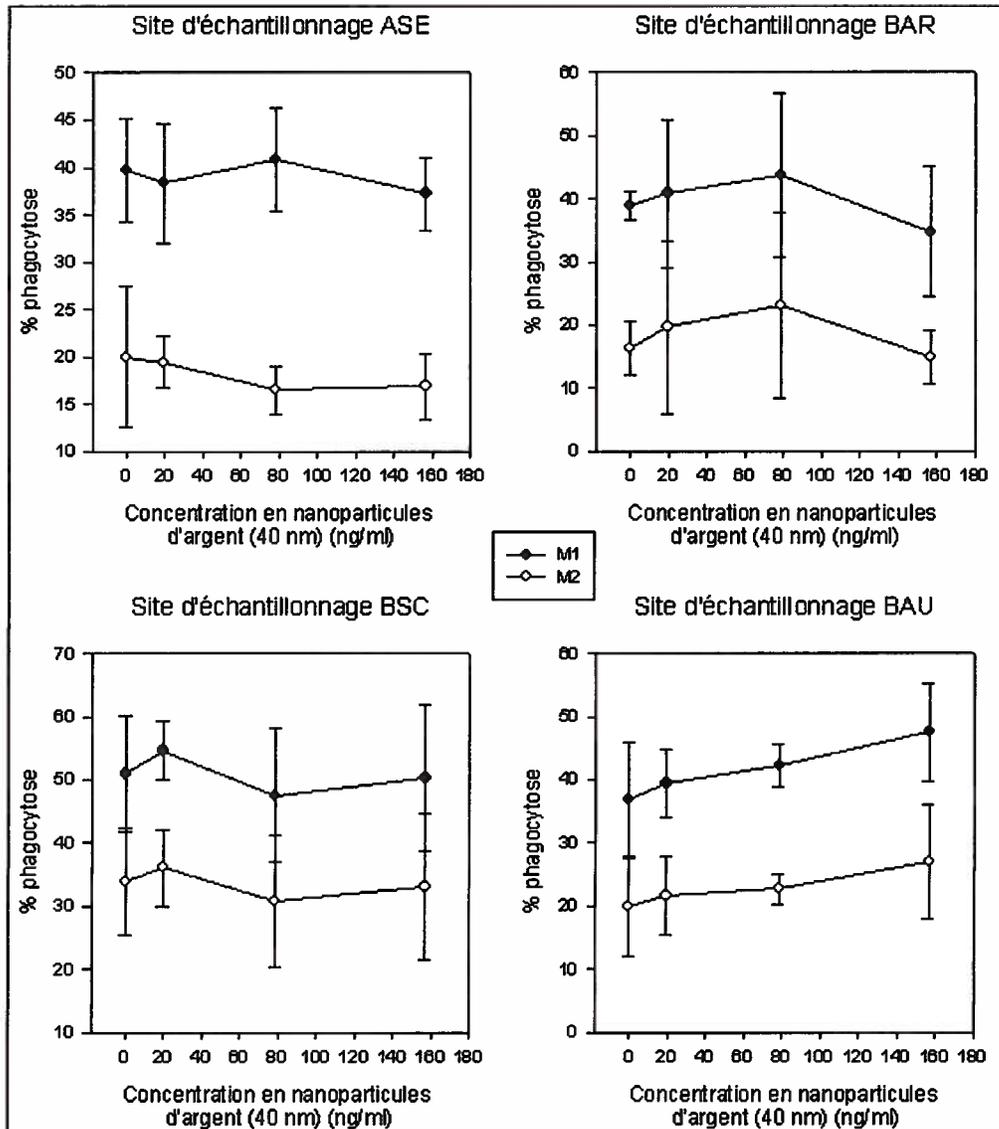


Figure 118 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs TP de 40 nm de diamètre. Deux paramètres ont été observés l'activité phagocytaire M1 ou la capacité des cellules immunitaires de phagocyter une bille et plus. L'efficacité phagocytaire M2 ou la capacité des cellules immunitaires à phagocyter trois billes et plus, a aussi été étudiée. Des pools d'hémocytes ont été analysés, n=6.

Aucune variation, de l'immunoactivité des hémocytes mise en présence de NPs d'argent de 40 nm de diamètre n'est observée quel que soit le site d'étude (Figure 118).

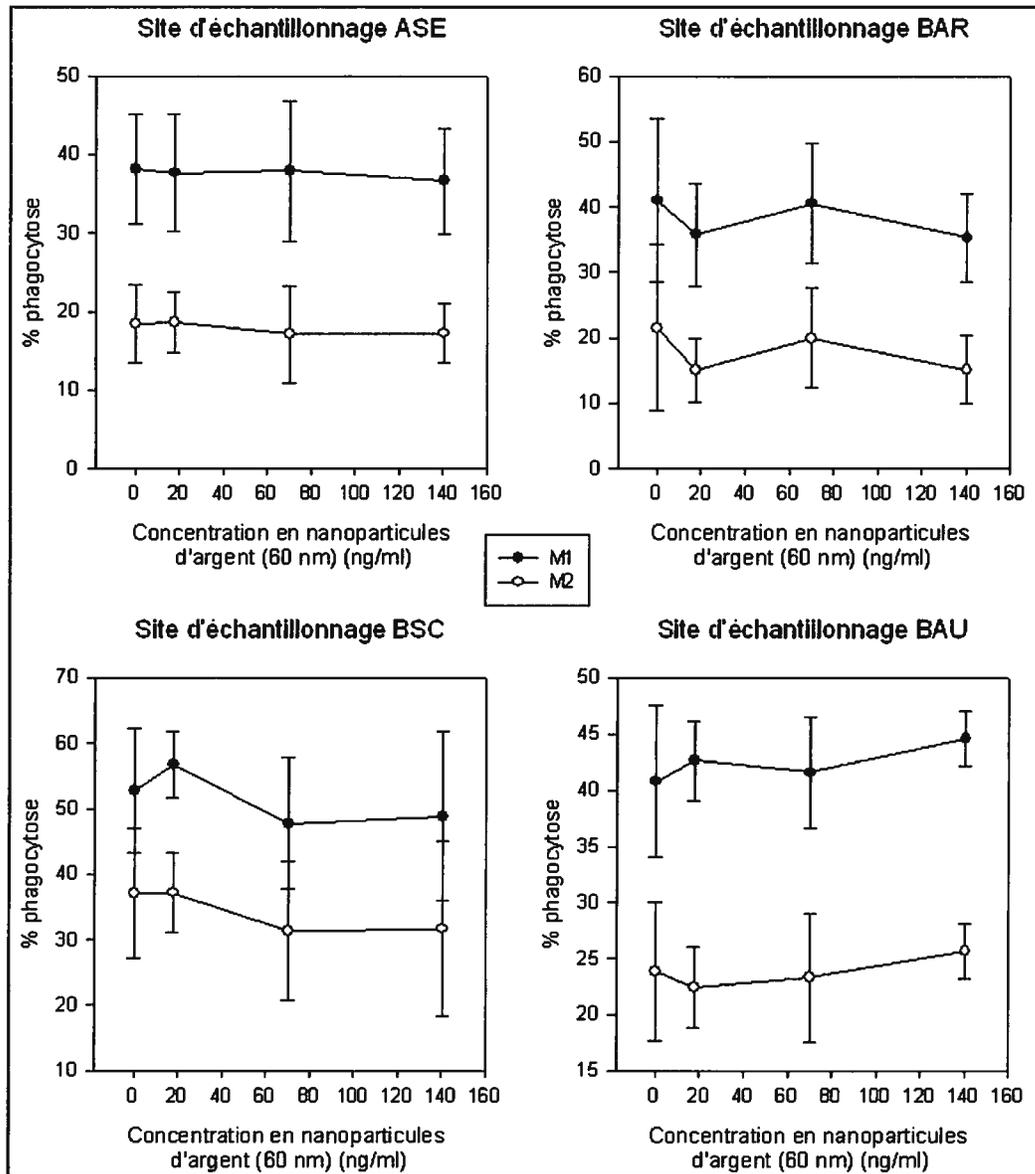


Figure 119 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs TP de 60 nm de diamètre. Deux paramètres ont été observés l'activité phagocytaire M1 ou la capacité des cellules immunitaires de phagocyter une bille et plus. L'efficacité phagocytaire M2 ou la capacité des cellules immunitaires à phagocyter trois billes et plus, a aussi été étudiée. Des pools d'hémocytes ont été analysés, n=6.

La phagocytose des hémocytes de moules n'est pas altérée quel que soit la concentration d'exposition de NPs d'argent. Le niveau de stimulation de base pour les moules de 2010 est plus faible que celui de celles en 2009, mais les patrons de réponses sont conservés (Figure 119).

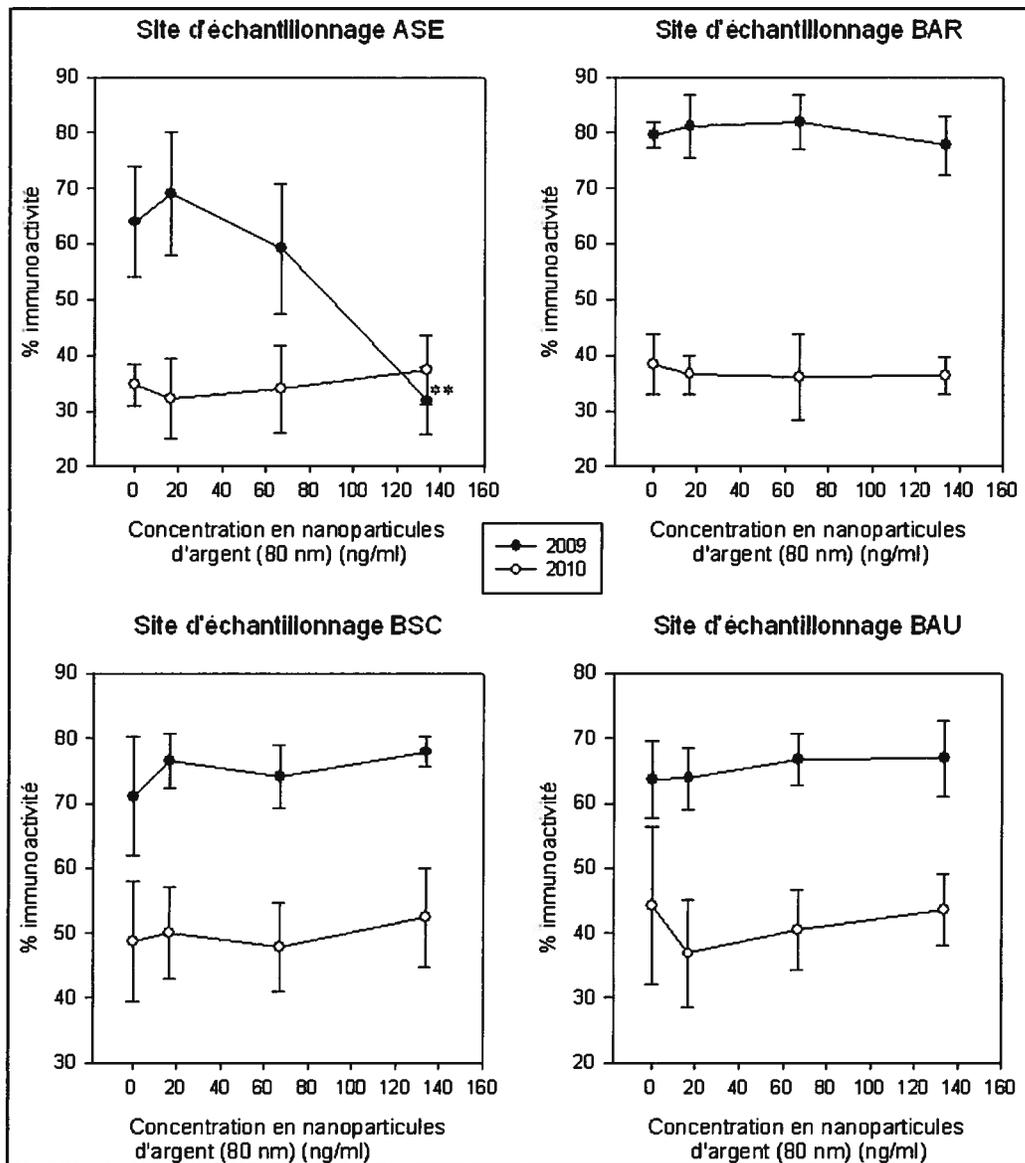


Figure 120 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés aux AgNPs TP de 80 nm de diamètre et ce durant 21h. Les échantillonnages ont été réalisés en 2009 et en 2010, pools d'hémocytes n=6.

Aucune variation significative de l'immunoactivité des hémocytes exposés aux NPs d'argent de 80 nm de diamètre n'est observée avec les sites de BAR, BSC et BAU (Figure 120). Une diminution très significative ($p < 0.001$) est observée pour la concentration maximale de NPs d'argent de 80 nm de diamètre.

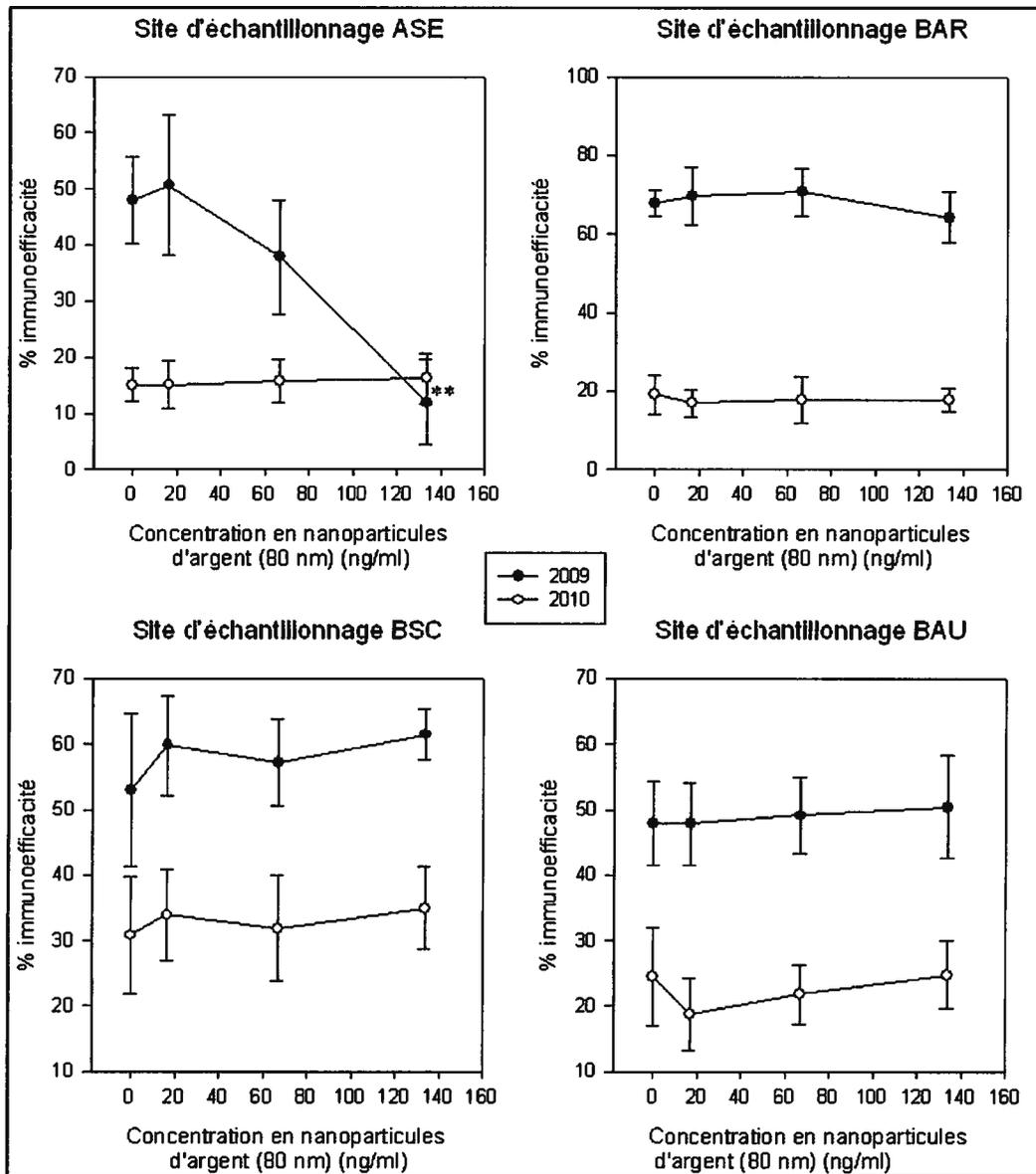


Figure 121 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés aux AgNPs TP de 80 nm de diamètre durant 21h. Les échantillonnages ont été réalisés en 2009 et en 2010, pools d'hémocytes n=6.

Aucune variation significative de l'immunoefficacité des hémocytes exposés aux NPs d'argent de 80 nm de diamètre n'est observée, pour les sites de BAR, BAU et BSC (Figure 121). Pour le site référence, ASE, l'immunoefficacité est significativement diminuée pour la plus forte concentration de NPs d'argent 80 nm.

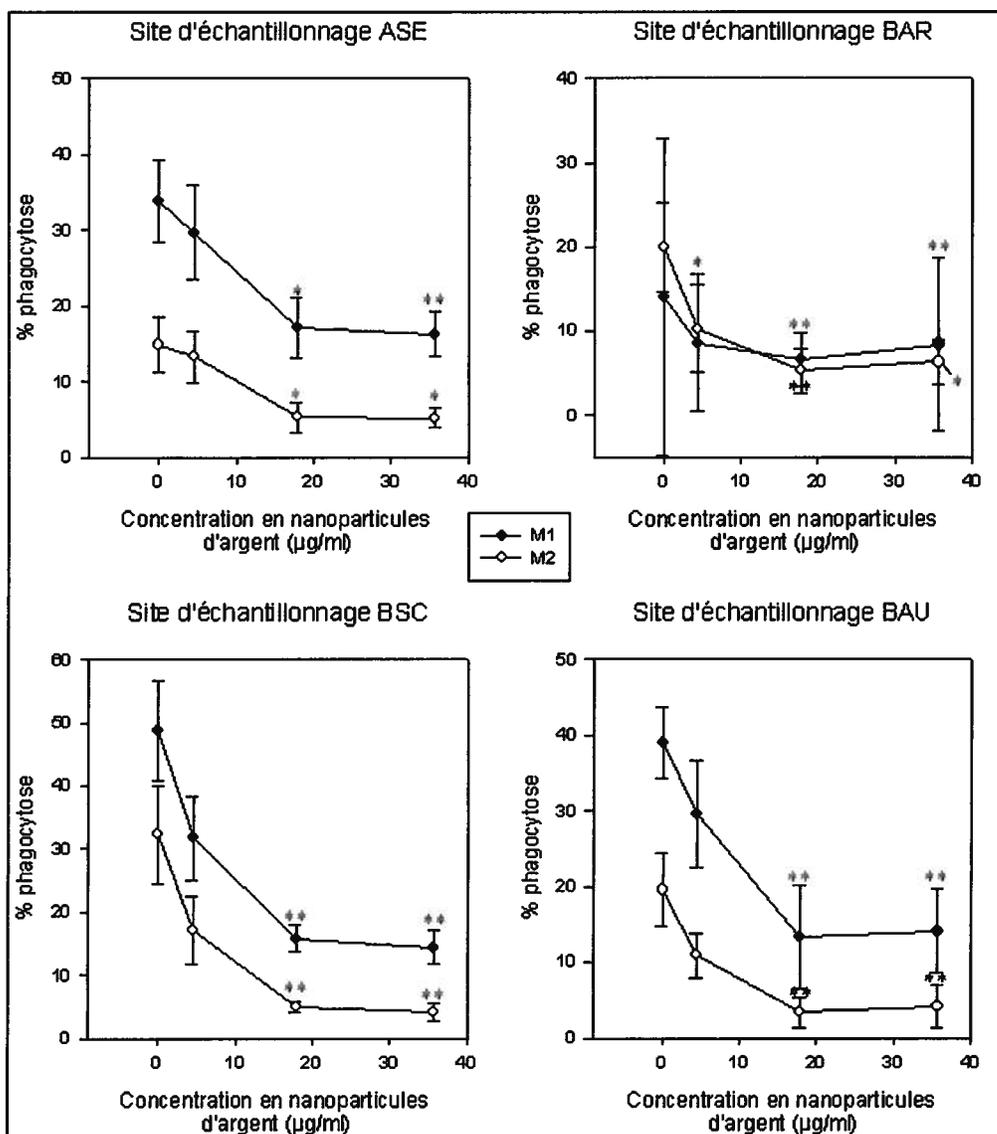


Figure 122 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21 h aux AgNPs ViveNano® en 2010. Deux paramètres ont été observés l'activité phagocytaire M1 ou la capacité des cellules immunitaires de phagocyter une bille et plus. L'efficacité phagocytaire M2 ou la capacité des cellules immunitaires à phagocyter trois billes et plus, a aussi été étudié. Des pools d'hémocytes ont été analysés, n=6.

L'immunoactivité et l'immunoefficacité des hémocytes de moules bleues est significativement diminuées quel que soit le site étudié après une exposition aux NPs d'argent durant 21h. Pour l'ASE, l'immunoactivité et l'immunoefficacité sont significativement diminués dès 17,85 µg/ml ($p < 0.05$) et est très significativement diminuée à 35,7µg/ml. Pour BAR la diminution de l'immunoefficacité est significative dès 4.46 µg/ml. Pour BSC et BAU les deux patrons sont semblables, la diminution de la phagocytose est très significative dès 17,85 µg/ml ($p < 0.001$) (Figure 122). Les IC 50 calculées pour les différents sites d'échantillonnage pour les NPs d'argent sont :

Le site d'ASE présente les IC 50 les plus élevées qu'il s'agisse de l'immunoactivité ou de l'immunoefficacité (Tableau 35).

Tableau 35 : IC 50 calculées, pour les années 2009 et 2010, pour la phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21H aux AgNPs ViveNano®. Toutes les valeurs sont exprimées en µg/ml de nanoparticules.

2010	ASE	BAR	BSC	BAU
Immunoactivité	27	13	17	13
Immunoefficacité	14	10	9	9

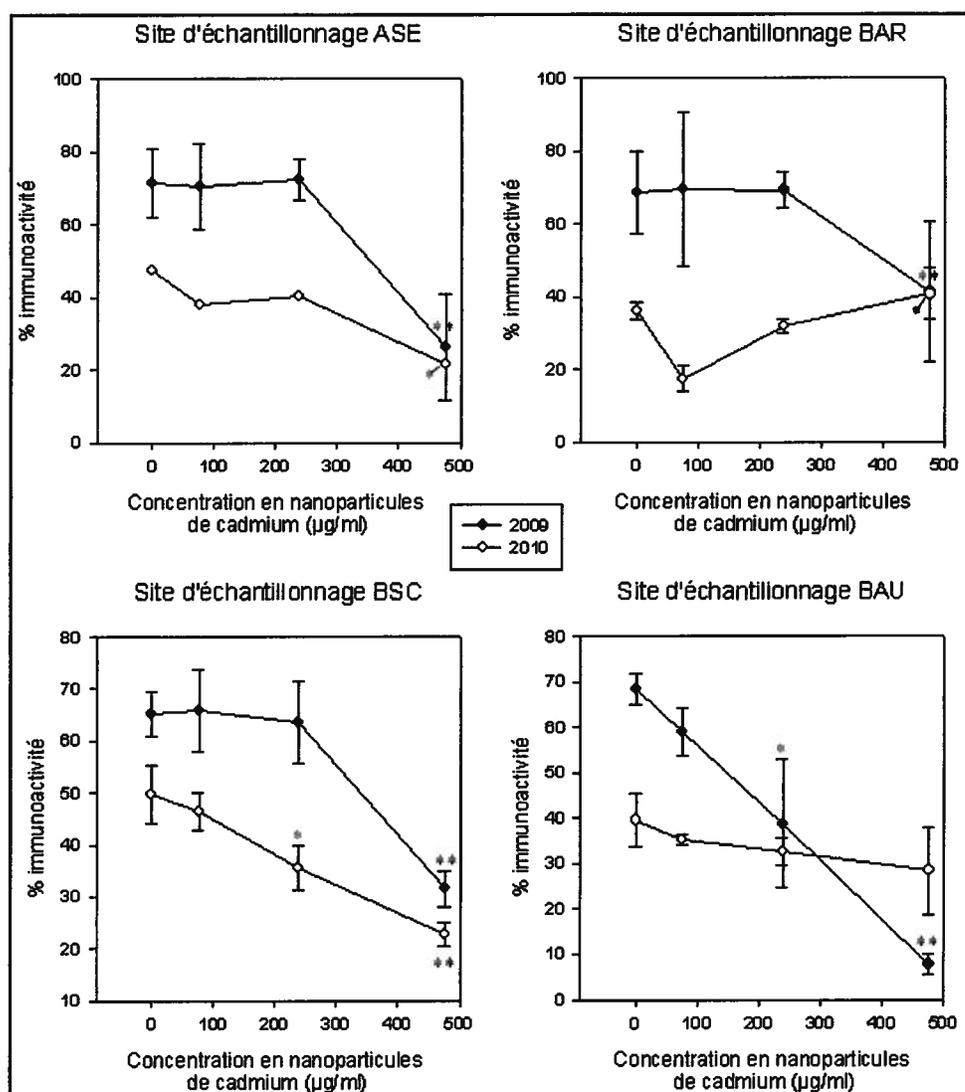


Figure 123 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules de cadmium (QDs) et ce durant 21h. Les échantillonnages ont été réalisés en 2009 et en 2010, pools d'hémocytes n=6.

L'immunoactivité de hémocytes de moules est significativement diminuée pour tous les sites en 2009 et pour 3 des 4 sites en 2010. En 2009, l'immunoefficacité est très significativement diminuée pour la plus forte dose d'exposition soit 476 $\mu\text{g/ml}$ pour les sites d'ASE de BAR et de BSC. Pour BAU, l'immunoefficacité est significativement diminuée dès 238 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 123). En 2010, l'immunoefficacité à 476 $\mu\text{g/ml}$ de QDs est significativement différente du contrôle pour ASE, BAR et BSC. Pour BSC, elle diminue significativement dès 238 $\mu\text{g/ml}$.

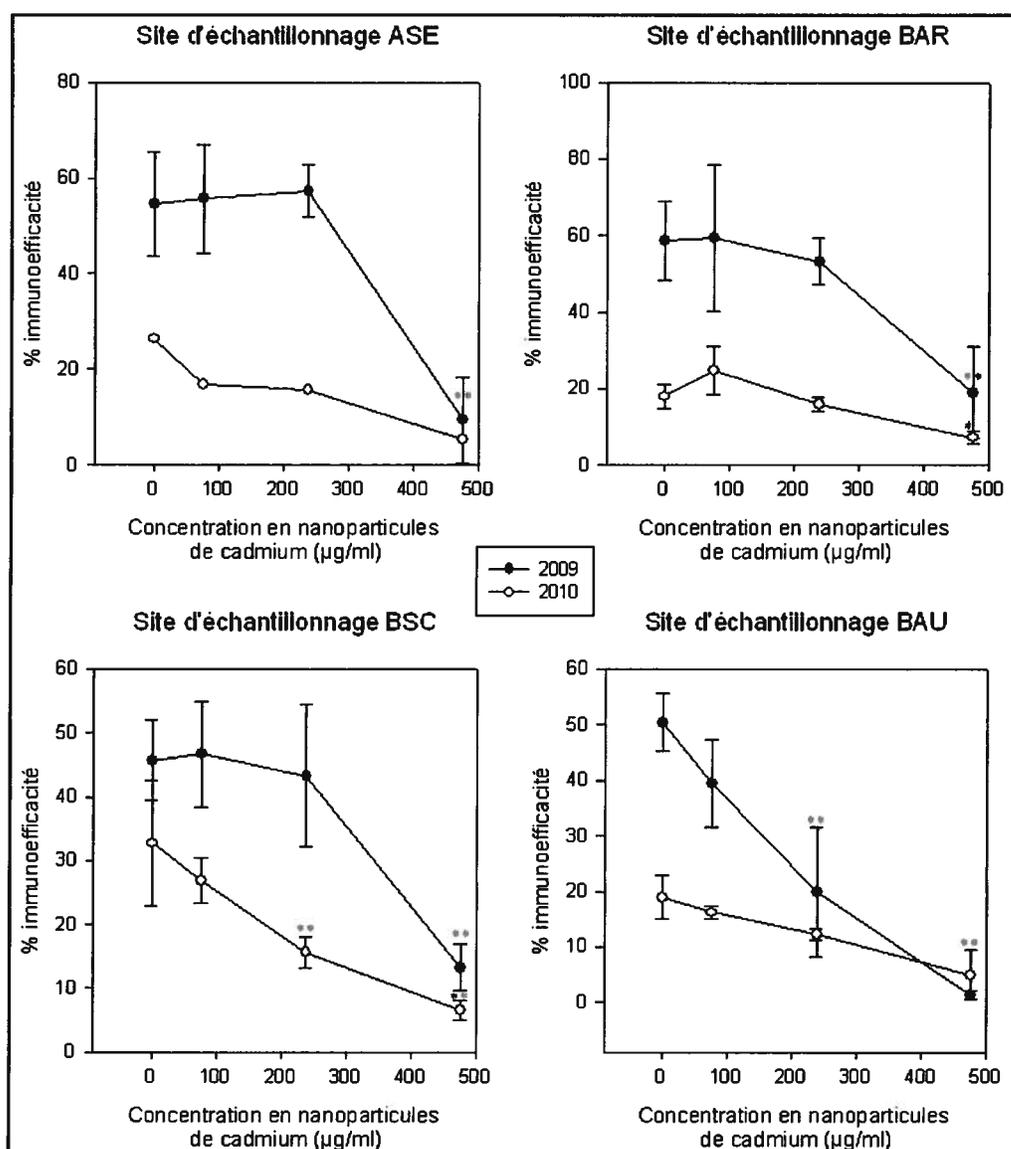


Figure 124 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules de cadmium (QDs) durant 21h. Les échantillonnages ont été réalisés en 2009 et en 2010, pools d'hémocytes n=6.

L'immunoefficacité des hémocytes exposés à différentes doses de points quantiques est significativement diminuée pour les 4 sites d'études. Pour ASE et BAR, l'efficacité de

phagocytose est significativement diminuée pour la plus grande valeur de NPs soit, 476 µg/ml pour 2009 et 2010. Pour BSC, en 2009 l'efficacité phagocytaire est très significativement diminuée à 476 µg/ml. En 2010, pour BSC l'efficacité phagocytaire diminue très significativement dès 238 µg/ml ($p < 0.001$). Pour BAU, le patron est inversé en 2009, l'efficacité de phagocytose est très significativement diminuée dès 238 µg/ml. En 2010, elle diminue très significativement pour la dose maximale 476 µg/ml (Figure 124).

Les CI 50 ont été calculées à l'aide de droites de régression (toutes les données sont exprimées en µg/ml) (Tableau 36).

Tableau 36 : CI 50 calculées, pour les années 2009 et 2010, pour la phagocytose des hémocytes de moules bleues exposées durant 21H aux nanoparticules de cadmium (QDs). Toutes les valeurs sont exprimées en µg/ml de nanoparticules.

2009	ASE	BAR	BSC	BAU
Immunoactivité	396	> 952.4	471	270
Immunoefficacité	354	393	383	222

2010	ASE	BAR	BSC	BAU
Immunoactivité	433	> 952.4	432	n.o
Immunoefficacité	264	424	270	324

En 2009, les CI 50 les plus faibles sont observées pour le site de BAU (Tableau 36), alors que le site de BAR présente les CI 50 les plus élevée. En 2010, le site de BAR présente toujours les CI 50 les plus élevées, par contre le site de BAU semble avoir des CI 50 plus élevées.

2.5 Paramètres humoraux analysés sur le plasma des moules bleues

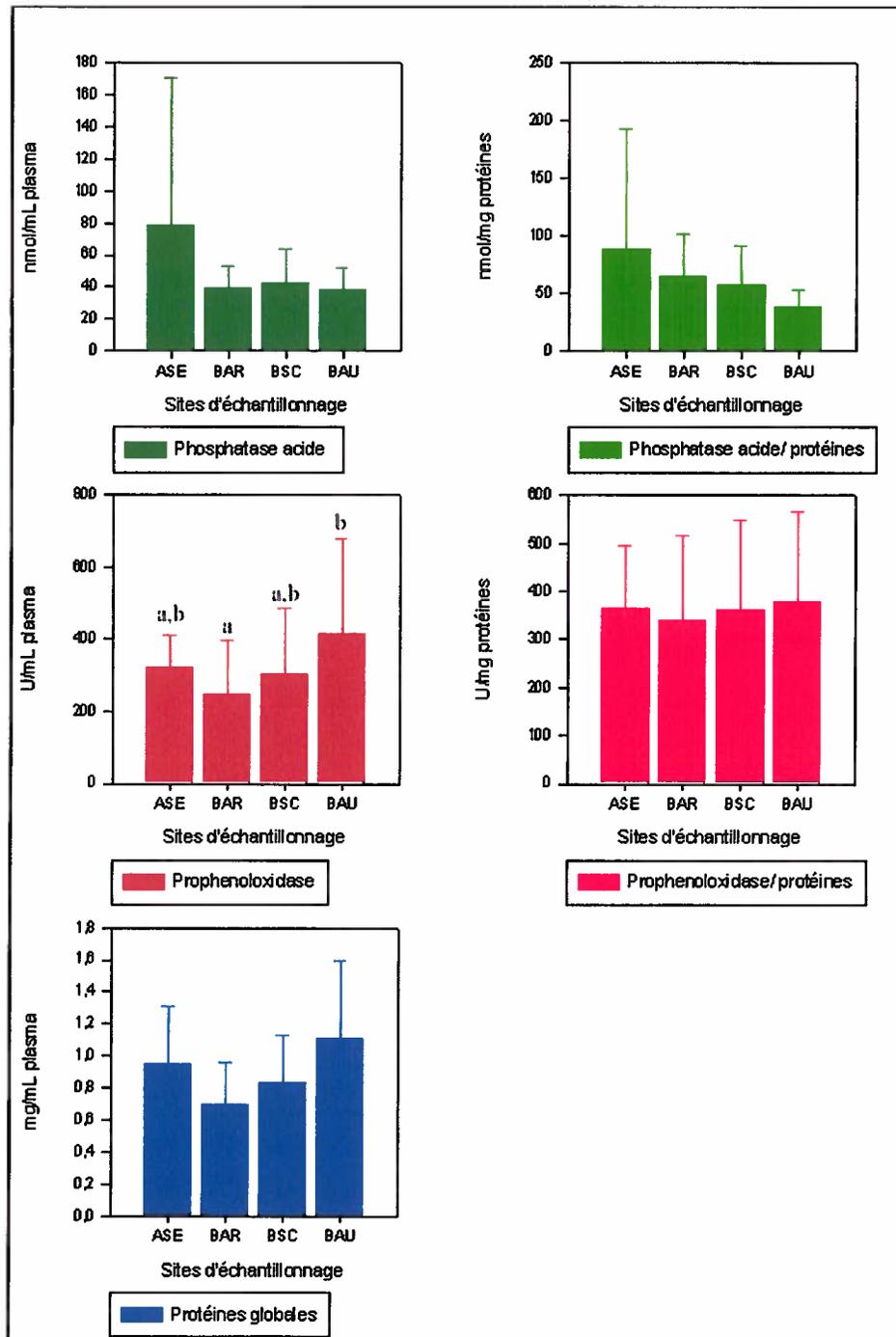


Figure 125 : Résultats des dosages de protéines mesurées sur le plasma de 15 moules présent sur le terrain lors de la campagne d'échantillonnage 2010. Seuls les graphiques présentant des différences significatives ont été annotés par des lettres.

Bien qu'il n'y ait pas de différences significatives, entre les sites des différences de paramètres humoraux sont observables (Figure 125). Le site d'ASE semble différent des autres

sites, il présente une forte concentration de phosphatase acide et de phosphatase acide / protéines globales (Figure 125). Entre les différents sites, la quantité de prophanoloxydase est variable entre les sites, ainsi le site de BAR est significativement différent du site de BAU (Figure 125). Le site de BAU présente la plus forte concentration en prophanoloxydase des 4 sites. Aucune variation significative de la concentration en prophanoloxydase / protéines est observée, bien que les moules de BAU soient celles qui présentent le plus fort taux de protéines globales (Figure 125).

3. Discussion sur les expériences menées au Saguenay

Les différents résultats collectés durant ces trois années d'échantillonnages permettent d'affirmer certaines hypothèses. Selon les résultats des paramètres chimiques, le site d'ASE diffère des autres sites. Ceci avait déjà été observé dans le passé et l'est encore avec les myes (Gagné, Blaise et al. 2009). Le site d'ASE est celui où les eaux de surface les plus chaudes et les moins salées ont été mesurées. Les eaux des trois autres sites échantillonnés à savoir, BSC, BAU et BAR présentent des eaux de surface plus froides, le site de BAR étant lui même situé dans le fleuve Saint Laurent. La faible salinité du site de ASE est aussi liée à la faible conductivité électrique observée (capacité d'un matériau ici un liquide à laisser passer des charges électriques librement ou courant électrique). Concernant le pH, le site d'ASE est en effet soumis aux eaux douces de lessivage du fjord car le pH à cette station est de 7,48. Ce pH est situé entre un pH d'eau douce 7 et un pH plus alcalin d'eau de mer (pH=8). Le site de BAR présente un pH plus alcalin que ceux des autres, situés dans des régions semblables pourtant, la conductivité des sites de BAR et de BSC est la même. La différence de pH pourrait donc être expliquée par la différence de profondeur à laquelle est prise l'échantillon.

D'autre part, les dispositions géographiques des sites échantillonnés sont différentes. Il est important de noter que les mares d'eau dans lesquelles se trouvent les moules, sur le site de l'ASE, sont soumises à des variations de température durant les heures de marées basses. Pour les sites de BAU, BSC et BAR les moules se trouvent souvent sur les plages dans des courants d'eau salées.

Les études passées de Gagné et al, 2009 ont mis l'accent sur la proximité des naissains de bivalves au rivage et leur exposition à l'air et à de fortes variations de températures. Plus les bivalves seraient proches du rivage, plus ils seraient soumis aux variations de conditions (Gagné, Blaise et al. 2009). Il est important de noter que les myes et les moules n'ont pas exactement la même biologie, en effet, les myes sont des bivalves qui s'enfouissent dans le

sédiment et qui assurent leurs principales fonctions via l'usage de siphons. Contrairement, les moules ne s'enfouissent pas autant dans le sédiment et ont très souvent besoin d'un substrat pour se fixer, de plus, les moules échantillonnées au Canada étaient toujours prélevées dans des mares d'eau ou dans des cours d'eau. Ainsi, les conditions de vie ne sont pas exactement les mêmes ; les conditions favorables pour les myes ne le sont pas forcément pour des moules. Sur le terrain, il a été observé que les moules du site ASE sont présentent en faible quantité dans des mares d'eau où les conditions sont variables. Ainsi les moules sont susceptibles d'être soumises à des variations de température et de variations d'oxygène.

Selon nos résultats, la viabilité des hémocytes de moule est faible pour les moules du site témoin ASE, ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce site est localisé dans une zone très dessalée où les moules y sont peu abondantes (données de terrain). Effectivement le terrain d'ASE présente, à marée basse, quelques marelles et une grande plage de sable. Les moules bleue ne sont présentent que dans ces mares de profondeur variable (de 30 cm à 1 m environ) et en faible nombre. Les cellules des moules présentes au site de l'ASE sont soumises à des conditions de vie plus variables que les autres moules. Ces observations sont retrouvées dans les résultats des paramètres immunitaires des moules d'ASE. Les conditions de viabilité lors de l'échantillonnage sont comparables à celles des deux autres sites, mais après 21h d'incubation la viabilité des moules d'ASE diminue plus fortement que pour les hémocytes des 2 autres sites. Les moules de ce site sont donc plus sensibles à l'action des NPs que les deux autres sites. Elles sont donc plus vulnérables lors de conditions de stress cumulatif. Ainsi nous pouvons valider l'hypothèse que des moules soumises à un stress environnemental pour le cas du fjord du Saguenay sont plus sensibles à un autre stress de nature chimique.

En 2008, la viabilité des moules présentent sur le site d'ASE est plus faible que celle des moules des autres sites. Cependant, les paramètres phagocytaires sont plus forts, attestant une stimulation de la capacité phagocytaire des moules liée aux conditions de vie des bivalves.

Concernant le fait que l'IC des moules du site de BAU en 2009 et en 2010 soit plus fort que celui des autres sites, indique que les moules sont en meilleure condition. D'autre part, en fonction des trois années d'échantillonnage, les moules présentent un meilleur IC en 2008 qu'en 2009 et qu'en 2010. Le fait que la valeur de l'IC de BAU soit supérieure à celle des autres sites n'est pas surprenant, en effet, lors d'une étude de Gagné et al en 2009, les myes prélevées à ce site avaient un IC supérieur à celui des autres sites ainsi que leur indice de croissance (Gagné, Blaise et al. 2009). D'autre part, nos résultats concordent aussi avec ceux

obtenus par ces mêmes auteurs pour BSC. Les individus présents à BSC présentent des faibles IC, ce qui pourrait être dû à la pollution du site. Ainsi, le site de BAU pourrait être considéré comme le site de référence. Malgré que le site d'ASE ne présente aucune contamination potentielle, il est soumis à une forte dessalure qui influe sur les paramètres immunitaires des moules et donc ne permet pas de le classer comme site de référence. Quant aux autres sites BAR et BSC, ils sont incontestablement soumis à des pollutions métalliques où, beaucoup de composés métalliques ont été mesurés chez les myes présentes aux sites d'études (Gagné, Blaise et al. 2006).

Durant les échantillonnages, les moules des sites de BAR et de BSC présentaient des perles incluses dans le manteau ou dans la coquille des bivalves, les autres moules n'en présentaient pas. Certaines études ont démontrées que la présence de perles dans les bivalves pourraient être liées à une espèce de trématodes (Lutz 1978). Ces études montrent qu'il s'agirait probablement de *Gymnophallus bursicola* (Odhner, 1900). Ce parasite rentre dans les parois du manteau des moules dès le stade larvaire. Ainsi, pour se protéger des lésions causées par ce métacercaire les moules forment des couches de coquille nacrée par-dessus les vers (Russell 1967). D'autre part, Jameson en 1902 définissait que les zones les plus propices pour trouver des trématodes sont les estuaires et les canaux. Selon nos résultats, c'est exclusivement dans ces conditions que les perles ont été observées. En 2009, de nombreuses moules mortes, surtout des coquilles, ont été retrouvées sur le site de BAR, attestant un épisode de mort massive, qui pourrait potentiellement être due aux trématodes. En effet, il a été démontré, dans une étude de Santos et al, 1995 que certains parasites dont *Gymnophallus bursicola* sont potentiellement à l'origine de sérieux dommages sur les gonades (ici le manteau chez les moules) (Santos and Coimbra 1995) et donc pourraient avoir une action sur la reproduction des bivalves mais aussi leur survie.

Ces variations de réponses entre les sites sont aussi observées lors de l'analyse des paramètres humoraux. La phénoloxydase (PO) est une enzyme qui existe sous une forme inactive aussi appelée prophénoloxydase (ProPO) qui peut être activée par des inducteurs spécifiques. Ainsi, la cascade liée à la ProPO peut être activée par la reconnaissance de protéines liées au β -1,3-glucanes, des lipopolysaccharides, du peptidoglycane ou comme d'autres composants tels que les facteurs endogènes émis lors de dommages tissulaires (Cerenius and Söderhäll 2004). Cette cascade a été étudiée pour les arthropodes par Cerenius et al, 2004. Brièvement, après l'activation de la cascade de ProPO par des protéases à sérines, est formée la phénoloxydase

(PO), qui catalyse l'oxydation des groupements phénols et forme des composés toxiques instables (quinones et anions superoxydes) qui vont par la suite être polymérisés en mélanine (de façon non enzymatique) (Söderhäll and Cerenius 1998). La mélanine et ses précurseurs ont été répertoriés comme des inhibiteurs de croissance des champignons et des bactéries (Söderhäll 1982).

Elle est souvent produite à la suite d'infestation avec des pathogènes (Luna-Gonzalez, Maeda-Martinez et al. 2003; Hong, Xiang et al. 2006). Le système de la PO est très sensible et une composante essentielle de la réponse immunitaire innée des mollusques contre les agents infectieux (Hong, Xiang et al. 2006). Ce moyen permet d'empêcher la formation d'un film bactérien dans les tissus des bivalves (Lambert 1998). Les mesures de prophénoloxydase montrent des différences entre les sites ainsi, les moules du site de BAU présentent une forte concentration de phénoloxydases comparées à celles de BAR. (Non valable pour ASE et BSC).

Contrairement, les faibles valeurs de BAR traduisent un déficit dans la production de système de défense. En effet, il a déjà été démontré que la réduction de l'activité de la phénoloxydase peut aussi faciliter les infections, ceci a déjà été vu pour les huîtres (Travers, Silva et al. 2008). Ce phénomène pourrait aussi être lié à la présence de trématodes dans les moules du site de BAR.

D'autre part, les résultats des mesures de la phosphatase acide confirment aussi certains résultats observés. La phosphatase acide est largement distribuée dans le règne animal et végétal (Panara 1985; Jing, Li et al. 2006) et est localisée dans les lysosomes. Ces enzymes sont surtout utilisées dans les mécanismes de défenses et dans les procédés métaboliques. Elles permettent la déphosphorylation ou enlèvement du complexe phosphorylés de molécules. Il existe des variations dans les phosphatases (dépendant de leur poids moléculaires), celles de forts poids moléculaires ne sont pas spécifiques et hydrolysent toutes les liaisons phosphoriques (Panara 1985; Cohen 1989; Panara, Angiolillo et al. 1989; Jing and Wenbin 2006). Nos résultats, bien que non significatifs, indiquent que les moules site d'ASE produisent beaucoup de phosphatases ce qui pourrait être lié à l'état de santé des organismes présents sur ce site.

Ces variations entre les sites sont aussi observées dans les mesures des paramètres immunitaires des 15 individus sélectionnés sur les sites d'échantillonnage. Selon les années, une diminution de viabilité des sites de contrôle aux sites impactés traduit un gradient de

contamination. D'autre part des variations entre les années sont observables, pour la phagocytose des différences non significatives sont observées entre 2008 et 2009.

En 2008, l'immunoactivité et l'immunoefficacité indiquent que les niveaux de stimulation des sites de BAU sont faibles par rapport à ceux des autres sites. Ceci est lié à la faible viabilité des sites de BAU et la forte cellularité (données non présentées). De plus, la forte stimulation de phagocytose des sites d'ASE comparée aux autres sites d'échantillonnage peut être liée aux conditions environnementales présentes à ce site. En 2009 et 2010, une tendance à une stabilisation des paramètres que ce soit pour la viabilité ou la phagocytose (immunoactivité et immunoefficacité) est observée indiquant éventuellement une amélioration des performances du système immunitaire.

Ainsi, les moules de terrain sont déjà soumises à des variations environnementales. Lorsqu'on leur soumet un autre stress de nature chimique, on parlera alors de « *stress on stress* » ou double stress. L'exposition aux NPs d'argent de différentes tailles de 20 nm 80 nm n'a pas de rôle significatif sur la viabilité des hémocytes. Aucune diminution de la phagocytose n'est observée (exception d'ASE pour 2009), ceci est lié à la faible concentration en argent présente dans les particules. Les réponses entre les années 2009 et 2010 ont les même patrons, ces résultats ont déjà été retrouvés pour les moules de terrain, ce qui confirme que les NPs d'argent de la compagnie Ted Pella^{Inc} n'ont pas d'action. Mais si l'on considère les particules de 80 nm pour le site d'ASE, une diminution significative de la phagocytose est observée. Cependant, cette diminution n'est pas induite pour les particules de petites tailles (20, 40 et 60 nm) pour le site d'ASE, ainsi les NPs de grosses tailles ont un effet mécanistique pour des organismes déjà stressés. Ces résultats valident donc l'hypothèse que des organismes déjà perturbés par leur milieu de vie (dessalure de l'ASE) sont plus sensibles à des variations de leurs paramètres immunitaires lorsqu'ils sont soumis à un autre stress de nature chimique (NPs). Cette observation est en accord avec les observations de Coles et al. (1995), sur l'exposition de moules prélevées en milieu naturel puis exposées à diverses concentrations de cadmium dissous (Coles 1995).

Concernant les résultats des NPs de la compagnie ViveNano[®], les QDS et les AgNPs ViveNano[®] présentent des profils de réponses similaires. Pour les QDs, la phagocytose est significativement diminuée pour les plus fortes doses de la gamme. La viabilité est significativement diminuée pour les fortes concentrations. Selon nos résultats une atteinte significative de la phagocytose est observée avant que la viabilité ne diminue

significativement. Les QDs sont donc toxiques mais à fortes doses. Pour les AgNPs ViveNano[®], les résultats démontrent que celles-ci sont très toxiques pour tous les sites échantillonnés. Les NPs d'argent induisent une diminution du système immunitaire hémolympatique. Ces résultats valident donc l'hypothèse que les NPs d'argent de ViveNano[®] ont une action cytotoxiques et mécanistique sur les hémocytes de moules échantillonnées sur le terrain. Cette forte diminution de la fonction phagocytaire est à mettre en relation avec la diminution de viabilité pour les hémocytes de moules. La plupart des cellules étant mortes à fortes doses, elles ne peuvent plus phagocyter, les cellules qui survivent ont une activité hémolympatique réduite. Etant donné que la viabilité est très diminuée aux fortes concentrations, il est vraisemblablement possible que les individus ne survivraient pas à un tel stress.

Cependant une atteinte mécanistique est observée pour les concentrations auxquelles la viabilité n'est pas diminuée et un effet sur la phagocytose est noté. Les individus déjà soumis à un stress environnemental sont donc fragilisés par un stress de nature chimique. Ce phénomène est aussi appelé « *stress on stress* », il diffère selon les sites échantillonnés dans le fjord du Saguenay.

D'autre part, ces résultats permettent de valider l'hypothèse que les hémocytes des moules provenant de l'aquarium de Québec (voir chapitre 3 et les tests réalisés au laboratoire) sont plus résistantes que ceux des moules issues de prélèvements sur le terrain. Aucune variation de la phagocytose des hémocytes de moule bleue provenant de l'aquarium de Québec, et exposés à des AgNPs de 80 nm, n'est observée, alors qu'une diminution de celle-ci est remarquée pour les hémocytes du site d'ASE, exposés à ces mêmes NPs. Pour les particules de la compagnie ViveNano[®], les doses toxiques expérimentées avec les moules prises sur le terrain sont inférieures à celles expérimentées en laboratoire. Cependant la toxicité des NPs dans les expériences de terrain est forte et à des concentrations inférieures à celles testées *in vitro* en laboratoire (voir chapitre 2 et les tests réalisés au laboratoire). Ces observations confirment que les paramètres immunitaires des moules bleues soumis à des stress multiples présentent des altérations plus importantes que les moules utilisées au laboratoire. Ainsi, il serait intéressant, dans une étude ultérieure d'analyser les performances du système immunitaire des moules provenant de l'aquarium de Québec, de les mettre en cage sur les sites définis pour ce projet et par la suite de les exposer aux nanoparticules.

Mise en contexte du Site de Brest

La rade de Brest, en France, abrite à la fois un port militaire, de commerce et de plaisance. Ces activités maritimes ont générés durant les dernières décades une sévère contamination au TBT, actuellement confinée dans les sédiments des zones portuaires. Cette contamination est accompagnées d'une pollution chronique par des hydrocarbures et métaux traces. De nombreux contaminants chimiques présents dans l'eau sont considérés comme des immunosuppresseurs. A partir de l'hypothèse que les perturbations environnementales, dont notamment les contaminations chimiques, peuvent altérer le fonctionnement du système immunitaire, nous avons tenté de vérifier que cette situation peut engendrer un stress physiologique accentuant la sensibilité des hémocytes à une contamination expérimentale par des NPs. En 2010, différents sites présents sur les côtes bretonnes ont été échantillonnées afin d'évaluer l'état de santé des communautés de moules bleues. De plus, des expériences *in vitro* avec des NPs ont été réalisées. Elles ont permis de tester les performances du système immunitaire des bivalves lorsque celui-ci est soumis à un stress chimique lié aux NPs. Ainsi, le but de cette section va être de combiner l'étude de populations de moules sélectionnées selon leur différents habitats à Brest et l'action des NPs. Comme pour le Saguenay, aucune étude n'a été menée sur des individus de terrain soumis à des conditions de vie hostiles et à d'autres contaminants tels que les NPs. Les objectifs de cette section sont donc d'étudier le fonctionnement du système immunitaire des bivalves vivant dans différents sites choisis et soumis à un autre stress de nature chimique. Nous allons vérifier que cette situation peut accentuer ou non, la sensibilité des hémocytes à une contamination expérimentale par des NPs. Ainsi nous pourrons démontrer la vulnérabilité des populations naturelles de milieux anthropisés à des stress chimiques additionnels.

Au mois de mai 2010, 3 sites d'échantillonnages ont été prélevés, 2 sites situés dans la rade de Brest, le site du Château (Château) et du Port de commerce (Commerce) et un site à l'extérieur de la rade sur la pointe de la Bretagne la plage du Conquet (Conquet) (Figure 126 et Figure 127). Ces trois sites ont été choisis selon leurs caractéristiques, les deux sites dans la rade sont susceptibles d'être influencés par les apports urbains et portuaires. Selon les données de la marine Nationale, la rade contient une charge métallique sédimentaire de 83 mg/kg de cuivre, 1,2 mg/kg de cadmium, 94 mg/kg de plomb (données de la marine Nationale- géode 2004). Plus particulièrement, le site du Château est situé à coté de la zone militaire. Ce site est localisé au niveau de sédiments contaminés par des métaux traces et des composés organiques tels que des dérivés de TBT, HAP, et autres dérivés d'hydrocarbures

(Troadec and Le Goff 1997). Le TBT est un biocide reconnu comme toxique pour les animaux et végétaux. Il est utilisé comme biocide dans les peintures antisalissures (Michel and Averty 1997; Negri, Hales et al. 2004). L'usage du TBT a beaucoup pris d'importance dans les années 1970 avec la construction navale et de la plaisance. Le site du Château, localisé au niveau du port de plaisance, est susceptible d'être soumis aux rejets urbains. Enfin, le site du Conquet situé à l'extérieur de la rade est un site de référence sans contamination apparente.

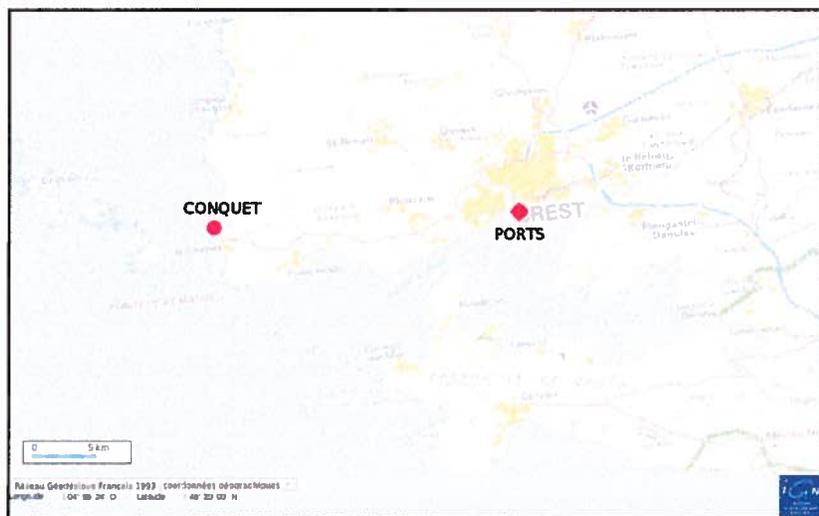


Figure 126 : Sites d'échantillonnages dans la rade de Brest, Bretagne, France. Deux sites ont été prélevés en zone portuaire voir figure 21. Le site de référence du Conquet est situé à l'extérieur de Brest. A ce site, les moules ont été échantillonnées sur des moulières présentes sur des rochers découverts à marée basse.

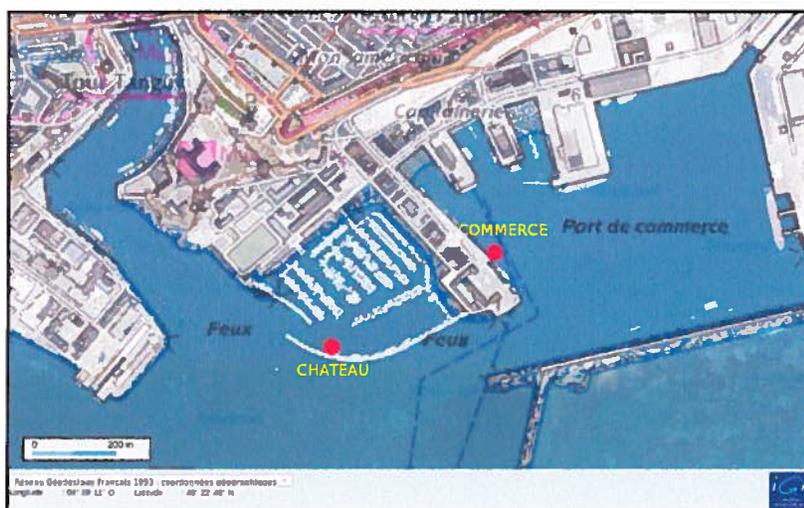


Figure 127 : Deux sites échantillonnés dans la zone portuaire de Brest. Le site du Château est situé non loin dans la zone du nouveau port de plaisance. Le site de Commerce est situé dans la zone du port de commerce non loin du mouillage des bateaux. Il est important de rappeler que ces deux sites sont situés à côté de la zone maritime militaire présente dans le port de Brest.

4. MATÉRIEL ET METHODE-BREST

Afin de répondre au premier objectif qui est l'étude du système immunitaire de populations de moules sélectionnées selon leur différents habitats à Brest, 15 moules de terrain ont été récoltées par site. Afin de répondre au deuxième objectif, qui est d'étudier le système immunitaire de populations de moules potentiellement soumises dans leur milieu à une contamination chronique et soumis à un double stress chimique (les nanoparticules), une expérience sur un pool de moules à été réalisée. Pour ces deux expériences, deux paramètres immunologiques ont été observés, à savoir la viabilité et la phagocytose.

4.1 Obtention des tissus et analyses

Lors des 3 années d'échantillonnages, des données de biométrie des bivalves ont été prises. Ainsi la taille a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse, le poids à l'aide d'une balance de précision et l'indice de condition, IC AFNOR (NF V 45056, sept85) a été mesuré selon la formule suivante :

$$IC = \frac{\text{Poids des tissus mous sans l'eau palléale (g)}}{\text{Poids total de l'organisme (g)}}$$

4.2 Obtention et préparation de l'hémolymphe

Le protocole d'obtention et de préparation de l'hémolymphe est le même que celui décrit dans la section 1.3 de ce chapitre.

4.3 Caractérisation des nanoparticules utilisées dans le projet de recherche

Les hémocytes vont être exposés à 3 types de NPs déjà présentées dans les chapitres précédents. Les NPs de cadmium QDs, les NPs d'argent de la compagnie ViveNano[®] (tel que présenté dans la section 5, 5.1 et 5.2 du chapitre 1) ainsi que les hémocytes vont aussi être exposé aux NPs d'argent de la compagnie Ted Pella^{INC} (AgNPs TP) qui sont décrites dans la section 1.1.3 du chapitre 3.

4.4 Détermination de la viabilité pour les moules exposées aux nanoparticules

Dans un tube 1,5 ml, 10 µl de contaminants (selon les différentes dilutions) et 200 µl de cellules de chaque pool ont été mélangés. Puis l'ensemble, cellule et contaminants, vont être incubé à 15°C durant 21H. À la fin de l'incubation, les cellules vont être décantées du tube et transférées dans une microplaque de comptage pour le Guava. La viabilité va être observée à l'aide de la solution de ViaCount (à raison de 50 µl de cellules pour 150 µl de ViaCount).

4.5 Détermination de la cellularité et de la viabilité, moules de terrain

La viabilité des hémocytes, après l'exposition de 21h avec les NPs, a été évaluée par cytométrie en flux (EasyCyte 5HT Guava PCA Cytometer). Une cellularité et une viabilité des hémocytes de moules ont été déterminés à l'aide d'une trousse ViaCount (Guava des Technologies, CA, USA). Brièvement, 50 µl de la suspension de cellules et de NPs ont été placés dans un puit de microplaque à fond rond avec 150 µl de Guava ViaCount® puis les échantillons ont été lus par groupe de 10. Chaque plaque va être incubée 1 min au noir avant la lecture. Les échantillons ont été analysés avec un cytomètre de flux par excitation avec un laser bleu de longueur d'onde d'émission 532 nm (Guava, EasyCyte 5HT, Milipore™, USA). L'excitation de l'IP est détectée par le FL1 et FL2 avec le filtre bande passante 583 ± 26 nm et 680 ± 30 nm. Un marqueur M1 (= 5%) sera placé sur l'histogramme de comptage et 1000 événements ont été enregistrés.

4.6 Détermination de la phagocytose, moules de terrain

Le protocole de phagocytose utilisé est le même que celui décrit dans la section 1.5 de ce chapitre (à l'exception que les incubations vont être réalisées à 15°C).

4.7 Détermination de la phagocytose pour les moules exposées aux nanoparticules

Le protocole de phagocytose utilisé est le même que celui décrit dans la section 1.6 de ce chapitre (à l'exception que les incubations vont être réalisées à 15°C).

4.8 Données hydrologiques 2010, le projet SOMLIT (Service d'Observation en Milieu Littoral)

Ce service dépendant de l'INSU (Institut National des Sciences de l'Univers rattaché au CNRS Centre National de Recherche Scientifique) (<http://www.insu.cnrs.fr/> dernière visite le 25 janvier 2011). Des paramètres sélectionnés sont mesurés à intervalle de temps réguliers et de manières reproductibles. Ainsi les données permettent d'avoir une approche multi-paramètres et multi-sites afin :

- D'examiner les changements des systèmes côtiers sur le long terme.
- De quantifier les influences de la variabilité climatique d'une part et anthropogénique d'autre part sur ces systèmes.

Ainsi, ce programme a pour but « *d'homogénéiser l'acquisition d'un corps de paramètres (hydro-climatiques, chimiques et biologiques) communs à tous les sites et rendre disponibles les données à l'ensemble de la communauté. De plus, ces données vont permettre une étude comparée de séries à long terme sur les 3 façades du littoral français (identification de fluctuations communes aux différents sites et réponses du littoral à des forçages climatiques ou anthropiques globaux - distinction entre ces deux sources de variabilité)* ». (Source <http://somalit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/spip.php?rubrique3> dernière visite le 25 janvier 2011).

- La Station Portzic

La station de Portzic est située devant Ste Anne du Portzic à la jonction entre la Mer d'Iroise et la Rade de Brest (200 m de la côte, profondeur 5 à 10 m suivant marnage) (Figure 128). Les prélèvements se font à -2 m sous la surface d'eau à partir d'une tour sur laquelle est installé un petit treuil d'hydrologie. Elle fonctionne depuis juillet 2000. (Source <http://somalit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/spip.php?article35> dernière visite le 25 janvier 2011).



Figure 128 : Localisation de la station d'échantillonnage SOMLIT pour les paramètres chimiques de l'eau. La station est située à $4^{\circ} 33' 07.19$ W de longitude et $48^{\circ} 21' 32.13$ N de latitude. Elle est située à 250 m de distance des côtes à une profondeur de 10 m environ. Le marnage moyen est de 7.6 m et les coefficients de marée moyenne sont de 70 ± 10 . La station est échantillonnée hebdomadairement.

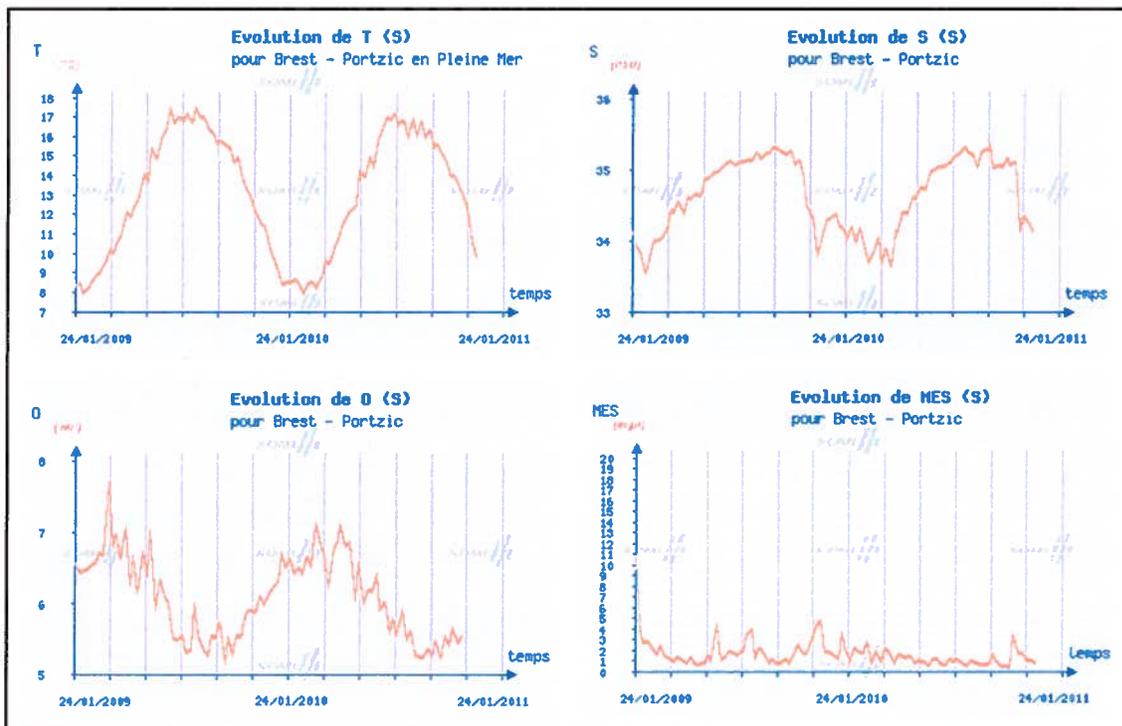


Figure 129 : Données de chimie récoltées par la station SOMLIT au cours des années 2009 et 2010. Des fluctuations saisonnières des paramètres tels que la température, la salinité et l'oxygène sont observables.

Les données prises à la station Portzic indiquent les variations saisonnières des paramètres chimiques de l'eau. En été la température avoisine les 17°C pour chuter durant les mois d'hiver aux alentours de $8,5^{\circ}\text{C}$ (Figure 129). Quand à la salinité, elle remonte toute l'année depuis janvier jusqu'à octobre. Elle chute durant les mois d'hiver, octobre, novembre,

décembre (Figure 129). Pour les mois d'été 2010, la salinité était d'environ 34,5 PSU. Les variations des quantités d'oxygène sont opposées à celles de la salinité. La concentration en oxygène dissous est à son plus haut niveau en janvier 2009, la concentration va diminuer toute l'année jusqu'à atteindre un minimum en septembre. En 2010 le profil est un peu différent, la concentration en oxygène continue d'augmenter jusqu'en avril-mai 2010. Puis elle va diminuer pour atteindre un minimum en octobre, novembre (Figure 129). Les variations de MES sont aussi saisonnières, les apports en MES sont plus importants en automne et en hiver. Les données ont été prélevées durant la période d'échantillonnage en mai 2010 à la station de Portzic (Figure 130). La température augmente de plus de 2°C dans ce mois (passage de 11,9°C à 14,2°C le 25 mai 2010) (Figure 130).

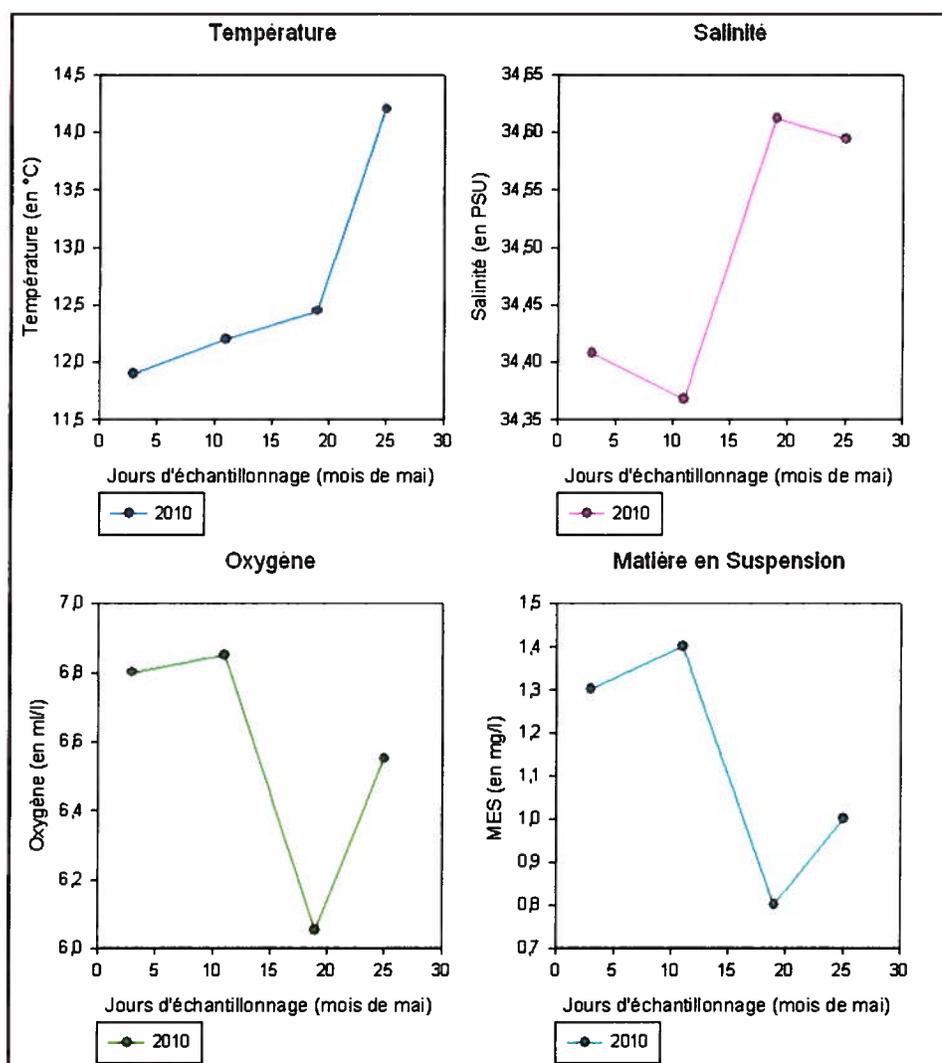


Figure 130 : Paramètres chimiques recueillis par la station d'échantillonnage Portzic du projet SOMLIT pour le mois de mai 2010.

De même les concentrations en oxygène et en matières en suspensions sont variables durant le mois de mai 2010. Les courbes de mesures de ces deux paramètres présentent les mêmes profils. En début de mois les concentrations en oxygène sont fortes (6,8 ml/l) comme celles de MES (1.4 mg/l). Entre le 2ième et le 3ième échantillonnage une diminution est observable (oxygène 6,05 ml/l et MES 0,8 mg/l).

4.9 Tests statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). La différence de viabilité, d'activité et D'efficacité de phagocytose ont été examinées utilisant une analyse factorielle des variations à une voie (ANOVA), lorsque les résultats étaient significatifs, un test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Lorsque les données n'étaient pas normales un test non paramétrique de Kruskal et Wallis avec mise en rang a été réalisé. Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$. Afin de calculer les concentrations d'inhibition à 50%, des courbes doses réponses ont été réalisées en utilisant Microsoft® office Excel 2007. Les CI 50 ont ensuite été calculées à l'aide de droites de régressions linéaires.

5. RÉSULTATS POUR LES ÉCHANTILLONNAGES RÉALISÉS DANS LA RADE DE BREST

5.1 Données morphométriques

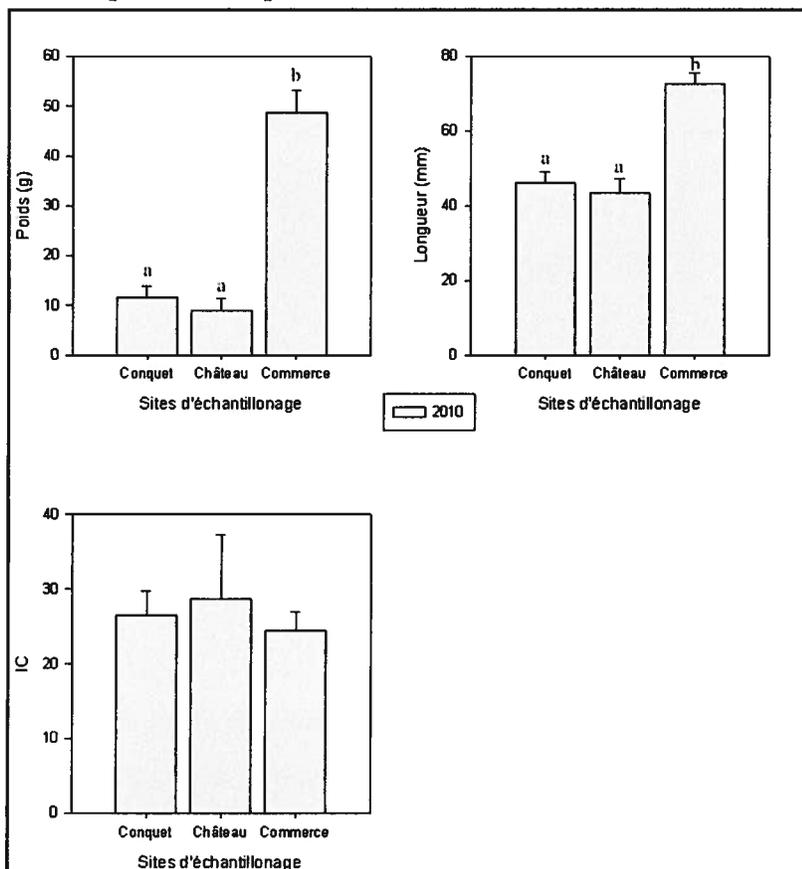


Figure 131 : Données biologiques prises sur les moules bleues échantillonnées à différents sites à Brest. n= 15. Les lettres indiquent les différences entre les sites, les sites ayant des lettres différentes présentent des différences significatives ($p < 0.05$).

Selon les résultats des différents paramètres biologiques, le poids des moules du site du port de Commerce sont significativement plus lourdes que celles du Conquet et celles du site du Château (environ 5 fois plus lourdes) (Figure 131). De même, les moules du port de Commerce sont significativement plus longues que celles prises sur la plage du Conquet ou au Château (Figure 131). Pour l'IC, les valeurs pour les trois sites ne sont pas significativement différentes, même si le Château présente un IC plus fort que celui des autres sites (Figure 131).

5.2 Paramètres immunologiques pour les moules de terrain

5.2.1 Viabilité

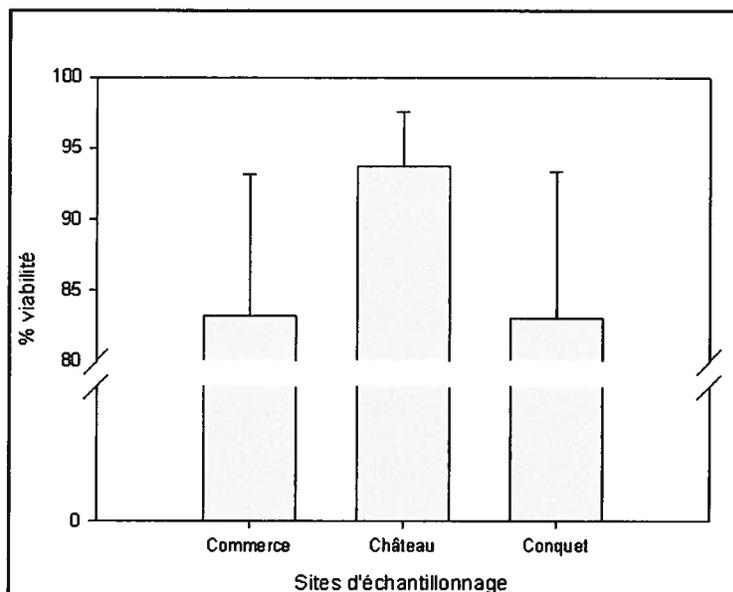


Figure 132 : Viabilité des hémocytes de moules bleues échantillonnées sur les différents sites sélectionnés en 2010. n= 15.

Bien qu'aucun résultat ne soit significatif, des différences de viabilité entre les moules des 3 sites d'échantillonnage sont observées. La viabilité des sites de Commerce et du Conquet est comparable mais elles sont plus inférieures à celle du site du Château (Figure 132). Les moyennes de viabilités sont de 83,2% pour Commerce ; 93,8% pour Château et 83 % pour le Conquet.

5.2.2 Phagocytose

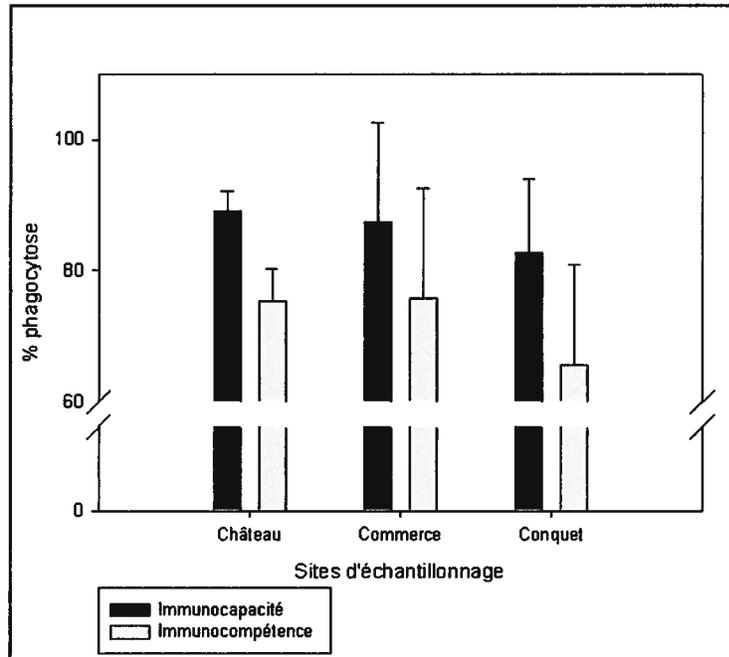


Figure 133 : Phagocytose des hémocytes de moules bleues prélevées lors de la campagne d'échantillonnage dans la rade de Brest en mai 2010. L'immunoactivité et l'immunoefficacité ont été mesurées. n= 15.

Les tests de phagocytose ont été réalisés sur 15 moules de terrain, aucune différence de capacité phagocytaire ou d'immunocapacité n'est observée. Toutefois, on observe une gradation de l'immunocompétence selon les trois sites Conquet < Commerce < Château (Figure 133).

5. 3 Paramètres immunitaires obtenus des pools de moules exposés aux nanoparticules

5.3.1 Viabilité des pools (essais préalables)

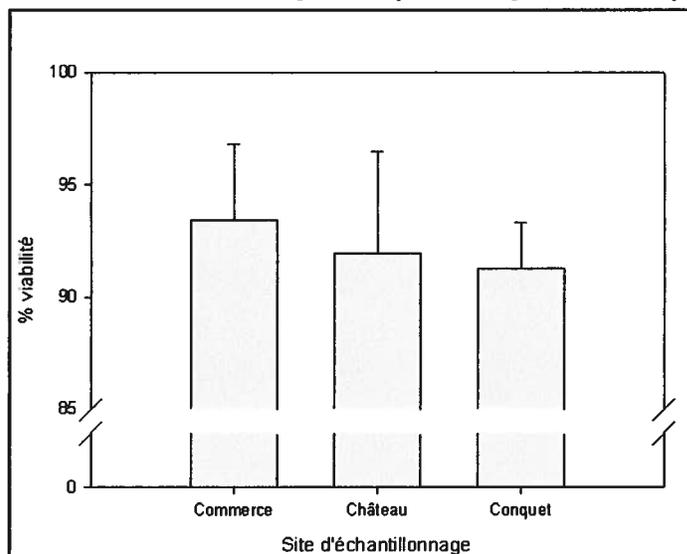


Figure 134 : Viabilité des pools d'hémocytes de moules bleues prises sur le terrain en 2010 dans 3 sites à Brest. n= 6.

Les résultats préliminaires des tests immunologiques, indiquent que les pools étaient homogènes et viables avant l'incubation donc, les conditions expérimentales étaient optimales (Figure 134).

5.3.2 Viabilité avec exposition à des nanoparticules d'argent de Ted Pella^{Inc}

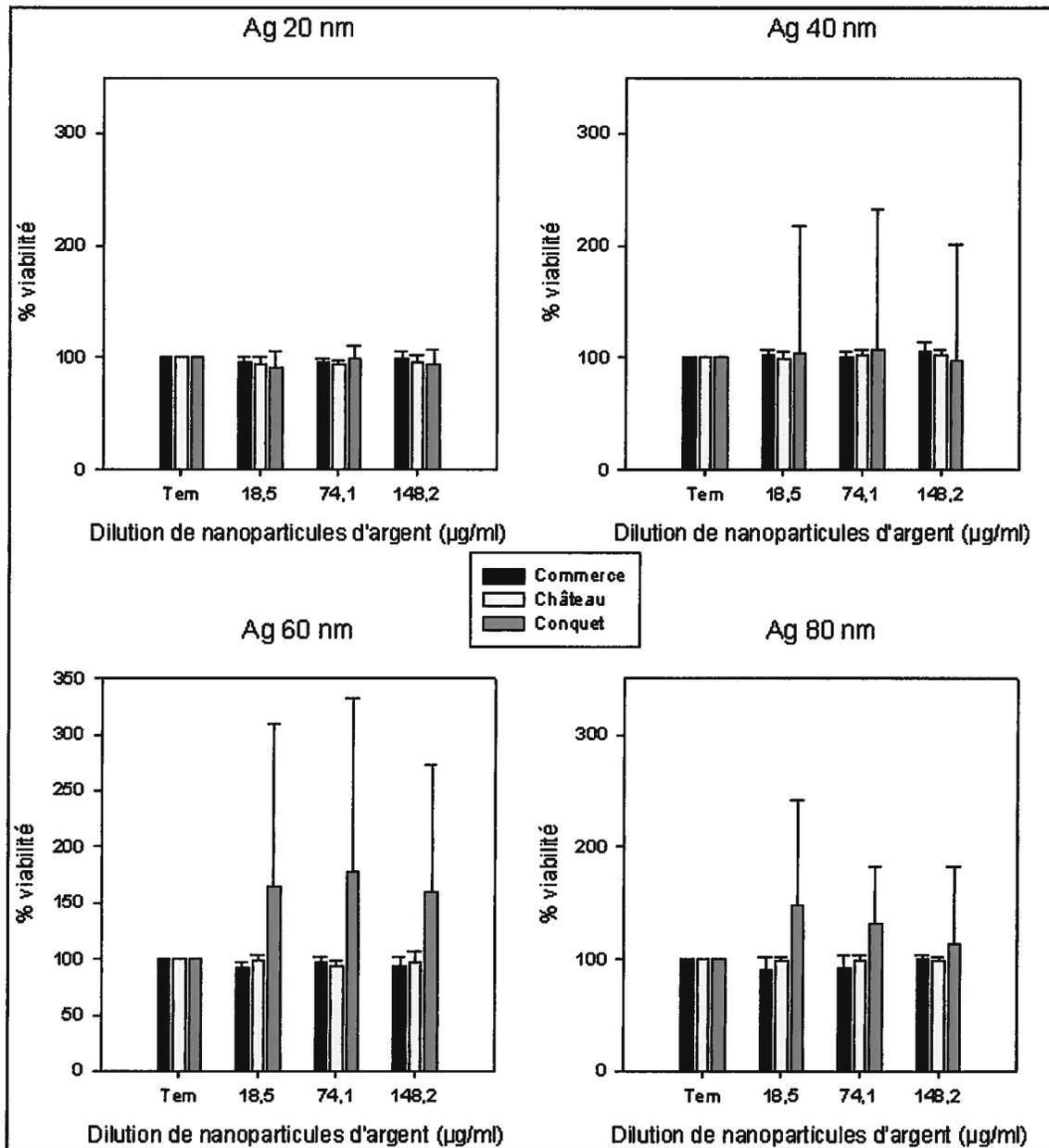


Figure 135 : Viabilité des hémocytes de moules bleues exposés à différentes tailles de nanoparticules d'argent et selon une gamme de concentration. N pools =5.

Concernant la viabilité pour les NPs d'argent de Ted Pella^{Inc}, aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations pour un même site. Cependant, il existe une tendance pour la viabilité selon les sites, la viabilité des hémocytes des moules du Conquet est plus faible que celles des autres sites (plus forte variabilité) (Figure 135). La viabilité des hémocytes

de moule du Conquet n'est pas affectée pour Ag 20 nm mais elle l'est pour les 3 autres NPs dès la plus faible concentration (18,5 µg/ml).

5.3.3 Viabilité avec les nanoparticules d'argent de VivNano®

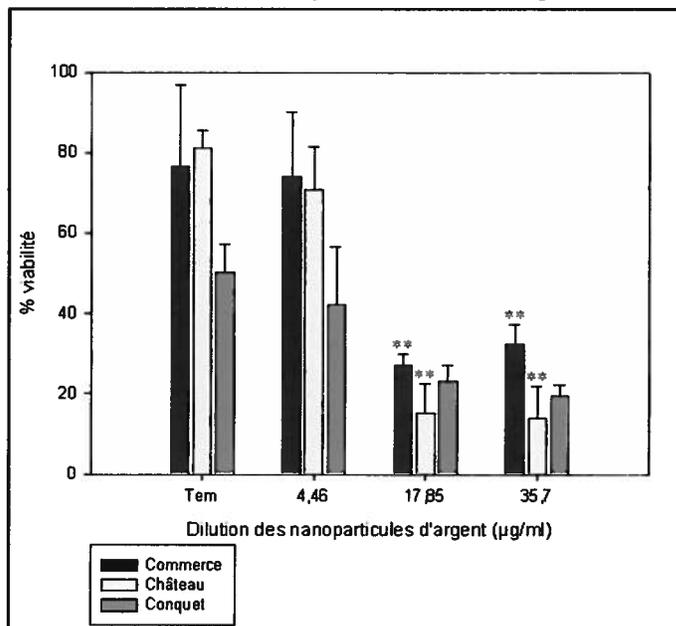


Figure 136 : Viabilité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules d'argent de ViveNano selon une gamme de concentration. N pools =6.

Concernant les viabilités avec les NPs d'argent de Vive Nano, quel que soit le site, on observe une diminution significative de la viabilité dès 17,85 µg/ml (Figure 136). Pour tous les sites, la viabilité passe en dessous des 50 %. Suite au calcul des CI 50 à l'aide de droites de régression les résultats suivant sont obtenus : CI Commerce = 14,11 µg/ml ; CI Château = 11,37 µg/ml ; CI Conquet = 16,37 µg/ml.

5.3.4 Viabilité avec les Nanoparticules de cadmium de VivNano®

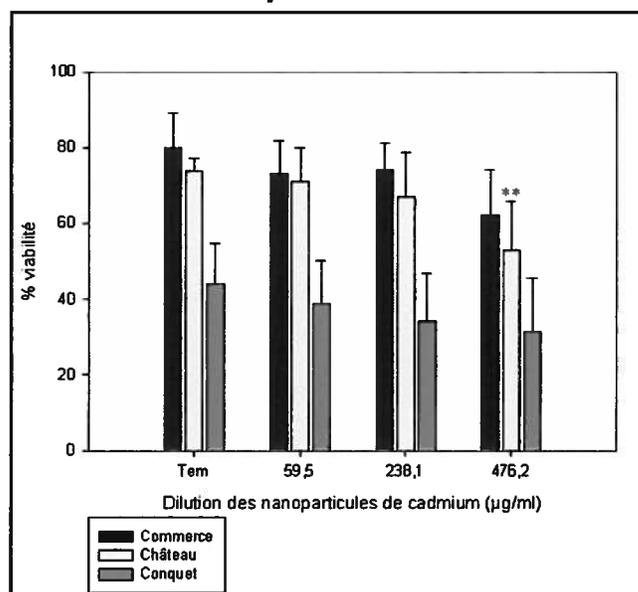


Figure 137 : Viabilité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules de cadmium QDs selon une gamme de concentration. N pools =6.

La viabilité des hémocytes pour le site de Château est significativement diminuée pour la concentration en cadmium la plus forte (476,2 µg/ml). Pour les autres sites, la viabilité diminue de 28,41 % (Figure 137). Bien qu'une diminution de la viabilité soit observée aucune CI 50 n'a pu être calculée.

5.3.5 Phagocytose avec exposition à des nanoparticules d'argent de Ted Pella^{Inc}

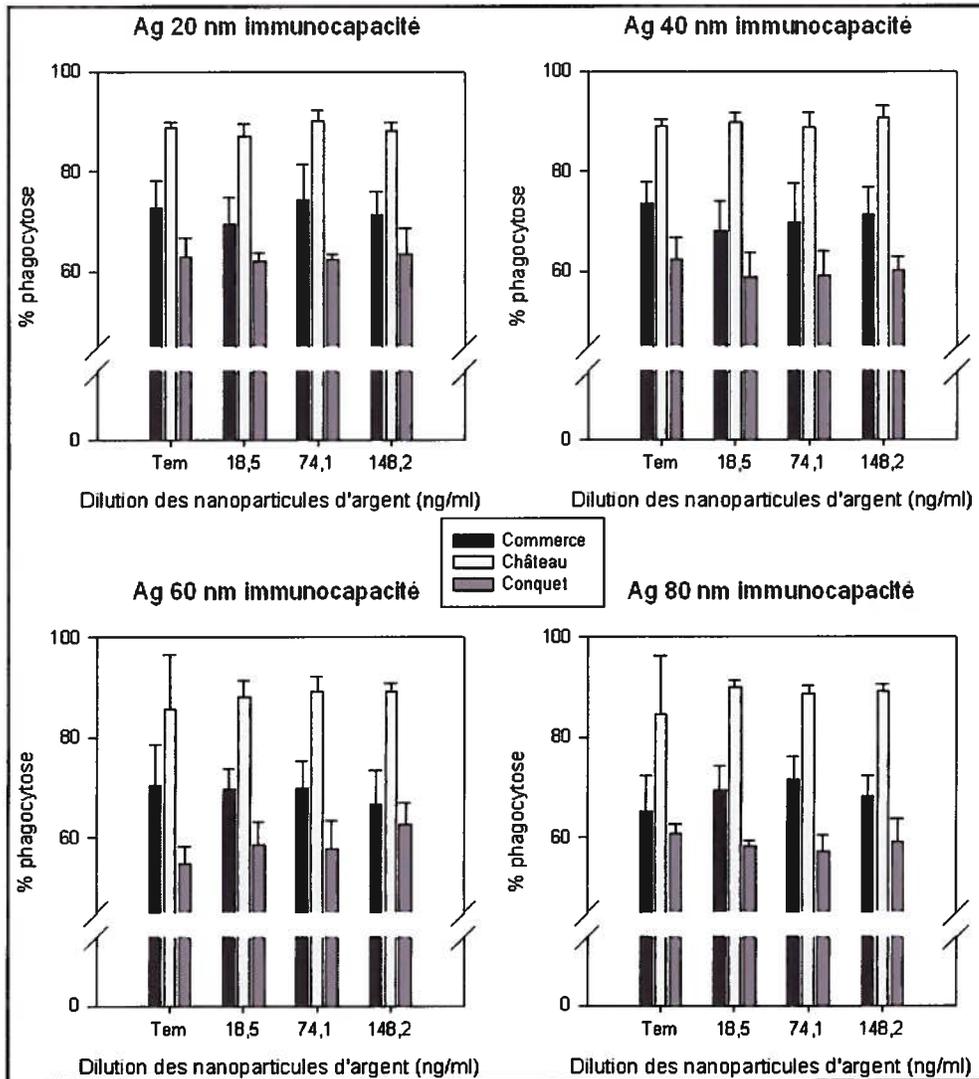


Figure 138 : Immunoactivité des hémocytes de moules bleues exposés à différentes tailles de nanoparticules d'argent. N pools =6.

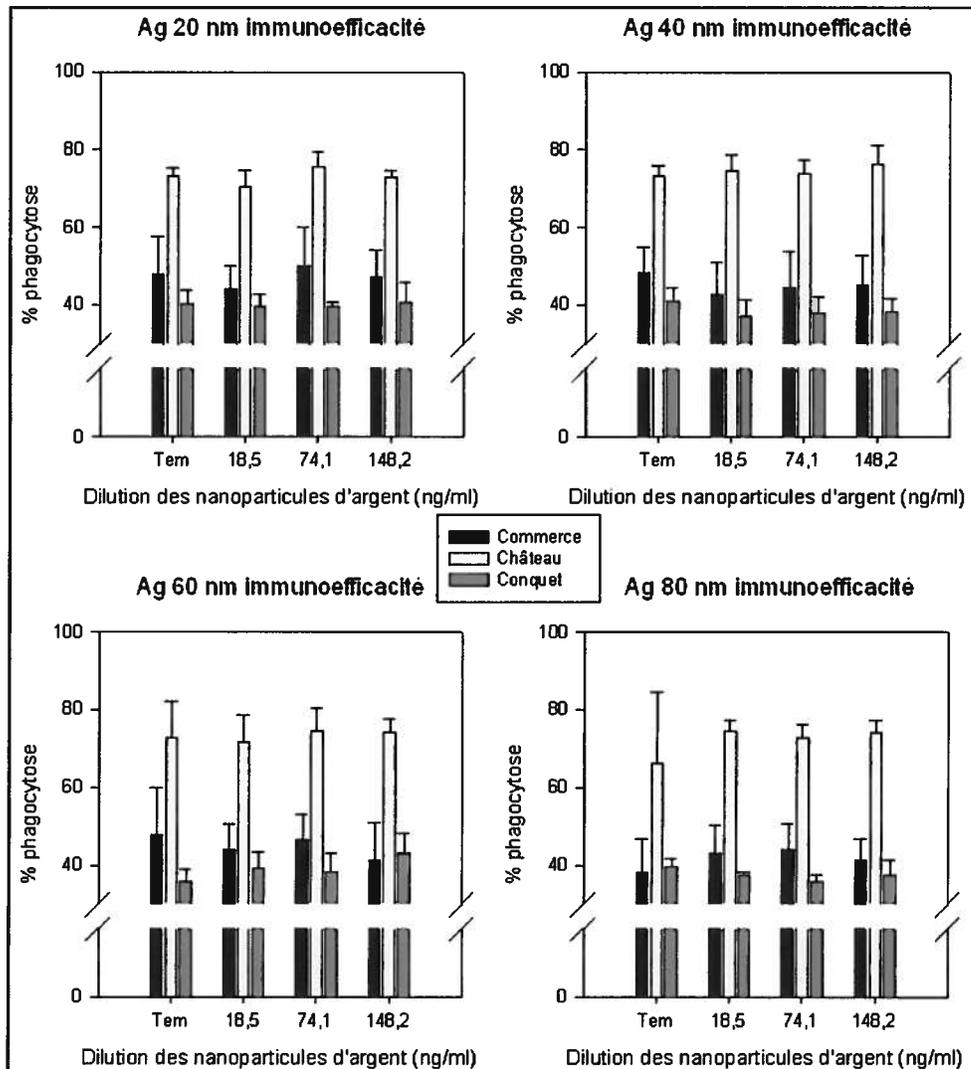


Figure 139 : Immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés à différentes tailles de nanoparticules d'argent. N pools =6.

Aucun effet dose significatif n'est observé pour les particules de 20, 40, 60 et 80 nm de diamètre que ce soit, pour l'activité ou l'efficacité phagocytaire (Figure 138 et Figure 139). Pour toutes les NPs d'argent produites par Ted Pella^{Inc}, aucune différence significative entre les sites pour une même concentration n'est observée. Aucune différence de concentration pour un même site n'est observée non plus.

5.3.6 Phagocytose avec exposition à des nanoparticules d'argent de ViveNano®

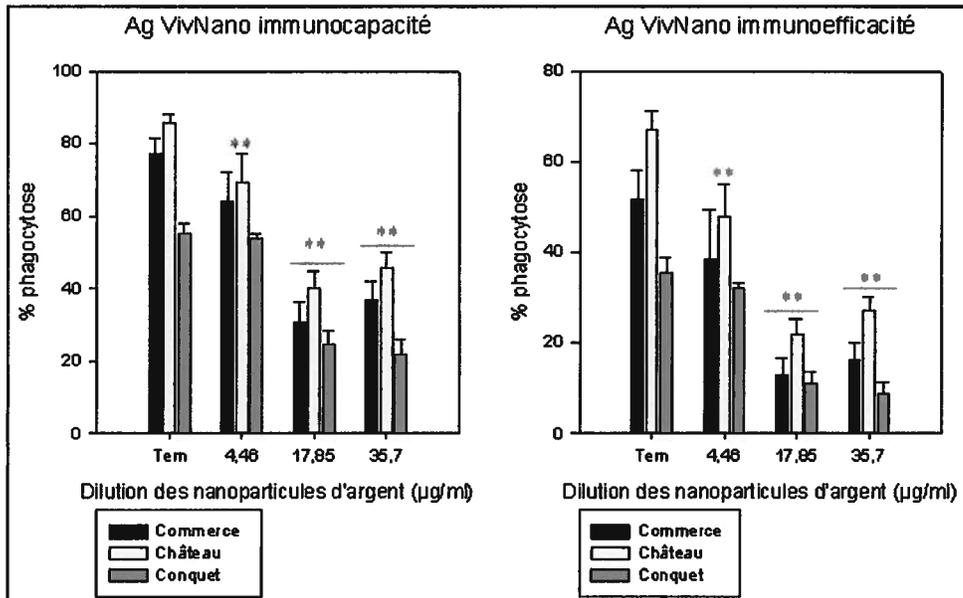


Figure 140 : Immunoactivité et immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposés à des nanoparticules d'argent de ViveNano. Pools n=6.

L'immunocapacité et l'immunoefficacité sont significativement affectées par la concentration en argent présente dans les nanoparticules, pour les trois sites étudiés (Figure 140). Le site du Château est le plus sensible à l'exposition aux NPs avec une diminution significative de la phagocytose dès 4.46 µg/ml ($p < 0.001$). Pour le port de commerce et le Conquet cette diminution est significative à partir de 17.85 µg/ml ($p < 0.001$). Les NPs d'argent de ViveNano® altèrent donc la phagocytose des hémocytes du site du Château à des doses subléthales (Figure 140). Les CI 50 de la phagocytose pour les trois sites sont celles du Tableau 37.

Tableau 37 : Valeur des CI 50 pour la phagocytose en fonction des différents sites échantillonnés dans la rade de Brest.

Paramètre immunitaire	Sites	CI 50 (µg/ml)
Immunoactivité	Commerce	15
	Château	16
	Conquet	16
Immunoefficacité	Commerce	11
	Château	12
	Conquet	13

5.3.7 Phagocytose avec exposition à des nanoparticules cadmium de ViveNano®

L'immunocapacité et l'immunoefficacité des hémocytes sont très significativement diminuées lorsque les cellules sont mises en présence des QDs et ce pour la plus forte dose d'exposition 476,2 (p< 0.001).

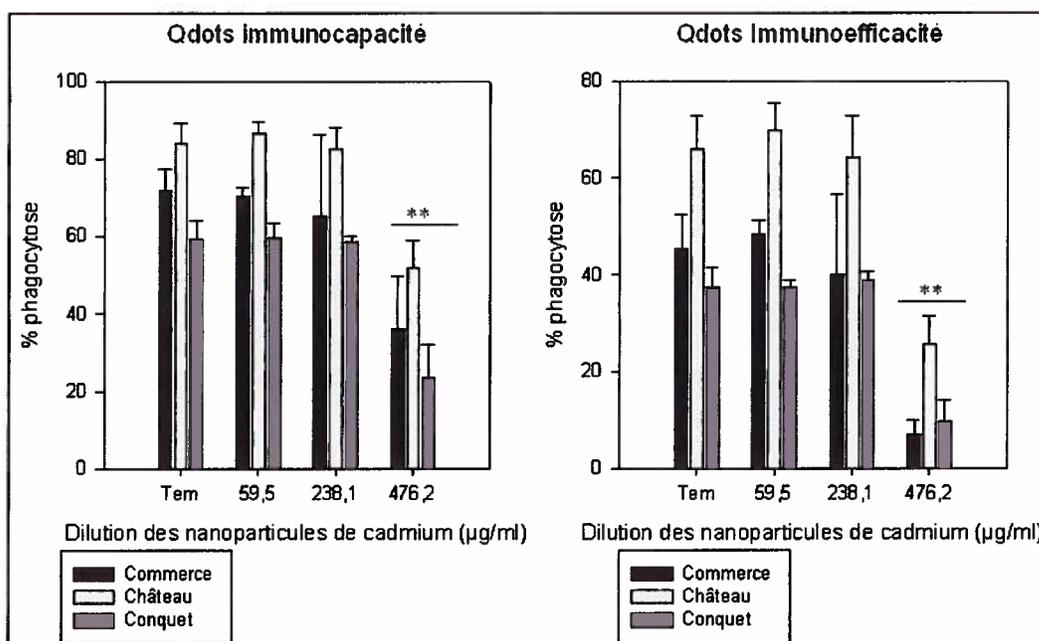


Figure 141 : Immunoactivité et immunoefficacité des hémocytes de moules bleues exposées à des nanoparticules de cadmium (QDs). Les moules ont été prises dans trois sites environnant Brest. N pools =6.

Les IC 50 calculées pour la phagocytose sont celles du Tableau 38.

Tableau 38 : Valeurs des IC 50 pour les différents sites échantillonnés dans la rade de Brest.

Paramètre immunitaire	Sites	CI 50 (µg/ml)
Immunoactivité	Commerce	486
	Conquet	420
Immunoefficacité	Commerce	342
	Château	424
	Conquet	369

5.4 Conclusion des expériences menées sur Brest

Les différents résultats obtenus pour les différents sites d'échantillonnage de la rade de Brest (Commerce et Château) et à l'extérieur (Conquet) permettent de répondre aux différentes hypothèses de départ. Bien qu'aucune différence significative ne soient observée pour la viabilité et la phagocytose pour les moules de terrain des trois sites, la réponse immunitaire semble affectée lors des expositions avec des NPs.

En effet, lors des expositions aux NPs d'Argent de ViveNano[®], l'immunoactivité et l'immunoefficacité des moules du Château sont significativement diminuées à faible dose de NPs (4,46 µg/ml d'AgNPs ViveNano[®]) alors que la viabilité des cellules aux mêmes concentrations est conservée. Ainsi, un effet mécanistique est observable pour le site du Château, alors qu'il n'est pas retrouvé pour les sites du Conquet et du port de Commerce. En effet le site du Château est soumis principalement à des sédiments contaminés aux HAP, TBT et autres dérivés d'hydrocarbures. Les HAP sont connus pour être des composés environnementaux très toxiques à des faibles concentrations et causent des contaminations locales de la biosphère (Salo, Dautremepuits et al. 2005). Les HAP entraînent des perturbations de la fonction phagocytaire chez les moules bleues, leur action est principalement liée à la déstabilisation de la membrane cellulaire (Wootton, Dyrinda et al. 2003). De plus les HAP sont aussi reconnu pour leur action sur la membrane lysosomale entraînant une activation des hydrolases et le relargage des enzymes dans le contenu cytosolique et fragiliser les hémocytes. Selon nos résultats, des individus déjà fragilisés

seraient donc plus sensibles à une contamination supplémentaire. En effet, la phagocytose est un processus dépendant de la membrane cellulaire, une altération de celle-ci sensibilise donc les hémocytes à une autre contamination.

Cette diminution de phagocytose est aussi observée pour les QDs à de fortes doses seulement pour le site du Château. Ainsi les organismes du site du Château sont plus sensibles que ceux du site du port de Commerce. Les individus du site du Château sont possiblement soumis à un double stress. En effet, les organismes déjà stressés par leur milieu de vie, en l'occurrence les pollutions portuaires, sont soumis à un autre stress toxique (NPs). Ce phénomène est aussi appelé « *stress on stress* ». En effet les moules sont des organismes filtreurs soumis aux variations des conditions environnementales, ainsi toutes variations des paramètres physico-chimiques peuvent être considérées comme un facteur immuno-supprimant (Auffret, Mujdzic et al. 2002). Les moules du Château sont soumises à des conditions environnementales qui les rendent plus sensibles que les moules du site du Commerce. Comme les deux sites présentent les mêmes pollutions potentielles, il est possible que les données morphométriques ainsi que l'IC influent sur les conditions des organismes. Cependant, l'IC des moules du Château est le plus élevé des trois sites mais aussi présente la plus grande variabilité, il est donc possible que cette hétérogénéité d'IC s'additionne aux influences de l'environnement et se répercute dans les résultats immunologiques des pools d'hémocytes. Ainsi un individu déjà stressé par son milieu environnant va réagir plus qu'un individu situé dans un milieu référence. Ceci est retrouvé dans les résultats d'activité phagocytaire des moules du Château. Concernant la viabilité des hémocytes, nos résultats confirment que le site de référence est le plus résistant aux NPs, car il présente la plus haute CI 50 (site du Conquet).

Concernant les NPs de Ted Pella^{inc}, aucune action de ces NPs n'est observée, ceci peut s'expliquer par deux caractéristiques. Les NPs de Ted Pella^{inc} sont beaucoup moins dosées que celles de ViveNano[®] (296 ng/ml vs 71.4 µg/ml pour les concentrations stock = concentrations maximales). Les enrobages sont différents, pour les NPs d'argent, elles sont mises dans une suspension aqueuse et entourées avec des enrobages de polyacrylate de sodium. Les NPs de Ted Pella^{inc} sont non conjuguées et donc peuvent être liées à des protéines, des alcanéthiols et de l'ADN par différentes méthodes. Elles sont aussi disponibles dans une solution aqueuse et possèdent une charge négative à leur surface. L'enrobage peut donc aussi jouer un rôle sur la toxicité et la stabilité des particules.

Finalement, les NPs d'argent de ViveNano[®] semblent être très toxiques beaucoup plus que les NPs de cadmium (QDs ViveNano[®]). Ceci avait déjà été observé dans le chapitre 2, et est confirmé dans ce chapitre. Une action cumulative des stress n'a donc pas d'influence sur la toxicité des particules.

6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU CHAPITRE 4

Les expériences de terrain réalisées au Saguenay et à Brest démontrent une influence des paramètres physiques et chimiques du terrain sur le système immunitaire des invertébrés. En effet, les paramètres environnementaux peuvent influencer l'accumulation de métal chez les bivalves (Phillips 1976). D'autre part, la salinité, la saison, la quantité de matière organique, la hauteur de marée, le sexe et la condition de reproduction, les conditions physiologiques sont autant de facteurs ayant un rôle sur les réponses des bivalves (Mubiana 2006). Toutes les données complémentaires, prises lors d'une étude écotoxicologique, sont importantes car elles s'additionnent aux perturbations causées par les pollutions environnementales. Ces données peuvent influencer les résultats des paramètres immunitaires. Les zones de dessalure jouent un rôle sur la santé des moules bleues, malgré que ces organismes soient très adaptés à leur milieu de vie et à ces conditions (marée, etc.) (Auffret, Mujdzic et al. 2002). Nos résultats observés dans le site d'ASE sont en accord avec ce concept. La viabilité des hémocytes de moules à ce site est influencée par la faible salinité du milieu. L'ASE est située en amont du Fjord à la limite de tolérance en salinité des espèces marines. De plus, la topographie du site influent sur la répartition des moules et leur amassement dans des marelles d'eau. De même, il a été démontré dans une étude de Lemaire et al, (2006) que la saisonnalité pouvait influencer les paramètres phagocytaires chez *Mytilus sp.*, ces variations seraient liées aux périodes de reproduction. Une diminution de la phagocytose avait été observée pour les myes dans le fjord du Saguenay en septembre, lors d'une suivi annuel (Blaise, Gagne et al. 2002). Ce phénomène est relativement courant chez les bivalves. Nos expériences en France et au Québec ont été réalisées aux mêmes périodes de l'année (mai-juin) et en dehors des périodes de reproduction (septembre). Ceci évite d'observer plusieurs phénomènes simultanément. Toutefois, il aurait été intéressant d'observer le sexe des individus échantillonnés et leur stade de maturité. Le stade de maturité est connu pour être fortement corrélé à l'activité phagocytaire. Le sexage des individus auraient permis d'évaluer si les moules étaient soumises à des phénomènes de délais dans la reproduction, ces derniers sont très fréquents chez les mâles et les femelles bivalves (Gauthier-Clerc, Pellerin et al. 2002). D'autres paramètres peuvent influencer la

réponse immunitaire, nos résultats de Brest indiquent que les moules du Conquet sont plus petites que les moules des deux autres sites échantillonnés. Ainsi le volume d'hémolymphe retiré des organismes est souvent inférieur à celui pour les autres sites, ce qui pourrait jouer un rôle sur les pools d'hémocytes pour les expériences. Mubiana et al., (2006) ont aussi démontré que les tailles peuvent influencer la concentration métallique.

De plus, les pollutions environnementales, qu'elles soient de natures métalliques, organiques (HAP) ou des composés plus complexes comme les TBT, DBT, et pesticides, influencent les réponses immunitaires des moules (Pipe and Coles 1995). Les bivalves doivent se protéger des stress liés à la pollution mais aussi des stress tel que les changements de température et les maladies, les stress pouvant se cumuler (Gagné, Blaise et al. 2009). Nos résultats obtenus ont démontré que les hémocytes de moules du site du Château et du Commerce étaient plus sensibles que ceux du site du Conquet lors de l'expérience de stress cumulatifs (mise en exposition avec des NPs). Ceci démontre que le contaminant potentiellement présent dans les deux zones portuaires affectent le système immunitaire des bivalves.

Selon nos résultats obtenus dans le Saguenay, il semble que certains sites (BAR et BSC) aient été contaminés par une espèce de Trématodes *Gymnophallus bursicola*. Celui-ci pourrait être à l'origine de dommages sur les gonades (Santos and Coimbra 1995) et donc pourrait potentiellement affaiblir son organisme hôte. Les organismes présentant des parasites étaient situés dans des zones pollués par des hydrocarbures (provenant du traversier). Il a été démontré que l'effet cumulatif d'une infection aux trématodes et aux polluants implique de nombreux changements chez le mollusque hôte. Ces changements sont de natures physiologiques tels que le ralentissement du rythme cardiaque, une réduction des concentrations de caroténoïdes et d'acide ascorbique, une diminution de la consommation alimentaire et de la respiration (Morley 2010). La conséquence majeure d'une infection aux trématodes est son effet néfaste sur le système producteur de l'hôte. Le système endocrinien de l'hôte est perturbé et la plupart du temps l'animal ne peut plus se reproduire (Morley 2006). Ainsi, il est très important de prendre en compte ce genre de phénomène lors d'une étude en toxicologie. D'ailleurs Morley et al, (2010) mentionnaient que les perturbations endocrines ont des effets majeurs sur les études en toxicologie. Les perturbations du système endocrinien tels que le changement de sexe, la diminution de la fonction reproductrice ou des organes reproducteurs anormalement développés sont aussi retrouvés dans des zones polluées (Morley 2010). Ainsi l'action de trématodes et de polluants cumulée peut être difficilement analysable dans les études de terrain. Les paramètres tels que le parasitisme sont aussi

nommés facteurs de confusion ou facteurs confondants. Ces facteurs vont potentiellement induire une mauvaise analyse ou jugement de la situation. Il est possible ainsi d'observer des faux positifs dans le cas d'expérience à paramètres multiples.

Dans ce chapitre, nos résultats ont aussi démontré que les stress cumulatifs affectent les performances du système immunitaire tel que la phagocytose. En effet, une immunosuppression ou une immunomodulation sont détectables comme les diminutions des fonctions immunitaires, humorales, cellulaires et non spécifiques (Krzystyniak, Tryphonas et al. 1995). Les résultats obtenus lors des expositions *in vitro* avec des QDs et des AgNPs pour Brest et le Saguenay ont indiqué que les nanoparticules provoquaient une diminution des paramètres immunitaires. De plus, une atteinte mécanistique (diminution de la phagocytose) est remarquée pour des concentrations de QDs auxquelles la viabilité hémocytaires est inchangée. Les tests *in vitro* réalisés en laboratoire et présentés dans le premier chapitre de la thèse démontrent aussi la toxicité de certaines NPs (QDs et AgNPs ViveNano®). Cependant, les concentrations auxquelles les individus réagissent sont beaucoup plus faibles pour des organismes échantillonnés sur le terrain comparées à celles retrouvées pour les moules de laboratoire. Ces résultats démontrent qu'il subsiste des différences entre les tests *in vitro* sur des organismes élevés en bassin et les tests *in situ* réalisés sur des individus pris dans l'environnement. D'autre part, lors des expériences *in situ*, la plupart des cellules étant mortes à fortes doses d'exposition en nanoparticules, il est possible que les organismes ne survivraient pas à un tel stress.

Les études de terrain ont de grands avantages car elles permettent d'analyser les effets réels d'un ou d'un ensemble de contaminants sur les organismes présents dans l'environnement. Cependant, ce genre de projet présente aussi des limites, les résultats peuvent être parfois difficilement interprétables en raison des stress cumulatifs et des facteurs confondants. Nos résultats s'inscrivent dans ce contexte, les données morphométriques et la présence de parasitisme indiquent que les moules sont soumises à différentes pressions environnementales. Une étude de Norkko et al, (2005) montraient l'importance de l'effet combiné des facteurs environnementaux, dans leur étude l'hypoxie et la disponibilité alimentaire jouaient un rôle sur les paramètres morphométriques, et la croissance des bivalves. Par ailleurs, les résultats de phosphatase acide obtenus dans le site d'ASE (fjord du Saguenay) indique que la condition du site rend les moules propices à la production d'enzymes antimicrobiennes.

Néanmoins, les résultats obtenus sur le terrain et les analyses *in vitro* en découlant sont à mesurer, en effet comme il a été évoqué plus tôt les doses utilisées pour les expériences sont relativement fortes et il est vraisemblable que les moules ne soient pas exposés à ces concentrations de NPs. De plus, le faible taux de viabilité des hémocytes à fortes doses laisse supposer que les moules ne survivraient pas. Les biomarqueurs utilisés dans ce projet permettent de mesurer les interactions entre différents stress (Gagné, Blaise et al. 2009). Pourtant certaines mesures pourraient être ajoutées afin de compléter cette thèse, telles que le sexe, le stade de maturité sexuelle, les tests biochimiques, et l'analyse spectrométrique des métaux contenus dans les chairs des individus pris sur le terrain.

En résumé, dans ce chapitre nous avons donc mis en évidence que des disparités des paramètres immunitaires sont observables pour des individus de différents sites d'échantillonnages. Des organismes stressés par des contaminations chimiques vont présenter une déficience du système immunitaire. De plus, nous avons validé l'hypothèse que des organismes déjà stressés par les contaminations potentiellement présentes dans leur milieu, peuvent être plus sensibles à une deuxième contamination de nature chimique (les NPs). Finalement, les résultats obtenus pour les campagnes dans le Saguenay et dans la rade de Brest ont permis de démontrer que les réponses immunitaires obtenus avec des individus de terrain sont plus sensibles que celles obtenus en laboratoire.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES, PERSPECTIVES

1. Discussion des résultats de la thèse

Les nanoparticules sont de plus en plus utilisées de nos jours. Elles sont utilisées dans différents domaines et sont potentiellement dispersées dans les milieux terrestres, aquatiques et aériens (Biswas 2005; Farre, Gajda-Schranz et al. 2009). Cependant peu d'informations sont connues sur le destin des nanoparticules, leur comportement, les voies d'exposition et de relargages dans le milieu (Simonet and Valcárcel 2009). Cette thèse s'inscrit dans ce contexte de recherche. Les objectifs principaux étaient les suivants : 1) Définir s'il y a une toxicité *in vitro* des QDs CdS/CdTe et AgNPs et évaluer si les particules utilisées dans le projet ont des toxicités différentes. 2) Évaluer la toxicité *in vitro* des nanoparticules selon les différents modèles d'animaux. 3) Étudier la chimie des particules (dispersion dans leur matrice, forme, concentration en métaux). 4) Comparer les effets immunotoxiques des nanoparticules (QDs et AgNPs) vs métaux qui les composent. 5) Évaluer si la taille des particules a une influence sur sa toxicité. 6) Visualiser ces contaminants au sein des cellules immunitaires et analyser les effets mécanistiques des NPs sur ces cellules. 7) Caractériser *in situ* les différents sites d'étude sélectionnés à l'aide des biomarqueurs utilisés et évaluer la toxicité des particules dans des études environnementales. Afin de répondre à ces différents objectifs des expériences *in vitro* et *in situ* ont été réalisées sur 4 modèles animaux : l'humain, la souris (*Mus musculus*), la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et la moule (*Mytilus edulis*). Ces espèces ont été définies car elles représentent des espèces sentinelles de leur milieu de vie.

Dans le chapitre 1, nous avons démontré que les QDs et AgNPs peuvent induire des altérations *in vitro* des performances du système immunitaire. Selon nos résultats, le modèle mammifère est le plus sensible aux NPs. Comme il a été évoqué dans le mémoire, les modèles ne présentent pas exactement le même degré d'organisation immunitaire en fonction de leur degré d'évolution (Holsapple, West et al. 2003). Ainsi il est possible que des organismes présentant un système immunitaire très développé comme les mammifères (humains) soient plus sensibles que ceux dont le système l'est moins (moules). Toutefois, il est important de s'assurer que les conditions expérimentales soient comparables.

Pour les souris, par exemple, le temps d'incubation des macrophages en présence des nanoparticules est inférieur à celui utilisé dans le modèle humain. Il est donc possible que cette durée d'exposition ne soit pas suffisante pour observer des effets néfastes des nanoparticules dans le modèle murin. En contrepartie, des travaux ont déjà montré que le temps de contact de 4 heures utilisé dans nos expériences était suffisant pour qu'il y ait

phagocytose et présentations des NPs par les cellules immunitaires. En effet, Clift et al, (2008) ont démontré que des QDs incubés durant 120 min avec des macrophages de souris, présentaient une diminution de fluorescence liée à la dégradation des particules dans les lysosomes et donc une internalisation des nanoparticules.

D'autre part, les résultats des paramètres immunitaires du projet démontrent une différence de sensibilité cellulaire. Ainsi, le test de phagocytose sur des macrophages et des monocytes est moins sensible que celui de la transformation lymphoblastique des lymphocytes T. Ces résultats ont donc permis de standardiser les méthodes, de comparer les espèces étudiées et les paramètres immunitaires testés. Nos résultats confirment que la transformation lymphoblastique pourrait être utilisée dans les tests de toxicité des NPs et servir d'indicateur de toxicité standardisé comme l'avait suggéré Hillegass et al.,(2010). D'autre part, le test de phagocytose a l'avantage de permettre une comparaison entre les différents modèles car ce paramètre immunitaire est relativement bien conservé selon les différentes espèces (Fournier, Cyr et al. 2000).

Par ailleurs, dans ce chapitre nous avons démontré que les NPs ne présentent pas toutes la même toxicité ; le gradient de toxicité étant le suivant : AgNPs ViveNano[®] > QDs > AgNPs TP. Aucune autres études comparant les effets des QDs vs ceux des nanoparticules d'argent n'a été retrouvé dans la littérature. Cependant d'autres études impliquant des NPs, différentes de celles utilisées dans la thèse, ont démontré que les nanoparticules pouvaient induire des toxicités différentes. Les travaux de Canesi et al., (2010a) chez la moule (*Mytilus galloprovincialis*) suite à une exposition au NPs, ont démontré des phénomènes de déstabilisations de la membrane lysosomale selon le gradient d'effets suivant : nanotubes de carbone >> fullerène C60 >TiO₂ > SiO₂. Ces mêmes auteurs ont observés une accumulation de lipofuscine lysosomale excepté pour C 60 selon le gradient suivant : nanotube de carbone > TiO₂ et SiO₂. Par ailleurs, la catalase et la GSH transférase ont aussi été activés selon différents gradients (Canesi, Ciacci et al. 2010a). De plus, nous avons aussi prouvé qu'un modèle animal peut être plus sensible à un type de NP qu'à un autre. Par exemple la souris, est un modèle plus sensible aux AgNPs ViveNano[®] qu'aux QDs. Ainsi les nanoparticules ne présentent pas la même toxicité pour un même modèle animal. De plus, chaque compartiment ou fonction cellulaire ne réagit pas similairement lors d'une exposition à une NPs. Ce qui rend les études en nanotoxicologie complexe.

Dans le chapitre 2, nos résultats ont démontré que les NPs ne sont pas stables dans tous les milieux de cultures utilisés. Elles sont stables dans l'eau stérile, dans le RPMIc et RPMIc sans bicarbonate. Toutefois, elles se désagrègent dans l'eau de mer. Ainsi ces résultats permettent d'expliquer les résultats des paramètres immunitaires obtenus chez la moule. Ceci a été confirmé dans les études de Canesi et al,(2010a) . En effet il a été démontré que les NPs étaient affectées par les forces ioniques, le pH, et les concentrations de calcium. Ainsi les suspensions de NPs sont susceptibles de former des agglomérats dans l'eau de mer de taille nanométrique et micrométrique (Canesi, Ciacci et al. 2008; Canesi, Ciacci et al. 2010a).

Effectivement, le modèle bivalve mis en présence de NPs indique une dégradation des particules et une activation du système de protection de l'organisme via la production de métallothionéines. Ceci a aussi été démontré chez le hépatocytes de truites arc-en-ciel mis en présence de QDs CdTe dans une étude de Gagné et al, (2008e). Les auteurs ont observé une production de métallothionéines en présence des QDs, qui pourrait être expliqué par les relargage de cadmium soluble (obtenus lors de l'oxydation de la nanoparticule) (Gagné, Maysinger et al. 2008e).

Il est donc fondamental dans le futur de bien caractériser les NPs. Actuellement, les méthodes utilisées en chimie permettent de visualiser les NPs, d'observer leur taille, de les tracer (Dubertret and Vincent Noireaux 2002; Mortensen, Oberdörster et al. 2008; Al Faraj, Cieslar et al. 2009). Ces méthodes servent également à d'analyser la stabilité des NPs, ce qui pourrait être également caractérisé via l'ICPS ES ou MS, les compteurs à particules de types Beckman, la spectroscopie radiographique dispersive d'énergie etc. D'autre part, la stabilité des nanoparticules dans les différentes matrices devrait être observée pour chaque étude. En effet, ces résultats nous renseignent sur la biodisponibilité des nanoparticules dans l'environnement et leur altération. Selon nos résultats les NPs ne sont pas stables dans l'eau de mer. Il serait donc envisageable que les NPs ne soient pas stables dans le milieu marin (Canesi, Ciacci et al. 2011).

D'autre part, le chapitre 2 a permis de prouver que les NPs non transformées (celles qui ne subissent pas de filtration etc.) sont internalisées entièrement dans les cellules. De nombreuses études attestent aussi l'internalisation de nanoparticules dans les endosomes (Garcia-Alonso, Khan et al. 2011), les lysosomes , le cytoplasme, le noyau (Lovrić 2005a) et au niveau de différents organes (Hoshino, Hanaki et al. 2004).

Par ailleurs, nous avons aussi démontré que généralement, les métaux sont plus toxiques que les NPs. Nos résultats indiquent que le tellure contenu dans les QDs présente lui aussi une certaine toxicité. Ainsi, la toxicité des QDs est principalement liée au cadmium et au tellure (et leurs sous produits de dégradation). Ceci a aussi été observé dans une étude de Miura et al.,(2009), les auteurs ont démontré que la viabilité de cellules HeLa était moins affectée par des AgNPs que par l'argent dissous.

Finalement notre étude a permis d'affirmer que la taille joue un rôle dans la toxicité des QDs. Les particules de grosses tailles sont plus toxiques que celles de petites tailles. Quant aux petites particules, elles induisent des phénomènes d'hormèse. Ce phénomène d'hormèse observé pourrait être le point de recherche à approfondir. Il est possible que les macrophages sur-stimulés par les NPs génèrent une flambée oxydative et donc un stress oxydant important. Ce stress étant, à long terme, néfaste aux cellules, il entraîne la mort de celles-ci (Maysinger 2007). Les phénomènes d'hormèse sont relativement peu exploités dans la littérature toutefois beaucoup d'études portant sur des métaux indiquent que les patrons de réponses sont caractéristiques de réponses hormétiques (Lefcort, Freedman et al. 2008). De plus, nos résultats ont indiqué que ces phénomènes d'hormèse sont observés dans les profils de réponses des thiols et des ROS (moules et souris), et de la phagocytose (truites). Afin d'identifier et de confirmer les phénomènes hormétiques se déroulant dans l'organisme, nos résultats pourraient être complétés avec des études *in vivo* d'exposition au NPs.

En considérant que nos travaux ont été réalisés *in vitro* sur des cultures primaires, les perspectives de ce travail seraient de réaliser des applications *in vivo*. Ceci dans le but de confirmer ces résultats dans un modèle comportant l'ensemble des interactions cellulaires et métabolique présentent dans un organisme. En effet, les voies d'action et de métabolisation des métaux sont souvent plus optimales dans un organisme entier (Lin, Chang et al. 2009a). Il a déjà été observé que des QDs à 0.1 mg/ml sont toxiques lorsqu'elles sont incubées avec des cellules EL-4 (cellules de lymphome T murin) et que cette toxicité ne s'exprime pas lors d'une injection dans des souris athymiques (« nude ») (Hoshino, Hanaki et al. 2004; Hardman 2006). Il est aussi important de mentionner que les résultats obtenus *in vitro* avec des lignées cellulaires ne sont pas exactement les mêmes que ceux avec des cellules issues de tissus frais ou d'organismes, et encore plus différents des études *in vivo*. En effet, les cultures cellulaires métabolisent peu les complexes chimiques et donc limitent la toxicité des particules (Lin, Chang et al. 2009a).

Par ailleurs, la gamme de concentrations utilisée dans notre projet est relativement élevée. Il est vraisemblable que les concentrations maximales employées ne se retrouveront pas dans l'environnement, cependant il est tout à fait possible que les nanoparticules se retrouvent dans les eaux de lessivages et contaminent le milieu (Biswas 2005; Gottschalk and Nowack 2011). Par ailleurs les nanoparticules peuvent être relarguées à plusieurs étapes dans le processus de manufacture que ce soit lors de la fabrication de la nanoparticule, la fabrication du produit ou le relargage des NPs contenus dans le produit (Gottschalk and Nowack 2011). Un modèle de Blaser et al (2008) a proposé différentes approches de relargage d'argent provenant des NPs dans le milieu. Environ 15% de l'argent total relargué dans les eaux seraient issus des nanomatériaux contenus dans les plastiques et les textiles (Blaser, Scheringer et al. 2008). Ainsi il est envisageable que les NPs soient lessivées dans le milieu et se complexent à différents types de matrices présentes dans le milieu. Une fois ces nanoparticules ainsi introduites, elles pourraient nuire aux espèces aquatiques. Une récente étude de Canesi et al, (2011) indique l'importance de tester l'écotoxicité des NPs sur des organismes aquatiques invertébrés. Effectivement ces derniers représentent environ 95 % des espèces animales ont une importance écologique indéniable (Baun, Hartmann et al. 2008). Il est donc très important dans les études en nanotoxicologie de considérer l'interaction des nanoparticules et des milieux aquatiques, au même titre que les nombreuses recherches sur les nanoparticules et les aérosols.

Par ailleurs, les QDs manufacturés par la compagnie Northern Nanotech (actuellement ViveNano) ont pu être employés dans le domaine médical car elles possèdent des propriétés fluorescentes dépendantes de leurs structures. Ces mêmes propriétés sont reconnues pour leur utilité dans le domaine médical. Nombreuses sont les publications traitant de marquages de cellules cancéreuses avec des QDs formées d'un noyau de Cd (Chen and Gerion 2004; Cho, Maysinger et al. 2007). Par ailleurs les nanoparticules d'argent sont aussi reconnues comme agents antimicrobiens utilisées principalement dans différents domaines : médical, cosmétique, alimentaire, dentaire etc. (Panacěk, Kvittek et al. 2006; Roe, Karandikar et al. 2008).

Dans le chapitre 3, les mécanismes de défense de la cellule ont été étudiés. Nos résultats ont attesté que la toxicité des NPs est aussi liée au phénomène de stress oxydatif. Il a également été démontré que le système immunitaire pouvait contrer les effets néfastes de ce stress à faible dose mais qu'à forte concentration la production de thiols était inhibée. Lors d'un stress aux nanoparticules, que ce soit pour celles d'argent ou pour les QDs une production d'espèces

oxygénées réactives est réalisée par les macrophages activés (Stohs, Bagchi et al. 2000). Les macrophages et neutrophiles génèrent des anions superoxydes et des oxydes nitriques, ces espèces sont souvent responsables de cytotoxicité cellulaire. (Dommages membranaires, relargage de lactate déshydrogénase). Ceci s'ajoute aux phénomènes d'oxydation « naturelle » des particules dans les milieux de cultures et dans les cellules. De plus, le processus d'oxydation n'est pas équivalent selon les NPs : les AgNPs sont soumis à une oxydation dans l'eau et les QDs à une oxydation lumineuse. Afin de contrer les effets néfastes des AgNPs et des QDs Cd/Te, Cd/S l'organisme produit des protéines du stress oxydant ainsi que des protéines capables de fixer les métaux sous forme ioniques libres (Lin, Chang et al. 2009a)

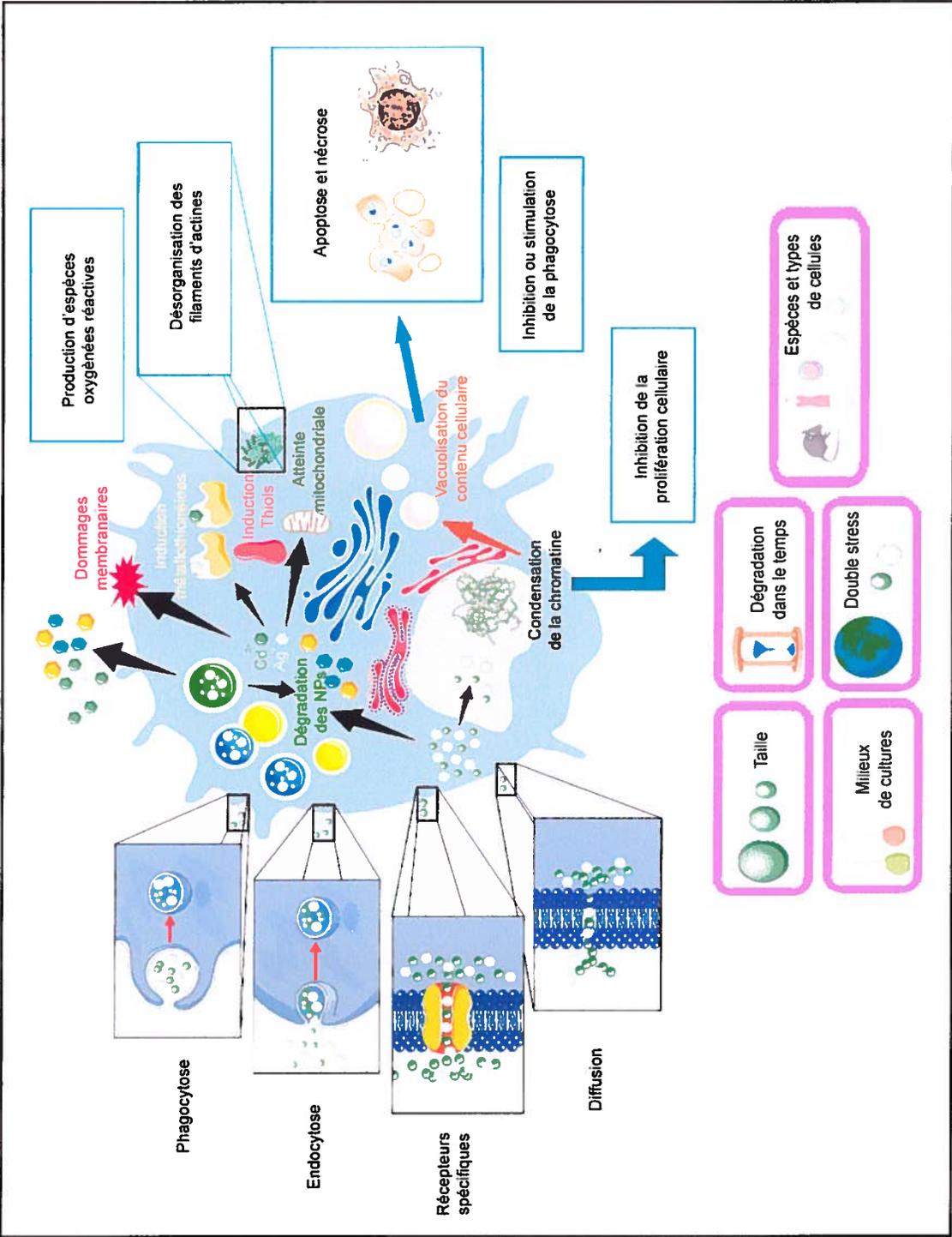
Les QDs sont aussi reconnues pour avoir un fort potentiel conducteur et sont capables de s'oxyder et de former des espèces oxygénées réactives, EOR (Lovric, Cho et al. 2005b). Que ce soit d'origine cellulaire ou nanoparticulaire (lors de la dégradation de celles-ci) la toxicité des NPs est souvent liée à la production de ces EOR. Les biomarqueurs mécanistiques tels que la production de métallothionéines et des thiols viennent corroborer les résultats obtenus par la phagocytose et valident l'hypothèse que le système immunitaire est activé, voir sur-activé, lorsqu'il est mis en présence de NPs.

Cependant, l'impact des NPs (sous forme ionique) sur la réponse inflammatoire du système immunitaire peut être contrôlé via des protéines telles que des métallothionéines. Dans cette thèse, pour de fortes concentrations en QDs, il a été observé que les cellules de bivalves produisaient des métallothionéines afin de chélater le cadmium dissous provenant de la nanoparticule. Nos résultats ont aussi démontré que les QDs et AgNPs ViveNano[®] induisent des phénomènes d'apoptose et de nécrose chez les cellules immunitaires pour de fortes concentrations. Ainsi il est possible que les NPs agissent sur les voies d'apoptose et plus particulièrement sur la sous-expression des facteurs apoptotiques tels que Bcl-2 et la surexpression des caspases 3, de p53 et du TNF α ou bien si la voie apoptotique suivie est celle du cadmium c'est-à-dire la voie mitochondriale et indépendante des caspases (Rana 2008). Au niveau mécanistique il serait intéressant d'observer si ces phénomènes sont liés à la concentration des NPs ou bien à leurs modes d'action. D'autre part, il pourrait être intéressant d'observer si les voies apoptotiques sont intrinsèques à la cellule apoptotique ou extrinsèques (les voies de signalisation impliquées étant différentes).

Finalement dans le chapitre 4, nous avons démontré que des organismes déjà sensibilisés par leur milieu de vie dans des sites choisis en France ou au Québec sont encore plus sensibles à

une exposition aux QDs et aux AgNPs ViveNano[®]. De plus, nous avons observé que lors de ces expériences de phénomène « *stress on stress* » des NPs non toxiques au laboratoire deviennent toxiques à fortes doses lors d'expérience de terrain. Il est essentiel de pouvoir vérifier la toxicité d'un composé selon différentes méthodes *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Les résultats obtenus avec des bivalves pris sur le terrain (*in situ*) et exposé (*in vitro*) aux NPs démontrent que les effets de contaminants émergents peuvent différer selon le mode d'exposition et la provenance des modèles étudiés. Ces deux types d'expositions complémentaires indiquent qu'il faut prendre des précautions lors d'étude *in vitro* et toujours « mesurer » les résultats obtenus au laboratoire avec ceux sur le terrain.

Ainsi les résultats obtenus au cours de la thèse pourraient se résumer au schéma suivant :



La Figure 142 indique les différentes voies d'entrées des nanoparticules identifiées dans la littérature et les répercutions cellulaires observées dans la thèse. Les encadrés violets rappellent les différents facteurs externes capables d'influencer la réponse de la cellule immunitaire. Différents facteurs peuvent donc modifier les réponses cellulaires lors d'une exposition aux nanoparticules d'argent et de cadmium.

Ce travail a donc permis de préciser l'effet toxique des nanoparticules sur le système immunitaire. L'effet de différents paramètres à la fois intrinsèques et extrinsèques capables de jouer un rôle sur la toxicité des NPs ont aussi été mis en évidence. Cette étude suggère que les futures recherches en nanotoxicologie doivent être multidisciplinaires afin de mieux cerner les effets réels des NPs sur les organismes. De nombreuses études sont encore nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action des nanoparticules sur l'organisme en général, mais plus particulièrement sur le système immunitaire.

2. Contribution à l'avancement des connaissances

La force de cette thèse est son originalité. Ce projet a confronté différents modèles d'études utilisés en tant qu'espèces sentinelles dans les études de risques (environnement et sécurité sanitaire). Ces modèles ont aussi été choisis pour leur appartenance à différents maillons du réseau trophique ce qui permettait d'avoir une vision globale de la toxicité des NPs dans un écosystème. Enfin, ces modèles présentent un système immunitaire relativement bien connu.

Lors de ce projet, un volet de chimie a été réalisé afin de caractériser le matériel utilisé dans la thèse selon le type de particules et le type d'expériences. Nous avons choisi d'utiliser des NPs commerciales dans le but de standardiser les tests et d'avoir une information sur un produit qui pourrait se retrouver dans l'environnement. Par ailleurs il était complémentaire de mener des expériences sur les NPs, mais aussi sur les métaux composants ces particules, ce que les recherches scientifiques faisaient encore peu au début de ce projet.

Lors de ces trois années, nous avons eu l'opportunité de travailler avec des nanoparticules de différentes tailles séparées par un processus d'ultrafiltration et ainsi de réaliser une étude comparative de la toxicité des NPs selon leur taille et dans le temps. L'étude par imagerie des particules est fondamentale dans ce projet, car elle permet visuellement de comprendre

l'interaction des particules avec les cellules. A l'heure actuelle peu d'articles scientifiques sur les NPs peuvent être publiés sans de solides bases en chimie et en imagerie sur ces particules.

Finalement, le volet *in situ*, entre deux pays, associe des organismes pris sur le terrain et des contaminants émergents. Ce genre de recherche n'a jamais été retrouvé dans la littérature, c'est un projet précurseur qui pourrait être généralisé dans le futur.

3. Perspectives

Les perspectives concernant les études de toxicologie des NPs sont donc (1) de caractériser la taille, la forme, l'état, le potentiel de surface des NPs, (2) connaître leur dispersion dans le milieu, (3) de détecter les NPs dans le milieu et donc de pouvoir différencier du Cd nanoparticules du Cd dissous, (4) d'approfondir les connaissances sur les voies d'internalisations (et d'excrétion) des NPs. De plus, il serait important de mener plus d'études sur la génotoxicité des NPs, et tous les processus de métabolisations des NPs, ce qui pourrait changer complètement notre point de vue sur ces contaminants émergents.

Malheureusement, peu de recherches ont été réalisées à ce jour sur l'influence des particules sur le système immunitaire. De plus, une étude récente de Riviere (2009), met en évidence le manque d'études comparatives entre les différents modèles d'animaux et la standardisation des protocoles. Cette thèse répond aux objectifs énoncés par Riviere. Notre étude est novatrice dans le choix de contaminants et des espèces. Nous avons tenté de comparer les performances de certains paramètres du système immunitaire des différents modèles choisis à l'aide de protocoles standardisés au laboratoire et comparer les différentes réactions immunitaires lors d'une contamination aux NPs.

De plus, cette thèse a permis de définir les modèles d'études et les tests à choisir pour analyser l'impact des NPs. Ceci pourra permettre de standardiser les méthodes, de pouvoir comparer les espèces étudiées et les paramètres immunitaires testés. Selon les différents résultats obtenus dans la thèse, la transformation lymphoblastique est un test sensible aux NPs (QDs et AgNPs). Il pourrait être utilisé couramment dans les tests de toxicité des NPs comme indicateur de toxicité standardisé (Hillegass, Arti et al. 2010). Ainsi, nous pourrions utiliser, pour des études futures, ce paramètre immunitaire afin de caractériser la toxicité et d'évaluer le risque lié aux contaminants émergents. Par ailleurs, il serait pertinent de comprendre plus précisément l'effet des NPs sur le système immunitaire et notamment sur les lymphocytes,

étant donné leur sensibilité. Il serait intéressant de vérifier si les NPs peuvent perturber l'éducation thymique des lymphocytes T mais aussi perturber la différenciation cellulaire des lymphocytes B, leur activation, ou le taux de production d'anticorps. Afin de réaliser cela il faudra procéder à des marquages spécifiques, par exemple un marquage des clusters de différenciations (CD) avec des anticorps anti-CD fluorescents et réaliser les différents biomarqueurs utilisés dans la thèse afin d'observer plus précisément les voies d'action des NPs. Ces résultats pourraient ainsi compléter ceux obtenus sur la réponse mitotique.

Par ailleurs, nos travaux ont été réalisés *in vitro* sur des cultures primaires, les perspectives de ce travail seraient de réaliser des applications *in vivo* pour confirmer ces résultats chez un organisme entier. En effet, les voies d'action et de métabolisation des métaux sont souvent plus optimales dans un organisme entier (Lin, Chang et al. 2009a). Il a déjà été observé que des QDs à 0.1 mg/ml sont toxiques lorsqu'elles sont incubées avec des cellules EL-4 (cellules de lymphome T murin) et que cette toxicité ne s'exprime pas lors d'une injection dans des souris athymiques (« nude ») (Hoshino, Hanaki et al. 2004; Hardman 2006). Il est aussi important de mentionner que les résultats obtenus *in vitro* avec des lignées cellulaires ne sont pas exactement les mêmes que ceux avec des cellules issues de tissus frais ou d'organismes entiers, et encore plus différents des études *in vivo*. En effet, les cultures cellulaires ne « métabolisent » pas les complexes chimiques ce qui limite la toxicité des particules (Lin, Chang et al. 2009a). Autrement dit les réponses biologiques ne sont pas exactement les mêmes que celles *in vivo*.

Dans de futures études, il serait donc fondamental de caractériser l'action mécanistique et génique des particules. Des tests comme ceux des MTT, de l'intégrité membranaire, du potentiel de membrane mitochondriale seraient des expériences qui pourraient renseigner sur le bon fonctionnement des organites cellulaires, ou l'intégrité des composants cellulaires (Braydich-Stolle 2005; Carlson, Hussain et al. 2008; Hillegass, Arti et al. 2010). Dans la littérature, il a été démontré que la toxicité des NP s'exprime aussi au niveau du noyau et a un effet sur les chromosomes. Ainsi il a été reconnu que les QDs ont bien un effet sur l'expression génique (Gagné, Fortier et al. 2010). Ce type d'analyse serait un bon complément aux expériences réalisées dans ce projet sur le système immunitaire.

Actuellement, les études sur les NPs que ce soit en toxicologie ou dans d'autres domaines, sont en explosion. Malheureusement certaines améliorations sont encore à réaliser car peu ou très peu d'études sont comparables. En effet, le premier point principal à clarifier est l'unité

de mesure des NPs. Au travers de la littérature, cette concentration est exprimée en $\mu\text{g/ml}$, en mole, en $\mu\text{g/kg}$ de poids en NPs/cellule, ce qui rend l'évaluation globale de la toxicité difficile (Hardman 2006). Il est donc actuellement nécessaire que l'ensemble des études de toxicologie avec des NPs adopte des standards afin de caractériser la toxicité de ces nouvelles molécules. Par exemple, dans ce projet, les concentrations des NPs exposées aux différents types cellulaires ont été exprimées en $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticules ou du métal constituant principalement la nanoparticule. Il a été difficile de la comparer à des études exprimant la toxicité en nombre de particules par litre ou en mole par litre. La désignation et la caractérisation des nanoparticules sont donc les bases de toutes les études de toxicologie.

Avec l'augmentation de l'utilisation des nanoparticules et plus particulièrement les QDs et AgNPs, des problèmes liés aux traitements de déchets et à l'exposition au cadmium et à l'argent sont à prévoir. Il est nécessaire à l'heure actuel de mettre en place des biomarqueurs capables de doser des toxicités liées au cadmium à des très faibles doses (Fowler 2009). Surtout que les quantités de NPs relarguées dans le milieu environnemental sont à ce jour inconnues et seulement estimés par modélisation (Kim, Park et al. 2010). Il est donc très important d'augmenter la traçabilité des NPs afin de pouvoir prévenir les conséquences des nanoparticules. A plus large échelle, il serait intéressant de mettre en place des modèles mathématiques afin de prévoir l'influence de la toxicité sur les différents maillons de la chaîne alimentaire et sur l'environnement. Certains auteurs essaient d'évaluer l'impact des NPs sur l'environnement (Blaser, Scheringer et al. 2008) car comme tout métal, il a été démontré que les QDs peuvent être transférés selon le réseau trophique (Holbrook, Murphy et al. 2008) .

De plus, il serait très important de mettre en place des mesures légales afin de gérer les risques occasionnés par les nanomatériaux. Différentes organisations sont déjà mises en place et ont pour vocation d'informer le public et le gouvernement sur les enjeux des nanotechnologies, d'évaluer l'exposition des travailleurs aux nanoparticules, et de regrouper les entreprises utilisant des NPs. Ces organisations sont les suivantes : Le National Nanotechnology Initiative (NNI), le Nanoscale Materials Stepwardship Program (NMSP), le Toxic Substances Control Act (TSCA) (Gwinn and Lang). Ce sont le Canada et la Norvège qui en 2009 ont mis en place les premiers, un rapport afin de limiter la production de nanoparticules par les entreprises. Puis, en Europe l'agence de la régulation des aliments a mis en place des règlements concernant les aliments modifiés par nanotechnologies (Gwinn and Lang). D'autre part, un volet nanoparticules est en train de se mettre en place avec le

programme REACH dont le but est d'évaluer la toxicité des NPs. Actuellement, les études d'immunotoxicité avec des NPs procèdent à une évaluation du risque au cas par cas (accords inter laboratoires Européen et Américains) (Dobrovolskaia and McNeil 2007). A court ou moyen terme l'idéal pour la recherche scientifique sur les NPs serait de grouper les résultats et de ne plus faire du cas par cas pour ainsi uniformiser les notions de toxicité des NPs sur le système immunitaire. Il est donc essentiel de travailler avec des solutions commerciales.

Au vue des résultats de cette thèse et des dernières tendances dans la recherche en nanotechnologie, il est fondamental de définir certains critères fondamentaux à respecter pour chaque étude :

- Connaitre et définir le type de nanoparticules employées dans l'étude (caractériser la taille, la forme, connaître les concentrations massiques de métal contenues dans la particule, son enrobage, sa solubilité, sa stabilité, définir une unité de mesure ...).

- Normaliser les tests afin de pouvoir comparer les effets, utiliser les nanoparticules qui sont employées dans le commerce et non pas celles réalisées par des chimistes (particules manufacturées). Les différences d'origines des NPs rendent très difficile la comparaison des effets de toxicité sur les cellules animales.

- Améliorer les méthodes de détection des nanoparticules bien qu'il en existe plusieurs (Fabrega, Luoma et al. 2011) aucune méthode de détection des nanoparticules dans le milieu en fonction de leur état de dispersion est connue etc.

Pour conclure, il semble donc primordial que les équipes scientifiques utilisent des NPs commerciales qui sont retrouvées dans le commerce et non pas des nanoparticules créées dans le but d'étudier la toxicité de celles-ci. Les comparaisons entre les différents articles sont actuellement très difficiles et il est audacieux de prévoir la toxicité de NPs qui seraient produites sous certaines conditions en petites quantités. Tous les projets sur les NPs devraient se dérouler en collaboration avec plusieurs équipes afin de pouvoir partager les spécificités de chaque laboratoire, car la toxicité des NPs touche à la fois les domaines de la biologie, de la physique et de la chimie. Il faudrait organiser des rencontres ou des conférences afin de pouvoir vulgariser les connaissances sur les NPs et de regrouper les résultats obtenus. Afin d'optimiser ce partage de connaissances et de compétences, il serait constructif de regrouper les réseaux à l'échelle internationale. Finalement, la mise en place de méthodes d'analyses standardisées selon les modèles animaux sélectionnés serait très utile. Selon ces différents

critères, il serait possible de créer des gradients de toxicité des nanoparticules, des gradients de sensibilité des espèces modèles et de prédire la toxicité de molécules commerciales qui sont utilisées à large échelle et se retrouveront dans le milieu environnant. Il est donc fondamental de tenir compte, dans le futur, de ces différents critères dans les études de toxicologie des NPs.

ANNEXES

Annexe 1 : Résultats des Tailles de nanoparticules d'argent (Ted pella^{inc})

Dans le chapitre 3 des expériences sur la taille des nanoparticules ont été réalisés. Partant de l'hypothèse la chimie des particules (agrégation, désagrégation) jouait un rôle sur leur toxicité, nous allons tenter de démontrer que des nanoparticules de tailles différentes pouvait entraîner des réponses immunitaires variées. L'objectif de cette section était donc de mettre en contacts des cellules immunitaires de différents modèles animaux en présence de différentes tailles de nanoparticules d'argent de la compagnie Ted Pella^{inc} AgNPs TP.

1-Matériel et méthode

1.1Caractérisation des particules

Voir la section 3.1.1 du chapitre 3.

1.2 Obtention des cellules et exposition cellulaire

Les protocoles d'exposition des nanoparticules sont les mêmes que ceux utilisés dans les sections 1, 2, 3 et 4 du matériel et méthode du chapitre 1.

1.3 Tests statistiques

Voir la section 3.1.3 du chapitre 3.

2- Résultats

Les différents modèles animaux ont été exposés aux nanoparticules de la compagnie Ted Pella^{inc} selon la gamme de concentration présentée ci-dessus.

- Pour la moule bleue : la viabilité des hémocytes et la phagocytose (Figure 143).
- Pour la truite arc-en-ciel : la viabilité des macrophages, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (Figure 144 et Figure 145).
- Pour la souris : la viabilité des macrophages, la phagocytose, la transformation lymphoblastique (Figure 146 et Figure 147).

Pour tous les tests, les valeurs ont été considérées significatives pour $p < 0.05$, très significatives pour $p < 0.001$, et très fortement significatives lorsque $p < 0.0001$.

2.1 Cellules de moules bleues

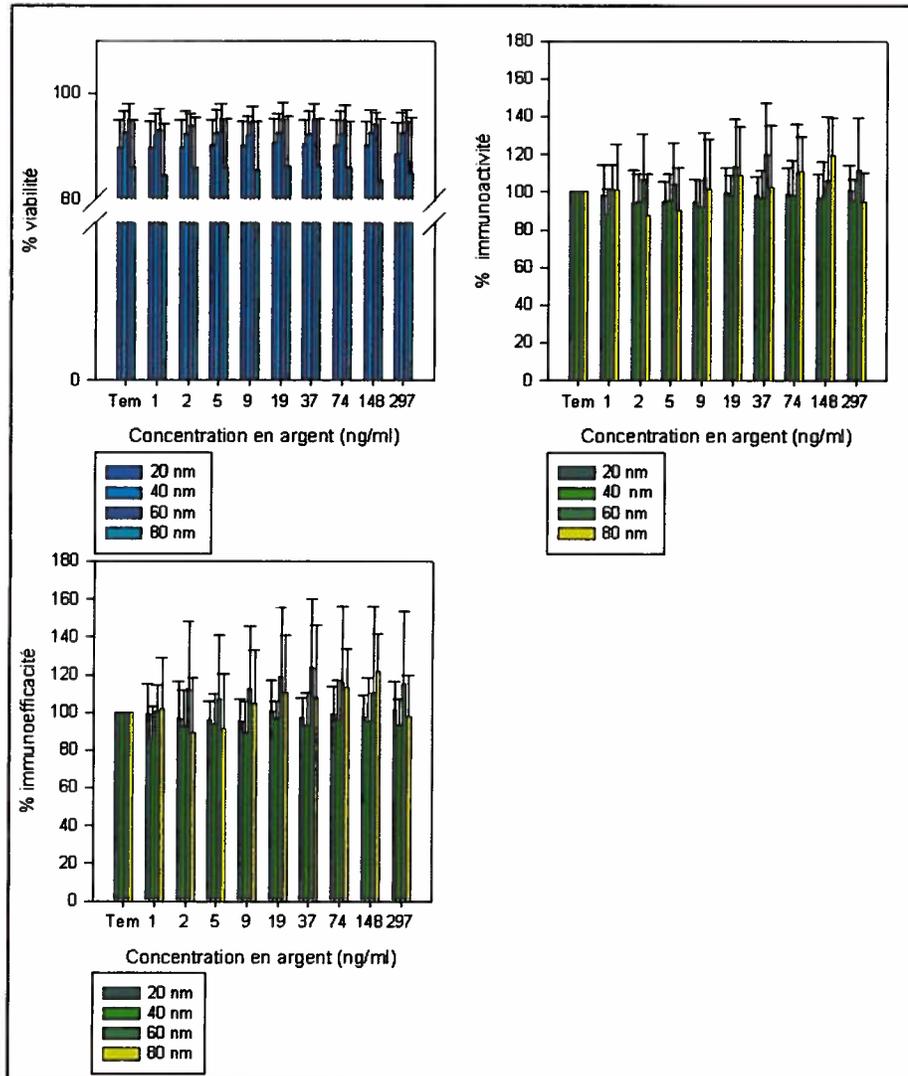


Figure 143 : Viabilité et phagocytose pour la moule exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}. Pour les viabilités des nanoparticules de 20 nm $n=11$, pour les autres tailles $n=9$. Pour la phagocytose des nanoparticules de 20 nm, 40 nm, 80 nm $n=9$ et pour 60 nm $n=8$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

Pour la viabilité aucune différence significative de viabilité n'est remarquée pour les AgNPs TP de 20, 40, 60 et 80 nm. Aucune différence significative de phagocytose pour les deux paramètres n'est observé pour la moules bleues (Figure 143).

2.2 Cellules de truites arc-en-ciel

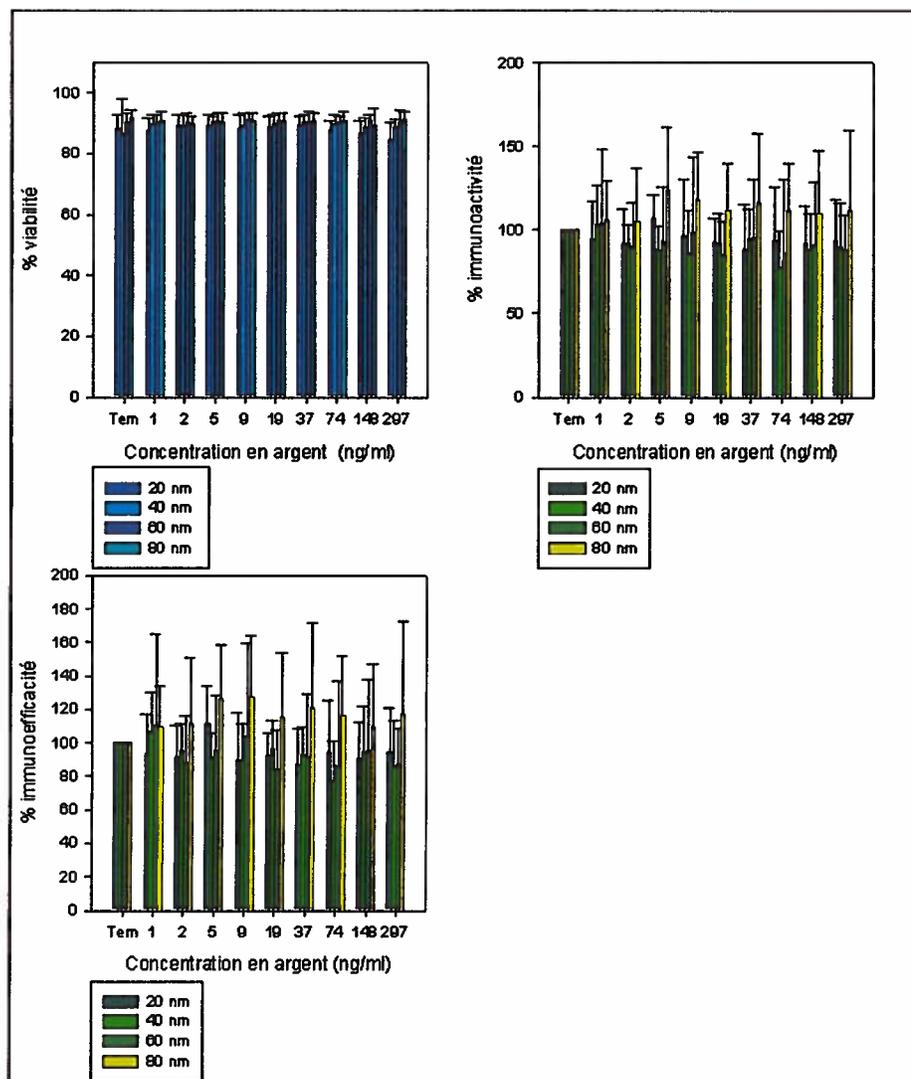


Figure 144 : Viabilité et phagocytose pour la truite arc-en-ciel exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}. Pour les viabilités et la phagocytose n=8. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

Aucune variation significative de la viabilité et des la phagocytose n'est observé quelques soit la taille des nanoparticules d'argent (AgNPs TP) (Figure 144).

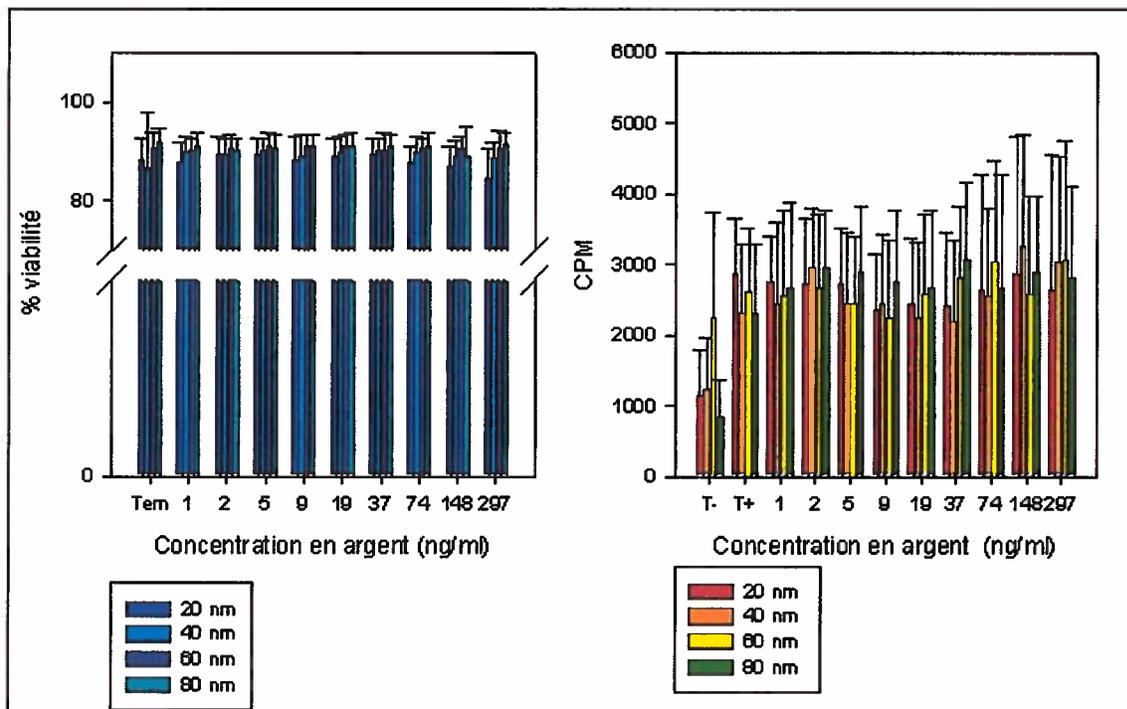


Figure 145 : Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique pour la truite arc-en-ciel exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}. Pour les viabilités et la transformation n=5. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

Aucune variation de la viabilité des lymphocytes ni de la transformation lymphoblastique n'est observée (Figure 145).

2.3 Cellules de souris

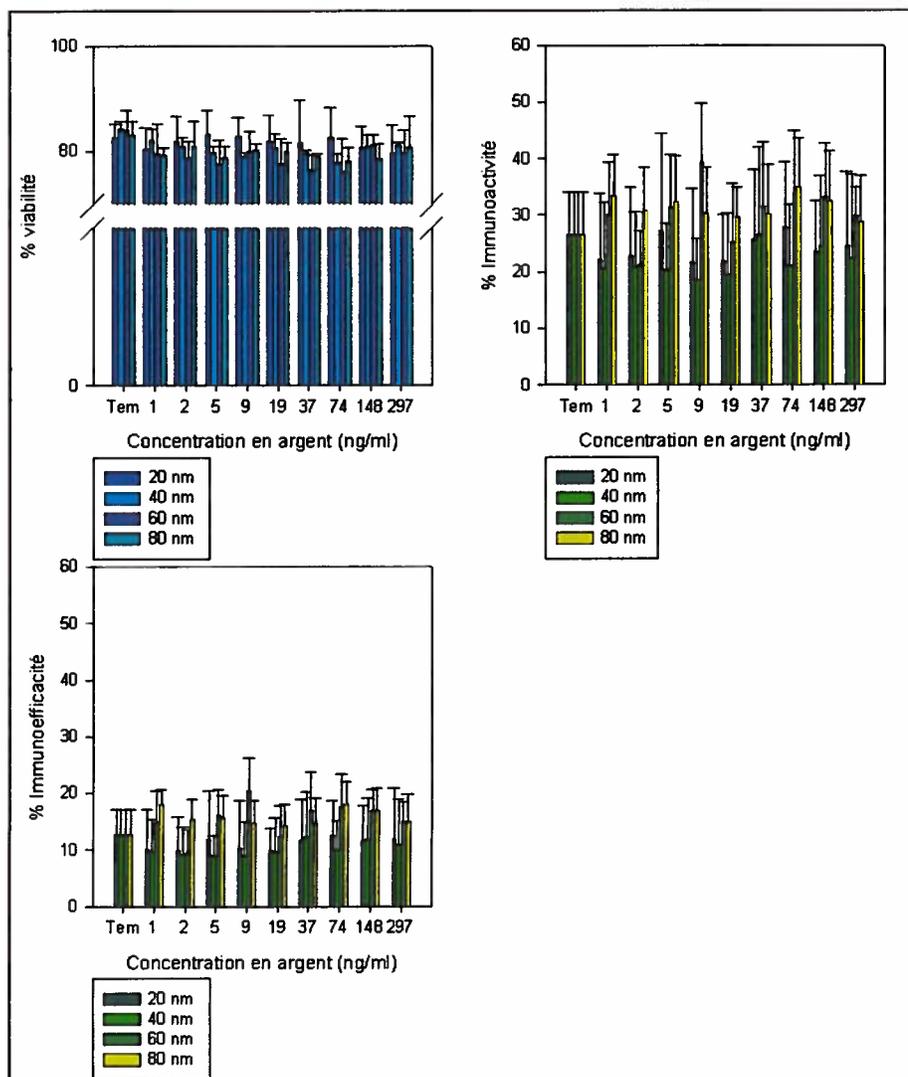


Figure 146 : Viabilité des macrophages et phagocytose pour la souris exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}. Pour les viabilités et la phagocytose n=6. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

Aucune variation significative de la viabilité et des la phagocytose n'est observé quelques soit la taille des AgNPs TP (Figure 146).

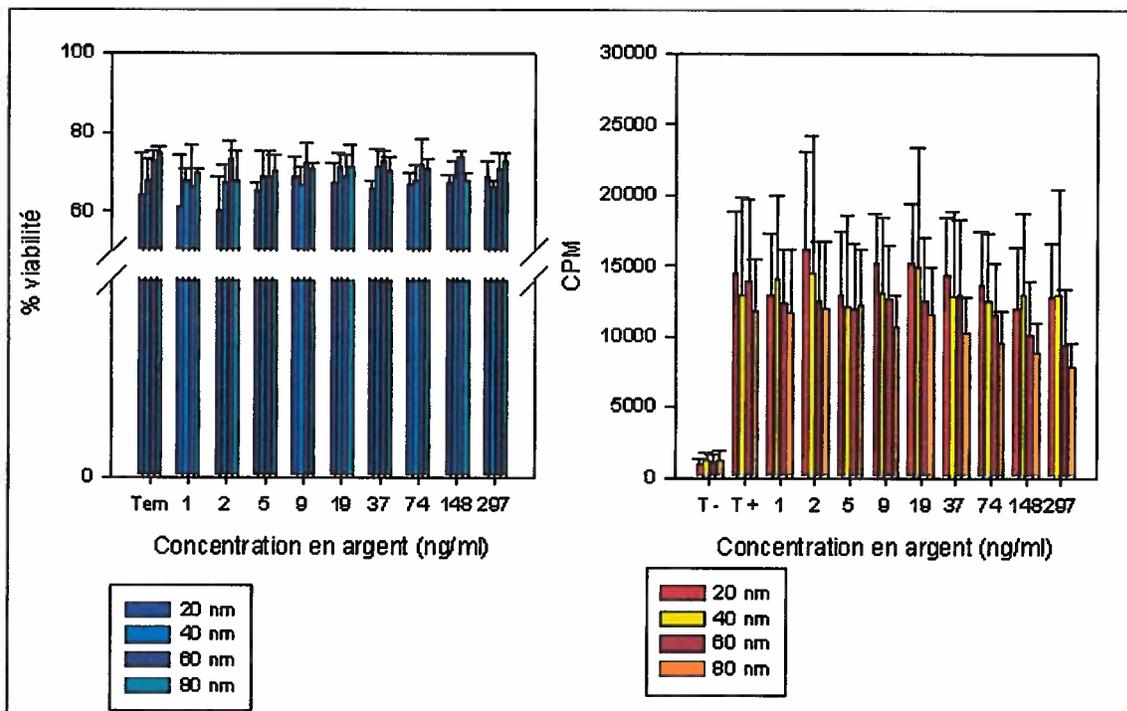


Figure 147 : Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique pour la souris exposée aux nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}. Pour les viabilités et la phagocytose n=3. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

Aucune variation de la viabilité des lymphocytes ni de la transformation lymphoblastique n'est observée (Figure 147).

2.4 Cellules d'humain

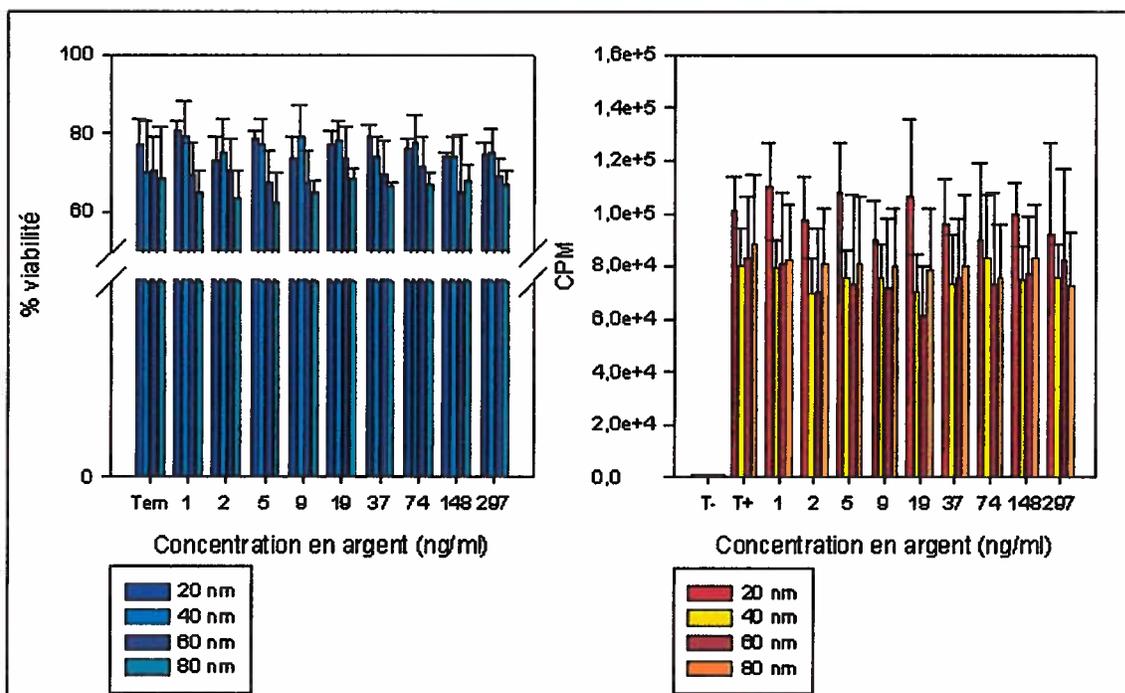


Figure 148 : Viabilité des lymphocytes et transformation lymphoblastique pour les lymphocytes d'humain exposés aux nanoparticules d'argent de Ted Pella^{inc}. Pour les viabilités et la transformation, 20 et 80 nm n=3, 40 nm n=4 et pour 80 nm n=6. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

Aucune variation de la viabilité des lymphocytes ni de la transformation lymphoblastique n'est observée (Figure 148).

3. Conclusions et discussion

Voir la section du chapitre 3

**Annexe 2 : Campagnes d'échantillonnage dans
le saguenay 2008, 2009, 2010. Résultats avec
*Mya arenaria***

1. Protocole 2008

En 2008, un état de santé des myes a été mis en place et les protocoles standards d'analyse de viabilité et de phagocytose ont été réalisés chez les myes.

1.1 Collection de l'hémolymphe

Des bivalves adultes récoltés dans tous les sites cités précédemment (voir Figure 149). L'hémolymphe de mye a été prélevée individuellement dans le muscle adducteur postérieur et antérieur, grâce à l'utilisation d'une seringue (23G) puis, les échantillons ont été immédiatement placés sur la glace pour éviter l'accumulation de hémocytes (Auffret and Oubella 1997; Brousseau, Pellerin et al. 2000; Araya, Siah et al. 2008).

1.2 Compte cellulaire et viabilité

Un compte cellulaire et une viabilité vont être lus au Cytomètre en flux (Guava PCA Cytomètre) à l'aide du kit Viacount® à raison de 50 µl d'hémolymphe pour 150 µl de Viacount®. L'excitation de l'IP est mesurée par les deux lasers FL1 (580-583 nm) et FL 2 (675-680 nm).

1.3 Phagocytose

Deux cents microlitres de la suspension cellulaire et ont été mis dans une plaque à fond plat en polypropylène. Par la suite, les billes rouges de carboxylate diluées 1 : 10 (Fluospheres) ont été ajoutées à la suspension. Le mélange de cellules et de billes va être incubé 18 heures à 15°C. Les billes vont être éliminées en retournant vigoureusement les plaques. Les hémocytes ayant phagocytés des billes, vont ensuite être remis en suspension dans le puit et fixés avec une solution de fixation composée d'eau de mer contenant 0.2% de sodium azide et de 0.5% de formaline. Les échantillons vont être lus au Facs calibur. Pour la lecture, le canal FL2 $\lambda = 585 \pm 42$ nm, cette fluorescence est adaptée à celle des billes. Au moins 10000 évènements ont été acquisitionnés. Les résultats ont été analysés selon deux marqueurs définis comme l'activité de phagocytose ou la capacité des hémocytes à phagocyter une bille et plus (M1) et l'immunoefficacité ou la capacité à phagocyter 3 bille et plus (M2).

2. Résultats et discussion 2008

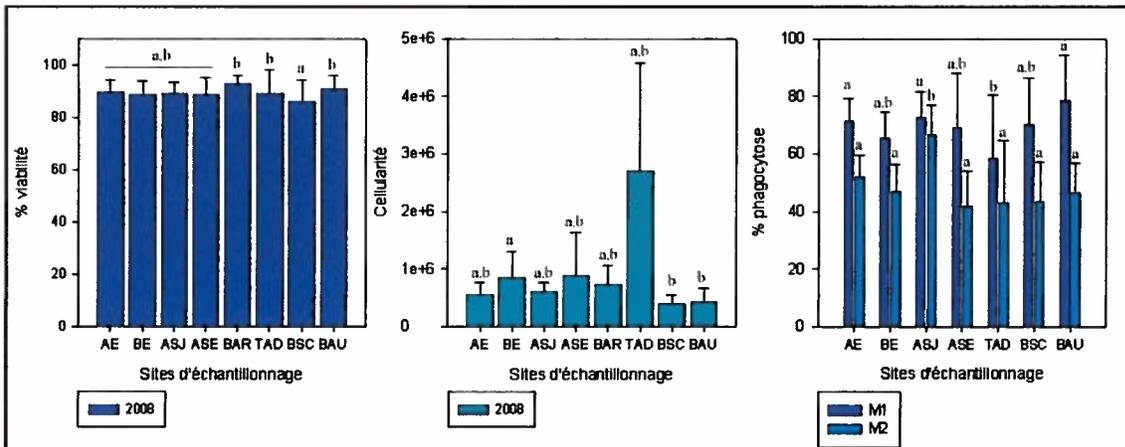


Figure 150 : Résultats des paramètres immunitaires dosés sur des myes pour l'année 2008. n=15.

En 2008 des différences de viabilités des hémocytes ont été observées entre les sites de BSC et les sites de BAR, TAD et BAU. La viabilité du site de BSC était plus faible que celle des autres. Concernant les cellularités, le site de BE était significativement différent de ceux de BSC et de BAU. Bien que le site de TAD présente une très forte cellularité, les écarts types ne permettent pas d'avoir une différence significative entre les échantillons (Figure 150). L'immunoactivité des hémocytes de TAD est significativement différente de celle des hémocytes de BAU, AE et ASE. Ces résultats sont à mettre en lien cellularité, en effet la phagocytose étant faible et la cellularité forte pour TAD, il est tout à fait possible que les cellules en questions soient des gamètes qui ne phagocytent pas les billes rouges fluorescentes, ce qui expliquerait la faible intensité de fluorescence. Concernant les résultats de l'immunoefficacité, le site d'ASJ est significativement différent des autres sites. Ainsi, les résultats ne sont pas les mêmes entre les deux paramètres. Le site de l'ASJ semble présenter une stimulation de la phagocytose sûrement lié à son environnement de pollutions.

3. Protocole 2009

En 2009, l'objectif principal était d'approfondir les divers impacts d'une pollution mixte et diffuse chez la mye, en réalisant les études suivantes :

- Analyses immunologiques chez les bivalves : techniques de cytométrie (Guava) à partir de prélèvements de myes

- Sexage et détermination des stades de développement des myes : comparaison entre zones contaminées et zones de références

-Mesures de réserves énergétiques et d'hormones stéroïdiennes chez les bivalves: comparaison entre zones contaminées et zones de références

Les myes ont été échantillonnées à 7 sites. Environ 60 myes de grosse taille et 60 de taille intermédiaire ont été prélevées à chaque site. Les myes étaient séparées ainsi :

-grosse taille : n = 12 seront sélectionnées pour mesures morphométriques usuelles, analyses en cytométrie, sexage/stade maturation, biomarqueurs

- taille intermédiaire : n = 12 seront sélectionnées pour mesures morphométriques usuelles, analyses en cytométrie, sexage/stade maturation, biomarqueurs

-grosse taille : n = 30 pour analyses chimiques (CSL) qui seront réalisées par les laboratoires d'EC de Burlington (métaux, HAP, BPC, organochlorés)

-taille intermédiaire: n = 30 pour analyses chimiques (CSL) qui seront réalisées par les laboratoires d'EC de Burlington (métaux, HAP, BPC, organochlorés)

Ainsi 12 myes par site, ont été prélevées pour les analyses en cytométrie en flux. Les protocoles de viabilité, de cellularité et de phagocytose utilisés sont les mêmes que ceux choisis en 2008.

4. Résultats et discussion 2009

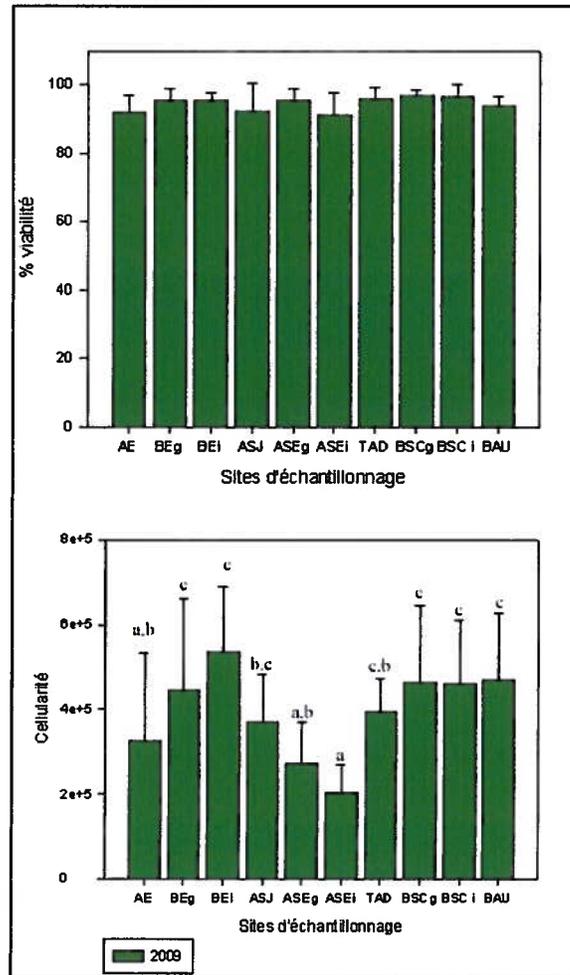


Figure 151 : Viabilité et cellularité des hémocytes de myes pour l'année 2009.

Aucune différence de viabilité des hémocytes de myes n'a été trouvée pour l'année 2009. Cependant des différences de cellularité entre les tailles de myes sont observables entre les sites (par exemple pour BE et ASE). Mais pour un même site, aucune différence de cellularité n'est observée (Figure 151).

Ainsi, il n'y a pas de différence de viabilité entre les tailles de myes selon les sites d'échantillonnage, ainsi il n'est pas utile de différencier les tailles de mollusques lors de l'échantillonnage. D'autre part, les différences de cellularité observées peuvent être du à des différences dans la qualité des échantillons (présence de gamètes). Cette différence de cellularité est significative entre les sites de l'ASE et BSC, BAU ainsi, il est possible aussi que la cellularité soit liée à l'état de santé des bivalves.

5. Protocole 2010

En 2010, l'objectif principal était d'approfondir les divers impacts d'une pollution mixte et diffuse chez la mye.

- Analyses immunologiques chez les bivalves : techniques en cytométrie (Guava) à partir de prélèvements de myes en zones contaminées et de références

- Sexage et détermination des stades de développement des myes : comparaison entre zones contaminées et zones de références

- Influence du temps d'immersion des myes (*i.e.*, distance de la rive) sur les réponses de biomarqueurs en zones contaminées et zones de références.

Les myes ont été échantillonnées dans 4 sites du fjord selon des transects. Huit points d'échantillonnage par sites ont donc été définis. Par point sur un site, 12 myes de grosses tailles ont été prélevées. Avec ces myes différents tests ont été réalisés :

- n = 4 seront sélectionnés pour chaque point pour mesures morphométriques usuelles, analyses en cytométrie Guava, sexage/stade maturation, biomarqueurs

- n = 8 pour analyses chimiques (CSL) qui seront réalisées par les laboratoires d'EC de Burlington (métaux, HAP, BPC, organochlorés)

Ainsi, 32 myes ont été prélevées par site pour les analyses en cytométrie en flux. Les protocoles de viabilité, de cellularité et de phagocytose utilisés sont les mêmes que ceux choisis en 2008. D'autre part, des paramètres humoraux ont été prélevés pour les myes à partir du plasma de l'hémolymphe.

5.1 Essais sur la fraction humorale de l'hémolymphe

Cette partie des tests a été réalisée par l'équipe du Dr. Sophie Gauthier Clerc (Professeur chercheure sous octroi en conchyliculture à l'ISMER, Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière, Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec).

Une partie de l'hémolymphe récoltée individuellement a été aliquotée selon les tests :

- Un aliquot de 500 µl pour les dosages de la prothrombinase (ProPO).
- Un aliquot de 400 µl pour les dosages de la phosphatase acide (Pac).

Les aliquots ont été centrifugés à 400 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été récolté (plasma, fraction acellulaire) et congelé à -80°C. Puis pour préparer les lysats d'hémocytes (à faire juste avant les dosages). Les aliquots ont été resuspendus dans le tampon approprié au dosage. L'ensemble a été vortexé et mis dans un sonicateur rempli d'eau et de glace pour 30

minutes à 35 KHz (sonicateur ELMA, LC 30 H, d'une fréquence non ajustable de 35 KHz). Par la suite, les échantillons ont été centrifugés durant 10 min à 12000g (4°C) et le surnageant (lysate d'hémocytes) a été récupéré. En fonction des deux analyses précédées les volumes suivant ont été utilisés.

Volume de plasma et nombre d'hémocytes nécessaires au dosage :

Essais	Plasma
Phosphatase acide	50 µl
Phénoloxydase	10 µl

5.1.1 Dosage de l'activité de la pro-phénoloxydase (pro-PO) Protocole modifié de (Coles and Pipe 1994) et (Muñoz, Meseguer et al. 2006)

Afin de doser l'activation de prophénoloxydase (ProPO), il faut préparer une solution de SDS à température pièce à 1 mg/ml (pH 7.4). Pour le dosage vont être ajoutés, en duplicat, 10 µl de plasma et 40 µl de PBS. Pour le contrôle négatif, seul 50 µl de tampon seront ajoutés. Puis 50 µL de SDS vont être mis dans chacun des puits à l'aide d'une pipette à répétition (ou par pipetage inversé, une pipette ordinaire est utilisée pour éviter que le SDS ne forme des bulles qui pourraient fausser les lectures). Puis les échantillons vont être incubés durant 30 minutes à 37°C avec agitation.

Durant l'incubation le substrat va être préparé, soit une solution de L-DOPA (3 mg/ml) avec 10 mM calcium et 0.2 M HCl. Cette dernière va être conservée à température de la pièce. Après l'incubation, 50 µl de L-DOPA vont être ajoutés à chacun des puits à l'aide d'une pipette à répétition (ou par pipetage inversé si une pipette ordinaire est utilisée pour éviter que le SDS ne forme des bulles qui fausseront les lectures). Puis, chaque puit va être lu à 492 nm pendant 15 minutes (1 lecture/min). Afin de calculer l'activation de la ProPO, une unité est définie comme l'augmentation de la densité optique de 0.001/min selon le rapport :

$$\left(\frac{\text{Absorbance échantillon 15 min} - \text{Absorbance contrôle négatif 15 min}}{15} \right) \times 1000 = \text{Unités}$$

5.1.2 Dosage de l'activité de la phosphatase acide (Pac) Modifié de (Hong, Xiang et al. 2006; Jing, Li et al. 2006).

Afin de doser la production de phosphatase acide, une courbe étalon doit être réalisée. La solution mère est faite de p-nitrophénol (2.5 mM) soit 0.0035 g p-nitrophénol + 10 ml de tampon acétate. Puis des dilutions sériées vont être mises en place telles que :

Tableau 39 : Courbe standard de p-nitrophénol afin de doser la production de phosphatase acide dans le plasma des myes.

Concentration (nmol/50 µl)	Volume (µL)	Quantité tampon acétate (µL)
S5= 5	40 µl de solution mère	960
S4= 2.5	500 µl de S5	500
S3= 1.25	500 µl de S4	500
S2= 0.75	500 µl de S3	500
S1= 0.3785	500 µl de S2	500
S0= 0	0	1000

Afin de doser la production de phosphatase acide, 50 µL de standard ou d'échantillon (dans notre cas le plasma) vont être ajoutés dans chaque puit d'une microplaque en duplicat. Par la suite, à l'aide d'une pipette à répétition, 150 µL de la solution de pNPP seront ajoutés. Puis, le mélange va être incubé durant 60 min à 37°C avec agitation. Finalement, 75 µl de NaOH seront ajoutés afin de développer la coloration de la réaction. Ainsi, la fluorescence va être lue dans chaque puit à une longueur de 405 nm. Afin de calculer la concentration de nitrophénol produit dans chaque puit avec la courbe standard (Concentration (nmol/puit) en fonction de l'absorbance) il faut diviser cette concentration par le volume d'échantillon ajouté aux puits selon la formule :

$$\frac{\text{Concentration (nmol / puit)}}{50\mu\text{l}} \times 1000 = \text{Concentration de l'échantillon (nmol nitrophénol / ml plasma)}$$

5.1.3 Dosage des protéines globales dans le plasma (Bradford 1976)

Cet essai permet le dosage des protéines à l'aide d'un colorant le bleu de Coomassie et du dosage de l'absorbance à 595 nm (Bradford 1976). Brièvement, une gamme étalon de protéines extraites de BSA va être préparée dans 0.15 M NaCl (Muñoz, Meseguer et al. 2006).

Le bleu de Coomassie va être dilué dans 50 ml d'éthanol à 95 %.

A cette solution vont être ajoutés 100 ml d'acide phosphorique à 85 % (v : v). La solution finale obtenue va être diluée dans un volume finale d'un litre. La concentration finale du réactif est de 0.01% (w/v) de bleu de Coomassie G-250, 4.7% (v : v) d'éthanol, and 8.5% (w/v) d'acide phosphorique. La solution de protéines contenant de 10 à 100 pg de protéines dans un volume de 0.1 ml est pipetée dans un tube. Cinq millilitres de la solution de réactif à protéines (bleu de Coomassie) vont être ajoutés et mixés (ou vortexés).

L'absorbance de la suspension va être mesurée à 595 nm après 2 min d'incubation. Un blanc sera aussi mesuré, il contient simplement 0,1 ml du tampon et 5 ml de la solution de réactifs à protéines. Les poids en protéines des échantillons à mesurer vont être calculés en fonction de l'absorbance mesurée à l'aide de la courbe standard de BSA.

5.1.4 Dosage de la L leucine aminopeptidase dans le plasma modifié de Travers et al. 2008. (Travers, Silva et al. 2008)

Une fois que l'hémolymphe est prélevée. Elle va être répartie selon les analyses.

Prélever quatre aliquots d'hémolymphe :

- Un aliquot de 300 µl pour les dosages de la leucine aminopeptidase (LAP)
- Un aliquot de 500 µl pour les dosages de la prothrombinase (ProPO)
- Un aliquot de 400 µl pour les dosages de la phosphatase acide (Pac)

Puis l'hémolymphe va être centrifugé à 400 g à 4 °C pendant 10 minutes. Le surnageant va être récolté (plasma, fraction acellulaire). Puis les échantillons vont être congelés à -80 °C.

Afin de mesurer la concentration en Leucine Amino peptidase une courbe étalon doit être faite à l'aide d'une solution mère de leucine aminopeptidase (1 U/ml). Ainsi, 5 µl de leucine aminopeptidase vont être dilués dans 495 µL de tampon tris. Puis cette solution va être diluée selon le tableau suivant :

Tableau 40 : Dilution pour la réalisation de la courbe standard de Leucine aminopeptidase.

Concentration (mU/mL de standard)	Concentration (mU/puit)	Quantité de solution mère (µL)	Quantité tampon tris (µL)
S0= 0	0	0	250
S1= 20	1	5	245
S2= 40	2	10	240
S3= 60	3	15	235
S4= 80	4	20	230
S5= 100	5	25	225

Le dosage va être par la suite réalisé à l'aide d'une solution de leucine-p-nitroanilide (L-PNA) 10 mM dans le tampon tris : méthanol 2 :1. Cette solution doit être préparée et conservée sur la glace. Pour procéder au dosage, dans une microplaque, 100 µl de plasma vont être mis dans chaque puit et à l'aide d'une pipette à répétition 100 µL de la solution de L-PNA vont être ajoutés par la suite. Les échantillons vont être lus au spectrophotomètre à 405 nm pendant 30 min (1 lecture/min).

Afin de calculer la concentration d'aminopeptidase dans chaque puit avec la courbe standard (concentration (mU/puit) en fonction de l'absorbance). Il faut diviser la concentration obtenue par le volume de l'échantillon ajouter au puit (soit 125 µl pour le plasma).

$$\frac{\text{Concentration (mU / puit)}}{\text{Volume (}\mu\text{l)}} \times 1000 = \text{Concentration de l'échantillon (mU / ml)}$$

6. Résultats et discussion 2010

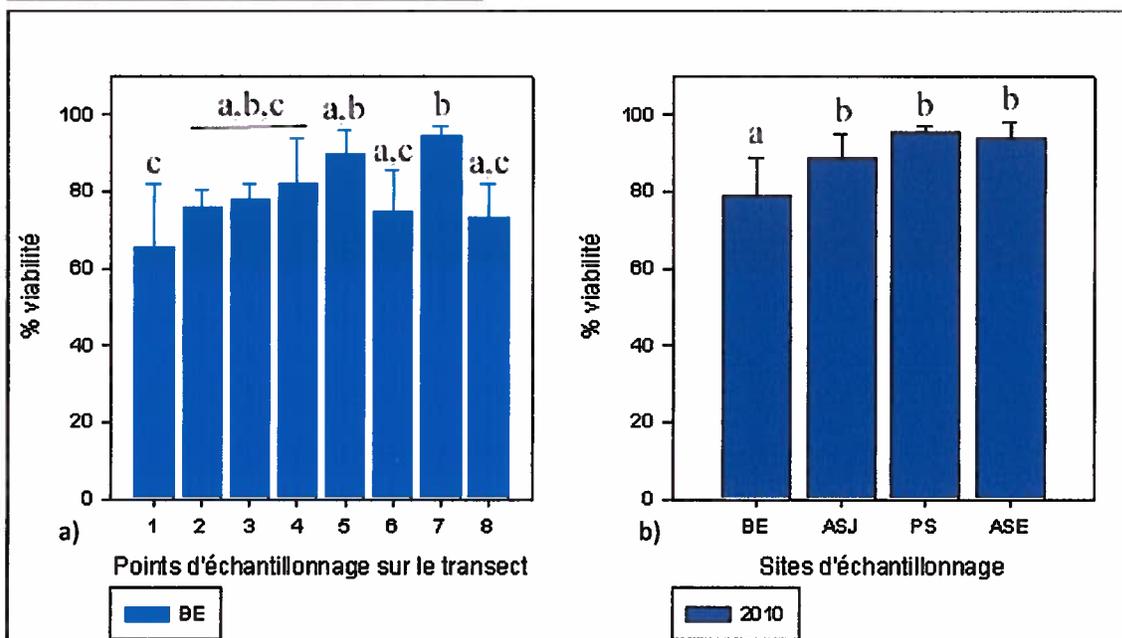


Figure 152 : Viabilité des hémocytes de myes pris à différents points des plages selon un transect, groupement des données. Pour le graphique a) n= 4 par point. Pour le graphique b) n= 32 par site.

Les résultats de viabilité des myes pour les sites d'ASJ, ASE et PS n'ont pas montrés de différences significatives selon les points du transect, seuls les résultats de BE vont être présentés. Pour BE certains points étaient différents les uns des autres. Aucune tendance concrète n'est observée, il est supposé que les sites les plus proches de l'eau 1,2. Soit différents des sites éloignés 7,8 mais les statistiques ne sont pas formelle pour ces résultats. Ainsi il a été décidé que les résultats seraient groupés, ainsi pour chaque site les résultats des 32 myes vont être groupé (Figure 152). En groupant les données, le site de BE est significativement différent des 3 autres sites.

Malheureusement les phagocytoses n'ont pas donné des résultats concluant pour l'année 2010, et les variabilités entre les échantillons étaient trop fortes.

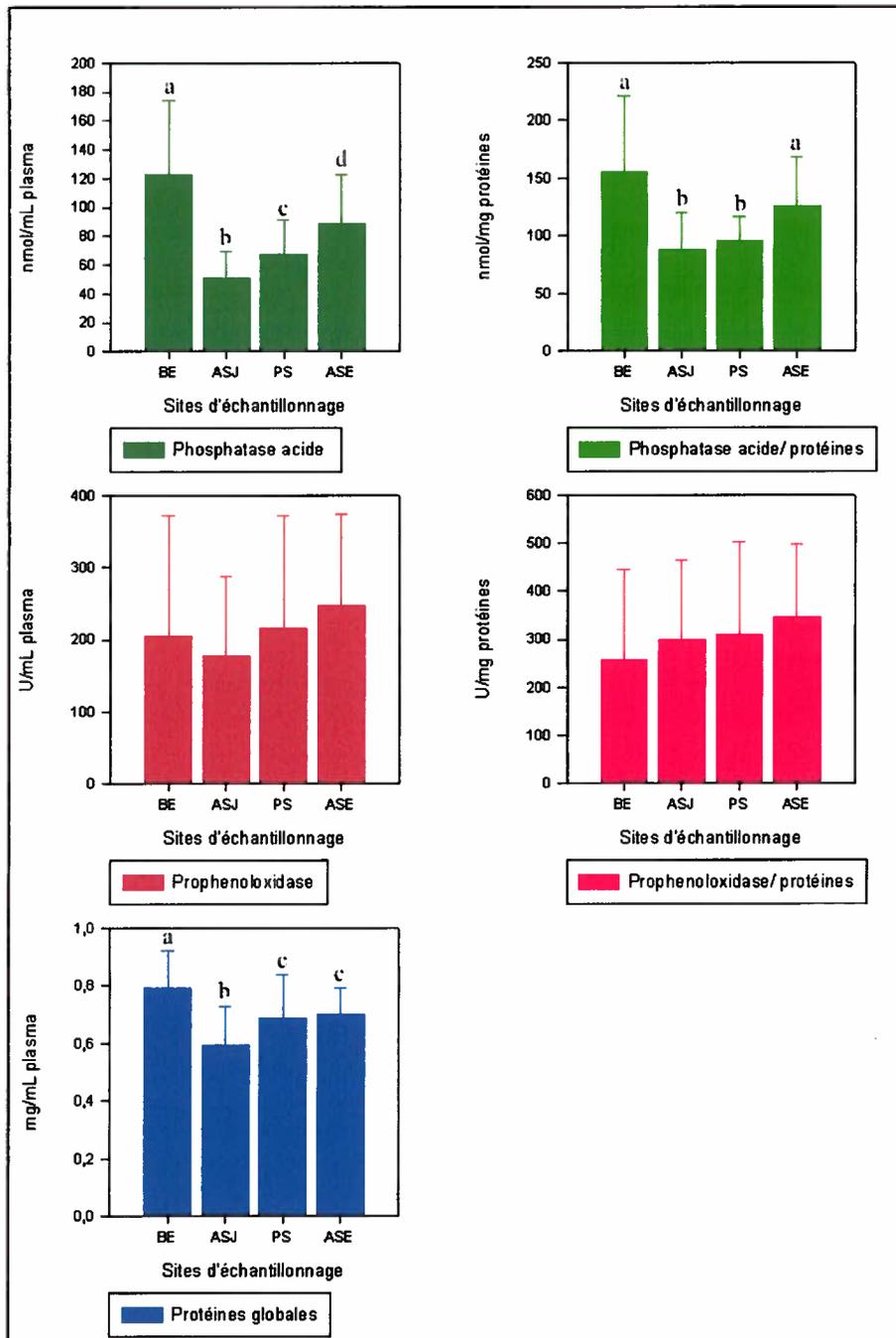


Figure 153 : Dosages des différents paramètres humoraux sur les myes de terrain lors de la campagne d'échantillonnage de 2010. n=32.

Les résultats obtenus pour la phosphatase acide et la phosphatase acide/ Protéines indiquent des différences entre les sites. Pour la phosphatase, tous les sites sont différents. Cependant lorsqu'on observe la quantité de phosphatase acide en fonction de la quantité de protéines fabriquées les sites de BE et ASE ne sont pas significativement différents, mais ils le sont de

PS et ASJ eux même non significativement différents entre eux (Figure 153). Aucune différence n'est observée pour la phosphatase ni pour la phosphatase / protéines. Concernant la quantité de protéines mesurée dans le plasma des myes des différents sites, les sites de BE est significativement différent de tous les autres comme le site de l'ASE. Seuls ASJ et PS ne sont pas significativement différents.

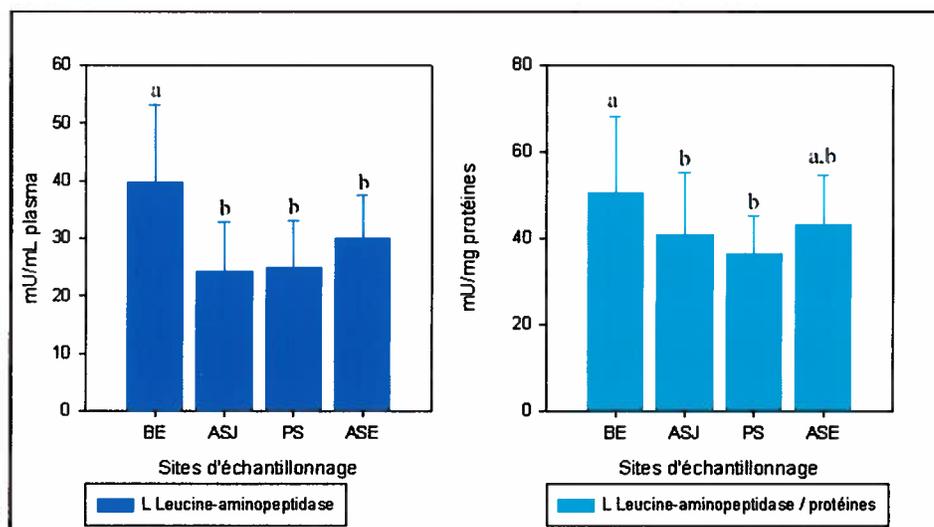


Figure 154 : dosage de L-leucine aminopeptidase dans le plasma des myes récoltées sur le terrain au Saguenay en 2010. n=32

Les résultats de mesures de la leucine aminopeptidase indiquent que le site de BE est significativement différent de tous les autres sites (Figure 154). Le rapport leucine aminopeptidase indique que le site de BE est significativement différent de l'ASJ et de PS mais non d'ASE.

Les résultats obtenus en 2010 indiquent des différences dans les réponses immunitaires des myes selon les sites d'échantillonnage. Particulièrement pour les sites de BE, il s'agit du seul site présentant des différences significatives de viabilité selon les points du transect, de plus la viabilité de ce site d'échantillonnage est significativement différent de celle des autres sites. De même la production d'enzymes, phosphatases, est plus importante pour le site de BE. Cette production est souvent liée à une perturbation du système de défense de l'organisme (Carballal, Lopez et al. 1997). Comme indiqué dans le tableau 1 du chapitre 4, le site de BE est soumis à des pollutions de type portuaire. Le site d'ASE est aussi différent d'ASJ et de PS pour la plupart des paramètres, en effet ce site est considéré comme site de référence. Ainsi les faibles concentrations en Leucine aminopeptidase et en phosphatase des sites ASJ et PS peuvent aussi être liées à une inhibition de ces productions.

Complément d'information : Il est important de mentionner que beaucoup de mesures ont été prises par Environnement Canada et que nos mesures viennent compléter leurs données.

Quelques photos prises sur le terrain durant ses trois années



Figure 155 : A gauche une mye et son siphon enfouis dans le sédiment, à droite récolte des moules bleue de l'Anse saint Etienne.

Concernant le chapitre 4, il avait été évoqué la présence de perles dans les moules bleues, ci-dessous, un exemple de perles noires, grises et blanches retrouvées dans le manteau et coquille de moules bleues durant les 3 années d'échantillonnage.





Figure 156 : Observation de perles dans les manteaux des moules bleues présentes aux sites d'échantillonnages. Souvent les perles étaient présentes dans la coquille des bivalves. Les perles sont de différentes couleurs du noir au blanc avec différentes nuances.



Annexe 3 : Tests *in vitro* et *in vivo* avec les métaux sur *Crassostrea Gigas*

Lors d'un séjour en France en mai 2008, des expériences ont été réalisées sur l'influence des contaminants métalliques sur une espèce commerciale de bivalves, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les expériences se sont déroulées en plusieurs temps selon les différents objectifs et types de recherche. Ces tests vont être présentés selon la logique du déroulement des expériences.

Présentation du modèle de recherche

L'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) est une huître creuse provenant du Pacifique du Nord-Ouest. Elle est très utilisée en France et représente la principale source de revenu de commerce aquicole en Europe. En effet, la production des huitres *Crassostrea gigas* est très forte dans le monde. Les trois principaux pays producteurs sont : le Japon (261 000 tonnes), la Corée (238 000 tonnes) et la France (115 000 tonnes) (données pour l'année 2003) (source http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/fr, site de la FAO dernière visite le 2 février 2011). En 2003, la valeur de cette production marchande était de 3,69 milliards d'USD.

Outre ses aspects commerciaux, l'huître est aussi une espèce très sensible au polluant environnant. En tant que bivalve filtreur, l'huître est soumise aux différents contaminants présents dans l'eau de mer. Ce bivalve est donc considéré comme une espèce sentinelle (au même titre que la moule bleue). C'est donc l'étude du système immunitaire de ces organismes qui permet de réaliser un suivi de ces espèces et d'évaluer la toxicité d'un composé.

Le système immunitaire de ces bivalves a été beaucoup étudié (Auffret and Oubella 1997; Goedken 2004; Duchemin, Fournier et al. 2007). Les hémocytes, comme il a été vu chez la moule bleue et la mye, sont donc des cellules pluripotentes qui permettent, parmi les nombreuses fonctions, d'assurer les défenses de l'individu. Ces cellules baignent dans un fluide circulant ouvertement dans l'organisme. Les hémocytes sont capables de reconnaître, phagocytose et élimination via des voies d'oxydation les particules du non soit (Hégaret, Wikfors et al. 2003). Il existe plusieurs sortes d'hémocytes comme Pipe et al, 1997 l'avait défini, les hémocytes sont divisés en plusieurs groupes (Pipe, Farley et al. 1997):

- des petites cellules agranulaires avec un fort ratio Noyau / Cytoplasme
- des cellules granulaires à petites granules (0.2–0.3 mm diamètre)
- des cellules granulaires à gros granules (0.5–1.5 mm diamètre)



Muscle adducteur postérieur

Figure 157 : dissection d'une huitre creuse *Crassostrea gigas*. L'hémolymphe est ponctionnée dans le gros muscle postérieur de l'animal (source : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dissection_crassostrea_gigas.jpg dernière visite du site le 2 février 2011).

I. Exposition *in vitro* d'hémocytes de *C.gigas* à différentes concentrations de Cadmium et de Cuivre

1.1 Matériel et méthode

1.1.1 Prélèvement des hémocytes :

Un millilitre d'hémocytes va être prélevé à l'aide d'une aiguille Terumo 16 Ø dans le muscle adducteur postérieur de chaque animal (30 individus). Une fois prélevé, la qualité de l'échantillon va être contrôlée au microscope optique (grossissement $\times 10$ ou $\times 40$). Chaque échantillon de bonne qualité va être filtré sur $80\mu\text{m}$ (éliminer les plus gros débris), tous les échantillons vont être mis dans un tube Falcon 50 ml gardé sur glace.

Puis une concentration cellulaire va être effectuée au Guava à l'aide du Viacount, à raison de $180\mu\text{l}$ de Viacount pour $20\mu\text{L}$ du mélange cellulaire. La concentration cellulaire va ensuite être ajustée à 1 million de cellules/ml à l'aide d'eau de mer filtrée stérile (afin d'éviter toutes contaminations supplémentaires) et d'un mélange d'antibiotiques (1% penstrep, afin de conserver les cellules durant 24h).

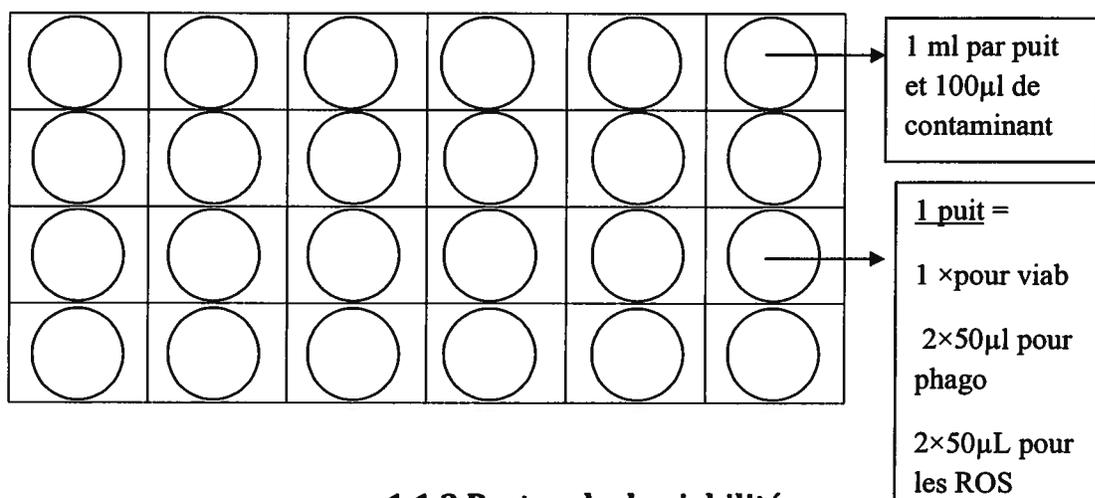
1.1.2 Incubation avec les toxiques :

Pour cette expérience, trois contaminants vont être testés, du cadmium et du cuivre selon la gamme 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M, (soit 10nM , 100nM , $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) et un le mélange cadmium cuivre dont la gamme sera : $10^{-8}\text{Cd} + 10^{-6}\text{Cu}$, $10^{-7}\text{Cd} + 10^{-6}\text{Cu}$, $10^{-6}\text{Cd} + 10^{-6}\text{Cu}$, $10^{-5}\text{Cd} + 10^{-6}\text{Cu}$, $10^{-4}\text{Cd} + 10^{-6}\text{Cu}$ M.

Un million de cellules va donc être placé dans chaque puit (pour chaque contaminant). Chaque puit comporte donc 1 ml de cellules et $100\mu\text{l}$ de contaminants (concentration au 1/11

des contaminants). Un puit correspondant au véhicule (cellules et eau de mer filtrée) sera le contrôle pour les trois types de contaminants. Les cellules et les contaminants vont par la suite, être incubés 18h en atmosphère humide à 18°C.

Après l'incubation, dans chaque puit, les cellules vont être remises en suspensions par un mouvement délicat de va et vient à l'aide d'une micropipette (ou par reprise du culot du puit à l'aide de Versen [PBS + 0.029% EDTA, 0,02% glucose in PBS, pH 7.2]). Ensuite pour chaque puit, 3 biomarqueurs vont être réalisés : la viabilité, la phagocytose et les Ros.



1.1.3 Protocole de viabilité

Afin d'analyser la viabilité des hémocytes d'huitres, dans chaque tube de polypropylène vont être ajoutés 100µl de solution anti agrégante, 50 µl d'eau de mer filtrée stérile et 50 µl d'hémolymphe. Puis 2 µl de solution stock de SYBR green (Concentration final 1/1000 de la solution commerciale) et 2µl d'IP (10 µg/ml dilué dans de l'eau) vont être ajoutés. Les tubes vont être incubés 2 h à température ambiante puis les cellules vont être lues au cytomètre en flux.

1.1.4 Protocole de phagocytose

Pour la phagocytose, 100µl de solution anti agrégante, 15µl de billes fluorescente et 50 µl d'hémolymphe vont être ajoutés dans un tube de polypropylène. Les tubes vont être vortexés délicatement. Puis les tubes vont être incubés durant 18 °C pendant 2 heures. La phagocytose va être stoppée en mettant les tubes sur la glace. La phagocytose va être analysée au cytomètre en flux en FL1.

1.1.5 Protocole de production de EOR (espèces oxygénées réactives)

Afin de mesure la production de EOR, 100 µl de solution anti agrégante vont être ajoutés à 50 µl d'hémolymphe et 1,5 µl de DCFH-DA (2'7'-dichlorofluorescein diacétate) (1mg/ml)

dans un tube de facs en polypropylène. Puis l'ensemble va être incubé durant 2 heures à 18°C. La réaction va être bloquée dans la glace. Puis les échantillons vont être analysés au cytomètre en flux en FL1. Incuber 2h à 18°C, bloquer dans la glace et analyser au cytomètre en flux.

Afin de tester la significativité des résultats, un t test d'indépendance des variables a été pratiqué à l'aide du logiciel Statistica[®].

1.2 Résultats et discussion

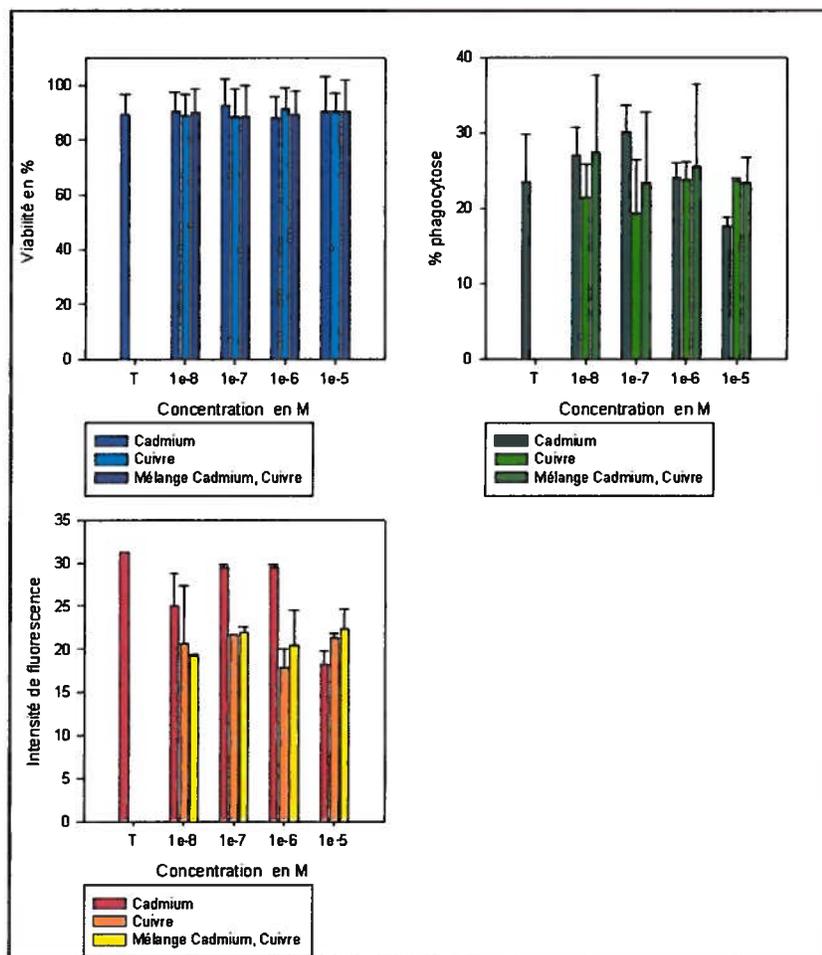


Figure 158 : Différents paramètres immunitaires mesuré chez l'huître creuse lors de l'exposition à différentes doses de contaminants métalliques.

Aucune différence de viabilité n'est observée quelque soit la concentration des métaux exposés. Les pourcentages de viabilité restent relativement élevés (max 91,53 et min 88, 29%). Même les fortes concentrations en métaux de la gamme n'ont pas d'action significative sur la viabilité des hémocytes d'huîtres.

Les intensités de phagocytose des échantillons contaminés sont plus faibles que celles du témoin (et cela pour tous les types de contaminants). Concernant le cadmium, il semble y avoir une stimulation de la phagocytose pour les concentrations 10^{-7} et 10^{-6} M puis la phagocytose diminue en intensité. Concernant le cuivre seul et le mélange des deux métaux, la phagocytose varie d'une concentration à l'autre. Cependant, l'intensité de phagocytose du cuivre et du mélange est plus faible que celle du Cadmium seul pour toutes les doses. De plus, il existe des différences significatives entre le Cu 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-5} M et l'échantillon témoin.

Le pourcentage d'EOR suit des patrons différents en fonction de types de métaux. Pour le cadmium la production d'EOR est stimulée pour des faibles concentrations (10^{-8} et 10^{-7}) puis elle diminue pour 10^{-6} et 10^{-5} M. Pour le cuivre, cette stimulation se fait à plus forte dose (10^{-6} et 10^{-5} M). Pour le mélange, les pourcentages de production d'EOR varient en fonction des doses (réponse en dent de scie). Il n'y a pas de différence significative entre les échantillons contaminés et les témoins.

La présence du cadmium, du cuivre et d'un mélange cadmium cuivre en exposition *in vitro* ne semble pas affectée la viabilité des cellules immunitaires de *C. gigas*. Les hémocytes sont donc capables de réagir à différents xénobiotiques, ce qui se retrouve très avec la phagocytose. En effet, les intensités de phagocytose sont plus faibles pour les échantillons contaminés, de plus, il semble y avoir un gradient de réponses, car l'intensité de phagocytose est plus faible pour le cuivre que pour le cadmium pour une même concentration (exemple 10^{-6} M). Le cadmium semble donc moins toxique que le cuivre pour une dose donnée. Ce décalage de réponse se retrouve aussi dans la production d'EOR. L'intensité de production des espèces oxygénées réactives est plus forte pour le cadmium et tend à diminuer dès 10^{-7} M. Pour le cuivre, l'intensité de production d'EOR augmente encore a 10^{-5} M. La diminution de production d'EOR pour le cadmium correspond avec la diminution de phagocytose, ce qui prouvent que les cellules réagissent à la dose de contaminants. Pour le cuivre cette correspondance est moins flagrante.

En conclusion, il existe une altération de la réponse immunitaire des huitres en fonction des contaminants et de la dose impliquée. Les réponses sont assez variables pour les mélanges (forts écarts types pour la production d'EOR) mais il semble exister un gradient de contamination entre le Cadmium et le cuivre : Cu > Cd.

2. Exposition *in vivo* de *Crassostrea gigas* à différentes concentrations de Cadmium et de Cuivre

2.1 Protocole expérimental

Le but de cette expérience va être d'évaluer la toxicité des métaux lourds sur des huîtres suite à une incubation aiguë (3 jours) suivie par un temps de récupération de 6 jours.

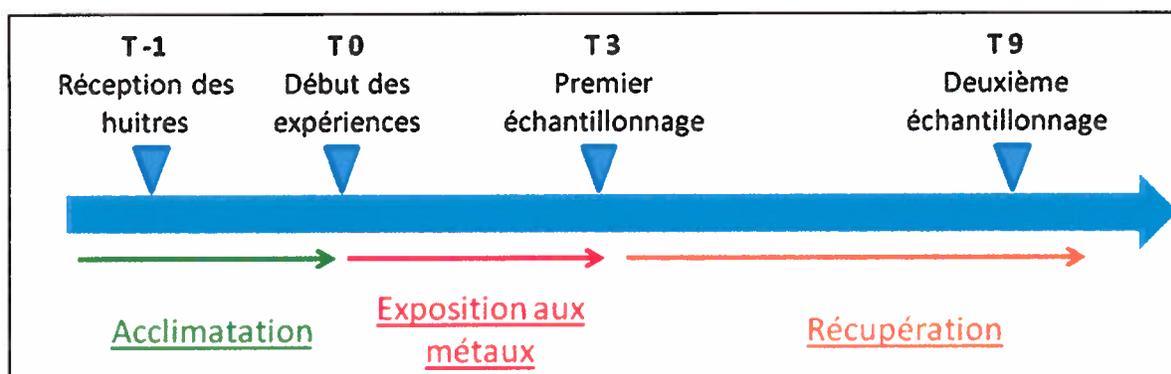


Figure 159 : Plan d'expérimentation *in vivo* avec des huîtres creuses *Crassostrea gigas* durant 9 jours. Une contamination aiguë est simulée durant 3 jours. Puis une période de récupération après 3 jours de contamination est prévue.

Nombre d'individus par bac	20 individus + 4 individus	20 individus + 4 individus
Concentration de contaminant	Cadmium 5 μ M + Cuivre 5 μ M	Cadmium 25 μ M + Cuivre 5 μ M

Tout d'abord les huîtres vont être récupérées chez La perle de Quéhan à Saint Philibert (Proche de la trinité). Les individus vont être mis en bac d'acclimatation durant 24h. Puis les huîtres vont être mises en bac de contamination à raison de 20 individus par bac (plus les pertes potentielles). Les contaminants vont être ajoutés dans les bacs, selon leurs concentrations respectives. Les huîtres vont être nourries à raison de 500 000 Cellules de T-iso /ml. 10 individus vont être testés à T0. Les deux jours suivants l'eau va être renouvelée, et les doses de phytoplancton ainsi que de contaminants vont être réajustées dans les 6 bacs de contaminations. Le troisième jour, différents biomarqueurs vont être testés sur 10 individus par bacs (les 6 bacs de contaminations et celui de contrôle T3). L'eau va aussi être renouvelée et les concentrations de phytoplancton réajustées. Durant les jours 4 à 8 inclus l'eau des bacs

va être renouvelée et le phytoplancton réajusté. Le 9^{ème} jour, après 6 jours de récupération, 10 individus par bacs (et moins pour les cas de fortes toxicités) ont été prélevés afin de mesurer les différents paramètres immunitaires.

2.2 Résultats et discussion

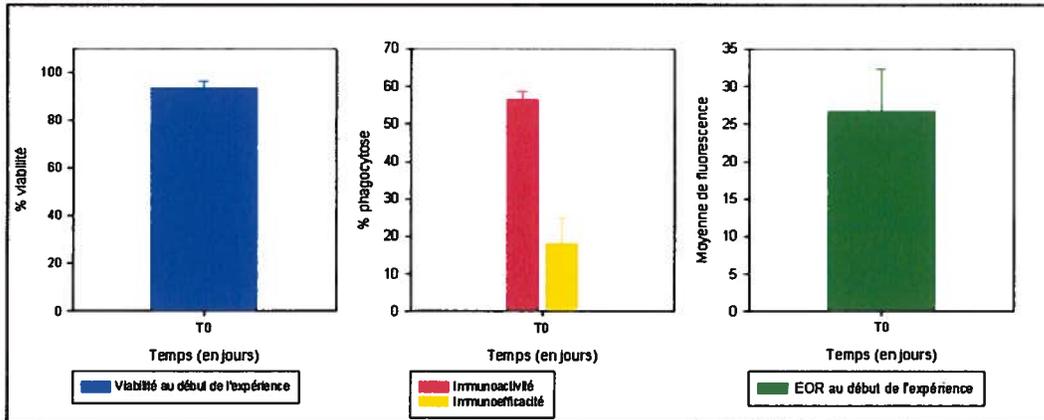


Figure 160 : Différents paramètres immunitaire mesurés sur les huitres à T0 avant l'expérience. n=10. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité des hémocytes d'huitre est très forte au début de l'expérience (93,5 % sd 3,1). L'intensité de phagocytose (immunoactivité) est forte (56,5 % sd 2,1 %), l'immunoefficacité est plus modérée 18,1 % sd 6,83. Finalement la production d'EOR est de 26,8 sd 5,6 (Figure 160).

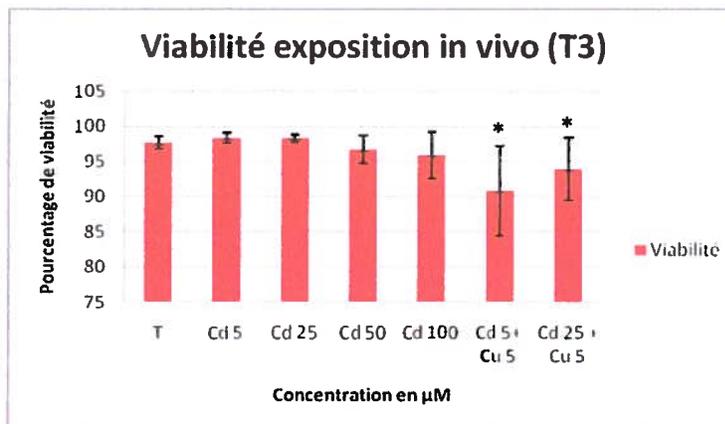


Figure 161 : Viabilité des hémocytes d'huitres après 3 jours d'incubation avec les métaux. n=10. * p < 0.05. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité pour les différentes concentrations reste relativement élevée cependant le Cd5 + Cu 5 et le Cd 25 + Cu 5 diffèrent significativement du témoin (Figure 161).

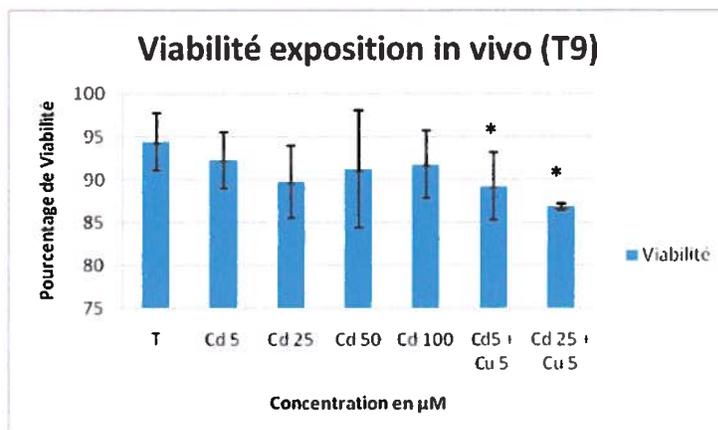


Figure 162 : Viabilité des hémocytes d'huitres après 9 jours d'incubation avec les toxiques. n=10. * $p < 0.05$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La viabilité est significativement différente pour les mélanges cadmium et cuivre. La forte variabilité pour le Cd 50 s'explique par une valeur atypique de viabilité à 78% inférieure aux autres données de l'échantillon (moyenne = 94%). La viabilité tend à diminuer avec l'augmentation de la toxicité pour le Cd seul ainsi que pour le mélange.

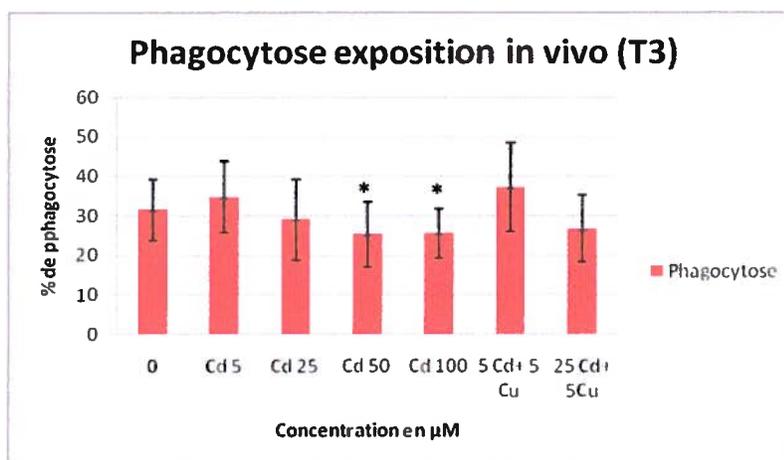


Figure 163 : Phagocytose des hémocytes d'huitres après 3 jours d'incubation avec les métaux. n=10. * $p < 0.05$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

L'intensité de la phagocytose est significativement différente pour les concentrations de 50 et 100 μM de cadmium. De plus, que ce soit pour le cadmium seul, ou pour les mélanges Cd + Cu, l'intensité de phagocytose est diminuée en fonction de l'augmentation de la concentration en polluants (Figure 163).

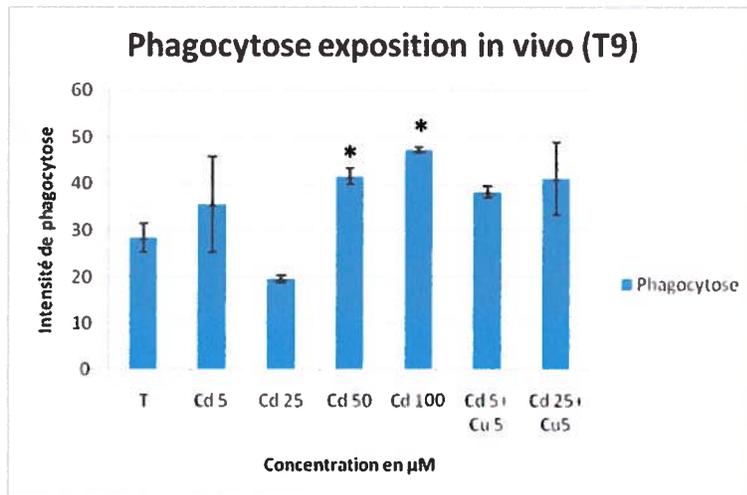


Figure 164 : Phagocytose des hémocytes d'huitres après 6 jours d'incubation avec les métaux. n=10. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

L'intensité de la phagocytose est significativement différente pour les concentrations de 50 et 100 μM de cadmium. Concernant le cadmium seul, l'intensité de phagocytose chute pour 25 μM , il est à noter que pour cette condition il n'y a que 3 individus, de même pour le mélange Cd 25 et Cu 5 seulement 2 individus ont été échantillonnés. Le faible N pourrait expliquer le patron de réponse pour la phagocytose (à T9) ainsi que le fort écart type pour le mélange.

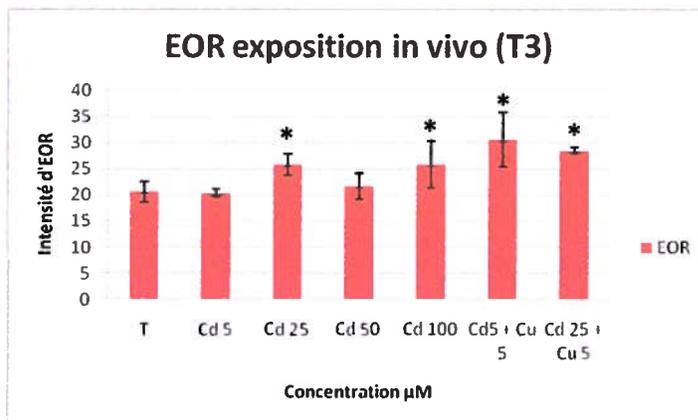


Figure 165 : Production d'EOR par les hémocytes d'huitres après exposition *in vivo* durant 3 jours. n=10. Les barres d'erreur correspondent aux écarts type.

La production de ROS augmente avec l'augmentation de concentration en métaux. De plus la production de ROS est significativement différente pour le Cd 25, Cd 100 et les deux mélanges de celle du témoin.

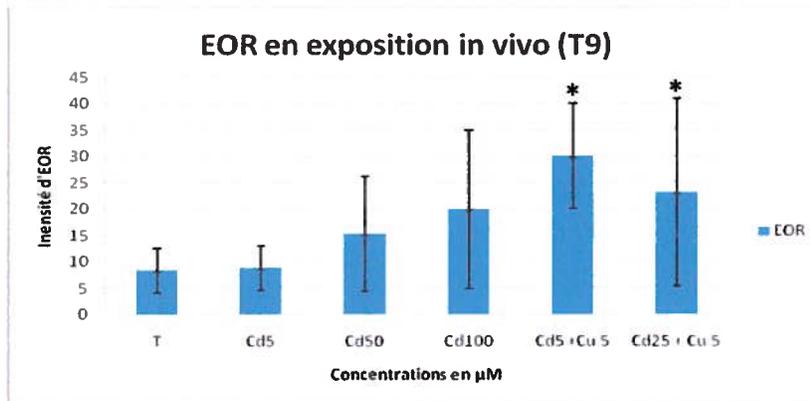


Figure 166 : Production d'EOR par les hémocytes d'huîtres après exposition *in vivo* durant 6 jours. n=10. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

La production d'EOR augmente aussi en fonction de l'augmentation de la concentration en contaminants cependant, les forts écarts types ne permettent pas de tester significativement les échantillons.

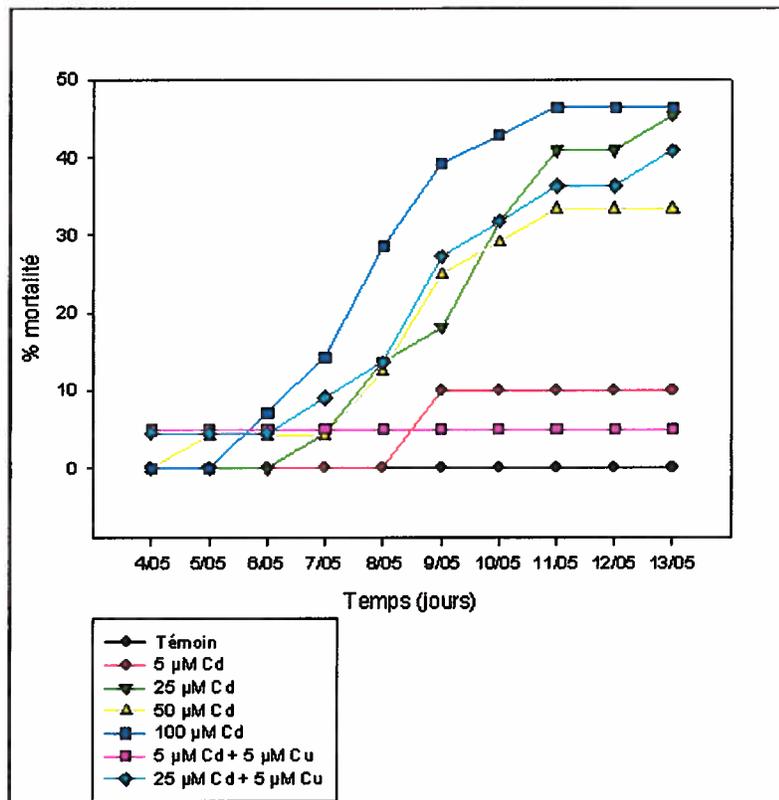


Figure 167 : Mortalité des huîtres creuses au fur et mesure de l'expérimentation.

Le pourcentage de mortalité cumulé (T3 +T9) suit globalement le même patron pour les différentes concentrations. Plus la dose de contaminants est forte, plus le pourcentage cumulé est élevé. Pour la concentration Cd 25 μ M, le patron de réponse de la courbe est différent, en effet le pourcentage de mortalité semble encore augmenter jusqu' à la fin de l'expérimentation (Figure 167). Cependant il est à noter que les écarts types sont forts et que le nombre de données pour un même échantillon est souvent faible. (Exemple 2 valeurs pour viabilité à T9 pour Cd 25 μ M + Cu5 μ M)

La viabilité est relativement élevée pour le T3 pour les différentes concentrations de contaminants ce qui prouve que les cellules immunitaires sont vivantes et aptes à défendre l'organisme. Les mélanges semblent être plus néfastes à l'organisme que l'action d'un contaminant seul. A T9 la viabilité est plus faible qu'au T3, ce qui traduit une moins bonne condition des animaux cependant, on retrouve le même patron de répartition. Pour la phagocytose, il semble y avoir une réponse spécifique des individus entre le T3 et le T9. Pour le T3 l'intensité de phagocytose diminue en fonction de l'augmentation en contaminants ce qui s'explique par les effets néfastes des contaminants sur le système immunitaire des mollusques. Concernant l'augmentation de la phagocytose pour le Cd 5 μ M à T3 il s'agit potentiellement du phénomène d'hormèse (une réponse primaire de l'organisme à un stress). D'autre part, on voit clairement que l'intensité de phagocytose est supérieure au T9 qu'au T3 ce qui nous laisse sous entendre que l'organisme a récupéré et que son efficacité de phagocytose est plus importante après 6 jours de non exposition (phase de récupération).

Pour la production d'EOR, l'augmentation de la concentration en métaux induit un stress chez les bivalves et donc induit une production plus importante d'Espèces Oxygénées Réactives. Pour la concentration de Cd 25 μ M (à T3), il semble y avoir une réponse spécifique étant donné que cette condition diffère du témoin. L'ensemble des résultats ci-dessus permettent d'affirmer que, les mollusques soumis à des métaux présentent des réponses de phagocytose et d'EOR liées à la dose de contaminants à laquelle sont exposés les animaux. A T3, La viabilité des cellules immunitaires ne semble pas trop affectée par cette contamination aiguë, ce qui permet à l'organisme de réaliser la phagocytose. D'autre part, Il existe des réponses différentes entre le T3 et le T9 pour les trois biomarqueurs. La viabilité diminue avec le temps ce qui peut s'expliquer par les conditions de maintien des animaux en aquarium (l'eau n'étant pas renouvelée permanence dans les bacs) mais aussi aux dommages postérieurs, causés par les métaux. La phagocytose présente des pourcentages plus élevés à T9, ce qui

implique une récupération de l'organisme malgré la diminution de viabilité. Les mortalités cumulées nous indiquent que plus la dose de contaminants est forte, plus le pourcentage de mortalité est élevé, il est à noter que la concentration de 25 μM semble être « critique » étant donné les réponses des différents paramètres immunitaires pour cette dose. En conclusion, nous pourrions avancer l'hypothèse que les doses subléthales pour *Crassostrea gigas* seraient < à 25 μM (et pour le mélange < Cd 25 μM + Cu 5 μM). Il est donc conseillé de mettre la dose inférieure testée dans des expériences d'exposition multiples.

Annexe 4 : Valorisation des travaux de recherche

Articles soumis et en soumission

-Comparative *in vitro* toxicology of nanoparticles (CdS/CdTe) and their metallic components on immune systems of different species. (article soumis)

A.BRUNEAU, M.FORTIER, F.GAGNE, C.GAGNON, C.TURCOTTE, A. TAYABALI, T.DAVIS, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

- Comparative toxicology of Quantum dots (CdS/CdTe) divide into fractions of various molecular weights: *in vitro* tests on different species models. (en cours de soumission)

A.BRUNEAU, M.FORTIER, F.GAGNE, C.GAGNON, C.TURCOTTE, P. SHWED, A. TAYABALI, T.DAVIES, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

Autres articles

- Comparative toxicology of Quantum dots (CdS/CdTe) divide into fractions of various molecular weights: *A temporal follow-up of biomarkers*. (en préparation ½) A.BRUNEAU, M.FORTIER, F.GAGNE, C.GAGNON, C.TURCOTTE, P. SHWED, A. TAYABALI, T.DAVIES, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

- Comparative *in vitro* toxicology of silver nanoparticles and their metallic components on immune systems of different species. (en préparation ½). A.BRUNEAU, M.FORTIER, F.GAGNE, C.GAGNON, C.TURCOTTE, A. TAYABALI, T.DAVIS, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

- *In vitro* toxicity of Quantum dots (CdS/CdTe) on different species models: comparison of immune system sensibility.(en projet) A.BRUNEAU, M.FORTIER, F.GAGNE, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

- *In vitro* evaluation of the toxicity of Quantum dots (CdS/CdTe) on two species: C57BL/6 mice and the trout *Onchorynchus mykiss*. (en projet)
A.BRUNEAU, M.FORTIER, F.GAGNE, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

- Toxicological effects of Quantum dots (CdS/CdTe) on the immune system of C57BL/6 mice. (en projet) M.FORTIER, A.BRUNEAU, F. GAGNE, M.AUFFRET, M.FOURNIER

- An *in-situ* toxicological study on the immune system of *Mytilus edulis* and *Mya arenaria* in the Saguenay Fjord. (en projet) A.BRUNEAU, E.FARCY, M.FORTIER, C.BLAISE, F. GAGNE, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

- Toxicity of Quantum dots (CdS/CdTe) on human immune system: influence of the size and the molecular weight and comparison on the particles and their metallic composition.(en projet) A.BRUNEAU, M.FORTIER, F. GAGNE, M.AUFFRET, M.FOURNIER.

Présentations orales et affiches réalisées durant la thèse

Bruneau, A., Fortier, M., Gagné, F., Blaise, C., Auffret., Fournier, M. 2011. Variations of immune parameters of the blue mussel *Mytilus edulis* in the Saguenay Fjord. Poster présenté au Congrès ISTA-15 : 15th International Symposium on Toxicity assessment. 3-8 Juillet 2011. Hong Kong.CHINE

Bruneau, A., Fortier, M., Gagné, F., Auffret., Fournier, M. 2011. In vitro evaluation of the toxicity of Quantum dots (CdS/CdTe) and silver nanoparticles on different species. Poster présenté au Congrès ISTA-15 : 15th International Symposium on Toxicity assessment. 3-8 Juillet 2011. Hong Kong.CHINE

Fortier, M., Bruneau, A., Gagné, F., Auffret., Fournier, M. 2011. In vitro evaluation of the toxicity of Quantum dots (CdS/CdTe) on different species. Oral présenté au Congrès ISTA-15 : 15th International Symposium on Toxicity assessment. 3-8 Juillet 2011. Hong Kong.CHINE

Bruneau A., Stephan, C., Auffret M., Fournier M. 2011. Chemical characterization of two nanoparticles: a main information for studies of toxicology. Affiche présentée lors du Nanotechnology and Engineered Nanomaterials Symposium 2011, 24 mars 2011. Washington. USA.

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Tayabali A., Auffret M., Fournier M. 2011. Susceptibility of the immune system of three animal models exposed to silver nanoparticles (AgNPs). Affiche présentée lors du Nanotechnology and Engineered Nanomaterials Symposium 2011, 24 mars 2011. Washington. USA.

Bruneau A., 2010. Immunotoxicité des nanoparticules de Cd/s, Cd/Te sur des espèces modèles. Oral présenté au Réseau de Santé et Sécurité du travail du Québec- axe nanotoxicologie 29 novembre 2010. Montréal. CANADA.

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2010. Evaluation in vitro de la toxicité des points quantiques (CdS/CdTe) et des nanoparticules d'Argent sur deux espèces Aquatiques. Affiche présentée lors du congrès du Chapitre Saint Laurent 28 mai 2010. Québec. CANADA.

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2010. In vitro evaluation of quantum dots toxicity (CdS/ CdTe) on different species. Affiche présentée lors du 20 ième congrès de la SETAC Europe du 23 au 28 mai 2010. Séville. ESPAGNE

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2010. Susceptibilité du système immunitaire de trois modèles animaux mis en présence de deux types de contaminants émergents : Les points quantiques et les nanoparticules d'argent. Présentation orale lors du congrès ECOBIM 2010 du 18 au 19 mai 2010. Nantes. France.

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2010. Variations des paramètres immunitaires chez *Mytilus edulis* dans le Fjord du Saguenay : 1- Suivi environnemental 2008-2009. 2- Stress induits par les nanoparticules sur des organismes déjà perturbés par leur environnement naturel. Affiche présentée lors du congrès ECOBIM 2010 du 18 au 19 mai 2010. Nantes. France.

Bruneau A., Fortier M., Dussault S., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2010. Comparaison *in vitro* de la toxicité de deux types de nanoparticules chez deux modèles d'animaux aquatiques : la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*) et la moule bleue (*Mytilus edulis*). Présentation orale au 78ième congrès de l'ACFAS du 10 au 14 mai 2010. Montréal. Québec. CANADA

Bruneau A., Auffret M., Fournier M. 2010. Le risque chimique, toxicité et écotoxicité de contaminants émergents : nanoparticules. Présentation orale à Workshop « Biotechnologies Marines et Aquaculture » pour la Mission Jeanne d'Arc au Québec (Workshop). 12 au 13 mai 2010. Québec. CANADA

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2009. Immunotoxicité des nanoparticules : comparaison multi-espèces. Présentation orale lors du congrès ECOBIM 2009 du 2-5 juin 2009. Anse Saint Jean. Québec. CANADA

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2009. Évaluation *in vitro* de la toxicité des points quantiques (cds/cdte) sur différentes espèces. Présentation orale lors du congrès Chapitre Saint Laurent du 27-29 mai 2009. Montréal. Québec. CANADA

Bruneau A., Fortier M., Gagné F., Gagnon C., Turcotte P., Davies T., Auffret M., Fournier M. 2009. Comparaison *in vitro* de la toxicité des points quantiques (CdS/CdTe) du cadmium et du tellure chez la truite arc en ciel *Onchorynchus mykiss* et la moule bleue *Mytilus edulis*. Affiche présentée lors du congrès Chapitre Saint Laurent du 27-29 mai 2009. (2^{ième} Prix d'excellence 150 \$). Montréal. Québec. CANADA

Bruneau, A., 2008. Des nanoparticules dans notre organisme ? Évaluation de la toxicité de nouveaux contaminants. Affiche présentée lors du congrès inter INRS du 24-25 avril 2008. Poster résumant un volet du doctorat réalisé en cotutelle (3^{ème} prix d'excellence 250\$). Québec. Québec. CANADA

Article 1 Confirmation de soumission reçue le 31 mai 2011.

Dear Dr. Audrey Bruneau,

I am writing to let you know that your Research Article titled "COMPARATIVE IN VITRO TOXICOLOGY OF NANOPARTICLES (CdS/CdTE) AND THEIR METALLIC COMPOSITION ON IMMUNE SYSTEM OF DIFFERENT SPECIES.," by Audrey Bruneau, Marlene Fortier, François Gagné, Christian Gagnon, Patrice Turcotte, Phil Shwed, Azam Tayabali, Thomas Davies, M. Auffret and Michel Fournier has been submitted to Journal of Toxicology by François Gagné and it has been assigned the manuscript number JT/534942.

You will be receiving a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the Manuscript Tracking System.

In order to view the status of your manuscript, we have created an account for you in the journal's Manuscript Tracking System at <http://mts.hindawi.com>, which you may access using the following login information:

Username: audrey.bruneau@iaf.inrs.ca
Password: Audrey.B3682

Please feel free to contact me with any inquiries you may have.

Best regards,

Mostafa Salem
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

COMPARATIVE *IN VITRO* TOXICOLOGY OF NANOPARTICLES (CdS/CdTe) AND THEIR METALLIC COMPONENTS ON IMMUNE SYSTEMS OF DIFFERENT SPECIES.

A. BRUNEAU^{a,d}, M. FORTIER^a, F. GAGNE^b, C. GAGNON^b, C. TURCOTTE^b,
A. TAYABALI^c, T. DAVIS^c, M. AUFFRET^d, M. FOURNIER^a.

a. INRS-Institut Armand-Frappier, 521 boulevard des prairies, Laval, Canada H7V 1B7
contact mail : audrey.bruneau@gmail.com

b. Fluvial Ecosystem Research, Environment Canada, 105 McGill Street, Montreal, Quebec, Canada H2Y 2E7

c. Environmental Health Sciences and Research Bureau, HECSB, Health Canada, Rm 201A, 50 Colombine Driveway, Ottawa, Ontario, K1A 0K9

d. Maritime European University Institut, Technopôle Brest-Iroise -Place N. Copernic 29280 Plouzané -France
Corresponding authors: Audrey Bruneau audrey.bruneau@gmail.com, tel 450 687 5010 # 8821 or 514 812 6498; Dr. Michel Fournier, email address: michel.fournier@iaf.inrs.ca, tel: 450 687 5010 # 8824

Abstract

The increasing use of products derived from nanotechnology has raised concerns about their potential toxicity. Some of nanoparticles such as (CdS/CdTe) quantum dots (QDs) are made from a metallic core and shell. However, the difference between nanoparticle toxicity compared to the metallic component is unknown. This study examines the comparative immunotoxicity of CdS/CdTe quantum dots (QDs) and their metallic components on four animal models: one bivalve (*Mytilus edulis*) one fish (*Oncorhynchus mykiss*) and two mammals (*Mus Musculus* and Human). The total levels of Cd and Te, mixed Cd+Te and QDs were examined for immunotoxicity. Results revealed that nanoparticles are less toxic than metals. Moreover, aside from Cd, Te could also induce toxicity to immune cells. For mussels, QDs were more toxic than Cd, which could be due to QDs degradation in sea water. Furthermore, mammalian cells (especially human cells) are sensitive models for use in risk assessment for QDs toxicity.

KEYWORDS: Quantum dots Cd/Te Cd/S, cadmium, tellurium, cytotoxicity, phagocytosis activity, human, mouse, fish, bivalves.

1. INTRODUCTION

The toxicity of nanoparticles (NPs) is due to their concentration, but also to their size, shape, porosity, charge and chemistry (Nel, Xia et al. 2006; Oberdörster 2007; Jiang, Oberdörster et al. 2009; Oberdörster 2010). Many of these characteristics are attributed to their composition. The quantum dots (QDs) used in this study are NPs composed of cadmium (Cd) and tellurium (Te). Dissolved Cd is a well known polluting agent, and is toxic to ground and aquatic mammals (Coles 1995; Campbell 2006; Nordberg, Fowler et al. 2008). For bivalves, such as oysters (*Crassostrea gigas*), Cd leads to production of reactive oxygen species (ROS) causing toxicity at high doses (Auffret, Mujdzic et al. 2002). In vertebrates, dissolved Cd increases secretion of metallothioneines which are protective mechanisms to acute toxicity (Eisler 1985; Jarup, Berglund et al. 1998; Klaassen, Liu et al. 2009). Cadmium also decreases glutathione levels and sulfhydryl proteins, and induces reactive oxygen species like superoxide, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide. Furthermore, dissolved Cd can induce the excretion of urinary lipid metabolites, modulate intracellular redox states, induce DNA damage and apoptosis (Stohs, Bagchi et al. 2000). However, Te is another metalloid, which is less understood for its toxicity. However, some studies report that Te toxicity is due to oxyanion tellurite (TeO_3), which has been shown to be very toxic for bacteria in concentrations as low as $1\mu\text{g} / \text{ml}$ (Taylor 1999). Moreover, a study by Chasteen and colleagues (2009) demonstrated that TeO_3 ions have an effect on thiols and glutathione production by *E. coli* (Chasteen, Fuentes et al. 2009).

Nanoparticles are known for their specific properties which are different from those of their elemental components (Maysinger 2007). The main source of QD CdTe toxicity is due to their stability, which is due to its inorganic nucleus and polyethylene glycol shell (Balbus 2006). This shell stabilizes and solubilizes the particle. This core and shell combination is a fundamental characteristic of NPs that needs to be analyzed in terms of toxicity (Sutherland 2002; Smith, Mancini et al. 2009; Oberdörster 2010). A particle which is insufficiently coated or not coated at all, is not stable and thus can cause production of ROS and organellar damage (Maysinger 2007). Also, an exposed metallic core could release free ionic Cd²⁺ and reduce cellular viability and function (Derfus 2004; Michalet 2005; Male, Lachance et al. 2008). As far as we are aware, there are no studies on the multimodal toxicity of NPs, arising from different metallic components and characteristics specific to NPs.

The purpose of this study was to examine the relative toxicity of QDs and their metallic components in representative species. Different sentinel species were selected in order to compare the toxic potency of NPs *in vitro*: two mammalian models, mouse and human, one fish species *Oncorhynchus mykiss* and one mussel species: *Mytilus edulis*. We measured changes in immune parameters of monocytes, macrophage, T lymphocytes, and hemocytes of these different species. The viability and capacity to phagocyte QDs during exposure was also tested.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 QDs solution

Green NPs of CdS/CdTe from Vive Nano Company (ON, Canada; stock solution of 20 mg/ml) were used for this project. The QDs consisted of a CdS/CdTe shell/core coated with a polyacrylic acid derivative polymer containing carboxyl groups (COOH) to prevent aggregation in solution. According to the manufacturer's specifications, the mean sizes of the particles were between 1-10 nm with a 2 nm shell. The NPs were stored at 4°C and were stable for at least 6 months. Green NPs of CdS/CdTe were diluted 1/21 with sterile water and samples were kept in vials at 4 °C for no more than six months before replenishing the stock.

2.2 Characterization of QDs in sterile water

For transmission electron microscopy (TEM), NPs were deposited and air-dried onto formvar-coated copper TEM grids. The grids were observed with a TEM (Joël 1230) operating at 60 kV (figures 1 A and B).

2.3 Dose Response Effects

The maximum QDs concentration of exposure that was possible was 952.4 µg / ml. According to the supplier, the concentration of the particle was 20 mM or 2.23 mg/ml of Cd (personal communication) (table 1). A range of QD concentrations were tested (0 to 952 µg/ml). At the highest dose, the amount of Cd in the QDs was 109.5 µg/ml and the amount of Te was 18.25 µg/ml. The combined Cd+Te concentration was 127.7µg/ml. The concentrations of the NP were verified by ICP-ES for the exposure. The other components of the QDs were S (from CdS / CdTe QDs) and the polymer coating which take an important role in the total concentration.

To test the contribution of the toxicity of metals in the QDs, a range of doses were used, which were equivalent to the metal content within the QDs. According to the ICP-ES results,

the ratio of Cd to Te in the QDs was measured to be six to one. A dose range of CdCl₂, NaTeO₃ and mixed CdCl₂ / NaTeO₃ was made in these same ranges (table 1). All the dilutions were prepared in deionized sterile water.

2.4 Hemolymph preparation and exposure to QDs and its fraction

Adult mussels (*Mytilus edulis*) were obtained from the Aquarium of Quebec (Qc, Canada). The hemolymph was collected from the posterior adductor muscle using a syringe with a 23G gauge needle and was immediately transferred on ice to avoid clumping and aggregation of hemocytes (Auffret and Oubella 1997). An initial count of individual mussels hemocytes and viability was assessed by ViaCount kit (Guava des Technologies, CA, the USA) (Frouin, Pellerin et al. 2007) to check for optimal viability before initiating the exposure. The results were read with a flow cytometer (Guava PCA Cytometer) and set to exclude fragmented samples, which were easily recognizable by their small size and complexity. Hemocytes were pooled in 15 ml tubes (N=8) to reach a specific cell volume of 12 ml. Viability of each pooled hemocyte suspension was determined with flow cytometry (Guava PCA Cytometer) using a Viacount kit (Guava Technologies, CA, USA). After, 500 µl of hemolymph was plated in 5 mL polypropylene round bottom tubes (non adherent tube; Sarstedt, Qc, Canada). Cells (500 000 cells/ml) were exposed to 25 µl of QDs suspensions for 21h at 15°C. Control tubes corresponded to 500 µl of hemocyte suspension and 25 µl of sterile water (vehicle of QDs dose range).

2.5 Fish leukocyte collection and purification

Fish (N=6) obtained from a commercial hatchery (Lachute, Canada) were ethically euthanized with 0.1% of MS-222 (Sigma, On, Canada). Head kidneys were removed under sterile conditions (laminar flow hood) and homogenised with sterile stainless steel mesh (100 mm diameter) in tissue culture medium RPMI 1640 (Sigma, On, Canada) supplemented with 10 U/mL heparin (CDMV, Qc, Canada), 10mM HEPES (Sigma, On, Canada), penicillin (100 U/mL)/ streptomycin (100 µg/mL) (Sigma, On, Canada), and 10% heat-inactivated Foetal Bovine Serum (FBS) (Sigma, On, Canada), at pH 7.2. The cells were isolated by centrifugation on Lympholyte-M gradient (density =1.085; Cedarlane, On, Canada) at 600g for 20 min at room temperature. Cells were collected from the Lympholyte-M interface and washed two times in PBS (Sigma, On, Canada) and resuspended in RPMI without heparin but containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 mM HEPES for phagocytosis and viability of macrophages and RPMI_C containing 5% FBS, 5% trout serum (Sea Grow) (East Coast Bio Inc, ME, USA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 mM HEPES for proliferation and viability of lymphocytes. The ratio of live/dead cells was assessed using trypan blue dye exclusion under a microscope with a haemocytometer (in duplicate).

2.6 Mouse leukocytes collection and purification

C57BL/6 female mice were obtained from Charles River Canada Inc (Qc, Canada). Mice arrived at the animal facility at 3-4 weeks of age, weighing between 12 to 15 g, and were placed in an exposure room with an automatic 12hr light/dark cycle and fed with a standard rodent diet and tap water ad libitum. After 2 weeks of acclimation, the mice (N=6) were killed by CO₂ inhalation and the spleen was aseptically removed and placed in RPMI 1640 medium. The cell suspensions were then filtered through nylon wool into Pasteur pipettes, washed two times in RPMI, and then retrieved by centrifugation at 1200 rpm for 10 min. Cells were resuspended in supplemented RPMI 1640 (Brousseau, Payette et al. 1998). Viability of cells was determined by trypan blue dye exclusion using a light microscope before culturing the cells (in duplicate).

2.7 Human blood collection and purification

Peripheral blood samples from healthy human volunteers (N=3) were collected by venipuncture into heparinized tubes. Monocytes and lymphocytes were separated from whole blood by density gradient centrifugation using a Lympholyte-H (density=1.077) from Cedarlane (On, Canada). The recovery of viable lymphocytes and monocytes after centrifugation was $\geq 70\%$ and 72% respectively. Cells were collected from the Lympholyte-H interface and washed three times in PBS (Sigma, On, Canada) and resuspended in RPMIC containing 10% heat-inactivated AB serum (Gemini Bio-Products, CA, USA), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Sigma, On, Canada) and 10 mM HEPES (Sigma, On, Canada). The ratio of live/dead cells was assessed using a Beckman coulter (Beckman Coulter Inc, USA).

2.8 Biomarkers

2.8.1 Determination of viability

Following exposure to increasing concentrations of QDs, CdCl₂, NaTeO₃ and mixed Cd+Te, human monocytes (1×10⁶ cells/ml), fish and mouse macrophage (1×10⁶ cells/ml) and mussel haemocytes (5×10⁵ cells/ml) were evaluated assessed for viability by flow cytometry using propidium iodide (PI) (Sigma, ON, Canada) (Table 1 and Table 2). Four µl of PI (100 µg/mL) was added in each polypropylene round bottom tubes (non adherent tube; Sarstedt, QC, Canada) containing 500 µl of each cell suspension for one min before the measurement. PI fluorescence was analyzed with a flow cytometer equipped with an argon laser excitation ($\lambda = 488 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) (Facs Calibur, Becton Dickinson, CA, USA). The IP fluorescence was measured at the FL3 channel at 625 nm with 42 nm bandwidth and 5000 events were registered.

2.8.2 Phagocytosis assay

Phagocytic activity for monocytes macrophages and mussel hemocytes was measured based on the protocol of Brousseau and colleagues, (1998). Briefly, 500 µl of cell suspension was added to 5 mL polypropylene round bottom tubes. Cells were incubated with different concentrations of QDs and metals for 90 min for human cells, 60 min for mouse cells, and 3 h for fish and mussel cells (Table 1 and Table 2). Following the incubation, fluorescent latex beads (Polysciences, PA, USA) were added to the cell suspensions at a 100 : 1 (beads : cell) ratio. After an incubation period of 18h at 15°C, the cell suspensions were overlaid with 4 mL of RPMIc supplemented with either 3% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma, On, Canada) for mammalian cells or 3.5% of sea salt for marine species (*Mytilus edulis*). The cell suspension was centrifuged at 150 x g for 8 min at 4°C. This step permitted removal of free and loosely adhered beads at the cell surface. For mammalian cells, the pellet was resuspended and fixed in 0.5 mL of 0.5% formaldehyde (Sigma, On, Canada) and 0.2% sodium azide (Sigma, On, Canada) in PBS. For fish and mussel cells, pellets were fixed in

0.5% formaldehyde in 3.5% of sea salt distilled sterile water and 0.2% sodium azide (Sigma, On, Canada). Cell fluorescence was analyzed by flow cytometry with an argon laser ($\lambda = 488 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) (Facs Calibur, Becton Dickinson, CA, USA). Latex bead fluorescence was detected with the FL1 channel and a bandwidth filter of 530 nm-42 nm. Approximately 10 000 events were acquired. Phagocytosis activity was expressed as the number of cells containing one bead or more (M1). The immunoefficiency was operationally defined by the number of cells that were able to ingest three beads.

2.8.3 Lymphoblastic transformation

Effects of QDs, CdCl_2 , NaTeO_3 and mixed Cd+Te on the proliferation of T-lymphocytes with Concanavalin A (Con A) were evaluated by the standard microculture method (Brousseau, Payette et al. 1998). Both mice and human cells (5×10^5 cells / well) were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 , and for fish and mussel at 15°C without CO_2 . The cells were incubated for 66 hr (mammalian cells) and 90 hr (fish and mussels) in 96-well plates (Sarstedt, Qc, Canada) under sterile conditions. Lymphoproliferation was evaluated with various concentrations of QDs and metals suspensions (table 1 and Table 2) and using single predetermined concentrations of Con A (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for mice and human; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for fish). The cells were pulsed with 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ of tritiated thymidine (6.7 Ci mmol⁻¹) (MP Biomedical, OH, USA) during the last 18 hr of incubation. Cells were harvested with a semi-automatic cell harvester (Skatron Instruments As, Norway) and transferred on fibreglass filter (Skatron Instruments As). Incorporated radioactivity was determined using a RackBeta from LKB (Turku, Finland) scintillation counter.

2.8 Data analysis

The difference in viability and phagocytic activity were examined using factorial analysis of the variations in one way (ANOVA). When the results were significant ($p < 0.05$), a post-hoc Tukey test was used to determine the differences between the groups. When the data were not normal, an ANOVA Kruskal Wallis test in rank was used. For all the tests, the values were

considered significant for $p < 0.05$. All the statistical analyses were conducted with STATISTICA (version 7, Statsoft Inc., 1995). For the calculation of the 50 % inhibition concentration (IC 50) parameter, doses effect curves were created with Microsoft[®] Excel 2007. The IC 50 was then calculated using linear regressions ($y = a x + b$) where y was the value of 50 % of the control and x was the IC 50.

3. RESULTS

3.1 Transmission electron microscopy results

Nanoparticles were observed by TEM following a dilution of 1/21 in water because the solution stock was very concentrated and individual particles could not be resolved. Figure 1 A indicates that even this diluted preparation contained aggregates of Cd/Te NPs (figure 1 A). A closer examination at high resolution revealed that most of the NPs were tightly packed (figure 1 B), but could be resolved enough to show an average diameter of 14 ± 3 nm in agreement with the manufacturer's specification (ca. 10 nm + 2 nm polymer corona).

3.2 Viability

3.2.1 Blue Mussel

Hemocyte viability was significantly decreased with the two highest concentrations of QDs (54.8 $\mu\text{g/ml}$ and 109.5 $\mu\text{g/ml}$ of Cd contained in the QDs; 9.13 $\mu\text{g/ml}$ and 18.25 $\mu\text{g/ml}$ of Te contained in the QDs; 63.89 $\mu\text{g/ml}$ and 127.78 $\mu\text{g/ml}$ of the mixed Cd+Te ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) (figure 2). For dissolved Cd as CdCl₂, no significant difference in viability was observed compared to the control. Viability was significantly decreased at 952.4 $\mu\text{g/ml}$. Also, hemocyte viability was unchanged with Te and mixed Cd+Te, but viability was significantly decreased at 238 $\mu\text{g/ml}$ of CdCl₂ and 39.5 $\mu\text{g/ml}$ of NaTeO₃. The 50% concentration of inhibition (CI 50) for hemocyte viability is summarized in table 3 A.

3.2.2 Rainbow trout

Macrophage viability during 21 h exposure to CdTe QDs was significantly decreased at 27.4 µg/ml of Cd contained in the QDs, (4.56 µg/ml of Te and 31.94 µg/ml of the mixed Cd+Te mix ($p < 0.05$). Macrophage viability was significantly decreased at 60 µg/ml ($p < 0.05$) and very significantly decreased at 476 µg/ml). There was no change in viability with dissolved Te, but there was a significant decrease at 79 µg/ml (data not shown). Macrophage viability during exposure to mixed Cd+Te was significantly decreased at 2 µg/ml ($p < 0.05$). The CI 50 data for macrophage viabilities are summarized in table 3 A.

3.2.3 Mouse

Macrophage viability was unchanged with the exposure of QDs, but viability was significantly decreased with 7.4 µg/ml dissolved Cd, 19.84 µg/ml dissolved Te ($p < 0.05$) and 3.6 µg/ml mixed Cd+Te. The CI 50 of macrophage viability was > 952 for QDs vs 10 for dissolved Cd, 47 for dissolved Te and 5 for mixed Cd+Te (table 3 A).

3.2.4 Human

Human monocyte viability was significantly decreased at 13.7 µg/ml of Cd contained in the QDs, 0.57 µg/ml of Te and 2 µg/ml of mixed Cd+Te contained in the QDs. For dissolved Te, the monocyte viability was significantly decreased for 19.84 µg/ml (very significantly decreased at 39.7 µg/ml). For the mixed Cd+Te, a significant decrease was observed compared to the control for 3.6 µg/ml. The CI 50 of monocyte viability is summarized in table 3 A.

3.3 Phagocytosis

3.3.1 Blue mussel

Immunocapacity and immunoefficiency of hemocyte phagocytosis at 21h of exposure with Cd/Te QDs were significantly decreased for the two highest concentrations ($p < 0.001$) (figure 3). For dissolved Cd, phagocytosis was significantly decreased at 238 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) (data not shown). Phagocytosis was not altered by Te (figure 3 c and d), but for mixed Cd+Te the activity and efficiency of phagocytosis was significantly decreased at 127.78 $\mu\text{g/ml}$ (figure 3 e and f). The CI 50 of hemocyte immunoactivity was 598 for QDs versus > 952 for the dissolved Cd, > 158 for dissolved Te and 194 for mixed Cd+Te (table 3 B and C).

3.3.2 Rainbow trout

Immunoactivity and immunoefficiency of trout macrophages were not significantly stimulated for concentrations $\geq 27.4 \mu\text{g/ml}$ of Cd (4.56 $\mu\text{g/ml}$ of Te and 31.94 $\mu\text{g/ml}$ of mixed Cd+Te). A significant increase of phagocytosis activity and efficiency was observed for 4.9, 9.9 and 19.8 $\mu\text{g/ml}$ of dissolved Te. No significant difference was found for mixed Cd+Te, Mixed Cd+Te and QDs compared to control. The CI 50 of hemocytes immunoactivity and immunoefficiency is summarized in tables 3 B and C.

3.3.3 Mouse

Immunoactivity and immunoefficiency showed similar trends. Immunoactivity was significantly decreased compared to the control at 4 $\mu\text{g/ml}$ of dissolved Te, but this was not observed for Te contained in the QDs. Immunoactivity and immunoefficiency were significantly decreased at the highest concentration of mixed Cd+Te ($p < 0.05$), but again these results were not shown with mixed Cd+Te contained in the QDs. The CI 50 of hemocytes immunoactivity and immunoefficiency is summarized in table 3 B and C).

3.3.4 Human

Immunoefficiency and immunoactivity of human monocytes were significantly decreased for

109.52 µg/ml of Cd contained in QDs, 18.25 µg/ml of Te and 127.8 µg/ml of mixed Cd+Te. For dissolved Cd, immunocapacity and immunoefficiency of phagocytosis were decreased significantly at 14.88 µg/ml. For dissolved Te, no changes were observed. For dissolved Cd/Te there was a significant decrease to 70 µg/ml ($p < 0.05$). Immunoefficiency was significantly decreased at 17.5 µg/ml of mixed Cd+Te ($p < 0.05$). The CI 50 of hemocytes immunoactivity and immunoefficiency is summarized in table 3 B and C.

3.4 Lymphoblastic transformation

3.4.1 Rainbow trout

After 72h of exposure to QDs, lymphocyte viability was significantly decreased for 1.7 µg/ml of Cd contained in the NPs (0.29 µg/ml of Te and 2 µg/ml of the mixed Cd+Te). For dissolved Cd the lymphocyte viability was significantly decreased for 30 µg/ml or more. Slight variations were observed at 15 µg/ml which indicates inter-individual variation. Lymphocyte viability for Te was significantly decreased at 4.96 µg/ml. Cellular mortality was observed for concentrations greater than 5 µg/ml. Lymphocyte viability with the mixed Cd+Te was significantly decreased at 34.9 µg/ml, all lymphocytes cells were died for higher mixed Cd+Te concentrations. The CI 50 of trout lymphoblastic transformation is summarized in table 3 D.

3.4.2 Mouse

Lymphoblastic transformation, of lymphocytic T cells exposed to QDs, was significantly decreased at 4 µg/ml, 9.9 µg/ml of Te ($p < 0.05$) and very significantly decreased at 79 µg/ml of Te. Lymphoblastic transformation was significantly decreased at the highest mixed Cd/Te concentration. The CI 50 of mouse lymphoblastic transformation is summarized in table 3D.

3.4.3 Human

Lymphoblastic transformation was significantly decreased at 2.23 µg/ml of QDs (3.42 µg/ml

of Cd contained in the QDs, 0.57 µg/ml of Te and 3.99 µg/ml of mixed Cd+Te. Significant changes were also observed for dissolved Cd at 3.7 µg/ml, dissolved Te at 1.24 µg/ml, and for mixed Cd+Te at the highest exposure concentration. The CI 50 of mouse lymphoblastic transformation is summarized in table 3 D.

4. Discussion

The immune responses and toxicity to QDs and metals were not equivalent. The aquatic species responded differently than the mammalian cells. For bivalves, the viability of hemocytes of *Mytilus edulis* was more altered by the QDs than by its metallic components (CdCl₂, NaTeO₃). This had been observed previously with the fresh water mussel, *Elliptio complanata*, but in lower concentrations of 4 µg / ml (Gagné, Auclair et al. 2008a). Furthermore, phagocytosis activity (1 bead and more) and the efficiency (3 beads or more) were significantly decreased; these results confirmed previous studies of Gagne and colleagues, 2008, which demonstrated a decrease in phagocytosis at 4 µg / ml of CdTe QDs. This difference of immune response at concentrations 100 times lower than those found in our results, could be due to the particle chemistry. These results indicate that NPs are not stable in sea water. Indeed QD stability studies conducted in different media confirmed that NPs are not stable in sea water. Indeed, the phenomena of Cd corrosion and oxidation is possible (Chang and Papillon 1998), so NPs would be less bioavailable for the cells of blue mussels compared with those of *elliptio*.

The metalloid Te did not appear to be toxic for blue mussel hemocytes. Our results could be explained with the precipitation of Te. Previously, Bouroushian and colleagues, 2010 demonstrated that Te forms a complex in sea water resembling a Te salt (Bouroushian 2010) which was not available for cell assimilation. However, for other models, Te induced a significant decrease of lymphocyte viability. Furthermore, our data indicate that Te is very

toxic for human monocytes but not for the mouse macrophage. So the toxicity of the Te varies according to the mammalian model employed. Although few study on Te are available, it is recognized as a dangerous molecule (Ogra 2009), which often forms complexes in the body or in the environment. Te is not naturally present in mammals, but can be accumulated like arsenic in the red blood cells of the rat (Shiobara, Ogra et al. 2001) and induce oxidative response (Nordberg, Fowler et al. 2008; Chasteen, Fuentes et al. 2009). Elemental Te is not very well studied in terms of toxicology (Dong, Li et al. 2006; Nordberg, Fowler et al. 2008). According to our results, Te induced a significant decrease in human cell phagocytosis, and affected macrophage viability. Also, Te significantly decreased the lymphoblastic transformation and the lymphocyte viability at low concentrations. Since there is not enough literature on the Te toxicity, it is difficult to attribute causation for these observations. It is possible that the long-term effect of Te is that of an oxidative stress mechanism. Furthermore, our results are in agreement with those of Sandoval and al, (2010), who demonstrated a toxicity of Te on HeLa cells (Sandoval, Levêque et al. 2010).

For trout, the sensitivity of the immune response for QDs was greater than that of dissolved Cd for macrophages and lymphocytes. Trout are sensitive models for studying environmental pollutants (Bailey, Williams et al. 1996; Zelikoff 1998). For trout lymphocytes and macrophage, viability decreased more in relation to Cd contained in the QDs, compared to dissolve Cd. Furthermore, the IC 50 of lymphocyte viability with QD was lower than that of dissolved Cd. This result was also found for mussel hemocytes. For mammals, mouse and human cells, results were different. Dissolved Cd was much more toxic than a similar concentration of Cd contained in the QDs. Also, the IC 50 of the monocytes, macrophage and lymphocytes exposed to the dissolved Cd was lower than those found for the QDs.

These results were also observed for trout phagocytosis (immunoactivity and

immunoinefficiency), since similar stimulation trends were observed for the QDs, as well as for the metals contained in the NPs (Cd, Te and mix Cd / Te). However, the phagocytosis stimulation was greater for trout macrophages exposed to Cd and to dissolved Te. For mussels, phagocytosis was even more reduced with QDs compared with dissolved Cd and Te. Mammalian phagocytosis was much lower with Te and Cd / Te mix than QDs. The IC 50 of mouse immunoinefficiency and immunoactivity were lower with dissolved metals than with QDs.

The dissolved mixture of Cd+Te was used to simulate QD metal content. Exposure of this material showed greater toxicity in the four models compared with whole QDs. This may be explained by considering the cellular bioavailability of dissolved metals. Indeed, it is possible that complex CdCl₂ and NaTeO₃ precipitate and are released as ions in the media which are susceptible to increase the toxicity for cells. Moreover this precipitation could induce pH change which was fatal for cells. Posselt and colleagues, (2000) have demonstrate that Cd form different complexes species in aqueous solutions (Posselt and Weber 2000).

The response pattern of the QDs and the mixture of Cd / Te for mussels are different. However for trout, the response pattern of macrophage and lymphocytes exposed to the QDs and to mixed Cd / Te were similar suggesting that nanoparticle components act together on cells. However, for mammals the IC 50 results indicate that the dissolved metal mixture is always more toxic than the NPs. In the literature, it has been demonstrated that the mixture of Cd and Te is very toxic (Fthenakis, Morris et al. 1999). An *in vivo* study of Morgan and colleagues, (1995) had demonstrated that the mixture Cd / Te at 17 mg / kg tested on rats, induced a significant decrease in the number of lung alveolar macrophages and an increase the percentage of polymorphonuclear leukocytes (Morgan, Shines et al. 1995; Fthenakis, Morris et al. 1999). Our results are in agreement with the CdTe toxicological studies.

The results of our study indicate that the toxicity of the QDs for mammalian cells is lower than with dissolved Cd. A significant decrease of the viability of the lymphocyte was observed between 27.38 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 7.44 $\mu\text{g} / \text{ml}$. These results are in agreement with the study of Lovric and colleagues (2005), who have demonstrated the toxicity of the CdTe QDs on rat pheochromocytes at 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Lovrić 2005a). Also our results are in agreement with those of Hoshino and colleagues (2004). The authors observed toxicity of the CdTe QDs on mouse Lymphoma T cells at 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Hoshino, Hanaki et al. 2004). Our results are also in agreement with those of Chan (2008), who observed a decrease of blastocyte transformation of mouse embryos in the presence of CdSe NPs (Chan 2008).

The dissolved metals results indicate that mussel hemocyte viability was preserved even at high Cd concentrations. These results are in agreement with those obtained by Gagnaire and colleagues (2004). The authors did not observe significant variation in blue mussel hemocyte viability with a maximum exposure of 54.9 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (3×10^{-4} M) CdCl₂ (Gagnaire, Thomas-Guyon et al. 2004).

In contrast, mammalian macrophage and monocyte viability was significantly lower with increasing dissolved Cd concentration (IC mouse = 10.21 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and human IC = 19.29 $\mu\text{g} / \text{ml}$). These results were lower than those of Water and colleagues (1975), who observed a decrease of 50 % of rabbit alveolar macrophage viability for an exposure in 183 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of CdCl₂ (1×10^{-3} M). The sensitivity difference between mammals macrophage could be due to the species (mouse vs. rabbit) and to the source of immune cells (spleen macrophages vs lungs macrophages).

Trout macrophage viability (IC 50) was greater than that of lymphocytes (291 $\mu\text{g} / \text{ml}$ vs 9.8 $\mu\text{g} / \text{ml}$), suggesting that lymphocytes are more sensitive than macrophages during an exposure to dissolved Cd. Our CI 50 for lymphocytes was similar to those observed in the

literature (Babich, Shopsis et al. 1986). In their study, toxicity was investigated in cell lines of the Bluegill (*Lepomis macrochirus*) BF-2 and RTG-2. The authors demonstrated a drop of 50 % of neutral red retention, which is a measure of membrane integrity, with 0.08 mM (9 µg / ml) of Cd for BF-2 and 0.18 mM (20 µg /ml) of Cd for RTG-2.

Our results suggest that for bivalves, QDs were more toxic than an equivalent dose of dissolved Cd contained in the nanoparticle. For the animal cells tested here, particles were less toxic than dissolved Cd, Te and mixed Cd + Te. These results demonstrate that there is a resistance to the particle due to the presence of capping, but in sea water, the QDs toxicity capacity is elevated. Moreover, the cytotoxicity of the QDs is partially due to the Cd presence as Cd²⁺ form and also indicates that Te is toxic. According to our results, nanoparticle toxicity could be due to Cd and Te ionic forms.

Exposures to mammalian cells indicate that dissolved metals are more toxic than QDs. The Cd / Te QDs are toxic at high doses but are less toxic than an equivalent dose of dissolved Cd, Te or mixed Cd / Te. This affirmation could be due to the integrity of the nanoparticle shell. To be stabilized, the QDs must be coated (Maysinger 2007). This layer is often made of ZnS and tends to increase the particle stability and limit the fatal effects of nanoparticle degradation (Hardman 2006).

The QDs used in this project also contain some sulfur (CdS / CdTe). As we demonstrated in this study, the CdS/CdTe QDs toxicity were due to metals contained in the nanoparticle. So, it would be interesting to observe the toxicity of the other compounds contained in the capping shell of the nanoparticle, but was not tested in this project.

In summary, our results suggest that the innate immune response is less affected than the acquired immune response. These results confirm that a long exposure time could increase the

QD toxicity by degradation process. Finally, different level of acquired immune response was mounted according to the sensitivity of the cells. The mouse immune cells were more sensitive than trout cells, which in turn were more sensitive than those of mussels. So mammalian cells are sensitive to QDs and metals, suggesting that more studies should be conducted by on the toxicity of QDs on the immune system of animals.

Figure 1A and 1B: TEM of cadmium nanoparticles. The micrograph in 1A shows the stock solution diluted 1/21 in sterile distilled water and dried on formvar grids. The micrograph in 1B shows a 37.8-fold magnification of the blue area in 1A.

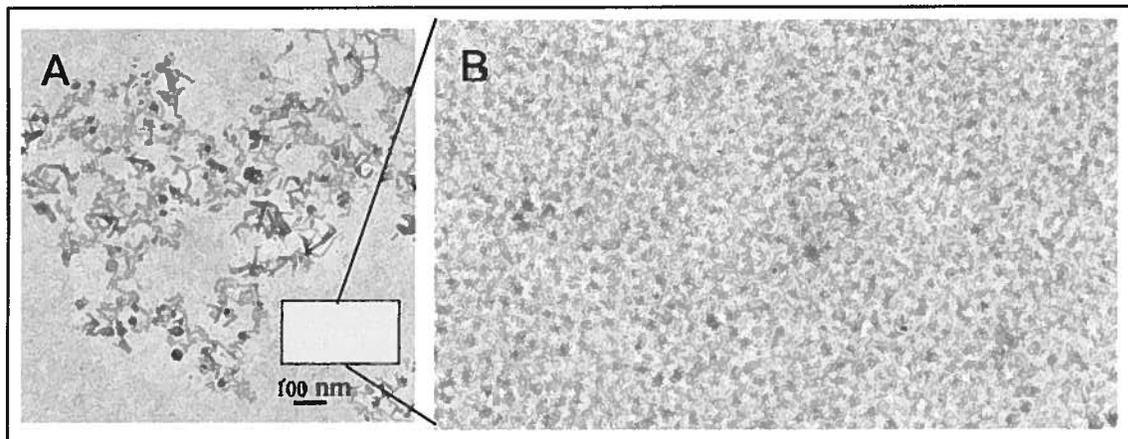


Table 1: Concentrations of QDs used on the experiments. The concentrations of each metal were calculated using ICP-ES which indicates a Cd/Te ratio of 6. QDs were shown to be stable in the water, so all dilutions were prepared in sterile water.

Dilution	Concentration in CdS/CdTe QDs in mM	Concentration of Cd contained in QDs ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration of QDs <i>in vitro</i> tested ($\mu\text{g/ml}$)
Stock Solution	20	2230	952.4
1/2	10	1115	476.2
1/4	5	557.5	238.1
1/8	2.5	278.75	119.05
1/16	1.25	139.38	59.52
1/32	0.63	69.69	29.76
1/64	0.31	34.84	14.88
1/128	0.16	17.42	7.44
1/256	0.078	8.71	3.72

Table 2: Immune cells exposed to various doses of dissolved metals : CdCl₂, NaTeO₃, CdCl₂ and NaTeO₃ mix. The concentrations are indicated in µg / ml. All dilutions were prepared in sterile water.

Dilution	CdCl ₂ (µg/ml)	NaTeO ₃ (µg/ml)	Mixed Cd+Te (µg/ml)
Stock Solution	109.5	18.25	127.78
½	54.8	9.13	63.89
¼	27.4	4.56	31.94
1/8	13.7	2.28	15.97
1/16	6.8	1.14	8
1/32	3.4	0.57	4
1/64	1.7	0.29	2
1/128	0.9	0.14	1
1/256	0.4	0.07	0.5
Control	0	0	0

Figure 2: Viability of mussel hemocytes exposed to QDs and their metallic components (Cd , Te and Cd/Te mix). Cells were exposed for 21h at 15°C. N= 9 for QDs, Cd et Cd/Te and N=16 for Te. * p<0.05, ** p< 0.001. The error bars correspond to the standard deviations.

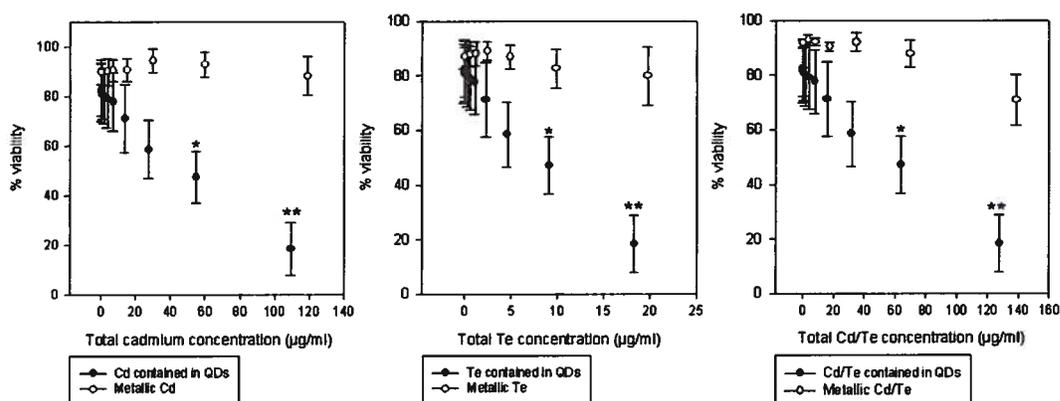


Figure 3: Immunoactivity and immunoefficiency of mussel hemocytes exposed for 21h to QDs and their metallic components. A and B: QDs (N=9) vs dissolved Cd (N=6); C and D: QDs (N=9) vs dissolved Te (N=6); E and F: QDs (N=9) vs dissolved Cd/Te (N=6). * p < 0.05, ** p < 0.001, * p < 0.0001. The error bars correspond to the standard deviations.**

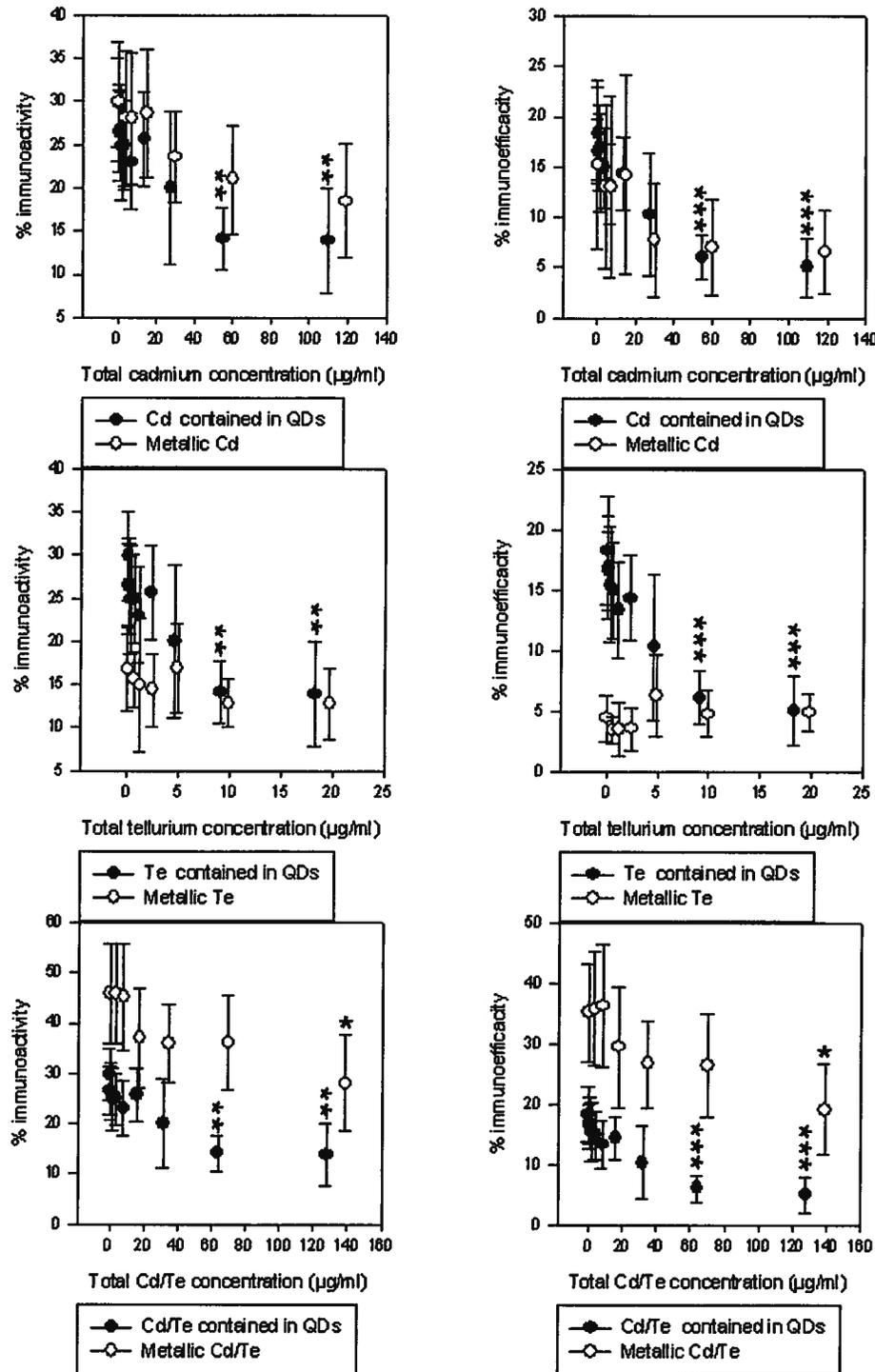


Table 3: Concentration at 50% inhibition (CI 50) for different immune parameters. Immune cells (macrophages, monocytes and hemocytes) were tested for (A) viability (B) immunocapacity (phagocytosis of one bead or more) (C) immunoefficiency (phagocytosis of three beads or more), and (D) lymphoblastic transformation.

A)

Immune cell Viability	QDs	CdCl ₂	NaTeO ₃	Mixed
Human	216.62	19.29	18.32	31.14
Mice	> 952.4	10.21	47.46	5.30
Trout	715.39	291.39	109.83	450.12
Mussel	581.92	> 952.4	> 158.7	381.39

B)

Phagocytosis μ 1 beads	QDs	CdCl ₂	NaTeO ₃	Mixed
Human	> 952.4	17.92	30.45	15.15
Mice	> 952.4	468.01	> 158.7	300.1
Trout	> 952.4	> 952.4	> 158.7	> 1110
Mussel	598.51	> 952.4	> 158.7	194.81

C)

Phagocytosis μ3 beads	QDs	CdCl ₂	NaTeO ₃	Mixed
Human	424.65	9.10	22.53	11.36
Mice	> 952.4	442.17	> 158.7	167.39
Trout	> 952.4	> 952.4	> 158.7	> 1110
Mussel	435.22	42.95	> 158.7	166.57

D)

Lymphoblastic Transformation	QDs	CdCl ₂	NaTeO ₃	Mixed
Human	28.70	3.29	5.29	28.70
Mouse	4.38	2.86	0.78	< M1
Trout	20.04	9.81	1.44	3.03

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the saint Lawrence Center team for their help. This work was supported by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr M. Fournier) and Health Canada Chemical Management Plan initiatives for the aquatic system and QD characterization.

References

1. Nel, A., et al., *Toxic Potential of Materials at the Nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-627.
2. Oberdörster, G., *Biokinetics and Effects of Nanoparticles*. NATO Security through Science Series, 2007: p. 15-51.
3. Jiang, J., G. Oberdörster, and P. Biswas, *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies*. Journal of Nanoparticle Research, 2009. **11**(1): p. 77-89.
4. Oberdörster, G., *Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology*. Journal of Internal Medicine, 2010. **267**(1): p. 89-105.
5. Coles, J.A., Sophia R. Farley, Richard K. Pipe, *Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium*. Diseases of Aquatic Organisms 1995. **22**: p. 59-65.
6. Campbell, P.G.C., *Cadmium—A Priority Pollutant*. Environ. Chem., 2006. **3**: p. 387–388.
7. Nordberg, G.F., et al., *Handbook on the toxicology of metals, third edition*. Academic Press, 2008: p. pp 975.
8. Auffret, M., et al., *Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis**. Marine Environmental Research, 2002. **54**(3-5): p. 585-589.
9. Eisler, R., *Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review* Contaminant Hazard Reviews 1985. **2**: p. 30.
10. Jarup, L., et al., *Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate*. Scand J Work Environ Health, 1998. **24** Suppl 1: p. 1-51.
11. Klaassen, C.D., J. Liu, and B.A. Diwan, *Metallothionein protection of cadmium toxicity*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009. **238**(3): p. 215-220.
12. Stohs, S.J., et al., *Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions*. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 2000. **19**(3): p. 201-213.
13. Taylor, D.E., *Bacterial tellurite resistance*. Trends in Microbiology, 1999. **7**: p. 111–115.
14. Chasteen, T.G., et al., *Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(4): p. 820-32.
15. Maysinger, D., *Nanoparticles and cells: good companions and doomed partnerships*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2007. **5**: p. 2335–2342.

16. Balbus , J.M., Karen Florini, Richard A. Denison and Scott A. Walsh, *Protecting workers and the environment: An environmental NGO's perspective on nanotechnology*. *Nanotechnology and Occupational Health*, 2006. Part 2: p. 11-22.
17. Sutherland, A.J., *Quantum dots as luminescent probes in biological systems*. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002. 6(4): p. 365-370.
18. Smith, A.M., M.C. Mancini, and S. Nie, *Bioimaging: Second window for in vivo imaging*. *Nat Nano*, 2009. 4(11): p. 710-711.
19. Derfus, A.M., Warren C. W. Chan, and Sangeeta N. Bhatia, *Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots*. *Nano Letters*, 2004. 4(1): p. 11-18.
20. Michalet, X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging and Diagnostics*. *Science*, 2005. 307: p. 538-544.
21. Male, K.B., et al., *Assessment of Cytotoxicity of Quantum Dots and Gold Nanoparticles Using Cell-Based Impedance Spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, 2008. 80(14): p. 5487-5493.
22. Auffret, M. and R. Oubella, *Hemocyte aggregation in the oyster Crassostrea gigas: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1997. 118(3): p. 705-712.
23. Frouin, H., et al., *Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam Mya arenaria*. *Aquatic Toxicology*, 2007. 82(2): p. 120-134.
24. Brousseau, P., et al., *Manual of Immunological Methods*. Boston USA, 1998.
25. Gagné, F., et al., *Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity*. *Aquatic Toxicology*, 2008a. 86(3): p. 333-340.
26. Chang, R. and L. Papillon, *Chimie fondamentale 2ième édition. Vol 2*. Chenelière/ Mc Graw Hill 1998: p. pp 339.
27. Bouroushian, M., *Electrochemistry of Metal Chalcogenides*. *Monographs in Electrochemistry*, 2010: p. 57-75.
28. Ogra, Y., *Toxicometallomics for research on the toxicology of exotic metalloids based on speciation studies*. *Anal Sci*, 2009. 25(10): p. 1189-95.
29. Shiobara, Y., Y. Ogra, and K.T. Suzuki, *Animal Species Difference in the Uptake of Dimethylarsinous Acid (DMAIII) by Red Blood Cells*. *Chemical Research in Toxicology*, 2001. 14(10): p. 1446-1452.
30. Dong, Z., et al., *Telluroxides Exhibit Hydrolysis Capacity*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006. 72(2): p. 606-609.
31. Sandoval, J., et al., *Tellurite-induced oxidative stress leads to cell death of murine hepatocarcinoma cells*. *Biomaterials*, 2010. 23(4): p. 623-632.

32. Bailey, G.S., D.E. Williams, and J.D. Hendricks, *Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout*. Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 1**: p. 5-21.
33. Zelikoff, J.T., *Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals?* Toxicology, 1998. **129(1)**: p. 63-71.
34. Posselt, H.S. and W.J.J. Weber, *Environmental chemistry of cadmium in aqueous system*. 2000, The University of Michigan - Departement of civil engineering. p. pp 189.
35. Fthenakis, V.M., et al., *Toxicity of cadmium telluride, copper indium diselenide, and copper gallium diselenide*. Progress in Photovoltaics: Research and Applications, 1999. **7(6)**: p. 489-497.
36. Morgan, D.L., et al., *Acute Pulmonary Toxicity of Copper Gallium Diselenide, Copper Indium Diselenide, and Cadmium Telluride Intratracheally Instilled into Rats*. Environmental Research, 1995. **71(1)**: p. 16-24.
37. Lovrić, J., Hassan S. Bazzi, Yan Cuie, Genevieve R. A. Fortin, Françoise M. Winnik, Dusica Maysinger, *Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots*. J Mol Med, 2005a. **83**: p. 377–385.
38. Hoshino, A., et al., *Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **314(1)**: p. 46-53.
39. Chan, W., Shiao, N., *Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **28(2)**: p. 259-266.
40. Gagnaire, B., H. Thomas-Guyon, and T. Renault, *In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg), haemocytes*. Fish Shellfish Immunol, 2004. **16(4)**: p. 501-12.
41. Babich, H., C. Shopsis, and E. Borenfreund, *In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1986. **11(1)**: p. 91-99.
42. Hardman, R., *A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors*. Environmental Health Perspectives, 2006. **114(2)**: p. 165-172.

RÉFÉRENCES

- Aaron, J. S., A. C. Greene, et al. (2011a). "Advanced Optical Imaging Reveals the Dependence of Particle Geometry on Interactions Between CdSe Quantum Dots and Immune Cells." Small 7(3): 334-341.
- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2006). Basic Immunology : Functions and Disorders of the Immune System, Ed Sanders.
- Afonso, A., S. Lousada, et al. (1998). "Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study." Diseases of Aquatic Organisms 34(1): 27-37.
- Ahamed, M., M. Karns, et al. (2008). "DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells." Toxicology and Applied Pharmacology 233(3): 404-410.
- Ahamed, M., R. Posgai, et al. (2009). "Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*." Toxicology and Applied Pharmacology In Press, Uncorrected Proof.
- Aitken, R., KS Creely, CL Tran (2004). "Nanoparticles: An occupational hygiene review." Health & Safety Executive, Research Report 274: 102.
- Akaishi, F. M., S. D. St-Jean, et al. (2007). "Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater." Aquatic Toxicology 82(1): 1-14.
- Åkerman, M. E., Warren C. W. Chan Pirjo Laakkonen, Sangeeta N. Bhatia, and Erkki Ruoslahti (2002). "Nanocrystal targeting in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences 99(20).
- Al Faraj, A., K. Cieslar, et al. (2009). "In Vivo Imaging of Carbon Nanotube Biodistribution Using Magnetic Resonance Imaging." Nano Letters 9(3): 1023-1027.
- Alivisatos, P. (2004). "The use of nanocrystals in biological detection." Nature Biotechnology 22(1): 47-52.
- Andrievski, R. A. (2003). "Review Stability of nanostructured materials." Journal of Materials Science 38(7): 1367-1375.
- Araya, M. T., A. Siah, et al. (2008). "Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*." Journal of Invertebrate Pathology 99(3): 326-331.
- Argyle, V., Robinson, B. (2006). "Are Nanoparticles Safe?" Chemistry in New Zealand: 1-15.
- Arumugam, M., Bernard Romestand, Jean Torreilles, Philippe Roch (2000). "In vitro production of superoxide and nitric oxide(as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis." European Journal of Cell Biology 79: 513-519.
- AshaRani, P. V., M. P. Hande, et al. (2009). "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles." BMC Cell Biology 10(1): 65.
- Asharani, P. V., Y. LianWu, et al. (2008a). "Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models." Nanotechnology 19.
- ATSDR (1999). "Toxicological Profile for Cadmium." Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, Atlanta, GA: pp 439.
- Au, D. W. T. (2004). "The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review." Marine Pollution Bulletin 48(9-10): 817-834.
- Auffray, C., M. H. Sieweke, et al. (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." Annual Review of Immunology 27: 669-692.
- Auffret, M. (1989). "Comparative of the hémocytes of two oyster species : The European flat Oysters, *Ostrea edulis*, linnaeus 1750 and the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)." Journal of shellfish Research 8(2): 367-373.

- Auffret, M., N. Mujdzic, et al. (2002). "Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*." Marine Environmental Research 54(3-5): 585-589.
- Auffret, M. and R. Oubella (1997). "Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 118(3): 705-712.
- Babich, H., C. Shopsis, et al. (1986). "In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines." Ecotoxicology and Environmental Safety 11(1): 91-99.
- Bailey, G. S., D. E. Williams, et al. (1996). "Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout." Environmental Health Perspectives 104 Suppl 1: 5-21.
- Balbus, J. M., Karen Florini, Richard A. Denison and Scott A. Walsh (2006). "Protecting workers and the environment: An environmental NGO's perspective on nanotechnology." Nanotechnology and Occupational Health Part 2: 11-22.
- Ballou, B., B. C. Lagerholm, et al. (2004). "Noninvasive imaging of quantum dots in mice." Bioconjugate Chemistry 15(1): 79-86.
- Balogh, L., S. S. Nigavekar, et al. (2007). "Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 3(4): 281-296.
- Bar-Ilan, O., M. A. Ralph, et al. (2009). "Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos." Small 5(16): 1897-1910.
- Bartneck, M., H. A. Keul, et al. (2009). "Phagocytosis Independent Extracellular Nanoparticle Clearance by Human Immune Cells." Nano Letters 10(1): 59-63.
- Baun, A., N. B. Hartmann, et al. (2008). "Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing." Ecotoxicology 17(5): 387-395.
- Bélanger, C. (2003). Observation and modelling of renewal event in the Saguenay Fjord. Rimouski, Université du Québec à Rimouski. Thèse doctorale: 235.
- Biju, V., T. Itoh, et al. (2008). "Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications." Analytical and Bioanalytical Chemistry 391(7): 2469-2495.
- Biswas, P., Chang-Yu Wu (2005). "Nanoparticles and the Environment." Journal of the Air & Waste Management Association 55: 708-746.
- Bjerregaard, P. and M. H. Depledge (1994). "Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentrations." Marine Biology 119(3): 385-395.
- Blaise, C., F. Gagne, et al. (2002). "Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*." Environmental Toxicology 17(3): 170-186.
- Blaser, S. A., M. Scheringer, et al. (2008). "Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles." Science of The Total Environment 390(2-3): 396-409.
- Bolognesi, C., A. Buschini, et al. (2004). "Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants." Science of The Total Environment 333(1-3): 127-136.
- Bosse, L., Bernard Sainte-Marie and Judith Fournier (1996). "Les invertébrés des fonds meubles et la biogéographie du fjord du Saguenay." Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques 2132: 45.
- Bourouai Z., M. B., J. Ghedira, C. Clerandau, H. Guerbej, J. F. Narbonne and H. Boussett (2007). "Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*." Fish Physiology and Biochemistry.
- Bouroushian, M. (2010). "Electrochemistry of Metal Chalcogenides." Monographs in Electrochemistry: 57-75.

- Bowen, R. E. and M. H. Depledge (2006). "Rapid Assessment of Marine Pollution (RAMP)." Marine Pollution Bulletin 53(10-12): 631-639.
- Bradford, M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brannon-Peppas, L. and J. O. Blanchette (2004). "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy." Advanced Drug Delivery Reviews 56(11): 1649-1659.
- Braydich-Stolle, L., Saber Hussain, John J. Schlager, and Marie-Claude Hofmann (2005). "In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells." Toxicological Sciences 88(2): 412-419.
- Brigger, I., C. Dubernet, et al. (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." Advanced Drug Delivery Reviews 54(5): 631-651.
- Brochu, C., S. Moore, et al. (1995). "Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sediments and bitoa of the Saguenay Fjord and the St Lawrence Estuary." Marine Pollution Bulletin 30(8): 515-523.
- Brousseau, P., P. Payette, et al. (1998). "Manual of Immunological Methods." Boston USA.
- Brousseau, P., J. Pellerin, et al. (2000). "Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals." Toxicology 142(2): 145-156.
- Buford, M. C., R. F. Hamilton, Jr., et al. (2007). "A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles." Particle and Fibre Toxicology 4: 6.
- Burnett, K. G. (1997). "Evaluating Intracellular Signaling Pathways as Biomarkers for Environmental Contaminant Exposures." American Zoologist 37: 585-594.
- Cabassi, E. (2007). "The Immune System and Exposure to Xenobiotics in Animals." Veterinary Research Communications 31(1): 115-120.
- Calabrese, E. J. (2009). "Getting the dose-response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted." Archives of Toxicology 83(3): 227-247.
- Campbell, P. G. C. (2006). "Cadmium—A Priority Pollutant." Environmental Chemistry 3: 387-388.
- Canesi, L., C. Ciacci, et al. (2008). "Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes." Environment International 34(8): 1114-1119.
- Canesi, L., C. Ciacci, et al. (2011). "Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity." Marine Environmental Research.
- Canesi, L., C. Ciacci, et al. (2010a). "In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes." Aquatic Toxicology 96(2): 151-158.
- Canesi, L., L. C. Lorusso, et al. (2007). "Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies." Aquatic Toxicology 81(1): 36-44.
- Canesi, L. and A. Viarengo (1991). "Mussels as biological indicators of pollution." Aquaculture 94: 225-243.
- Canty, M. N., J. A. Hagger, et al. (2007). "Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*." Marine Pollution Bulletin 54(4): 396-402.
- Cao, A., J.-I. Ramos-Martinez, et al. (2007). "In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk., treatment with corticotropin or growth factors conditions catecholamine release." International Immunopharmacology 7(11): 1395-1402.
- Carballal, M. J., C. Lopez, et al. (1997). "Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*." Journal of Invertebrate Pathology 70(2): 96-105.
- Carlson, C., S. M. Hussain, et al. (2008). "Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species." The Journal of Physical Chemistry B 112(43): 13608-13619.
- Cerenius, L. and K. Söderhäll (2004). "The prophenoloxidase-activating system in invertebrates." Immunological Reviews 198(1): 116-126.

- Chae, Y. J., C. H. Pham, et al. (2009). "Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." *Aquatic Toxicology* 94(4): 320-327.
- Champion, J. A. and S. Mitragotri (2006). "Role of target geometry in phagocytosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(13): 4930-4934.
- Chan, W., Shiao, N. (2008). "Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development." *Acta Pharmacologica Sinica* 28(2): 259-266.
- Chan, W. C. and S. Nie (1998). "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection." *Science* 281(5385): 2016-2018.
- Chang, A. L. S., V. Khosravi, et al. (2006). "A case of argyria after colloidal silver ingestion." *Journal of Cutaneous Pathology* 33(12): 809-811.
- Chang, E., N. Thekkek, et al. (2006). "Evaluation of Quantum Dot Cytotoxicity Based on Intracellular Uptake." *Small* 2(12): 1412-1417.
- Chang, R. and L. Papillon (1998). "Chimie fondamentale 2ième édition. Vol 2." *Chenelière/ Mc Graw Hill* pp 339.
- Chassot, E., Gascuel, D., Colomb, A. (2005). "Impact of trophic interactions on production functions and on the ecosystem response to fishing: A simulation approach. Aquatic Living resources." *Aquatic Living ressources* 18(1): 1-13.
- Chasteen, T. G., D. E. Fuentes, et al. (2009). "Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance." *FEMS Microbiology Reviews* 33(4): 820-832.
- Chattopadhyay, P., K. , P. P. Stephen, et al. (2010). "The use of quantum dot nanocrystals in multicolor flow cytometry." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2(4): 334-348.
- Chau, C.-F., S.-H. Wu, et al. (2007). "The development of regulations for food nanotechnology." *Trends in Food Science & Technology* 18(5): 269-280.
- Chen, F. and D. Gerion (2004). "Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells." *Journal Name: NanoLetters: Journal Volume: 4; Journal Issue: 10; Medium: ED; Size: PDF-file: 23 pages; size: 22.26 Mbytes.*
- Chilmonczyk, S. and D. Monge (1987). "Le système lymphoïde de la truite arc en ciel." *Annales de Recherche Vétérinaire* 18: 294-295.
- Chithrani, B. D., A. A. Ghazani, et al. (2006). "Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells." *Nano Letters* 6(4): 662-668.
- Cho, S. J., D. Maysinger, et al. (2007). "Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells." *Langmuir* 23(4): 1974-1980.
- Choi, H. J., Jungyoun Ji, Kyung-Ho Chung, In-Young Ahn (2007). "Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145: 227-235.
- Choi, J. E., S. Kim, et al. (2010). "Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish." *Aquatic Toxicology* 100(2): 151-159.
- Ciocan, C. M. and J. M. Rotchell (2004). "Cadmium induction of metallothionein isoforms in juvenile and adult mussel (*Mytilus edulis*)." *Environmental Science & Technology* 38(4): 1073-1078.
- Clift, M. J., B. Rothen-Rutishauser, et al. (2008). "The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line." *Toxicology and Applied Pharmacology* 232(3): 418-427.
- Cohen, P. (1989). "The Structure and Regulation of Protein Phosphatases." *Annual Review of Biochemistry* 58: 453-508.
- Coles, J. A. and R. K. Pipe (1994). "Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*." *Fish & Shellfish Immunology* 4(5): 337-352.
- Coles, J. A., Sophia R. Farley, Richard K. Pipe (1995). "Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium." *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 59-65.

- Colton, H. M., J. G. Falls, et al. (2004). "Visualization and quantitation of peroxisomes using fluorescent nanocrystals: treatment of rats and monkeys with fibrates and detection in the liver." Toxicological Sciences 80(1): 183-192.
- Cooper, E. L. (2003). "Comparative immunology." Current Pharmaceutical Design 9(2): 119-131.
- Cooper, M. D. and M. N. Alder (2006). "The Evolution of Adaptive Immune Systems." Cell 124(4): 815-822.
- Côté, R. (1981). "Variations saisonnières de la production primaire dans les eaux de surface de la rivière du Saguenay." Hydrobiologia 83: 3-10.
- Côté, R., D. Bussières, et al. (2002). "Distribution spatio-temporelle du phytoplancton et du zooplancton dans le lac Saint-Jean (Québec), un réservoir hydroélectrique." Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science 15(3): 597-614.
- Cui, Z. and R. J. Mumper (2002). "Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses." International Journal of Pharmaceutics 238(1-2): 229-239.
- Dagtepe, P. and V. Chikan (2008). "Effect of Cd/Te Ratio on the Formation of CdTe Magic-Sized Quantum Dots during Aggregation" The Journal of Physical Chemistry A 112(39): 9304-9311.
- Dailianis, S. and M. Kaloyianni (2007). "Role of cAMP in Tissues of Mussel *Mytilus galloprovincialis* As a Potent Biomarker of Cadmium in Marine Environments." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52(3): 371-378.
- Damiens, G., C. Mouneyrac, et al. (2007). "Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*." Environmental Pollution 140(3): 492-499.
- Daniel, S. C. G. K., V. Tharmaraj, et al. (2010). "Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles." Applied Clay Science 48(4): 547-551.
- De Vito, P. (2006). "The sodium/hydrogen exchanger: A possible mediator of immunity." Cellular Immunology 240(2): 69-85.
- Deegan, L. A., Robert H. Garritt (1997). "Evidence for spatial variability in estuarine food webs." Marine Ecology Progress Series 147: 31-47.
- Demers, A. and H. Guderley (1993). "Acclimatization to intertidal conditions modifies the physiological response to prolonged air exposure in *Mytilus edulis*." Marine Biology 118(1): 115-122.
- Demers, N. E. and C. J. Bayne (1997). "The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout." Developmental and Comparative Immunology 21(4): 363-373.
- Derfus, A. M., Warren C. W. Chan, and Sangeeta N. Bhatia (2004). "Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots." Nano Letters 4(1): 11-18.
- Di Gioacchino, M., C. Petrarca, et al. (2008). "Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells." Science of The Total Environment 392(1): 50-58.
- Dobrovolskaia, M. A. and S. E. McNeil (2007). "Immunological properties of engineered nanomaterials." Nature Nanotechnology 2(8): 469-478.
- Domart-Coulon, I., S. Auzoux-Bordenave, et al. (2000). "Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures." Toxicology in Vitro 14(3): 245-251.
- Dong, Z., X. Li, et al. (2006). "Telluroxides Exhibit Hydrolysis Capacity." The Journal of Organic Chemistry 72(2): 606-609.
- Drainville, G. (1968). "1968. Le fjord du Saguenay : Contribution à l'Oc eanographie. ." Le Naturaliste Canadien 95: 809-855.
- Dubertret, B., Paris Skourides, David J. Norris, and A. H. B. Vincent Noireaux, Albert Libchaber (2002). "In Vivo imaging of quantum Dots encapsulated in phospholipid Micelles." Science 298: 1758-1762.
- Duchemin, M. B., M. Fournier, et al. (2007). "Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)." Aquaculture 264(1-4): 73-81.

- Duchemin, M. d. t. d. M. (2007). "Validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude des effets biologiques des contaminants chimiques en milieu mari." Aquaculture.
- Duckett, S. (1970). "Fatal encephalopathy following ingestion of tellurium." Experientia 26: 1239-1241.
- Duffin, R., L. Tran, et al. (2007). "Proinflammogenic Effects of Low-Toxicity and Metal Nanoparticles In Vivo and In Vitro: Highlighting the Role of Particle Surface Area and Surface Reactivity." Inhalation Toxicology 19(10): 849-856.
- Duffus, J. H. and H. G. J. Worth (2006). "Fundamental Toxicology." The Royal Society of Chemistry: pp 490.
- Duncan Matthew R. , George Frederick W., et al. (1982). "Cnocalanin A induced human lymphocytes mitogenic factor : activity distinct from interleukin 1 and 2." The Journal of Immunology 129(2): 56-62.
- Dyrynda, E. A., Richard K. Pipe, Gary R. Burt, Norman A. Ratcliffe (1998). "Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK." Aquatic Toxicology 42: 169–185.
- Eaton, D. L. and C. D. Klaassen (2001). " Principles of toxicology." In: Klaassen CD (ed), Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York: 11-34.
- Edwards-Jones, V. (2009). "The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare." Letters in Applied Microbiology 49(2): 147-152.
- Eisler, R. (1985). "Cadmim hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review " Contaminant Hazard Reviews 2: 30.
- Ellis, A. E. (1977). "The leucocytes of fish : A review." Journal of Fish Biology 11: 453-491.
- Ellis, A. E. (2001). "Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria." Developmental & Comparative Immunology 25(8-9): 827-839.
- Emmanouil, C., T. M. T. Sheehan, et al. (2007). "Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI)." Aquatic Toxicology 82(1): 27-35.
- Empedocles, S. A., Stephen A., Robert Neuhauser, Kentaro Shimizu, and a. M. G. Bawendi (1999). "Photoluminescence from Single Semiconductor Nanostructures." Advanced Materials 11(15).
- Eom, H.-J. and J. Choi (2010). "p38 MAPK Activation, DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Apoptosis As Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Jurkat T Cells." Environmental Science & Technology 44(21): 8337-8342.
- Espinosa, E. and P. Chillet (2010). Immunologie, Collection Parcours LMD- SVT. Ed Ellipses.
- Esteban, M. A., A. Rodriguez, et al. (2004). "Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.)." General and Comparative Endocrinology 137(1): 89-98.
- Fabrega, J., S. R. Fawcett, et al. (2009). "Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter." Environmental Science & Technology 43(19): 7285-7290.
- Fabrega, J., S. N. Luoma, et al. (2011). "Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment." Environment International 37(2): 517-531.
- Farkas, J., P. Christian, et al. (2009). "Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes." Aquatic Toxicology In Press, Corrected Proof.
- Farre, M., K. Gajda-Schrantz, et al. (2009). "Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment." Analytical and Bioanalytical Chemistry 393(1): 81-95.
- Fent, K. (2010). "Ecotoxicology of Engineered Nanoparticles." In Nanoparticles in the Water Cycle: pp 23.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-247.

- Fischer, U., K. Utke, et al. (2003). "Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Developmental & Comparative Immunology* 27: 323-337.
- Foldbjerg, R., P. Olesen, et al. (2009). "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes." *Toxicology Letters* 190(2): 156-162.
- Fournier, M., D. Cyr, et al. (2000). "Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics." *American Zoologist* 40(3): 412-420.
- Fournier, M., Lalancette, A., Ménard, L., Christin-Piché, M.S., and S. De Guise, Brousseau, P., Eds. (2004). *Biomarqueurs immunologiques appliqués à l'écotoxicologie*. Pelletier, E., Denizeau, F., Campbell, P. (Eds.), *Écotoxicologie Moléculaire*. Presses Université du Québec.
- Fournier, M., J. Pellerin, et al. (2001). "Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes." *Toxicology* 161(3): 201-211.
- Fournier, M., J. Pellerin, et al. (2002). "Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes." *Aquatic Toxicology* 59(1-2): 83-92.
- Fowler, B. A. (2009). "Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: A review." *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3): 294-300.
- Franc, N. C., J. L. Dimarcq, et al. (1996). "Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells." *Immunity* 4(5): 431-443.
- Friberg, L. (1984). "Cadmium and the kidney." *Environmental Health Perspectives* 54: 1.
- Frouin, H., J. Pellerin, et al. (2007). "Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*." *Aquatic Toxicology* 82(2): 120-134.
- Fthenakis, V. M., S. C. Morris, et al. (1999). "Toxicity of cadmium telluride, copper indium diselenide, and copper gallium diselenide." *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* 7(6): 489-497.
- Fynewever, T. L., Evelyn S. Agcaoili, John D. Jacobson, William C. Patton, Philip J. Chan (2007). "In vitro tagging of embryos with nanoparticles." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 24: 61-65.
- Gagnaire, B., H. Thomas-Guyon, et al. (2004). "In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes." *Fish Shellfish Immunol* 16(4): 501-512.
- Gagné, F., J. Auclair, et al. (2008a). "Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity." *Aquatic Toxicology* 86(3): 333-340.
- Gagné, F., C. Blaise, et al. (2008d). "Relationships between intertidal clam population and health status of the soft-shell clam *Mya arenaria* in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord (Quebec, Canada)." *Environment International* 34(1): 30-43.
- Gagné, F., C. Blaise, et al. (2009). "Impacts of pollution in feral *Mya arenaria* populations: The effects of clam bed distance from the shore." *Science of The Total Environment* 407(22): 5844-5854.
- Gagné, F., C. Blaise, et al. (2006). "Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(3): 348-361.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S. (2002). "Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord." *Marine Environmental Research* 53: 295-310.
- Gagné, F., M. Fortier, et al. (2010). "Immunocompetence and alterations in hepatic gene expression in rainbow trout exposed to CdS/CdTe quantum dots." *Journal of Environmental Monitoring* 12(8): 1556-1565.
- Gagné, F., D. Maysinger, et al. (2008e). "Cytotoxicity of aged cadmium-telluride quantum dots to rainbow trout hepatocytes." *Nanotoxicology* 2(3): 113-120.
- Gall, G. A. E. and P. A. Crandell (1992). "The rainbow trout." *Aquaculture* 100: 1-10.

- Gallego, O., Victor Puentes (2006). "What can nanotechnology do to fight cancer?" Clinical and Translational Oncology 8(11): 788-795.
- Galloway, T. S. and M. H. Depledge (2001). "Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance." Ecotoxicology 10(1): 5-23.
- Galvez, F. and C. M. Wood (1999). "Physiological effect of dietary silver sulfide exposure in rainbow trout." Environmental Toxicology and Chemistry 18(1): 84-88.
- Gamelli, R. L., T. P. Paxton, et al. (1993). "Bone marrow toxicity by silver sulfadiazine." Surgery, gynecology & obstetrics 177(2): 115.
- Gao, J., S. Youn, et al. (2009). "Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition." Environmental Science & Technology 43(9): 3322-3328.
- Gao, X., Yuanyuan Cui, Richard M Levenson, Leland W K Chung and Shuming Nie (2004). "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots." Nature Biotechnology 22(8): 969-976.
- Garcia-Alonso, J., F. R. Khan, et al. (2011). "Cellular Internalization of Silver Nanoparticles in Gut Epithelia of the Estuarine Polychaete *Nereis diversicolor*." Environmental Science & Technology.
- Gauthier-Clerc, S., J. Pellerin, et al. (2002). "Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors?" Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 131(4): 457-467.
- Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity 19(1): 71-82.
- Gestel, C. A. M. and T. C. Brummelen (1996). "Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms." Ecotoxicology 5(4): 217-225.
- Geys, J., A. Nemmar, et al. (2008). "Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge." Environmental Health Perspectives 116(12): 1607-1613.
- Gilbert, R. (2000). "Environmental assessment from the sedimentary record of high-latitude fiords." Geomorphology 32(3-4): 295-314.
- Godleski JJ and B. JD. (1972). "The origin of alveolar macrophages in mouse radiation chimeras." Journal of Experimental Medecine 136(3): 630-643.
- Goedken, M., De Guise, S. (2004). "Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. ." Fish and Shellfish Immunology 16: 539-552.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways." EMBO reports 8(9): 829-833.
- Gomez, S., C. Gamazo, et al. (2007). "Gantrez AN nanoparticles as an adjuvant for oral immunotherapy with allergens." Vaccine 25(29): 5263-5271.
- Gopee, N. V., Dean W. Roberts, Peggy Webb,Christy R. Cozart,Paul H. Siitonen,Alan R. Warbritton, William W. Yu,Vicki L. Colvin, Nigel J. Walker,and Paul C. Howard (2007). "Migration of Intradermally Injected Quantum Dots to Sentinel Organs in Mice." Toxicological Sciences 98(1): 249-257.
- Gosheger, G., J. Harges, et al. (2004). "Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects." Biomaterials 25(24): 5547-5556.
- Gossling (1992.). "The mussel *mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and culture." Developpement in aquaculture and fisheries science. Ed ELSEVIER Amsterdam - London - New York - Tokyo 1992. 25.
- Gottschalk, F. and B. Nowack (2011). "The release of engineered nanomaterials to the environment." Journal of Environmental Monitoring 13(5): 1145-1155.
- Goyer, R. A. (1995). "Nutrition and metal toxicity." The American Journal of Clinical Nutrition 61(3 Suppl): 646S-650S.
- Granucci, F. and I. Zanoni (2009). "The dendritic cell life cycle." Cell cycle 8(23): 3816-3821.

- Green, M. a. E. H. (2005). "Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking." Chemical Communications: 121–123.
- Grieve, K., P. Mulvaney, et al. (2000). "Synthesis and electronic properties of semiconductor nanoparticles/quantum dots." Current Opinion in Colloid & Interface Science 5(1-2): 168-172.
- Griffitt, R. J., K. Hyndman, et al. (2009). "Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles." Toxicological Sciences 107(2): 404–415.
- Griffitt, R. J., J. Luo, et al. (2008). "Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms." Environmental Toxicology & Chemistry 27(9): 1972-1978.
- Guillou, M., F. Quiniou, et al. (2000). "Comparison of Embryonic Development and Metal Contamination in Several Populations of the Sea Urchin &Sphaerechinus granularis& (Lamarck) Exposed to Anthropogenic Pollution." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 39(3): 337-344.
- Gupta, P., M. Bajpai, et al. (2008). "Investigation of Antibacterial Properties of Silver Nanoparticle-loaded Poly (acrylamide-co-itaconic acid)-Grafted Cotton Fabric." The Journal of Cotton Science 12(280-286).
- Gwinn, M. R. and T. Lang (2010). "Risk management of nanomaterials." Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 2(2): 130-137.
- Handy, R. D., R. Owen, et al. (2008). "The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs." Ecotoxicology 17(5): 315-325.
- Hardman, R. (2006). "A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors." Environmental Health Perspectives 114(2): 165-172.
- Hayes, W. A. (2007). Principles and Methods of Toxicology, 5th edition, CRC.
- Hégaret, H., G. H. Wikfors, et al. (2003). "Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 293(2): 249-265.
- Helland Aasgeir, H. K., Aake Thidell, Peter Arnfalk and Knut Deppert (2006). "Nanoparticulate materials and regulatory policy in Europe: An analysis of stakeholder perspectives." Journal of Nanoparticle Research 8(5): 709-719.
- Herbomel, P., B. Thisse, et al. (1999). "Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo." Development 126(17): 3735.
- Hikmet, R. A. M., D. V., Talapin, and H. Weller (2003). "Study of conduction mechanism and electroluminescence in CdSe/ZnS quantum dot composites." Journal of Applied Physics 93(6): 3509-3514.
- Hillegass, J., M., S. Arti, et al. (2010). "Assessing nanotoxicity in cells in vitro." Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 2(3): 219-231.
- Holbrook, R. D., K. E. Murphy, et al. (2008). "Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web." Nature Nanotechnology 3(6): 352-355.
- Holladay, S. D., S. Xiao, et al. (2010). "Perinatal Bisphenol A Exposure in C57B6/129svj Male Mice: Potential Altered Cytokine/Chemokine Production in Adulthood." International Journal of Environmental Research and Public Health 7(7): 2845–2852. .
- Holland, J. W., T. G. Pottinger, et al. (2002). "Recombinant interleukin-1 beta activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Journal of Endocrinology 175(261-267).
- Hollinger, M. A. (1996). "Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals." Critical Reviews in Toxicology 26(3): 255-260.
- Holmes, J. D., David J. Richardson, Shaheen Saed, Richard Evans-Gowing, David A. Russell and John R. Sodeau (1997). "Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*." Microbiology 143: 2521–2530.

- Holsapple, M. P., L. J. West, et al. (2003). "Species comparison of anatomical and functional immune system development." Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology 68(4): 321-334.
- Hong, X.-T., L.-X. Xiang, et al. (2006). "The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea." Fish & Shellfish Immunology 21(4): 357-364.
- Hood, E. (2004). "Nanotechnology : Looking AsWe Leap." Environews Focus 112(13): 740-749.
- Horn, D., and Jens Rieger (2001). "Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use." Angewandte Chemie International Edition 40: 4330-4361.
- Hoshino, A., K.-i. Hanaki, et al. (2004). "Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body." Biochemical and Biophysical Research Communications 314(1): 46-53.
- Hoshino Akiyoshi, N. M., Kouki Fujioka, Kazuo Suzuki, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto (2007). "Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity." Journal of Artificial Organs 10(3): 149-157.
- Huff, J., R. M. Lunn, et al. (2007). "Cadmium-induced cancers in animals and in humans." International Journal of Occupational and Environmental Health 13(2): 202-212.
- Hussain, S. M., K. L. Hess, et al. (2005). "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells." Toxicology in Vitro 19(7): 975-983.
- Iavicoli, I., E. J. Calabrese, et al. (2010). "Exposure to Nanoparticles and Hormesis." Dose-Response an International Journal: 1-17.
- Ispas, C., D. Andreescu, et al. (2009). "Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish." Environmental Science & Technology 43(16): 6349-6356.
- Jain, J., S. Arora, et al. (2009). "Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use." Molecular Pharmaceutics 6(5): 1388-1401.
- Janssen, H. H. and N. Scholz (1979). "Uptake and cellular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*." Marine Biology 55(2): 133-141.
- Järup, L. and A. Åkesson (2009). "Current status of cadmium as an environmental health problem." Toxicology and Applied Pharmacology 238(3): 201-208.
- Jarup, L., M. Berglund, et al. (1998). "Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate." Scand J Work Environ Health 24 Suppl 1: 1-51.
- Jiang, J., G. Oberdörster, et al. (2009). "Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies." Journal of Nanoparticle Research 11(1): 77-89.
- Jiang, W., Y. S. KimBetty, et al. (2008). "Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent." Nature Nanotechnology 3(3): 145-150.
- Jin, T., J. Lu, et al. (1998). "Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein." Neurotoxicology 19(4-5): 529-535.
- Jing, G., L. Li, et al. (2006). "Purification and partial characterization of two acid phosphatase forms from pearl oyster (*Pinctada fucata*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 143(2): 229-235.
- Jing, X. and Z. Wenbin (2006). "Comparison of antigenicity among haemocytes of seven bivalve species by monoclonal antibodies against haemocytes of scallop (*Chlamys farreri*)." Fish & Shellfish Immunology 20(4): 528-535.
- Jones, S. A., P. G. Bowler, et al. (2004). "Controlling wound bioburden with a novel silver containing Hydrofiber® dressing." Wound Repair and Regeneration 12(3): 288-294.
- Joseph, P. (2009). "Mechanisms of cadmium carcinogenesis." Toxicology and Applied Pharmacology 238(3): 272-279.
- Journey, W. S., S. S. Suri, et al. (2008). "High-aspect ratio nanoparticles in nanotoxicology." Integrated Environmental Assessment and Management 4(1): 128-129.

- Juhel, G., S. C. Culloty, R.M. O’riordan, J. O’Connor, L. DE Faoite AND and R. Mcnamara (2003). "Histological study of the gametogenic cycle of the freshwater mussel dreissena polymorpha (Pallas, 1771) in Lough Derg, Ireland " Journal of Molluscan Studies 69: 365–373.
- Kan, S., Taleb Mokari, Eli Rothenberg And Uri Banin (2003). "Synthesis and size-dependent properties of zinc-blende semiconductor quantum rods." Nature Materials 2: 155- 159.
- Karlsson, H. L., J. Gustafsson, et al. (2009). "Size-dependent toxicity of metal oxide particles--A comparison between nano- and micrometer size." Toxicology Letters 188(2): 112-118.
- Kawata, K., M. Osawa, et al. (2009). "In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells." Environmental Science & Technology 43(15): 6046-6051.
- Ke, C., Wen-Xiong Wang (2001). "Bioaccumulation of Cd, Se, and Zn in an estuarine oyster (Crassostrea rivularis) and a coastal oyster (Saccostrea glomerata)." Aquatic Toxicology 56: 33–51.
- Kehrer, S. R., C. M. Hannan, et al. (1998). "Identification of a subpopulation of leucocytes from the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) responsive to pokeweed mitogen." Fish & Shellfish Immunology 8(6): 477-487.
- Kelly, K. A., C. M. Havrilla, et al. (1998). "Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems." Environmental Health Perspectives 106(7): 375-384.
- Kennedy, C. J. and A. P. Farrell (2008). "Immunological alterations in juvenile Pacific herring, Clupea pallasii, exposed to aqueous hydrocarbons derived from crude oil." Environmental Pollution 153(3): 638-648.
- Kim, J., Y. Park, et al. (2010). "Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n-octylphosphine oxide/gum arabic in Daphnia magna under environmentally relevant UV-B light." Aquatic Toxicology 97(2): 116-124.
- Kim, J. S., E. Kuk, et al. (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles." Nanomedicine 3(1): 95-101.
- Kim, S., J. E. Choi, et al. (2009). "Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells." Toxicology in Vitro 23(6): 1076-1084.
- King-Heiden, T. C., P. N. Wicinski, et al. (2009). "Quantum Dot Nanotoxicity Assessment Using the Zebrafish Embryo." Environmental Science & Technology 43(5): 1605-1611.
- Kirchner, C., Tim Liedl, Stefan Kudera, Teresa Pellegrino, Almudena Munoz Javier, Hermann E. Gaub, Sonja Stolze, N. Fertig, and Wolfgang J. Parak (2005). "Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles." Nano Letters 5(2): 331-338.
- Kittler, S., C. Greulich, et al. "Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions." Chemistry of Materials 22(16): 4548-4554.
- Klaassen, C. D. and J. Liu (1998). "Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury." Environmental Health Perspectives 106 Suppl 1: 297-300.
- Klaassen, C. D., J. Liu, et al. (2009). "Metallothionein protection of cadmium toxicity." Toxicology and Applied Pharmacology 238(3): 215-220.
- Klaassen, C. D., J. B. Watkins, et al. (2008). Casarett and Doull's Essentials of Toxicology, Ed. Curtis D. Klaassen & John B. Watkins III.
- Klaper, R., D. Arndt, et al. (2010). "Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss." Aquatic Toxicology 100(2): 211-217.
- Koehn, R. K. (1991). "The genetics and taxonomy of species in the genus Mytilus." Aquaculture 94(2-3): 125-145.
- Koenenman, B. A., Y. Zhang, et al. (2009). "Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots." Toxicology in Vitro 23(5): 955-962.

- Köllner, B., B. Wasserrab, et al. (2002). "Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)—how can environmental influences be detected?" Toxicology Letters 131(1-2): 83-95.
- Krzystyniak, K., H. Tryphonas, et al. (1995). "Approaches to the Evaluation of Chemical-induced Immunotoxicity." Environmental Health Perspectives 103(9).
- Kuby, J., R. A. Goldsby, et al. (2001). Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision. Paris, Dunod.
- Kuby, J., R. A. Golsby, et al. (2001). "Immunologie : Le cours de Janis Kuby, Avec questions et révisions." Sciences Sup. Paris : Dunod: pp 660.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." International Reviews of Immunology 30(1): 16-34.
- Kumar, R., S. Howdle, et al. (2005). "Polyamide/silver antimicrobials: Effect of filler types on the silver ion release." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 75B(2): 311-319.
- Kumar, V. and A. Sharma (2010). "Neutrophils: Cinderella of innate immune system." International Immunopharmacology 10(11): 1325-1334.
- Laban, G., L. Nies, et al. (2009). "The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos." Ecotoxicology.
- Lafuente, A., A. Gonzalez-Carracedo, et al. (2003). "Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen." Journal of Physiology and Biochemistry 59(1): 43-48.
- Lallias, D., S. Lapègue, et al. (2007). "AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*)." International Society for Animal Genetics, Animal Genetics 340: 340-349.
- Lambert, C. (1998). Etude des infections à Vibrionaceae chez les mollusques bivalves, à partir d'un modèle de larves de *Pecten maximus*., Université de Bretagne occidentale. Thèse de doctorat: pp 190.
- Lampert, P., F. Garro, et al. (1970). "Tellurium neuropathy." Acta Neuropathology 15: 308-317.
- Larkin, P. A. (1996). "Concepts and issues in marine ecosystem management." Reviews in Fish Biology and Fisheries 6(2): 139-164.
- Lassere, M. N., K. R. Johnson, et al. (2007). "Definitions and Validation Criteria for Biomarkers and Surrogate Endpoints: Development and Testing of a Quantitative Hierarchical Levels of Evidence Schema." The Journal of Rheumatology 607-615.
- Latinwo, L. M., V. L. Badisa, et al. (2006). "Effect of cadmium-induced oxidative stress on antioxidative enzymes in mitochondria and cytoplasm of CRL-1439 rat liver cells." International Journal of Molecular Medicine 18(3): 477-481.
- Lauwerys, R., V. Haufroid, et al. (2007). "Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles." 5ième édition Masson: pp 1268.
- Lefcort, H., Z. Freedman, et al. (2008). "Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: Is a little bit of pollution good?" Ecohealth 5(1): 10-17.
- Lemaire, N., J. Pellerin, M. Fournier, L. Girault, E. Tamigneaux and E. P. S. Cartier (2006). "Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec." Aquaculture 261: 729-751.
- Levin, A. A., R. W. Kilpper, et al. (1987). "Fetal toxicity of cadmium chloride: The pharmacokinetics in the pregnant Wistar rat." Teratology 36(2): 163-170.
- Lewinski, N., V. Colvin, et al. (2008). "Cytotoxicity of Nanoparticles." Small 4(1): 26-49.
- Li, K. G., J. T. Chen, et al. (2009). "Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots." Toxicology in Vitro 23(6): 1007-1013.
- Liedberg, H. and T. Lundeborg (1989). "Assessment of silver-coated urinary catheter toxicity by cell culture." Urological Research 17(6): 359-360.
- Lin, C. H., L. W. Chang, et al. (2009a). "The chemical fate of the Cd/Se/Te-based quantum dot 705 in the biological system: toxicity implications." Nanotechnology 20(21): 215101.

- Lin, H., Jie Jiang, Chang-hu Xue, Bin Zhang and Jia-chao Xu (2003). "Seasonal changes in phospholipids of mussel (*Mytilus edulis* Linne)." Journal of the Science of Food and Agriculture 83: 133–135.
- Liu, J. and R. H. Hurt (2010). "Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids." Environmental Science & Technology 44(6): 2169-2175.
- Liu, R., F. Sun, et al. (2009). "Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin." Science of The Total Environment 407(13): 4184-4188.
- Lok, C.-N., C.-M. Ho, et al. (2007). "Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities." Journal of Biological Inorganic Chemistry 12(4): 527-534.
- Lok, C. N., C. M. Ho, et al. (2006). "Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles." Journal of Proteome Research 5(4): 916-924.
- Louis, S., F. Gagné, et al. (2010). "The characterization of the behaviour and gill toxicity of CdS/CdTe quantum dots in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology 1(1): 52-69.
- Louria, D. B., M. M. Joselow, et al. (1972). "The human toxicity of certain trace elements." Annals of Internal Medicine 76(2): 307-319.
- Lovern, S. B., J. R. Strickler, et al. (2007). "Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx)." Environmental Science & Technology 41(12): 4465-4470.
- Lovrić, J., Hassan S. Bazzi, Yan Cuie, Genevieve R. A. Fortin, Françoise M. Winnik, Dusica Maysinger (2005a). "Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots." Journal of Molecular Medicine 83: 377–385.
- Lovric, J., S. J. Cho, et al. (2005b). "Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death." Chemistry & Biology 12(11): 1227-1234.
- Lowe, D. M. (1988). "Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions." Marine Ecology Progress Series 46: 91-100.
- Lower, W. R. and R. J. Kendall (1990). "Sentinel Species and Sentinel Bioassay." Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.: p 309-331.
- Lu, F., S. H. Wu, et al. (2009). "Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles." Small 5(12): 1408-1413.
- Luna-Gonzalez, A., A. N. Maeda-Martinez, et al. (2003). "Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs." Fish Shellfish Immunol 15(4): 275-282.
- Luoma, S. N. (2008). "Silver nanotechnologies and the environment : old problems or new challenges ? ." Project on Emerging Nanotechnologies is supported by THE PEW CHARITABLE TRUSTS: pp 72.
- Lutz, R. A. (1978). "Pearl incidence in *Mytilus edulis* L. and its commercial raft cultivation implications." Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society 9(1-4): 507-522.
- Mackay, D. (1982). "Correlation of Bioconcentration Factors." Environmental Science & Technology 16: 274-278.
- Male, D., J. Brostoff, et al. (2007). "Immunologie." Campus reference: pp 600.
- Male, K. B., B. Lachance, et al. (2008). "Assessment of Cytotoxicity of Quantum Dots and Gold Nanoparticles Using Cell-Based Impedance Spectroscopy." Analytical Chemistry 80(14): 5487-5493.
- Mancini, M. C., B. A. Kairdolf, et al. (2008). "Oxidative Quenching and Degradation of Polymer-Encapsulated Quantum Dots: New Insights into the Long-Term Fate and Toxicity of Nanocrystals in Vivo." Journal of the American Chemical Society 130(33): 10836-10837.
- Manolova, V., A. Flace, et al. (2008). "Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size." European Journal of Immunology 38(5): 1404-1413.

- Markarian, J. (2002). "Antimicrobial plastics additives: trends and latest developments in North America." Plastics, Additives and Compounding 4(12): 18-21.
- Martel, L., M. J. Gagnon, et al. (1986). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Saguenay Fjord, Canada." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 37(1): 133-140.
- Maurer-Jones, M. A., Y.-S. Lin, et al. (2010). "Functional Assessment of Metal Oxide Nanoparticle Toxicity in Immune Cells." ACS Nano 4(6): 3363-3373.
- Mayer, A., M. Vadon, et al. (2009). "The role of nanoparticle size in hemocompatibility." Toxicology 258(2-3): 139-147.
- Maynard, A. D. (2007). "Nanotechnologies: Overview and Issues." NATO Security through Science Series: 1-14.
- Maynard, A. D., R. J. Aitken, et al. (2006). "Safe handling of nanotechnology." Nature 444(7117): 267-269.
- Maysinger, D. (2007). "Nanoparticles and cells: good companions and doomed partnerships." Organic & Biomolecular Chemistry 5: 2335-2342.
- McCauley, R. L., H. A. Linares, et al. (1989). "In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts." Journal of Surgical Research 46(3): 267-274.
- McDonagh, B., and David Sheehan (2007). "Effect of oxidative stress on protein thiols in the blue mussel *Mytilus edulis*: Proteomic identification of target proteins." Proteomics 3: 3395-3403.
- Medintz, I. L., H. Tetsuouyeda, Ellen R. Goldman and H. Mattoussi (2005). "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing." Nature Materials 4: 435-446.
- Merrill, J. C., J. P. Morton, et al., Eds. (2008). Metals. In Principles and methods of toxicology editor, A. Wallace Hayes.
- Michalet, X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss (2005). "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging and Diagnostics." Science 307: 538-544.
- Michaud, M. H. and E. Pelletier (2006). "Sources and fate of butyltins in the St. Lawrence Estuary ecosystem." Chemosphere 64(7): 1074-1082.
- Michel, P. and B. Averty (1997). "Contamination des eaux de la rade de Brest par le tributyl étain (TBT) = Tributyltin contamination in the Bay of Brest." Annales de l'institut océanographique 73(1): 25-34.
- Min, Y., M. Akbulut, et al. (2008). "The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly." Nature Materials 7(7): 527-538.
- Mirsattari, S. M., R. R. Hammond, et al. (2004). "Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver." Neurology 62(8): 1408-1410.
- Miura, N. and Y. Shinohara (2009). "Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells." Biochemical and Biophysical Research Communications In Press, Corrected Proof.
- Mohamad, N., A. Gutiérrez, et al. (2005). "Mitochondrial apoptotic pathways." Biocell (Mendoza) 29: 149-161.
- Mohanpuria Prashant, N. K. R., Sudesh Kumar Yadav (2007). "Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications." Journal of Nanoparticle Research.
- Moniruzzaman, M., and Karen I. Winey (2006). "Polymer Nanocomposites Containing Carbon Nanotubes." Macromolecules 39: 5194-5205.
- Monserrat, J. M., P. E. Martinez, et al. (2007). "Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 146(1-2): 221-234.
- Moore, M. N. (2006). "Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?" Environment International 32(8): 967-976.

- Moore, M. N., J. Icarus Allen, et al. (2006). "Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status." Marine Environmental Research 61(3): 278-304.
- Morgan, D. L., C. J. Shines, et al. (1995). "Acute Pulmonary Toxicity of Copper Gallium Diselenide, Copper Indium Diselenide, and Cadmium Telluride Intratracheally Instilled into Rats." Environmental Research 71(1): 16-24.
- Morley, N. J. (2006). "Parasitism as a source of potential distortion in studies on endocrine disrupting chemicals in molluscs." Marine Pollution Bulletin 52(11): 1330-1332.
- Morley, N. J. (2010). "Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs." Aquatic Toxicology 96(1): 27-36.
- Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, et al. (2005). "The bactericidal effect of silver nanoparticles." Nanotechnology 16(10): 2346-2353.
- Mortensen, L. J., G. Oberdörster, et al. (2008). "In Vivo Skin Penetration of Quantum Dot Nanoparticles in the Murine Model: The Effect of UVR." Nano Letters 8(9): 2779-2787.
- Mubiana, V. K., Kathleen Vercauteren, Ronny Blust (2006). "The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*." Environmental Pollution 144: 272-279.
- Mulcahy, G. and P. J. Quinn (1986). "A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 9(2): 119-139.
- Muñoz, P., J. Meseguer, et al. (2006). "Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*." Fish & Shellfish Immunology 20(1): 12-19.
- Murphy, C. J. (2009). "Spatial Control of Chemistry on the Inside and Outside of Inorganic Nanocrystals." ACS Nano 3(4): 770-774.
- Murray, C. B., C. R. Kagan, M. G. Bawendi (2000). "Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies " Annual Review of Materials Science 30: 545-610.
- Nappi, A. J., Enzo Ottaviani (2000). "Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates." BioEssays 22: 469-480.
- Narnaware, Y., B. Baker, et al. (1994). "The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." Fish Physiology and Biochemistry 13(1): 31-40.
- Nasir, A. (2009). "Nanotechnology in Vaccine Development: A Step Forward." Journal of Investigative Dermatology 129: 1055-1059.
- Nassimi, M., C. Schleh, et al. (2009). "Low cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in in vitro and ex vivo lung models." Inhalation Toxicology 21 Suppl 1: 104-109.
- Navarro, E., F. Piccapietra, et al. (2008). "Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*." Environmental Science & Technology 42(23): 8959-8964.
- Negri, A. P., L. T. Hales, et al. (2004). "TBT contamination identified in Antarctic marine sediments." Marine Pollution Bulletin 48(11-12): 1142-1144.
- Nel, A., T. Xia, et al. (2006). "Toxic Potential of Materials at the Nanolevel." Science 311(5761): 622-627.
- Neuberger-Cywiak, L., Y. Achituv (2007). "Effects of Sublethal Zn⁺⁺ and Cd⁺⁺ Concentrations on Filtration Rate, Absorption Efficiency and Scope for Growth in *Donax trunculus* (Bivalvia; Donacidae)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 79: 622-627.
- Neumann, N. F., D. Fagan, et al. (1998). "Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages." Developmental & Comparative Immunology 19(6): 473-482.
- Nies, D. H. (1999). "Microbial heavy-metal resistance." Applied Microbiology and Biotechnology 51(6): 730-750.

- Nigro, M., A. Falleni, et al. (2006). "Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels." Aquatic Toxicology 77(4): 339-347.
- NIOSH (2009). "Approaches to safe nanotechnology. Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials." NIOSH: pp 104.
- Nogawa, K. (1981). "Itai-Itai Disease and Follow-Up Studies." JOHN WILEY & SONS, INC., 605 THIRD AVE., NEW YORK, NY 10158.: 1-37.
- Nordberg, G. F., B. A. Fowler, et al. (2008). "Handbook on the toxicology of metals, third edition." Academic Press: pp 975.
- Nordberg, G. F., R. Goyer, et al. (1975). "Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney." Archives of pathology 99(4): 192.
- Nordberg, G. F., T. Jin, et al. (1997). "Biological monitoring of cadmium exposure and renal effects in a population group residing in a polluted area in China." Science of The Total Environment 199(1-2): 111-114.
- Norkko, J., C. A. Pil ditch, S. F. Thrush, R. M. G. Wells (2005). "Effects of food availability and hypoxia on bivalves: the value of using multiple parameters to measure bivalve condition in environmental studies." Marine Ecology Progress Series 298: 205-218.
- Nozik, A. J. (2002). "Quantum dot solar cells." Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures 14(1-2): 115-120.
- Oberdörster, G. (2007). "Biokinetics and Effects of Nanoparticles." NATO Security through Science Series: 15-51.
- Oberdörster, G. (2010). "Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology." Journal of Internal Medicine 267(1): 89-105.
- Oberdörster, G., Andrew Maynard, Ken Donaldson, Vincent Castranova, Julie Fitzpatrick, Kevin Ausman, Janet Carter, Barbara Karn, Wolfgang Kreyling, David Lai, Stephen Olin, Nancy Monteiro-Riviere, David Warheit, Hong Yang and A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005). "Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy." Particle and Fibre Toxicology 2(8): 35.
- Oberdörster, G., Juraj Ferin, and Bruce E. Lehnert (1994). "Correlation between Particle Size, In Vivo Particle Persistence, and Lung Injury." Environmental Health Perspectives 102(5): 173-179.
- Ogra, Y. (2009). "Toxicometallomics for research on the toxicology of exotic metalloids based on speciation studies." Analytical Sciences 25(10): 1189-1195.
- Olabarrieta, I., B. L'Azou, et al. (2001). "In vitro effects of cadmium on two different animal cell models." Toxicology in Vitro 15(4-5): 511-517.
- Orbea, A., M. Ortiz-Zarragoitia, et al. (2002). "Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay)." Aquatic Toxicology 58(1-2): 75-98.
- Osaki, F., T. Kanamori, et al. (2004). "A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region." Journal of the American Chemical Society 126(21): 6520-6521.
- Ostiguy, C., G. Lapointe, et al. (2006). "IRSST- Health effects of Nanoparticles." Studied And Research Projects Report: 53.
- Ostrander, G., G. R. Bullock, et al. (2000). The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals), Academic Press.
- Paetkau, V., G. Mills, et al. (1976). "Proliferation of Murine Thymic Lymphocytes in Vitro Is Mediated by the Concanavalin A-Induced Release of a Lymphokine (Costimulator)." The Journal of Immunology 117(4): 1320-1324.
- Pages, D., J. Rose, et al. (2008). "Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*." PLoS One 3(2): e1539.
- Panacék, A., L. Kvittek, et al. (2006). "Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity." The Journal of Physical Chemistry B 110(33): 16248-16253.

- Panara, F. (1985). "Isolation and partial characterization of high and low molecular weight acid phosphatases from chicken liver." International Journal of Biochemistry 17(11): 1213-1217.
- Panara, F., A. Angiolillo, et al. (1989). "Acid phosphatases from liver of *Rana esculenta*. Subcellular localization and partial characterization of multiple forms." Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology 93(4): 877-882.
- Panyam, J. and V. Labhasetwar (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue." Advanced Drug Delivery Reviews 55(3): 329-347.
- Parak, W. J., T. Pellegrino, et al. (2005). "Labelling of cells with quantum dots." Nanotechnology 16: 9-25.
- Park, E.-J. and K. Park (2009). "Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro." Toxicology Letters 184(1): 18-25.
- Park, E.-J., J. Yi, et al. (2010). "Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism." Toxicology in Vitro 24(3): 872-878.
- Passantino, L., M. Altamura, et al. (2002). "Fish immunology. I. Binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)." Immunopharmacology and Immunotoxicology 24(4): 665-678.
- Paul, J. and K. Lyons (2008). "Nanotechnology : The next challenge for organics " Journal of Organic Systems 3(1): 1-22.
- Paul, W. E., Ed. (2008). Fundamental immunology, Lippincott Williams & Wilkins.
- Pellerin, J. and J.-C. Amiard (2009). "Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150(2): 186-195.
- Pelletier, E. (1998). "Contamination du fjord du Saguenay : Contexte historique et perspectives d'un changement durable " Résumé de conférence présentée au congrès GAC-MAC Québec.
- Perceval, O., Y. Couillard, et al. (2004). "Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distribution to population-level responses." Aquatic Toxicology 69(4): 327-345.
- Peyrot, C., C. Gagnon, et al. (2009). "Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150(2): 246-251.
- Phillips, D. J. H. (1976). "The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals." Marine Biology 38(1): 59-69.
- Picard- Bérubé, M. and D. Cossa (1983). "Teneurs en Ben 3,4 Pyrène chez *Mytilus edulis* L. de l'estuaire et du golfe du Saint Laurent." Marine Environmental Research 10: 63-71.
- Pipe, R. K. and J. A. Coles (1995). "Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs." Fish & Shellfish Immunology 5(8): 581-595.
- Pipe, R. K., S. R. Farley, et al. (1997). "The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*." Cell Tissue Res 289: 537-545.
- Posselt, H. S. and W. J. J. Weber (2000). Environmental chemistry of cadmium in aqueous system, The University of Michigan - Departement of civil engineering: pp 189.
- Poulsen, E., H. U. Riisgård, et al. (1982). "Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*." Marine Biology 68(1): 25-29.
- Pradeep, T. and Anshup (2009). "Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review." Thin Solid Films 517(24): 6441-6478.
- Prevodnik, A., Johanna Gardeströmb, Karl Lilja Tina Elfwing, Brian McDonaghc, Natasa Petrovic, Michael Tedengren, David Sheehan, Tomas Bollner (2007). "Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea." Aquatic Toxicology 82: 63-71.

- Purcell, T. W. and J. J. Peters (1998). "Sources of silver in the environment." Environmental Toxicology Chemistry 17: 539–546.
- Quadros, M. E. and L. C. Marr (2010). "Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles." Journal of the Air & Waste Management Association 60(7): 770-781.
- Rai, M., A. Yadav, et al. (2009). "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials." Biotechnology Advances 27(1): 76-83.
- Rainbow, P. S. (1995). "Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment." Marine Pollution Bulletin 31(4-12): 183-192.
- Rana, S. V. S. (2008). "Metals and apoptosis: Recent developments." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 22(4): 262-284.
- Randolph, G. J., K. Inaba, et al. (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity 11(6): 753-761.
- Ratte, H. T. (1999). "Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review." Environmental Toxicology and Chemistry 18(1): 89-108.
- Richardson, S. D. (2003). "Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues." Analytical and Bioanalytical Chemistry 75: 2831-2857.
- Rijkers, G. T., E. M. H. Frederix-Wolters, et al. (1980). "The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*)." Immunology 41: 91-97.
- Rikans, L. E. and T. Yamano (2000). "Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity." Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 14(2): 110-117.
- Riviere, J. E. (2009). "Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 1(1): 26-34.
- Rodríguez-Domínguez, H., M. Soto-Búa, R. Iglesias-Blanco, C. Crespo-González, C. Arias-Fernández, J. García-Estévez (2006). "Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro." Aquaculture 254: 563–570.
- Roe, D., B. Karandikar, et al. (2008). "Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61(4): 869-876.
- Roesijadi, G., L. L. Brubacher, et al. (1997). "Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in Vitro." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 118(2): 171-176.
- Roh, J.-y., S. J. Sim, et al. (2009). "Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics." Environmental Science & Technology 43(10): 3933-3940.
- Romeo, M., N. Bennani, et al. (2000). "Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*." Aquatic Toxicology 48(2-3): 185-194.
- Ross, A. H. and R. M. Nisbet (1990). "Dynamic models of growth and reproduction of the mussel *Mytilus edulis* L." Functional ecology 4: 777-787.
- Royal Academy of Engineering (2004). "Nanosciences and nanotechnologies : opportunities and uncertainties." The Royal Society & The Royal Academy of Engineering.
- Rungby, J. and E. Ernst (1992). "Experimentally Induced Lipid Peroxidation after Exposure to Chromium, Mercury or Silver: Interactions with Carbon Tetrachloride." Pharmacology & Toxicology 70(3): 205-207.
- Russell, F., S. (1967). "Advances in Marine Biology." 5: pp.
- Ryman-Rasmussen, J. P., J. E. Riviere, et al. (2006). "Surface Coatings Determine Cytotoxicity and Irritation Potential of Quantum Dot Nanoparticles in Epidermal Keratinocytes." Journal of Investigative Dermatology 127(1): 143-153.
- Rzagalinski, B. A. and J. S. Strobl (2009). "Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots." Toxicology and Applied Pharmacology 238(3): 280-288.

- Sager, T. and V. Castranova (2009). "Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: comparison to ultrafine titanium dioxide." Particle and Fibre Toxicology 6(1): 15.
- Sager, T., D. Porter, et al. (2007). "Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity." Nanotoxicology 1(118-129).
- Salo, H., C. Dautremepuits, et al. (2005). Immune markers in ecotoxicology : A comparison across species, CRC Taylor & Francis Ed.
- Salzet, M. (2001). "Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses." Trends in Immunology 22(6): 285-288.
- Samuel, U. and J. P. Guggenbichler (2004). "Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter." International journal of antimicrobial agents 23: 75-78.
- Sandoval, J., P. Levêque, et al. (2010). "Tellurite-induced oxidative stress leads to cell death of murine hepatocarcinoma cells." Biometals 23(4): 623-632.
- Santiago, S., K. Becker Van Slooten, et al. (2002). Guide pour l'utilisation des tests ecotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement., Université de Genève.
- Santoro, C. M., N. L. Duchsherer, et al. (2007). "Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles." Nanobiotechnology.(1551-1294 (Electronic)).
- Santos, A. M. T. d. and J. Coimbra (1995). "Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation." Aquaculture 132(3-4): 195-211.
- Sarkar, A., D. Ray, et al. (2006). "Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring." Ecotoxicology 15(4): 333-340.
- Sarna, J. R., R. H. Dyck, et al. (2000). "The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking." Behavioural Brain Research 108(1): 39-45.
- Sarwar, N., Saifullah, et al. (2010). "Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants." Journal of the science of food and agriculture 90(6): 925-937
- Sastry, M., Absar Ahmad, M. Islam Khan and Rajiv Kumar (2003). "Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete." Current Science 85(2): 162- 170.
- Saulnier, I. and A. Mucci (2000). "Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada." Applied Geochemistry 15(2): 191-210.
- Sauve, S., P. Brousseau, et al. (2002). "Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn)." Aquatic Toxicology 58(3-4): 189-200.
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2009). Risk Assessment of Products of Nanotechnologies 19 January 2009., European Commission.
- Scharsack, J. P., D. Steinhagen, et al. (2001). "Flow Cytometric Analysis of Mitogen-Induced Activation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Peripheral Blood Leucocytes." Journal of Veterinary Medicine, Series B 48(5): 331-339.
- Schrand, A. M., J. J. Schlager, et al. (2010). "Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy." Nature Protocols 5(4): 744-757.
- Seed, R., T.H. Suchanek, Ed. (1992). The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture., Elsevier.
- Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nature Immunology 7(3): 311-317.
- Shahverdi, A. R., A. Fakhimi, et al. (2007). "Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 3(2): 168-171.
- Sharma, V. K., R. A. Yngard, et al. (2009). "Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities." Advances in Colloid and Interface Science 145(1-2): 83-96.

- Shin, S. H., M. K. Ye, et al. (2007). "The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells." International Immunopharmacology 7: 1813-1818.
- Shinogi, M. and S. Maeizumi (1993). "Effect of preinduction of metallothionein on tissue distribution of silver and hepatic lipid peroxidation." Biological & Pharmaceutical bulletin 16(4): 372-374.
- Shiobara, Y., Y. Ogra, et al. (2001). "Animal Species Difference in the Uptake of Dimethylarsinous Acid (DMAIII) by Red Blood Cells." Chemical Research in Toxicology 14(10): 1446-1452.
- Shiohara, A., H. Akiyoshi, et al. (2004). "On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots." Microbiology and Immunology 48(9): 669-675.
- Shortkroff, S., M. Turell, et al. (2002). "Cellular responses to nanoparticles." Materials Research Society 704: W11.15.11-W11.15.16.
- Simonet, B. and M. Valcárcel (2009). "Monitoring nanoparticles in the environment." Analytical and Bioanalytical Chemistry 393(1): 17-21.
- Smith, A. M., M. C. Mancini, et al. (2009). "Bioimaging: Second window for in vivo imaging." Nat Nano 4(11): 710-711.
- Smith, A. M. and S. Nie (2009). "Semiconductor Nanocrystals: Structure, Properties, and Band Gap Engineering." Accounts of Chemical Research 43(2): 190-200.
- Smith, A. M., Xiaohu Gao and Shuming Nie (2004). "Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging." Photochemistry and Photobiology, 80.
- Smith, J. N. and E. M. Levy (1990). "Geochronology for polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in sediments of the Saguenay Fjord. ." Environmental Science & Technology 24(6): 874-879.
- Söderhäll, K. (1982). "Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods? A review." Developmental & Comparative Immunology 6(4): 601-611.
- Söderhäll, K. (2010). "Invertebrate immunity." Advances in Experimental Medicine and Biology 708: pp 316.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius (1998). "Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity." Current Opinion in Immunology 10(1): 23-28.
- Sokolova, I. M., S. Evans, et al. (2004). "Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition." The Journal of Experimental Biology 207(Pt 19): 3369-3380.
- Sondi, I. and B. Salopek-Sondi (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria." Journal of Colloid and Interface Science 275(1): 177-182.
- Stebbing, A. (1998). "A theory for growth hormesis." Mutation Research 403: 249-258.
- Stepien, K. M., R. Morris, et al. (2009). "Unintentional silver intoxication following self-medication: an unusual case of corticobasal degeneration." Annals of Clinical Biochemistry 46(6): 520-522.
- Stohs, S. J., D. Bagchi, et al. (2000). "Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions." Journal of environmental pathology, toxicology and oncology 19(3): 201-213.
- Su, Y., Y. He, et al. (2009). "The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase - Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating." Biomaterials 30(1): 19-25.
- Sutherland, A. J. (2002). "Quantum dots as luminescent probes in biological systems." Current Opinion in Solid State and Materials Science 6(4): 365-370.
- Swiergosz-Kowalewska, R. (2001). "Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents." Microscopy Research and Technique 55(3): 208-222.
- Syvitski, J. P. M. and C. T. Schafer (1996). "Evidence for an earthquake-triggered basin collapse in Saguenay Fjord, Canada." Sedimentary Geology 104(1-4): 127-153.

- Tatner, M. F. (1985). "The migration of labelled thymocytes to the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*." Developmental and comparative immunology 9(1): 85-91.
- Taylor, D. E. (1999). "Bacterial tellurite resistance." Trends in Microbiology 7: 111–115.
- Teodoro, J. S., A. M. Simões, et al. (2011). "Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective." Toxicology in Vitro In Press, Uncorrected Proof.
- Thorarinsdottir, G., Karl Gunnarsson (2003). "Reproductive cycles of *Mytilus edulis* L. on the west and east coasts of Iceland." Polar Research 22(2): 217-223.
- Thurn K. Ted, E. M. B. B., Aiguo Wu, Stefan Vogt, Barry Lai, Jörg Maser, Tatjana Paunesku, Gayle E. Woloschak (2007). "Nanoparticles for Applications in Cellular Imaging." Nanoscale Research Letters 2(9): 430-441.
- Tierney, K. B., A. P. Farrell, et al. (2004). "The differential leucocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*." Journal of Fish Biology 65: 906-919.
- Tort, L., Balasch, J.C., MacKenzie, S. (2004). "Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence." Contributions to Science 2(4): 443-454.
- Travan, A., C. Pelillo, et al. (2009). "Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity." Biomacromolecules 10(6): 1429-1435.
- Travers, M.-A. s., P. M. d. Silva, et al. (2008). "Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes." Fish & Shellfish Immunology (2008) 24: 400-411.
- Tremblay, G. (1971). "Sur les étapes successives de la mise en place d'une partie du réseau hydrographique dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, Québec, Canada." Cahiers de géographie du Québec 15: 105-114.
- Tremblay, H., J. Locat, et al. (2001). "Géodynamique littorale de la couche diluviennes de 1996, baie des HAHA!, Fjord du Saguenay, Québec, Canada." Conférence canadienne sur le littoral 2001.
- Troadec, P. and R. Le Goff (1997). "Etat des lieux et des milieux de la rade de Brest et de son bassin versant." Phase préliminaire du Contrat de Baie de la rade de Brest. Edition Communauté Urbaine de Brest: pp 335.
- Tryphonas, H., M. Fournier, et al. (2005). Investigate Immunotoxicology, CRC Taylor & Francis Ed.
- Turner, R. J., Y. Aharonowitz, et al. (2001). "Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*." Canadian Journal of Microbiology 47(1): 33-40.
- Ulkur, E., O. Oncul, et al. (2005). "Comparison of silver-coated dressing (Acticoat), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and silver sulfadiazine 1% (Silverdin) for topical antibacterial effect in *Pseudomonas aeruginosa*-contaminated, full-skin thickness burn wounds in rats." Journal of Burn Care & Rehabilitation 26(5): 430-433.
- Vallhov, H., J. Qin, et al. (2006). "The Importance of an Endotoxin-Free Environment during the Production of Nanoparticles Used in Medical Applications." Nano Letters 6(8): 1682-1686.
- Van der Oost, R., J. Beyer, et al. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology 13(2): 57-149.
- Varol, C., L. Landsman, et al. (2007). "Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells." The Journal of experimental medicine 204(1): 171.
- Vastag, B. (2004). "Nanotechnology Grows Into Billion-Dollar Enterprise." Journal of the National Cancer Institute, 96(21): 1566-1567.
- Verderame, M., D. Alcorta, et al. (1980). "Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloidin in normal and transformed cells." Proceedings of the National Academy of Sciences 77(11): 6624-6628.
- Viarengo, A., F. Dondero, et al. (2007). "A Biomonitoring Study Assessing the Residual Biological Effects of Pollution Caused by the HAVEN Wreck on Marine Organisms in the Ligurian Sea (Italy)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 53(4): 607-616.

- Viglino, L., E. Pelletier, et al. (2006). "Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50(1): 45-59.
- Von Stebut, E. and M. C. Udey (2004). "Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*." Microbes and Infection 6(12): 1102-1109.
- Vos, J. G. and H. Van Loveren (1998). "Experimental studies on immunosuppression: how do they predict for man?" Toxicology 129(1): 13-26.
- Waalkes, M. P. (2003). "Cadmium carcinogenesis." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 533(1-2): 107-120.
- Waalkes, M. P. and C. D. Klaassen (1985). "Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals* 1." Fundamental and Applied Toxicology 5(3): 473-477.
- Wang, C. H., Andrew See Weng Wong, and Ghim Wei Ho (2007). "Facile Solution Route to Vertically Aligned, Selective Growth of ZnO Nanostructure Arrays." Langmuir 23: 11960-11963.
- Wang, L., H. Zheng, et al. (2009). "Rapid determination of the toxicity of quantum dots with luminous bacteria." Journal of Hazardous Materials In Press, Corrected Proof.
- Waters, M., D. Gardner, et al. (1975). "Metal toxicity for rabbit alveolar macrophages in vitro." Environmental Research 9(1).
- Wester, P. W., Vethaak, A.D., van Muiswinkel, W.B. (1994). "Fish as biomarkers in immunotoxicology." Toxicology 86: 213-232.
- Widmeyer, J. R. and L. I. Bendell-Young (2007). "Influence of food quality and salinity on dietary cadmium availability in *Mytilus trossulus*." Aquatic Toxicology 81(2): 144-151.
- Wood, C. M., C. Hogstrand, et al. (1996). "The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag⁺." Aquatic Toxicology 35(2): 93-109.
- Wootton, E. C., E. A. Dyrinda, et al. (2003). "Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*)." Fish & Shellfish Immunology 15: 195-210.
- Wu, X., Hongjian Liu, Jianquan Liu, Kari N. Haley, Joseph A. Treadway, J. Peter Larson, Nianfeng Ge, Frank Peale, and Marcel P. Bruchez (2003). "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots." Nature Biotechnology 21: 41-46.
- Wuister, S. F., Celso de Mello Donega, Andries Meijerink (2004). "Luminescence Temperature Antiquenching of Water-Soluble CdTe Quantum Dots: Role of the Solvent." Journal of the American Chemical Society 126: 10397-10402.
- Yang, D., Y. Zhao, et al. (2010). "[Gd@C82(OH)22]n Nanoparticles Induce Dendritic Cell Maturation and Activate Th1 Immune Responses." ACS Nano 4(2): 1178-1186.
- Yoder, J. A. (2004). "Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 138(3): 271-280.
- Yoon, K. Y., J. H. Byeon, et al. (2008). "Antimicrobial Effect of Silver Particles on Bacterial Contamination of Activated Carbon Fibers." Environmental Science & Technology 42(4): 1251-1255.
- Yue, H., W. Wei, et al. (2010). "Particle size affects the cellular response in macrophages." European Journal of Pharmaceutical Sciences 41(5): 650-657.
- Zapata, S., L. R., et al. (1993). Cytotoxicity to human leukocytes by topical antimicrobial agents used for burn care. Hagerstown, MD, ETATS-UNIS, Lippincott Williams & Wilkins.
- Zardi, G. I., C. D. McQuaid, K. R. Nicastro (2007). "Balancing survival and reproduction: seasonality of wave action, attachment strength and reproductive output in indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis* mussels." Marine Ecology Progress Series 334: 155-163.

- Zarogian, G. and E. Jackim (2000). "In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 127(3): 251-261.
- Zelikoff, J. T., Ed. (1994). Fish immunotoxicology. In: Deqan, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Kimber, I. (Eds.), Immunotoxicology and Immunopharmacology, second ed. Raven Press, New York.
- Zelikoff, J. T. (1998). "Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals?" Toxicology 129(1): 63-71.
- Zhang, L. W. and N. A. Monteiro-Riviere (2009). "Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake." Toxicological sciences 110(1): 138-155.
- Zhang, L. W., W. W. Yu, et al. (2008). "Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes." Toxicology and Applied Pharmacology 228(2): 200-211.
- Zhang, T., J. L. Stilwell, et al. (2006). "Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements." Nanno Letters(1530-6984 (Print)).
- Zhang, X., M. Zhang, et al. (2006). "Time course of age-dependent changes in intraocular pressure and retinal ganglion cell death in DBA/2J mouse." Yan Ke Xue Bao 22(3): 184-189, 194.
- Zhang, Y., L. Mi, et al. (2009). "The environmental influence on the photoluminescence behavior of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells." Biomed Mater 4(1): 12001.
- Zhou, Q., J. Zhang, et al. (2008). "Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem." Analytica Chimica Acta 606(2): 135-150.
- Zhu W., P. J. M. B. a. A. P. (2004). "Application of nanotechnology in construction." Materials and Structures 37(9): 649-658.
- Zolnik, B. S., A. Gonzalez-Fernandez, et al. (2010). "Nanoparticles and the immune system." Endocrinology 151(2): 458-465.