UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

# ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DES NANOPARTICULES D'ARGENT ET D'OXYDE DE TITANE POUR CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

## COMME EXIGENCE PARTIELLE

# DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

# ANDRÉ LUIZ DOS ANJOS GOMES DA SILVA

SEPTEMBRE 2017

### UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

#### Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

#### REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de deux ans. Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à ma directrice, Madame Isabelle Marcotte. Je la remercie pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils judicieux, qui ont contribué à orienter mon cheminement et à alimenter ma réflexion.

Je remercie aussi Bertrand Génard pour son aide dans l'initiation aux cultures des microalgues en laboratoire, ainsi que Dr Alexandre Arnold et Dr Dror Warschawsk pour leur assistance dans les analyses de spectroscopie de la RMN. Sans la contribution de ces personnes, ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je remercie également Dr Abdallah Oukarroum pour son aide énorme dans les expériences de toxicité et dans le traitement de données des résultats de biochimie.

Mes remerciements s'adressent également à toute personne qui a contribué d'une manière ou d'une autre à ce mémoire. Je voudrais exprimer mon énorme reconnaissance à mes amis et collègues de mon groupe de recherche. Je les remercie pour leur soutien sur le plan personnel et professionnel tout au long de ma maîtrise. Un grand merci à Andrée Gravel, David Chokouadeu, Fréderic Byette, Marwa Laadhari, Maïwenn Beaurgrand, Souryvanh Nirasay, Zeineb Bouhlel.

Je remercie également les membres de l'équipe chaleureuse et gentille du laboratoire de Dr David Dewez et Mashid Samadani pour leurs conseils et leur collaboration.

Je remercie mes parents pour leur présence morale et leur soutien infini : « Vous êtes un modèle magnifique de persévérance et d'éducation dont je suis fier ». Sans oublier mes frères, mon compagnon Sylvain Archambault et tous les membres de ma famille pour leur soutien, leur affection et leur amour.

Je remercie tous ceux qui ont de près ou de loin aidé à ce que ce travail puisse être réalisé.

Avant tout, je tiens à remercier Dieu pour m'avoir donné aussi la force et le courage de surmonter les difficultés que j'ai rencontrées au cours de mes études universitaires.

# DÉDICACE

Agradeço à Deus pelo dom da vida, e por todas as coisas... sei que este Deus grande colocou obstáculos em minha vida, sabendo que eu poderia ultrapassá-los e adquirir sabedoria

# TABLE DES MATIÈRES

LIST	TE DES FIGURESviii
LIST	TE DES TABLEAUXxii
LIST	TE DES ABREVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMESxiv
LIST	TE DES UNITES
RÉS	UMÉxx
CHA INTI	APITRE I RODUDCTION GÉNÉRALE1
1.1	Introduction
1.2	Nanoparticules
1.3	Nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane10
	1.3.1 Oxyde de titane
	1.3.2 Nanoparticules d'argent
1.4	Objectifs
1.5	Généralités sur les microalgues vertes Chlamydomonas reinhardtii16
1.6	Les microalgues et leur interations avec les NPs21
CHA ASP	APITRE II ECT THÉORIQUE DES MÉTHODES ET TECHNIQUES UTILISÉES23
2.1	Les conditions de culture
2.2	Marquage des microalgues en <sup>13</sup> C
2.3	Étude de toxicité
2.4	Extractions des lipides des algues
2.5	Nanoparticules étudiées
2.6	Préparation des suspensions de NPs
2.7	Potentiel Zeta

2.8	Microphotographies optiques algales		
2.9	Microscopie électronique à balayage		
2.10	Fluores	scence de la chlorophylle <i>a</i>	
2.11	La cinétique rapide et polyphasique de l'émission de fluorescence chlorophyllienne		
2.12	Viabilit	té cellulaire41	
2.13	Déterm	ination d'espèces réactives de l'oxygène43	
2.14	Concen	tration d'oxyde de Titane et d'argent43	
2.15	La spec	trométrie de masse ICP-MS45	
2.16	Princip	es de base de la RMN46	
	2.16.1	Généralités de la RMN46	
	2.16.2	Relaxation Longitudinale	
	2.16.3 Méthodes utilisées pour augmenter le signal et la résolution de spectres en RMN de l'état solide		
	2.16.4	Rotation à l'angle magique (MAS)54	
	2.16.5	Polarisation croisée (Cross Polarisation, CP)55	
CHAPITRE III ÉTUDE DE TOXICITÉ INDUITE PAR DES NANOPARTICULES D'ARGENT ET D'OXYDE DE TITANE CHEZ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII (AVEC ET SANS PAROI CELLULAIRE)			
3.1	Caractérisation de NPs d'Ag et $TiO_2$ et des microalgues en milieu cellulaire 57		
3.2	Change	ments cellulaires en présence des NPs62	
3.3	Analyses par spectroscopie d'absorption atomique (ICP-MS)		
3.4	Détermination de la chlorophylle totale70		
3.5	La cinétique rapide et polyphasique de l'émission de fluorescence chlorophyllienne		
3.6	Le changement de ROS et viabilité cellulaire		
3.7	Analyse	es des microalgues par RMN	
	3.7.1	Attribution spectrale et effets des NPs	
	3.7.2	Mesures de temps de relaxation92	
CHAPITRE IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES104			

vi

BIBLIOGRAPHIE	10
---------------	----

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Comparaison de tailles entre les structures à l'échelle nanométrique et micrométrique. Adaptée de Gu <i>et al.</i> , (2006) avec permission de l'auteur3
1.2	Utilisation des nanoparticules pour diverses applications. Figure réalisée à partir d'informations tirées de (Blinova <i>et al.</i> , 2010; Chen et Schluesener, 2008; Domingos <i>et al.</i> , 2009; Drobne, 2007; Grassian <i>et al.</i> , 2008; Hara <i>et al.</i> , 2011; Klaine <i>et al.</i> , 2008; Lundqvist <i>et al.</i> , 2011; Mazzola, 2003)4
1.3	Interaction des NPs dans l'environnement aquatique adaptée de Baum <i>et al.</i> (2008) avec permission
1.4	Comportement des nanoparticules dans l'environnement, adapté de Farre <i>et al.</i> (2009)
1.5	Les formes géométriques cristallines de TiO <sub>2</sub> A) anatase B) rutile, adapté de Lafont, (2009)11
1.6	Gauche, représentation de C. reinhardtii. Droite : les lipides prédominants pour cette espèce soient: glycéryltrioléate-TAGs (A) monogalactosyles diglycerides-MGDG (B) digaloctosyles diglycérides-DGDG (C). Adaptée de Merchant <i>et al.</i> (2007)
1.7	Schéma de la paroi cellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , tiré de Harris (2001) avec permission
1.8	Interaction entre une membrane cellulaire et les NPs (Lundqvist <i>et al.</i> , 2011; Ma et Lin, 2013)
2.1	Schéma du système de culture pour le marquage des algues, élaboré par Bertrand Gernard
2.2	Essais de toxicité réalisées sur <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de type sauvage (WT) et mutants sans paroi (CW15) avec et sans présence de nanoparticules d'Ag et TiO <sub>2</sub>
2.3	Spectre d'absorption des chlorophylles a et b ainsi que bactériochlorophylle a et spectre d'émission de la lumière solaire de 350 à 800 nm, d'après (Malkin et Niyogi, 2000)

2.4	Modèle simplifié de dissipation d'énergie par PSII. Par processus photochimique (flèche noire), un électron (e <sup>-</sup> ) est transféré du centre de réaction de P680 à la quinone (Q <sub>A</sub> ) premier accepteur d'électrons du PSII. Processus non photochimique (flèche chaleur brune). Fluorescence (flèche rouge de la fluorescence chlorophylle) (Baker, 2008)
2.5	Cinétique rapide de fluorescence induite par un éclair saturant. Les transitions 0, J, I et P sont indiquées à 50 $\mu$ s, 2 ms, 30 ms et au tF <sub>M</sub> , soit le temps donnant l'émission maximale de fluorescence. L'état d'oxydoréduction de Q <sub>A</sub> et Q <sub>B</sub> est indiqué pour chaque transition. En inséré : fluorescence chlorophyllienne normalisée selon V = (F <sub>r</sub> -F <sub>0</sub> ) /(F <sub>M</sub> F <sub>0</sub> ) montrant la linéarité du début de la courbe de fluorescence. Cette figure a été retirée de la thèse de Oukarroum <i>et al.</i> (2007) avec permission
2.6	Réaction moléculaire du CMFDA avec les estérases et les groupements thiols protéiques, adaptée de Vincent (2006)42
2.7	Représentation des niveaux d'un noyau d'énergie avec I = $\frac{1}{2}$ quand ils sont exposés au champ B <sub>0</sub> (Marcotte, 2014)
2.8	Représentation de la précession des spins dans le champ magnétique B <sub>0</sub> (Marcotte, 2014)
2.9	Magnétisation résultante après application d'une impulsion à 90°50
2.10	Représentation de la séquence d'impulsion utilisée dans la technique d'inversion-recouvrement. $d_1$ = temps de répétition entre deux accumulations successives; $\tau$ = le délai d'incrémentation; $t_1$ = temps d'acquisition
2.11	Évolution temporelle de l'aimantation longitudinale du spectre <sup>1</sup> H d'échantillons d'acide gras avec variable $\tau$
2.12	Principe de la rotation à l'angle magique. L'angle magique est 54,7°, compris entre le champ magnétique externe et l'axe d'un échantillon en rotation54
2.13	Séquence d'impulsions d'une expérience CP en <sup>13</sup> C avec découplage de protons
2.14	Séquence d'impulsions avec excitation directe et découplage hétéronucléaire. 
3.1	Distribution de la taille des nanoparticules d'Ag et TiO <sub>2</sub> , préparées en milieu de culture Minimum-Tris. Suspension Stock de 10 mg/L préparée et soumise aux ultrasons pendant 2 min à l'aide d'un sonicateur avant utilisation60
3.2	Microphotographie optique utilisée pour observer les changements morphologiques algaux des <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> exposées à une

.

concentration de 10 mg/L de NPs d'Ag et TiO <sub>2</sub> pendant 72h. (A): le contrôle,
cellules Wild-Type (WT) non exposées; (D): le contrôle, cellules mutantes
(CW15) non exposées; (B): cellules WT exposées avec NPs d'Ag; (E)
cellules CW15 exposées avec d'Ag ; (C): cellules WT exposées avec TiO <sub>2</sub> ;
(F) cellules CW15 exposées avec NPs de TiO <sub>2</sub> 61

3.3	Microscopie électronique des cellules de Chlamydomonas reinhardtii
	exposées à 10 mg/L de NPs pendant 72h. (A): le contrôle, cellules Wild-
	Type (WT) non exposées; (D): le contrôle, cellules mutantes (CW15) non
	exposées; (B) : cellules WT exposées avec NPs d'Ag; (E) cellules CW15
	exposées avec d'Ag; (C) : cellules WT exposées avec TiO <sub>2</sub> ; (F) cellules
	CW15 exposées avec NPs de TiO <sub>2</sub> . Abréviations: Am, l'amidon; N, noyau;
	Pyr, pyrenoïde; Vc, vacuole; NPs, nanoparticules

3.4 Quantification de métaux totaux de l'Ag et du Ti dans le milieu de culture minimum-TRIS par ICP-MS. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

- 3.6 Diminution de la teneur en chlorophylle totale chez Chlamydomonas reinhardtii (WT et CW15) exposées aux NPs d'Ag (A) et de TiO<sub>2</sub> (B) pendant 72 h (n=03) ± SD. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

- 3.10 Changement de ROS/Viabilité cellulaire dans les algues *Chlamydomonas reinhardtii* exposées à des nanoparticules d'Ag et TiO<sub>2</sub> pendant 72h. Les

	expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type
3.11	Spectres NOE-DP <sup>13</sup> C des extraits lipidiques de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> par RMN en solution. Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et le nombre de scans pour chaque expérience est de 2048 pour une durée de 3h. 
3.12	Spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup> C MAS avec impulsion directe et MAS de 10 kHz <i>in vivo</i> pour les deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> marquées au <sup>13</sup> C : WT (en noir) et CW15 (en rouge)
3.13	Spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup> C avec impulsion directe et MAS de 10 kHz <i>in vivo</i> pour les deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> marquées au <sup>13</sup> C : A) WT et B) CW15 exposées (rouge) et non exposées (noir) aux AgNPs 10 mg/L pendant 72 h
3.14	Spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup> C avec impulsion directe et MAS 10kHz <i>in vivo</i> pour les deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> marquées au <sup>13</sup> C : A) WT et B) CW15 exposées (rouge) et non exposées (noir) aux TiO <sub>2</sub> NPs 10 mg/L pendant 72 h
3.15	Microphotographies optiques algales de souches de <i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> WT, prises après l'expérience de RMN en MAS et statique: (A) 1h, (B) 2h et (C) 24h92
3.16	Mesure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C des souches WT et CW15 de <i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> par RMN-ÉS, en absence (vert) ou en présence (gris) de NPs d'Ag et TiO <sub>2</sub> pendant 72 h. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type. 
3.17	Écart relatif de la mesure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C entre les deux souches WT et CW15 de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> par RMN-ÉS. Avec paroi WT (bleu) sans paroi CW15 (rouge) sans exposition aux NPs
3.18	Écart relatif de la mesure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C entre les deux souches WT (bleu) et CW15 (rouge) de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> par RMN-ÉS en présence d'AgNPs pendant 72h
3.19	Écart relatif de la mesure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C entre les deux souches WT (bleu) et CW15 (rouge) de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> par RMN-ÉA en présence de TiO <sub>2</sub> NPs pendant 72h

xi

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau Page		
aractéristiques des nanoparticules7	1.1	
ste de quelques paramètres tirés du JIP-test (Strasser et al., 2004)38	2.1	
otentiel zeta des NPs d'argent, d'oxyde de titane et des deux types de icroalgues Chlamydomonas reinhardtii	3.1	
omparaison de la concentration intracellulaire d'Ag et de Ti (ng/mg) entre s deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (WT et CW15)69	3.2	
omparaison du contenu en chlorophylle totale entre les deux souches de hlamydomonas reinhardtii (WT et CW15) avec aux NPs (résultats obtenus r calculs de variation relative)	3.3	
ésultats de la fluorescence transitoire sur les deux souches de hlamydomonas reinhardtii (CW15 et WT)76	3.4	
ésultats de la fluorescence transitoire sur les deux souches de hlamydomonas reinhardtii (CW15 et WT)77	3.5	
omparaison de l'augmentation intracellulaire en ROS entre les deux auches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (WT et CW15)	3.6	
ttribution spectrale des acides gras TAG et DHA par RMN de l'état liquide. 	3.7	
esure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C des souches WT et CW15 de <i>Chlamydomonas</i> inhardtii par RMN-ÉS	3.8	
esure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C des souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> WT en ésence d'AgNPs par RMN-ÉS95	3.9	
esure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C des souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW15 en ésence d'AgNPs par RMN-ÉS95	3.10	
esure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C des souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> WT en ésence de TiO <sub>2</sub> NPs par RMN-és96	3.11	

3.12	Mesure des T <sub>1</sub> des <sup>13</sup> C des souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW15 en présence de TiO <sub>2</sub> NPs par RMN-ÉS96
3.13	Comparaison de la différence relative de la mesure de T <sub>1</sub> entre les deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (WT et CW15) sans exposition aux NPs
3.14	Comparaison de la différence relative de la mesure de T <sub>1</sub> entre les deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (WT et CW15) en présence d'AgNPs
3.15	Comparaison de la différence relative de la mesure de $T_1$ entre les deux souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (WT et CW15) en présence de TiO <sub>2</sub> NPs. 101

# LISTE DES ABREVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES

<sup>12</sup> C	Isotope de masse 12 du carbone
<sup>13</sup> C	Isotope de masse 13 du carbone
1D .	Une dimension
<sup>1</sup> H	Proton-1
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> *	Oxygène singulet
2D	Deux dimensions
ABS/RC	Niveau d'absorption de l'énergie lumineuse (ABS)
	par centre réactionnel
ADC	Anisotropie du déplacement chimique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
Ag	Argent
AgNPs	Nanoparticule d'argent
Arg7	Arginine succinate lyase
B <sub>0</sub>	Champ magnétique
B <sub>1</sub>	Intensité du champ magnétique
BC	Bande de conduction
B <sub>eff</sub>	Champ magnétique effectif
BV	Bande de Valence
C-0	Liaison carbone hydrogène
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
Chl	Chlorophylle

Chl a	Chlorophylle a
CMFDA	5-chlorométhylfluorescéine diacétate
COSY	Spectroscopie de Corrélation
СР	Polarisation croisée
CW15	Chlamydomonas reinhardtii mutant-sans paroi
CWT	Chlamydomonas reinhardtii de Type-sauvage
d1	Temps de recyclage
DCF	Dichlorofluorescéine
DGDG	Dialactosyl diglycérides
DHA	L'acide docosahexaénoïque
DLS	La Diffusion dynamique de la Lumière
DLVO	« Derjaguin-LandauVerwey-Overbeek »
DP	Impulsion Directe-DP
e	Électron
F <sub>0</sub>	Fluorescence de base
F20µs, F300µs, F20ms, F30ms,	Intensité de fluorescence à 20 et 300 ~LS, 2 et 30
	ms
FDA	Diacétate de Fluorescéine
FID	"Free induction Decay"
$F_P$ ou $F_M$	Fluorescence maximale induite par un flash
	saturant
Fv	Fluorescence variable
h	Constante de Planck
H <sub>2</sub> DCF	2 ', 7'-dichlorofluorescéine
H <sub>2</sub> DCFDA	2 ', 7'-diacétate dichlorodihydrofluoresceine
$H_2O_2$	peroxyde d'Hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Corrélation
hv	énergie d'un photon

$I(\infty)$	Intensité proportionnelle à l'équilibre d'aimantation mesurée	
$I(\tau)$	Intensité signe sur un temps de $\tau$	
ICP-MS	Spectromètre à couplage inductif au plasma couplé	
	à un spectromètre de masse	
k	Constante de Boltzamann	
KCl	Chlorure de potassium	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogène Phosphate	
КОН	Hydroxyde de potassium	
LED	Diodes électroluminescentes	
M <sub>0</sub>	Alimentation d'équilibre	
M <sub>0</sub>	Vitesse initiale de 1'induction de la fluorescence	
	variable	
M <sub>1</sub>	Premier moment spectral	
M <sub>2</sub>	Deuxième moment spectral	
MAS	"Magic Angle spinning"	
MeOH	Méthanol	
MGDG	Monogalactosyles diglycérides	
Minimum-tris	Milieu de culture tamponnée	
MLV	Vésicules multilamellaires	
M <sub>n</sub>	Moments spectraux	
mol	Mole	
$M_z(\tau)$	Valeur d'aimantation longitudinale à un temps $\tau$	
N1T1	Nitrate réductase	
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous	
	forme oxydée	
NaH <sup>13</sup> CO <sub>3</sub>	Bicarbonate marqué au ( <sup>13</sup> C)	
NOE	"Nuclear overhauser effect"	
NPs	Nanoparticules	

xvi

au niveau d'énergie plus élevée e	
e	
Hydroxyle	
Fluorescence transitoire (Test-JIP)	
ctionnel du PSII à l'état stable et excité	
ciency analyzer fluorimeter»	
erformance du PSII	
Processus d'oxydation avancé	
Plastoquinone à l'état oxydé	
me l	
me II	
êta	
, accepteur primaire d'électron du PSII	
, accepteur secondaire d'électron du PSII	
ctionnel	
Radio fréquence	
Résonance Magnétique Nucléaire	
actives de l'oxygène	
d'oxydation de composants organiques	
re	
longitudinale	
lestrioléate	
ie électronique en transmission	
itane	
ula d'avrida da titana	
ule a oxyde de mane	

UTR	Première région non traduite d'un gène	
UV	Lumière	
ν	Fréquence d'irradiation (Hz)	
V1 et V2	Valves	
γ	Rapport gyromagnétique	
ΔΕ	Différence d'énergie entre les états initial et final	
	de la matière	
θ	Angle entre l'aimantation dans l'axe z	
λ	Longueur d'onde	
τ	Temps entre les impulsions	

### LISTE DES UNITES

°C Unité de température (degré Celsius)

μL Unité de volume (microlitre)

Da Unité de masse volumique (Dalton)

g Unité d'accélération (gravité)

h Unité de temps (heure)

Hz Unité de fréquence (hertz)

min Unité de temps (minute)

mL Unité de volume (millilitre)

mM Unité de concentration (millimolaire)

Mol Unité de quantité de matière (mole)

nm Unité de distance (nanomètre)

pg Unité de masse (picogramme)

rpm Unité de fréquence (tours par minute, *rotation per minute*)

s Unité de temps (seconde)

t Unité de masse (tonne)

W Unité de puissance (watts)

μg Unité de masse (microgramme)

K Unité de masse (kilo)

# RÉSUMÉ

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de pointe qui permet d'étudier les interactions membranaires. Compte tenu de la complexité des membranes biologiques, les interactions sont étudiées sur des membranes modèles de composition plus simple, soient des bicouches (bicelles, vésicules multi lamellaires). Cependant, pour déterminer les effets des contaminants sur les constituants membranaires, il est avantageux de réaliser des études in vivo sur des microalgues unicellulaires. Afin d'étudier les effets toxiques induits par les nanoparticules d'argent de 50 nm (AgNPs) et d'oxyde de titane de 21 nm (TiO<sub>2</sub>NPs), des microalgues d'eau douce Chlamydomonas reinhardtii de types, sauvage (WT-avec paroi cellulaire) et mutant (CW15-sans paroi cellulaire) ont été exposées à différentes concentrations de nanoparticules allant de 0 à 10 mg/L pendant 72 h. Ensuite, les mesures de la viabilité cellulaire, de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la fluorescence transitoire O-J-I-P ont été étudiées pour évaluer et confirmer les effets toxiques d'AgNPs et TiO<sub>2</sub>NPs. Nos résultats ont montré que les NPs étaient capables d'interagir directement avec la paroi cellulaire de Chlamydomonas reinhardtii et de gros agrégats ont été observés. Les NPs ont montré un effet négatif sur les algues, qui se manifeste par une forte diminution de la teneur en chlorophylle et de la viabilité cellulaire, et par l'augmentation des ROS. Vu que les effets de toxicité des deux souches vis à vis des NPs ont été observés, notre deuxième objectif était d'enrichir les microalgues au <sup>13</sup>C afin d'étudier leur effet sur tous les constituants cellulaire. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de 1D (DP-MAS) et des mesures du temps de relaxation  $T_1$  en RMN du <sup>13</sup>C à l'état solide. Les spectres obtenus nous ont permis de conclure que les nanoparticules d'Ag et TiO<sub>2</sub> ont eu un effet sur la mobilité dynamique des protéines au niveau de la paroi cellulaire sur les algues aquatiques et ces modifications pourraient avoir de graves conséquences sur la structure et la fonction des communautés végétales aquatiques.

MOTS-CLÉS : Chlamydomonas reinhardtii, nanoparticules, cytotoxicité, RMN.

### CHAPITRE I

## INTRODUDCTION GÉNÉRALE

#### 1.1 Introduction

Les microalgues, ou phytoplancton, sont des organismes qui sont à la base de la chaine alimentaire marine. Elles jouent le rôle de sentinelles à l'égard des perturbations de la microflore et des organismes supérieurs. Dans l'environnement marin, les microalgues constituent donc une cible essentielle pour évaluer l'impact des polluants dans l'écosystème (Baun et al., 2008). Dans leur milieu de vie, les microalgues sont soumises à de nombreuses interactions avec des molécules bioactives environnantes ou des contaminants provenant des activités humaines, comme plusieurs nanoparticules (NPs). L'oxyde de titane ( $TiO_2$ ) et les nanoparticules d'argent sont employés dans de nombreux procédés industriels, et l'impact des rejets sur l'environnement aquatique inquiète les agences environnementales et sanitaires à travers le monde (Blinova et al., 2010; Hara et al., 2011; Lundqvist et al., 2011). En effet, les contaminants peuvent perturber la membrane cellulaire et la traverser pour s'y accumuler, les microalgues agissant ainsi comme vecteurs de contaminants pour les organismes supérieurs. Les interactions moléculaires des polluants dans les parois cellulaires des microalgues démontrent leur rôle dans le transfert de contaminants à l'intérieur des cellules (Lundqvist et al., 2011).

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de pointe qui permet d'étudier les interactions membranaires. Compte tenu de la complexité des membranes biologiques, les interactions sont étudiées sur des membranes modèles de composition plus simple, soit des bicouches (bicelles, vésicules multilamellaires) faites d'une ou de plusieurs phospholipides. Cependant, afin de tenir compte du rôle de tous les constituants membranaires dans l'interaction de contaminants, il est préférable de réaliser les études *in vivo* sur des microalgues unicellulaires. L'analyse en RMN du <sup>13</sup>C est en mesure de rendre compte des perturbations subies par les constituants des microalgues en présence des contaminants, comme les nanoparticules d'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) et d'argent.

#### 1.2 Nanoparticules

Les nanoparticules (Poole et Owens, 2003; Schulte et Salamanca-Buentello, 2007) sont définies comme des composés formés par des atomes ou des molécules de taille variable, entre 1-100 nm. En 2008, l'étude réalisée sur diverses formes de nanoparticules par Nagarajan (Nagarajan, 2008) révèle que les nanoparticules ont différentes morphologies. De plus, elles sont généralement synthétisées avec des modifications de surface spécifiques pour répondre aux besoins des différentes applications (Oberdörster, 2005). La Figure 1.1 montre la différence observée à l'échelle nanométrique entre un échantillon de nanoparticule d'Ag et les microalgues *Chlamydomonas reinhardtii.* 



**Figure 1.1** Comparaison de tailles entre les structures à l'échelle nanométrique et micrométrique. Adaptée de Gu *et al.*, (2006) avec permission de l'auteur.

En raison de leur taille et de leur surface, les NPs peuvent avoir des propriétés particulières par rapport à leur forme et à leur masse (Gu *et al.*, 2006). Par exemple, les propriétés physiques, chimiques et biologiques se comportent différemment dans la nano-échelle grâce à une grande surface par rapport à la masse. Cela implique que l'atome est situé non loin de l'interface et fait donc l'objet d'une plus grande interaction avec le monde extérieur, ce qui le rend plus réactif (Farre *et al.*, 2009).



**Figure 1.2** Utilisation des nanoparticules pour diverses applications. Figure réalisée à partir d'informations tirées de (Blinova *et al.*, 2010; Chen et Schluesener, 2008; Domingos *et al.*, 2009; Drobne, 2007; Grassian *et al.*, 2008; Hara *et al.*, 2011; Klaine *et al.*, 2008; Lundqvist *et al.*, 2011; Mazzola, 2003).

La nanotechnologie est une science qui a connu une avancée spectaculaire dans plusieurs domaines, comme la production d'énergie, le textile, la thérapeutique, automobile et l'exploitation minière (Figure 1.2) (Blinova *et al.*, 2010; Chen et

Schluesener, 2008; Domingos et al., 2009; Grassian et al., 2008; Hara et al., 2011; Klaine et al., 2008; Lundqvist et al., 2011; Mazzola, 2003). Dans les dernières années, plusieurs études ont été effectuées pour évaluer les risques liés à l'utilisation des produits de la nanotechnologie, particulièrement dans les systèmes biologiques. En 2002, Gatti et Rivasi ont réalisé des études sur l'impact des nanoparticules inorganiques sur les tissus humains des reins et du foie. Ces auteurs ont inventé le terme « nano-pathologie » et ont montré que ces particules d'origine exogène sont liées à des granulomes dans les tissus étudiés (Gatti et Rivasi, 2002). Les connaissances sur les effets de la toxicité des nanoparticules sont très limitées et presque inexistantes chez les animaux aquatiques. En outre, on sait peu de choses sur l'absorption des nanoparticules par les systèmes biologiques qui est facilitée par les voies cavéolaires et d'endocytose vers l'intérieur des cellules (Panyam et al., 2003; Pelkmans et Helenius, 2002).

La taille des particules en soi peut être décisive dans la toxicité directe. La biodégradabilité, quant à elle, peut être un autre facteur qui influe directement sur les effets biologiques nocifs (Brown *et al.*, 2001; Hoet *et al.*, 2004). L'absorption de nanoparticules par inhalation ou par ingestion semble être les principales voies d'entrée de ces molécules dans les organismes terrestres (Bridges et Zalups, 2005). Toutefois, pour les animaux aquatiques, il semble y avoir d'autres voies d'entrée, comme l'absorption directe par les branchies et la surface de l'épithélium. Au niveau cellulaire, la plupart des internalisations se produisent par l'endocytose où la surface cellulaire impliquant les «radeaux lipidiques» associés à des cavéoles évite la dégradation du matériau internalisé par les endosomes/lysosomes (Panyam *et al.*, 2003).

Les nanoparticules ont une grande surface spécifique et les organismes aquatiques ont une affinité élevée avec les métaux et les composés chimiques organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), augmentant la toxicité de ces contaminants (Cheung *et al.*, 2001). Cette surface peut conduire à la formation directe de radicaux oxygénés réactifs qui peuvent endommager les structures telles que des molécules d'ADN, les protéines et les membranes cellulaires (Brown *et al.*, 2001). En outre, les nanoparticules pourraient pénétrer facilement dans les cellules, fournissant des itinéraires d'entrée pour d'autre polluants liés aux nanoparticules et facilitant ainsi l'accès à des endroits où ils ne sont généralement pas retrouvés (Berry *et al.*, 2004; Panyam *et al.*, 2003). Par conséquent, les études de risques impliquant des nanoparticules ne doivent pas se concentrer uniquement sur la toxicité intrinsèque des NPs, mais doivent également tenir compte des interactions possibles avec des polluants déjà présents dans l'environnement, comme le démontre la Figure 1.3 (Baun *et al.*, 2008).



**Figure 1.3** Interaction des NPs dans l'environnement aquatique adaptée de Baum *et al.* (2008) avec permission.

Les déchets industriels, à l'exemple des eaux usées, ont tendance à atteindre facilement les plans d'eau. Ces rejets non ou mal traités sont à l'origine de la pollution des eaux et représentent un vecteur potentiel de nanoparticules dans les milieux aquatiques (Baun *et al.*, 2008). Les procaryotes, telles que les bactéries, sont moins affectés par ces polluants, car ils peuvent être mieux protégés contre l'entrée de différents types de nanomatériaux, en raison de l'absence du mécanisme de transport supramoléculaire (Klaine *et al.*, 2008). Cependant, la situation est très différente pour les organismes eucaryotes, comme les microalgues vertes, car ils ont des processus cellulaires hautement spécialisés d'internalisation des particules à l'échelle nanométrique (100 nm ou moins) et micrométrique (0,1  $\mu$ m – 100  $\mu$ m) par endocytose et phagocytose, respectivement (Na *et al.*, 2003; Panyam *et al.*, 2003; Pelkmans et Helenius, 2002).

Les nanoparticules peuvent être divisées en deux catégories : les nanoparticules naturelles et les nanoparticules synthétiques. Ces dernières sont développées dans les laboratoires avec des propriétés très spécifiques. Le Tableau 1.1 ci-dessous permet de comparer les nanoparticules naturelles et les nanoparticules synthétiques en fonction de la taille, de l'état d'agrégation, de la composition chimique et de la toxicité (Oberdörster, 2005).

Les particules primaires	Nanoparticules naturelles	Synthétisé
Taille	<100 nm	<100 nm
Distribution de taille	Polydispersée	monodispersée
Agrégation lorsque générée	Oui	Non
Composition chimique	Variable à bien définie	Bien définie
Importance toxique	Petite taille, surface, composition chimique	Petite taille, surface, composition chimique

 Tableau 1.1
 Caractéristiques des nanoparticules

Pour Christian et al. (2008), deux types de nanoparticules possèdent une grande pertinence environnementale: les nanoparticules inorganiques et les nanoparticules

organiques. Parmi les nanoparticules inorganiques, on distingue, par exemple, le nanoor, le nano-cuivre, le nano-argent, les oxydes métalliques tels que le nano-oxyde de cuivre, le dioxyde de titane et les points quantiques. Quant aux nanoparticules organiques, les plus classiques sont les nanotubes de carbone et fullerènes ( $C_{50}$  et  $C_{70}$ ).

En raison de cette utilisation accrue, les études toxicologiques sont très importantes pour évaluer les effets des nanoparticules en contact avec l'environnement ou avec des organismes vivants. Les NPs peuvent être trouvées sous la forme libre (nanoparticules primaires), collées, et même en agrégats qui peuvent affecter directement la toxicité (Farre *et al.*, 2009). Ces processus d'agglomération, d'agrégation de fonctionnalisation de surfaces par les différentes molécules présentes dans le milieu tels que les acides humiques et sulfiques représentent un processus dynamique, comme illustré la Figure 1.4. Dans ces processus une NP primaire peut subir un processus d'agglomération et de désagglomération en raison de facteurs tels que le pH et la présence de dispersants. Les NPs fonctionnalisées, lorsqu'elles sont en contact avec l'environnement général (eau, sol et air) ou en contact avec des organismes vivants, subissent un effet de choc sur leurs surfaces, à travers des facteurs environnementaux (pH, salinité, composés chimiques organiques et inorganiques, etc.) qui les transforment en NP primaires et accroissent ainsi leur pouvoir toxique (Farre *et al.*, 2009).

8



**Figure 1.4** Comportement des nanoparticules dans l'environnement, adapté de Farre *et al.* (2009).

De nombreux facteurs influencent la toxicité des NPs vis-à-vis des organismes exposés à des milieux naturels. On note, entre autres, la biodisponibilité (la concentration) des nanoparticules, leur capacité à subir une auto agrégation, le pH du milieu environnent, la solubilité et enfin l'interaction ionique entre les nanoparticules, des matières organiques et des colloïdes naturels (Oukarroum *et al.*, 2013). D'autres études ont montré que la taille des nanoparticules est cruciale pour leur internalisation et, par conséquent, la toxicité sera liée à cette caractéristique (Carlson *et al.*, 2008; Fujiwara *et al.*, 2008; Limbach *et al.*, 2005).

### 1.3 Nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane

Les nanoparticules peuvent être développées à partir d'une grande quantité d'éléments chimiques dont les plus courants sont des métaux, des oxydes métalliques, des silicates, des céramiques non oxydées, des polymères, des produits organiques, du carbone et des biomolécules. Les NPs se distinguent par une grande surface spécifique par rapport aux particules micrométriques et sont donc plus réactives en raison de la charge de transport. Cette propriété les rend très bénéfiques pour les différents secteurs d'applications commerciales, médicales, militaires et environnementales, surtout les oxydes métalliques (Drobne, 2007).

Les nanoparticules d'oxyde de métal sont fabriquées sur une grande échelle pour usage industriel et domestique (matériel électronique, les textiles, les cosmétiques, etc.) avec une augmentation prévue dans ses applications. Les oxydes de métaux de transition sont une classe importante de semi-conducteurs magnétiques. Lorsque ces oxydes sont présents dans des couches électroniques lors de la conversion de l'énergie solaire, la surface peut avoir une profonde influence sur les propriétés catalytiques parce que cette activité est liée à l'état d'oxydation (Popov *et al.*, 2009).

#### 1.3.1 Oxyde de titane

L'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) est un oxyde de métal, semi-conducteur, trouvé sous formes allotropique, brookite, anatase et rutile. Les formes cristallines anatase et rutile (Figure 1.5) sont les plus utilisées et les plus commercialisées comme pigment blanc dans la composition de peintures, de fibres synthétiques, de plastiques, de papier, de verre, de céramique, etc. (Gupta et Tripathi, 2011). Le TiO<sub>2</sub> a été appliqué dans de nombreux domaines tels que la production de cosmétiques, de peintures, de matériel électronique ainsi que dans la production d'électricité, la construction de cellules solaires photoélectrochimiques (Tachan *et al.*, 2013) et dans le domaine de l'environnement (Farre *et al.*, 2009).



**Figure 1.5** Les formes géométriques cristallines de  $TiO_2$  A) anatase B) rutile, adapté de Lafont, (2009).

Notamment à cause de sa large utilisation comme semi-conducteur dans l'industrie de la peinture et des cosmétiques, le  $TiO_2$  a une grande possibilité de toucher l'homme (Lafont, 2009). Ainsi, au cours des dernières années, plusieurs études ont été menées sur ses effets toxicologiques, impliquant principalement les voies respiratoires (Grassian *et al.*, 2008; Sayes et Warheit, 2008) ainsi que des études éco-toxicologiques utilisant des organismes aquatiques (Wiench *et al.*, 2009).

Grâce à des processus d'oxydation avancés (POA) (Fenoll *et al.*, 2014) les NPs de TiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>NPs) sont appliquées à la décontamination de l'environnement, principalement dans le traitement de l'eau et de dans son assainissement. Elles sont également utilisées pour la dégradation photo-catalytique de nutriments et dans la purification de l'air. Les TiO<sub>2</sub>NPs modifiées (dopées avec d'autres éléments, par exemple, le soufre et l'azote) peuvent également être utilisées dans la construction de capteurs et de diodes électroluminescentes (LEDs) (Elliott et Zhang, 2001; Raillard *et al.*, 2004).

L'application du TiO<sub>2</sub> dans le domaine de l'environnement pour la désinfection de l'air ou de l'eau dépend de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dans le processus photo-catalytique, tel que les radicaux hydroxyles (\*OH), le super-oxyde (\*O<sub>2</sub><sup>-</sup>), et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Elliott et Zhang, 2001; Raillard *et al.*, 2004). Parmi les radicaux générés dans le processus photocatalytique de TiO<sub>2</sub>, les radicaux 'OH sont ceux qui ont un plus grand pouvoir oxydant, en raison de leur potentiel redox élevé (2,80 V). Ce radical est principalement responsable de la dimérisation de l'ADN des cellules de microorganismes tels que des bactéries et des virus. En effet, le radical désactive les fonctions vitales du microorganisme, ce qui peut également conduire à sa minéralisation complète. Cette minéralisation se produit aussi sous les processus de photo-catalyse pour la destruction des composés organiques dans l'eau (Elliott et Zhang, 2001; Raillard *et al.*, 2004).

La compréhension du mécanisme de génération ROS est d'une importance fondamentale dans la compréhension des études impliquant la désinfection photocatalytique. Les détails de ce mécanisme ont été abordés en 2004 dans les travaux de Cho *et al.* (Cho *et al.*, 2004). Ils ont étudié la corrélation de l'inactivation de la bactérie *E. coli* avec la concentration du radical <sup>°</sup>OH, généré par ce processus photo-catalytique. De ces résultats découle, clairement que, pour les études éco-toxicologiques dans le cadre de notre projet, les propriétés photo-catalytiques de TiO<sub>2</sub> doivent être prises également en compte, car les effets sur l'environnement aquatique peuvent être multipliés par cette propriété.

#### 1.3.2 Nanoparticules d'argent

Parmi les différents types de nanoparticules déjà développées par la science, il y a les nanoparticules d'argent (AgNPs) qui, en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, sont utilisées dans divers produits. Les applications typiques de ces nanoparticules comprennent les doublures de vêtements et les textiles, les appareils médicaux, la conservation des aliments, les cosmétiques, les crèmes solaires, la lessive pour les vêtements (Jung *et al.*, 2007), les pansements et les bandages (Arora *et al.*, 2008), les

filtres pour le traitement de l'eau (Li et al., 2008), les capteurs (Schrand et al., 2008) et les produits pharmaceutiques (Chen et Schluesener, 2008).

Certaines études suggèrent que les nanoparticules d'argent ont non seulement une action antimicrobienne, mais aussi des propriétés, cytotoxiques (Braydich-Stolle *et al.*, 2005) qui pourraient induire la formation de ROS dans les cellules (Oukarroum *et al.*, 2013). Ainsi donc, de nombreux produits comme les détergents, des articles de toilette et de soins personnels au cours de leur synthèse ou de leur utilisation, que ce soit à l'échelle industrielle ou domestique, produisent une libération de nanoparticules qui se retrouvent dans les égouts. Ces eaux usées non traitées affecteront l'écosystème aquatique et par conséquent les microorganismes.

Au cours des dernières années, les nanoparticules d'argent sont devenues un sujet de grande préoccupation en ce qui concerne la toxicologie aquatique (Farre *et al.*, 2009), car il est difficile de suivre ces particules dans l'environnement et d'avoir accès avoir accès à leurs effets sur les organismes vivants dans ces lieux (Domingos *et al.*, 2009). Le devenir des nanoparticules dans l'environnement aquatique, et leurs interactions l'interaction de ces dernières avec les composantes biotiques et abiotiques et leur potentiel de causer des dommages sont mal compris et ces incertitudes sont à l'origine des préoccupations au sujet des risques que ces molécules imposent à sur la santé humaine et à sur l'environnement (Scown *et al.*, 2010).

Les concentrations de nanoparticules d'argent dans l'environnement n'ont pas été déterminées, mais leur estimation dans l'eau des milieux naturels serait entre 0,03 et 500 ng/L (Lushchak *et al.*, 2001). L'utilisation de nanoparticules d'argent dans la composition de chaussettes en tant qu'agent bactéricide est probablement la principale source de nanoparticules d'argent dans le milieu aquatique. En outre, les travaux réalisés par Benn *et al.* (Benn et Westerhoff, 2008) démontrent que le lavage des chaussettes imprégnées de nanoparticules d'argent entrainent la libération de plus de 1300  $\mu$ g/L d'argent et une grande partie sous forme de nanoparticules.

Les nanoparticules d'argent ont été reconnues pour provoquer une toxicité dans des lignées cellulaires de vertébrés causant différents effets comme le stress oxydatif (Hussain *et al.*, 2005; Oukarroum *et al.*, 2013), l'apoptose (Park *et al.*, 1996), l'augmentation de la peroxydation lipidique (Arora *et al.*, 2008) et une fonction mitochondriale réduite (Schrand *et al.*, 2008). En outre, une étude récente menée par (Larese *et al.*, 2009) a démontré que l'absorption de nanoparticules d'argent à la surface de l'épiderme de la peau humaine peut l'endommager.

Il existe des différences entre l'argent sous sa forme ionique et globale pour former des nanoparticules, principalement en ce qui concerne leur toxicité, et leur comportement dans l'environnement. Selon Walker *et al.* (2008), la toxicité élevée de nanoparticules d'argent, par rapport aux ions d'argent, peut résulter de sa forme ou de sa taille par la libération d'ions d'argent ou une combinaison des deux (Walker *et al.*, 2008).

Étant donné que le mécanisme de la toxicité des nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane pour les microalgues n'est pas encore totalement connu (Scown *et al.*, 2010), ce travail a tenté d'étudier l'absorption et les effets toxiques potentiels dynamiques de ces nanoparticules par résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'état solide sur des espèces de microalgues nommées *C. reinhardtii*.

Les microalgues sont à la base de la chaîne alimentaire aquatique. Par conséquent, l'action des activités humaines peut avoir un impact important sur l'environnement. Les polluants peuvent s'accumuler à l'intérieur de la cellule ou se lier à la paroi cellulaire, ce qui pourrait exercer des effets sur les structures internes, provoquant ainsi la mort des cellules. Il est donc important de connaître l'interaction de ces dernières avec les polluants et les effets de ces derniers sur la paroi cellulaire. Les microalgues synthétisent les protéines, les pigments et les graisses, les acides gras polyinsaturés essentiels pour la vie des organismes supérieurs. Les valeurs nutritionnelles et énergétiques de ces constituants sont exploitées en biotechnologie en production animale. Ces applications biotechnologiques soulignent la nécessité de fournir des outils pour l'étude des effets sur la composition de la membrane des microalgues, tel que débuté par Arnold *et al.* (2015) par RMN de l'état solide du <sup>13</sup>C.

Cependant que, l'étude de la toxicité des nanoparticules est un sujet important tant du point de vue de la biochimie que de l'ensemble de la société, a cause des conséquences que ces particules peuvent causer à l'équilibre naturel et à des problèmes de santé publique. Alors que trop peu d'études se consacrent à mesures ces effets, celle ci se penche sur aspect encore moins exploré : celui de l'effet sur les algues, élément pourtant essentiel de la chaîne alimentaire.

### 1.4 Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet était d'étudier, par RMN du <sup>13</sup>C sur des cellules intactes, les effets de la toxicité et la perturbation membranaire de *C. reinhardtii* sauvage par des nanoparticules d'oxyde de titane et d'argent. De plus, les algues mutantes de *C. reinhardtii* CW15 (dépourvue de paroi cellulaire) nous ont permis d'évaluer le rôle de la paroi cellulaire sur la toxicité aux AgNPs et TiO<sub>2</sub>NPs et leurs différences pendant les analyses de toxicité. Dans un premier temps, nous avons évalué et comparé les effets de la toxicité des AgNPs et de TiO<sub>2</sub>NPs sur les deux différentes souches de *C. reinhardtii* (WT et CW15). Nous avons caractérisé les suspensions de nanoparticules dans leur milieu de culture, et avec les cultures de *C. reinhardtii*, précédemment validées à travers la microscopie électronique afin de s'assurer de la stabilité de la suspension, la surface et la solubilité des métaux totaux d'Ag et Ti.

Dans un second temps, pour l'étude de RMN du <sup>13</sup>C, nous avons d'abord effectué des expériences de RMN 1D (unidimensionnel) et 2D (bidimensionnelle) sur des dérivés d'acides gras, les triglycérides trioléate (TAG) et l'acide docosahéxaénoique (DHA)
afin d'obtenir des informations sur la valeur des déplacements chimiques de ces noyaux et de comparer avec les pics d'extraits lipidiques de *C. reinhardtii*. Ce travail préliminaire permet ainsi de faire une comparaison avec ceux déjà décrits dans la littérature (Arnold *et al.*, 2015). Par la suite, nous avons réalisé l'expérience sur des échantillons marqués au carbone-13 (<sup>13</sup>C) afin d'obtenir l'information sur l'interaction membranaire des contaminants et vérifier l'effet du TiO<sub>2</sub> et d'Ag sur les constituants membranaires de *C. reinhardtii*. Nous avons également réalisé des expériences de 1D (DP MAS) et mesuré la relaxation du signal afin d'étudier le profil dynamique des constituants membranaires en présence de nanoparticules.

# 1.5 Généralités sur les microalgues vertes Chlamydomonas reinhardtii

Avant de détailler les expériences réalisées avec *C. reinhardtii*, nous aborderons certaines caractéristiques générales de cette espèce d'algue verte qui a été si largement étudiée dans plusieurs domaines de la science.

Chlamydomonas reinhardtii est une microalgue unicellulaire qui est devenue un organisme modèle pour l'étude de la photosynthèse, de la structure, de la formation flagellaire, de la biogénèse des organites, de la reproduction sexuée algale et pour les études toxicologiques (Harris, 2001). D'après Samadani (2014) *C. reinhardtii* est devenue un organisme très apprécié pour l'étude de la photosynthèse, en comparant avec les plantes vasculaires et les cyanobactéries, car ce microorganisme unicellulaire facilite les études biochimiques et biophysiques de la photosynthèse. En effet, ces souches ont la capacité de se développer et de croitre sans la photosynthèse, simplement à l'obscurité en présence d'acétate comme source de carbone ainsi que sous faible lumière, permettant ainsi d'isoler les mutants qui sont incapables d'effectuer la photosynthèse (Harris, 2001). Leur capacité de croissance sans

photosynthèse dans un milieu de culture simple, avec un temps de développement court, une génétique bien caractérisée et la disponibilité d'une grande collection de mutants rendent cette microalgue intéressante aux yeux des chercheurs. Cette souche a d'ailleurs attiré l'attention d'un grand nombre d'entre eux. La publication de la séquence complète du génome (Lindahl *et al.*, 1995) et la capacité à gérer tous les trois génomes (nucléaire, mitochondries et les chloroplastes) de *C. reinhardtii* a suscité beaucoup d'intérêt dans le développement d'applications biotechnologiques de cet organisme.

Dans le domaine des Eucaryotes, la *Chlamydomonas* appartiennent à un genre d'algues vertes (*Chlorophyta*) de la famille des *Chlamydomonadaceae* (Harris, 2001). Ces algues unicellulaires minuscules, comme montré à la Figure 1.6, ont une paroi cellulaire distincte (Figure 1,8), un seul grand chloroplaste et deux flagelles antérieurs. La taille moyenne des alvéoles est d'environ 10  $\mu$ m, bien qu'une variation significative soit observée au cours du cycle cellulaire. Une autre caractéristique de *C. reinhardtii* est la présence de deux flagelles antérieurs ayant de 10 à 12  $\mu$ m de longueur. Les flagelles sont originaires d'une paire de corps de base situés en dessous de l'extrémité apicale de la cellule. La structure du flagelle et la formation de *C. reinhardtii* ont été intensivement étudiées et un grand nombre de cellules mutantes ont surgi avec des défauts de motilité qui ont été isolés. Plus de 40 gènes codant des composantes du flagelle ont été clonés et séquencés en *C. reinhardtii* et certains de ces gènes ont été identifiés chez les animaux (Minko *et al.*, 1999; Mussgnug *et al.*, 2005; Nagaya *et al.*, 2010).



**Figure 1.6** Gauche, représentation de C. reinhardtii. Droite : les lipides prédominants pour cette espèce soient: glycéryltrioléate-TAGs (A) monogalactosyles diglycerides-MGDG (B) digaloctosyles diglycérides-DGDG (C). Adaptée de Merchant *et al.* (2007).

Dans les cellules de *C. reinhardtii*, les chloroplastes occupant environ les deux tiers du volume de la cellule en ont fait un organisme modèle pour l'étude de la biogenèse du chloroplaste et la photosynthèse. En raison de sa capacité à croître sans photosynthèse, *C. reinhardtii* a largement été utilisée pour étudier le rôle des protéines D1 et D2 du photosystème II, la biosynthèse de la chlorophylle, l'analyse génétique de la chaîne de transport d'électrons, la synthèse/formation de complexes du cytochrome  $b_6$ /f. Le long génome 195kb du chloroplaste a été séquencé (Harris, 2001).

L'enveloppe nucléaire, comme dans les organismes supérieurs, est en continuité avec le réticulum endoplasmique (RE), mais le réseau n'est pas aussi vaste. Deux vacuoles contractiles se trouvent dans l'extrémité antérieure de la cellule. Les mitochondries sont distribuées dans toute la cellule. Le génome mitochondrial ne dispose que de 15,8 kb et ne contient que quelques gènes, et les codes mutants avec des délétions du gène Cob1 mitochondrial qui, codant le cytochrome b, ne peut pas se développer sur l'acétate dans l'obscurité, mais peut se développer par photosynthèse (Harris, 2001).

Pour l'augmentation directe dans la voie de biosynthèse des lipides, plusieurs enzymes liées à cet itinéraire ont été modifiées et des effets positifs ont été réalisés dans de nombreux cas (Courchesne *et al.*, 2009). Une autre stratégie qui peut être utilisée pour augmenter la quantité de lipides est le blocage de la synthèse de l'amidon. Cette stratégie a également été utilisée et de bons résultats ont été obtenus, pour atteindre une augmentation de 10 fois la quantité de triglycéryltrioléate produite (Figure 1.6) (Li *et al.*, 2010). D'autres moyens indirects pour augmenter la biomasse comme l'augmentation de l'efficacité et de la manipulation des enzymes liées à l'absorption de  $CO_2$  photosynthétique, également testée sur *C. reinhardtii* (Radakovits *et al.*, 2010).

En vue de produire des biocarburants, la recherche de nouveaux gènes cibles pour la manipulation génétique à la recherche d'un meilleur phénotype est un domaine qui attire beaucoup de scientifiques. C'est dans cette optique que l'étude réalisée par Nguyen *et al.* (2008) a montré que le transcriptome des algues *C. reinhardtii* est capable de produire de grandes quantités de lipides lorsqu'il y a un manque d'éléments nutritifs. Cela s'explique par l'action de gènes uniques du cycle du glyoxylate (Nguyen *et al.*, 2008).

Dans des conditions de croissance photosynthétique (photo ou mésotrophe), les cellules de *C. reinhardtii* (Figure 1.7) pourraient offrir entre 18 à 24 mg de lipides (solubles dans l'éther) par gramme de poids sec ( $\sim 10^9$  de cellule) et en croissance hétérotrophe entre 9 à 12 mg. Dans ce total, on retrouve une moyenne de 19% de chlorophylles, 26% de monogalactosyles diglycerides (MGDG) et 19% de digaloctosyles diglycérides (DGDG) dont les structures moléculaires sont montrées à la (Figure 1.6) (Hoober, 1989). Les microalgues sont riches en glycéryltrioléate

(Davey et al., 2012) et ces lipides ont déjà été étudiés par RMN du <sup>13</sup>C (RMN-<sup>13</sup>C) par Beal et al. (Beal et al., 2010).

Selon Harris 2001, la paroi est composée de sept couches visibles par microscopie électronique (Figure 1.8). La W1 est la couche la plus interne qui varie en épaisseur (30-200 nm). Insoluble au contact d'agents chaotropes (perchlorate de sodium, LiCl, urée), elle contient des fibres de longueur variable et des granules de 15-20 nm qui ont également été associées à de telles fibres. Ces fibres s'étendent vers l'extérieur de la membrane cellulaire comme un réseau de petits bâtonnets. Les W2 et W6 forment des réseaux de glycoprotéines entourant une couche granulaire W4. La W2 est un réseau de fibres plus rapprochées et connectées à W1 et à des fibres plus épaisses presque parallèles à la surface de la cellule. Les W3 et W5 sont des régions transparentes au microscope électronique, probablement des espacements à la place des vrais constituants de la paroi. La W6 comprend un tapis cristallin densément tissé (W6A) de fibres épaisses, interconnectées par des fibrilles, ainsi que d'une couche de tissu plus ouvert. La W7 est une couche amorphe et parfois manquante en fonction des conditions de croissance. Cette dernière est composée de glycoprotéines non structurelles dans une phase de transition, avant d'être libérées dans le milieu de culture. Elle peut également être constituée de fibres ramifiées similaires à celles de W1. Les W2, W4 et W6 sont appelées «triplet de base» et sont caractérisées par leur apparence et leur taille constante, quelles que soient les conditions de croissance et la procédure de coloration.



**Figure 1.7** Schéma de la paroi cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii*, tiré de Harris (2001) avec permission.

## 1.6 Les microalgues et leur interations avec les NPs

*Chlamydomonas reinhardtii* est une microalgue verte très étudiée qui se prête bien à des études exploratoires de RMN *in vivo* pour évaluer les interactions des NPs avec la paroi cellulaire. Dans cette étude, nous avons évalué deux espèces de *C. reinhardtii* par RMN *in vivo* et leur interaction avec des nanoparticules d'Ag et de TiO<sub>2</sub>. La paroi cellulaire de *C. reinhardtii* agit comme une barrière contre l'absorption de nanoparticules et les souches mutantes sans paroi, comme a été démontré par Oukarrroum *et al.* 2013, sont plus fragiles aux interactions des NPs que les *C. reinhardtii* de type sauvage (Harris, 2001; Oukarroum *et al.*, 2013; Vincent, 2006). Les NPs aussi peuvent aussi influencer le taux de croissance, altérer la photosynthèse et modifier la structure cellulaire de *C. reinhardtii* (Prasad *et al.*, 1998).

D'après Ma et Lin (2013), une fois que les NPs entrent en contact avec la surface des cellules, elles peuvent être adsorbées à travers les parois cellulaires (ou des membranes) par plusieurs forces telles que les forces de « Van der Waal ». Il est probable qu'elles entreront dans les cellules par diverses voies. Cependant, les interactions bio-physico-chimiques aux interfaces entre les NPs et les cellules comprennent principalement l'adsorption et l'internalisation (Ma, et Lin, 2013). Pour les cellules sans paroi cellulaire, selon toute logique, les NPs ne pourraient pas interagir directement avec cette paroi absente, mais elles peuvent être internalisées par endocytose ou par d'autres mécanisme (Figure 1.9). Les NPs peuvent perturber la membrane cellulaire et entrer directement dans les cellules. Par exemple, les NPs cationiques et les polymères polycationiques peuvent induire la formation de trous à l'échelle nanométrique, des modifications de la perméabilité de la membrane, l'érosion de la membrane dans des cellules pour être internalisées. La plupart du temps, l'internalisation ne peut se produire indépendamment. Selon Evans et al. (2011), il a été montré que l'internalisation des NPs d'oxyde de fer dans les cellules de phéochromocytome de rat comporte trois étapes distinctes: le plasma fixation de la

membrane, l'endocytose, et l'accumulation progressive dans les vésicules intracellulaires membranaires. L'endocytose est la voie la plus acceptée pour l'absorption des NPs.



**Figure 1.8** Interaction entre une membrane cellulaire et les NPs (Lundqvist *et al.*, 2011; Ma et Lin, 2013).

Les protéines, les lipides et les polysaccarides sont des composantes communes existantes sur les interfaces internes ou externes des organismes. Ainsi, ces interfaces seraient inévitablement en contact avec les NPs. Selon Desai *et al.* (2010), il a été montré que les protéines peuvent s'associer avec des NPs comme une «couronne» et, alors lier, les NPs et les cellules ensemble (Desai *et al.*, 2010). D'après Lundqvist *et al.* (2011), les liaisons hydrogène, les interactions ioniques, et la déshydratation de groupes polaires peuvent être les principales forces de liaison avec les polysaccharides de la membrane cellulaire (Lundqvist *et al.*, 2011).

#### CHAPITRE II

# ASPECT THÉORIQUE DES MÉTHODES ET TECHNIQUES UTILISÉES

# 2.1 Les conditions de culture

Les deux espèces de *C. reinhardtii*, avec et sans paroi (WT et CW15), ont été cultivées selon une procédure standard citée dans différentes publications sur la cytotoxicité pour des algues unicellulaires vertes, comme celle de Michel (2006). Les souches de type sauvage ainsi que la souche CW15 sans paroi ont été obtenues à partir de la collection de l'Institut de Biologie et Physicochimique (Paris, France).

Dans le but d'assurer le bon état des algues pendant tous les essais de cytotoxicité, des contrôles rigoureux de qualité physicochimique et microbiologique ont été réalisés pendant le processus de manipulation des cultures. Tous ces contrôles seront présentés de manière approfondie dans les pages ci-après.

Quant aux conditions de cultures, les algues mères ont été inoculées et cultivées dans des Erlenmeyers de 1 L contenant 500 mL de solution tamponnée de Minimum-Tris, dont le pH varie de 7,2 à 7,4. Après l'inoculation des algues, les Erlenmeyers ont été fermés avec des bouchons de coton pour faciliter la libération du  $CO_2$  accumulé, et équilibrer la pression interne. Ils ont ensuite été placés sur des plaques agitatrices à 8 rpm pour éviter la décantation organique puis rangés sur les étagères de culture. Pour une meilleure optimisation de la culture, nous avons considéré les conditions naturelles des algues en exposant les milieux de culture sous une lumière constante de 100 µmoles de photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> et une température environnante de 23  $\pm$  1°C (Vincent, 2006).

Lors de la culture, les croissances algales ont été suivies, à partir du moment de l'inoculation de départ (environ  $3 \times 10^5$  cellules par millimètre) jusqu'à la phase stationnaire, avec l'aide d'un hémacytomètre utilisé pour déterminer la densité cellulaire. De plus, dans le but de maintenir une constance dans la qualité du matériel biologique, les cultures mères ont été renouvelées. Pendant le décompte cellulaire, tous les échantillons à mesurer ont reçu 0,05 mL d'éthanol sur 1 mL contenu dans un eppendorf de (1,5 mL). L'éthanol permet la fixation des algues dans le but d'éviter les mouvements statiques occasionnés par les flagelles des algues et aussi d'arrêter la croissance cellulaire (Samadani, 2014; Vincent, 2006).

# 2.2 Marquage des microalgues en <sup>13</sup>C

Pour le marquage au <sup>13</sup>C, le système de culture est composé de deux Erlenmeyers (de préférence de 1 L et de 250 mL) fermés par deux bouchons de caoutchouc percés de deux trous dans lesquels des tiges de verre courtes (au ras du bouchon) et longues (proche du fond de l'Erlenmeyer) sont introduites. Sur chaque extrémité supérieure des tiges est fixé un bout de tube en silicone qui permettra aux pièces de joint de se fixer sur les tiges. Ces pièces de joint vont permettre, d'une part, l'ancrage des valves (V1 et V2) sur l'Erlenmeyer de 1 L et, d'autre part, celui du tube de jonction sur l'Erlenmeyer de 250 mL. Le montage du système doit être fait de manière à assurer une parfaite étanchéité (bouchon et trou de taille adéquate), selon le schéma suivant (Figure 2.1).



**Figure 2.1** Schéma du système de culture pour le marquage des algues, élaboré par Bertrand Gernard.

Pour réaliser la composition du milieu de culture, nous avons ajouté 1 mM de bicarbonate de sodium marqué au  $[C^{13}]$  (NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub>, 99%) (Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA) dans 2,8 L de le milieu Minimum-TRIS tel que décrit par (Arnold *et al.*, 2015). La mise en culture a été effectuée à pH entre 7.2 et 7.4, plus précisément, nous avons ajouté le milieu de culture dans le plus grand Erlen (maximum à 1/3 du volume total) et autoclavé ces milieux ainsi que les bouchons et le tube de jonction. Après que les milieux aient refroidi, nous avons ajouté le bicarbonate marqué au <sup>13</sup>C (1g/L) puis l'inoculum (culture en phase plateau) à un rapport 1/50 (v/v).

Une fois le milieu inoculé, les bouchons ont été mis sur les Erlenmeyers et le tube de jonction a été connecté sur la valve 2 de l'Erlenmeyer de 1 L avec la grande tige de verre de l'Erlenmeyer de 250 mL, ensuite, nous avons rempli ce dernier avec de l'eau nano pure pour que la grande tige de verre y baigne. Après les montages, nous avons connecté l'installation à l'azote gazeux avec un faible débit à la valve 1 et vérifié que

la valve 2 soit bien ouverte pour que le milieu de culture puisse barboter pendant 15 secondes. Puis a été fermée la valve 1 pour sceller le système (puis nous avons scellé le système en fermant la valve 1 afin d'empêcher tout contact avec l'atmosphère pour éviter les risques de contamination croisée). Cette étape a été respectée chaque fois que le système était en contact avec l'air ambiant. Et enfin, le système a été mis dans la chambre de culture sous illumination. Indépendamment de la souche de microalgue utilisée, la culture durera entre 7 et 10 jours.

# 2.3 Étude de toxicité

Nous visons à connaitre la toxicité des NPs d'Ag et de TiO<sub>2</sub> sur les deux souches de *C. reinhardtii* avec paroi (WT) et sans paroi (CW15). D'abord, afin de bien mettre en évidence l'interaction des NPs avec la paroi cellulaire, nous avons utilisé les algues mutantes de *C. reinhardtii* CW15 dépourvues de paroi cellulaire pour nous permettre aussi d'évaluer le rôle de la paroi cellulaire sur la toxicité aux AgNPs et aux TiO<sub>2</sub>NPs et d'évaluer leurs différences lors des analyses de toxicité. Pour cette étude, des tests de toxicité ont été effectués sur la croissance algale suivant la méthodologie proposée par Oukarroum *et al.* (2014). Ces tests ont permis d'identifier la ou les concentrations d'intérêt pour réaliser les expériences de RMN. Les concentrations de 1, 10 et 100 mg/L de NPs utilisées ont été adoptées afin d'explorer les effets sur une grande gamme de concentrations.

Dans des Erlenmeyers contenant 50 ml de milieu de culture, Tris à pH 7.2-7.4, nous avons ajouté différentes concentrations de NPs, à l'exception des contrôles, et dans chaque Erlenmeyers inoculés de 1 ml de la culture mère en phase exponentielle  $(4 \times 10^6$  cellules/mL). Les flacons ont été scellés avec une feuille d'aluminium et ont été conservés sur une table agitatrice à 8 rpm sous un éclairage homogène d'environ 100

µmoles de photons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. à une température de  $23 \pm 1$  °C. Cette expérience a été réalisée trois fois pour chaque concentration testée selon la Figure 2.2.



**Figure 2.2** Essais de toxicité réalisées sur *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (WT) et mutants sans paroi (CW15) avec et sans présence de nanoparticules d'Ag et TiO<sub>2</sub>.

## 2.4 Extractions des lipides des algues

Pour les extractions de lipides des algues, nous avons broyé, pendant environ 1 min dans un bounce, 150 à 200 mg (158 mg) de masse humide dans 2 mL de dichlorométhanol ( $CH_2Cl_2O$ ) (dans un rapport 2:1). Ensuite, nous avons transvasé toute la matière organique broyée dans un tube en verre conique et rincé le bounce avec 5x2 mL de dichlorométhanol. Après avoir tout transvasé dans le tube conique, nous avons ajouté un 3 ml de solution de KCL à 3% et mélangé le tout à l'aide d'un Vortex pendant environ 30 secondes. Ensuite, pour séparer la matière organique de la solution aqueuse, nous avons centrifugé le tube conique pendant 2 min à 2000 rpm. Après la centrifugation, deux phases ont été formées dans le tube conique, une phase aqueuse et une phase organique. La phase aqueuse n'étant pas pertinente, nous avons conservé à la phase organique. Ainsi, nous avons transvasé le tout dans un tube rond. Pour bien récupérer toute la matière organique, nous avons rincé une dernière fois le tube conique avec 3 mL de dichlorométhanol. Pour la dernière partie de l'extraction, nous avons évaporé le contenu du tube rond sous flux d'azote, à 35°C. Après l'évaporation, une fine pellicule des lipides a été formée au fond du tube rond. Pour récupérer les lipides au fond du tube, nous avons ajouté du dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Avec une pipette pasteur, nous avons transvasé une dernière fois le tout dans un vial ambré de 4 mL puis rincé le tube rond avec 2x1 mL de dichlorométhane et évaporé sous flux d'azote. Ensuite, au dernier moment, pour la conservation des extraits et pour les analyses par RMN du liquide, nous avons ajouté un volume précis de dichlorométhane-d (1 mL). La conservation des extraits a été faite sous atmosphère d'azote à -80°C et le bouchon a été recouvert de téflon pour éviter les fuites et l'évaporation.

# 2.5 Nanoparticules étudiées

Les substances d'essai évaluées et comparées dans cette étude sont les nanoparticules d'argent (AgNPs) et d'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>NPs), qui sont deux composés inorganiques et insolubles. Pour le choix de la NP à étudier, quatre points principaux ont été pris en considération:

- 1. la manière dont elles sont utilisées;
- 2. le mode de libération en grandes quantités dans les milieux aquatiques;

- la facilité qu'elles ont à pénétrer dans les systèmes vivants en raison de leur taille nanométrique;
- et enfin, l'absence de connaissance concernant leur potentiel toxicologique, qui peut présenter des risques dans la chaîne alimentaire à différents niveaux trophiques;

Les AgNPs ayant un diamètre de 50 nm furent acquises de MTI Corporation (Richmond, CA, USA) et les TiO<sub>2</sub>NPs ayant une pureté de 99,5% et un diamètre de 21 nm ont été acquises de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA).

# 2.6 Préparation des suspensions de NPs

Pour la caractérisation des NPs, il était nécessaire de préparer des suspensions de substance d'essai. La méthode de préparation pour obtenir des suspensions de NP a été étudiée par plusieurs auteurs, mais il n'existe pas de procédure standard. La principale méthode utilisée est le traitement aux ultrasons effectué par un sonicateur, qui vise à briser les agglomérats de NPs formés dans le milieu de culture (Heinlaan *et al.*, 2008).

Les suspensions de NPs ont été préparées à une concentration de 10 mg/L dilués en milieux de culture. La solution a été faite dans un flacon de 15 mL mis dans un bain de glace et soumis à une sonication pendant 10 min à 10 Watts RMS (*«Root Mean Square»* racine carrée de la moyenne des carrés). Ensuite, la suspension finale a été ajoutée dans des Erlenmeyers à un volume de 50 mL de milieu de culture, formant une dilution finale de 10 mg/L de NPs. Avant et pendant les réalisations de caractérisations toxicologiques, nous avons pris soin d'homogénéiser la suspension test (Heinlaan *et al.*, 2008).

# 2.7 Potentiel Zeta

Nous avons déterminé la stabilité de la suspension par mesure du potentiel zêta (Pz). La plupart des NPs peuvent acquérir une charge électrique de surface lorsqu'elles sont mises en contact avec un milieu polaire (par exemple aqueux). Les possibles mécanismes de création de telles charges peuvent être résumés par l'ionisation, l'adsorption d'ions, ou de la dissolution des ions générées dans le milieu et déterminées par la théorie DLVO (*Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek*). Selon cette théorie, la stabilité de la suspension dépend de la quantité d'interactions des NPs qui résultent des forces d'attraction (forces de Van der Waals) et de répulsion (électrostatiques). Cette charge de surface affecte la distribution des ions dans le voisinage de la solution, qui à son tour entraîne une augmentation de la concentration des contre-ions qui l'entourent, formant une double couche électrique (O'Brien *et al.*, 1990).

Le Pz étant le potentiel électrocinétique des ions et des molécules, il est possible d'exploiter cette technique pour déterminer les charges électriques présentes dans le milieu et, par ricochet, la stabilité de la suspension. En général, les suspensions avec des particules de haut Pz (en valeur absolue) sont considérées comme plus stables, tandis que les particules ayant de petites valeurs ont tendance à s'agglomérer et à coaguler et sont considérées plus instables (Hanaor *et al.*, 2012) (Tableau 2.1). Les mesures de Pz ont été réalisées à une concentration de 10 mg/L de avec un BTC Zeta Plus (Brookhaven Instruments Corporation).

Le potentiel zêta [mV]	comportement de stabilité du colloïde
de 0 à ± 5,	coagulation rapide ou floculation
de ± 10 à ± 30	instabilité naissance
de ± 30 à ± 40	stabilité modérée
de ± 40 à ± 60	bonne stabilité
plus de ± 61	excellente stabilité

Tableau 2.1 Comportement de stabilité colloïdale mesuré par le potentiel zêta. Adapté de (Hanaor *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 1990).

# 2.8 Microphotographies optiques algales

Les modifications morphologiques de la culture des algues exposée à 0, 1, 10 et 100 mg/L de NPs d'Ag pendant 72 heures ont été déterminées en utilisant un microscope Nikon Eclipse TS 100 et les images ont été enregistrées avec un appareil photo Pixelinke à NanoQam.

# 2.9 Microscopie électronique à balayage

La caractérisation des microalgues avec et sans NPs a été réalisée par microscopie électronique à transmission (TEM) afin de vérifier la taille et la morphologie des NPs et des cellules d'algues. Ce type d'analyse a également été utilisé et rapporté dans plusieurs articles (Blinova *et al.*, 2010; Federici *et al.*, 2007; Oukarroum *et al.*, 2014).

Une concentration de 10 mg/L de NPs a été choisie pour une exposition de 72 h. Après l'exposition des NPs, 50 mL des cultures contrôles et traitées ont été centrifugées et le surnageant a été rejeté. Sans perturber le culot, les cellules ont été lavées avec 500  $\mu$ l de tampon de lavage (0,1 M cacodylate, 0,1% de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) pendant 10 s. Le tampon de lavage a été éliminé et 500  $\mu$ L de tampon de fixation (2,5% de glutaraldéhyde dans un tampon 0,1 M de lavage) ont été ajoutés. Les cellules ont été fixées pendant une nuit à 4 °C. Après fixation au glutaraldéhyde, le culot a été lavé trois fois 10 min avec le tampon de lavage, et coloré avec du tétroxyde d'osmium (1% OsO<sub>4</sub>, 1,5% KFeCN dans l'eau) pendant 2 h à 4 °C. Ensuite, le culot a été lavé avec de l'eau nanopure (3 x 10 min) et déshydraté avec des concentrations croissantes d'acétone (30%, 50%, 70%, 80%, 90% et 100%, 3 x 10 min chacun). Les échantillons déshydratés ont été infiltrés (pour la fixation) à la température ambiante avec des concentrations croissantes d'Epon (résine utilisée pour l'immobilisation des échantillons) dans l'acétone 1:1 (pendant la nuit), 2:1 (4 h), 3:1 (pendant la nuit).

Ensuite, le culot a été placé dans l'Epon pur, laissé 4 heures sous vide et ensuite chauffé 48 h à 58 °C. Les granulés durcis ont été découpés en tranches épaisses de 6  $\mu$ m et placés sur une grille de référence pour l'analyse TEM. On n'a pas utilisé de fixation secondaire dans le but d'obtenir une meilleure visualisation des NPs à l'intérieur de la cellule. Les échantillons ont été visualisés avec un microscope TEM Tecnai 12 120kv et les photos prises par un appareil photo grand Gatan 792 Bioscan 1 × 1k Angle Multiscan CCD dans le laboratoire central de microscopie électronique de l'Université McGill.

## 2.10 Fluorescence de la chlorophylle *a*

Dans le domaine de l'écotoxicologie, plusieurs techniques ou méthodes sont employées pour les études de l'effet toxique d'un produit polluant sur les plantes photosynthététiques aquatiques. Parmi celles-ci techniques ou méthodes, nous pouvons citer la mesure de la fluorescence chlorophyllienne, une technique très utilisée pour les études des effets d'un stress abiotique physique ou chimique (Maxwell et Johnson 2000, Baker et Rosenqvist 2004, Oukarroum *et al.*, 2007; 2012; 2013). Du point de vue historique, Kautsky et Hirsch (1931) ont observé que, lorsque des échantillons photosynthétiques ont été transférés de l'obscurité à la lumière, l'intensité de la fluorescence augmente. Plus tard, il a été démontré que la majeure partie de cette fluorescence est originaire du complexe PSII, comme démontré par Govindjee, (2004) et les références citées dans ce travail (Govindjee, 2004).

Le spectre d'émission de fluorescence de la chlorophylle *a* (centre réactionnel du PSII) à la température ambiante se caractérise par un pic principal autour de 685 nm et un pic de faible intensité entre 700 - 750 nm. Ces deux pics sont dus à l'absorption de la lumière de l'antenne de PSII du PSI respectivement (Stirbet et Govindjee, 2011). Selon Gilmor *et al.* (2000), la fluorescence émise par le PSI est pratiquement constante, contribuant environ à 5-30% du signal fluorescent total chez les plantes qui réalisent la fixation du carbone en  $C_3$  (voie métabolique de fixation du carbone) (Gilmor *et al.*, 2000). Pour cette raison, le signal de fluorescence émis est principalement lié au signal du PSII.



**Figure 2.3** Spectre d'absorption des chlorophylles a et b ainsi que bactériochlorophylle a et spectre d'émission de la lumière solaire de 350 à 800 nm, d'après (Malkin et Niyogi, 2000).

Il est à noter que la lumière absorbée par un appareil photosynthétique peut se diriger vers une des trois voies suivantes:

- 1- Elle peut être employée pour la photochimie (synthèse de l'ATP et NADPH).
- 2- L'énergie excessive peut être réémise comme chaleur.
- 3- Elle peut être émise comme fluorescence.

Ces processus se produisent simultanément et en concurrence. En d'autres termes, si un de ces processus augmente, il aura comme conséquence une diminution du rendement des deux autres processus (Strasser et Butler, 1978). Donc, la fluorescence des chlorophylles donnera indirectement des informations sur l'efficacité de la photochimie et la dissipation thermique, ce qui va renseignera sur l'état physiologique de l'organisme photosynthétique étudié.



**Figure 2.4** Modèle simplifié de dissipation d'énergie par PSII. Par processus photochimique (flèche noire), un électron (e<sup>-</sup>) est transféré du centre de réaction de P680 à la quinone ( $Q_A$ ) premier accepteur d'électrons du PSII. Processus non photochimique (flèche chaleur brune). Fluorescence (flèche rouge de la fluorescence chlorophylle) (Baker, 2008)

D'après Maxwell et Johnson (2000), cette technique de fluorescence chlorophyllienne donne des indications sur les différentes étapes de la réduction du PSII. Différents paramètres basés sur la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne permettent d'évaluer différents aspects structurels et fonctionnels du PSII. L'étape initiale de la réaction photosynthétique centrale est régie par trois étapes fonctionnelles de base. Ces dernières sont décrites ici afin, d'expliquer la variation de l'absorption d'un photon par la molécule de chlorophylle dans le complexe des antennes (ABS): l'accumulation d'énergie absorbée (TR); la conversion de l'énergie d'excitation à la chaîne du transport d'électrons (ET); l'énergie dissipée sous forme de chaleur et de fluorescence (DI). Pour ce travail nous avons utilisé les paramètres  $F_V/F_M$  et PI selon le JIP-test (Strasser *et al.*, 2004).

# 2.11 La cinétique rapide et polyphasique de l'émission de fluorescence chlorophyllienne

Chez les organismes photosynthétiques y compris les algues, l'intensité d'émission de la fluorescence par la Chlorophylle *a* (Chl *a*) montre une courbe en fonction du temps. Cette courbe a été appelés l'effet Kautsky (au nom du chercheur qui a découvert pour la première fois ce phénomène) ou transition de la fluorescence. Cette courbe se divise en deux parties, une première partie rapide (à partir d'une valeur initiale,  $F_o$ , qui est le début de l'illumination), jusqu'à une valeur maximale  $F_M$ , dépendante de l'intensité d'illumination (Strasser et Srivastava, 1995), et une deuxième qui montre l'émission de la fluorescence diminue pour finalement arriver à un état stationnaire  $F_S$  (s pour « steady-state »). Cependant, durant la première partie (partie rapide), la fluorescence augmente d'une manière polyphasique (avec deux paliers) entre les deux extrêmes  $F_o$  et  $F_M$ . Ces paliers intermédiaires sont nommés J et I (respectivement à 2 ms et à 30 ms) (Strasser, 1992; Strasser et Srivastava, 1995). C'est pour cette raison que la courbe est ainsi appelée courbe de O-J-I-P.



**Figure 2.5** Cinétique rapide de fluorescence induite par un éclair saturant. Les transitions 0, J, I et P sont indiquées à 50  $\mu$ s, 2 ms, 30 ms et au tF<sub>M</sub>, soit le temps donnant l'émission maximale de fluorescence. L'état d'oxydoréduction de Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub> est indiqué pour chaque transition. En inséré : fluorescence chlorophyllienne normalisée selon V = (F<sub>t</sub>-F<sub>0</sub>) /(F<sub>M</sub>F<sub>0</sub>) montrant la linéarité du début de la courbe de fluorescence. Cette figure a été retirée de la thèse de Oukarroum *et al.* (2007) avec permission.

L'augmentation rapide de  $F_0$  à  $F_M$  est le reflet de la réduction progressive de  $Q_A$ (Strasser *et al.* 2004; Stirbet et Govindjee, 2011). Selon Kodru *et al.* (2015), l'étape  $F_0$ signifie que le côté accepteur du PSII est ouvert ( $Q_A$  oxydé), tandis que s'il atteint  $F_M$ , il est dit fermé ( $Q_A$  complètement réduit) en raison de la réduction du transport d'électrons linéaire, qui est le résultat d'une accumulation d'électrons sur le côté accepteur du PSI (Kodru *et al.*, 2015). L'augmentation de l'intensité de fluorescence entre les étapes O et J, connue en tant que phase photochimique très rapide, dépend largement de l'intensité de la lumière d'excitation, tandis que les parties de la courbe de fluorescence J-I et I-P sont connues comme thermiques (sensible à la température) (Oukarroum *et al.*, 2007). La courbe de fluorescence O-I est liée à la réduction de la quinone ( $Q_A$ ), qui est un accepteur d'électrons primaires du PSII. La phase J-I de la fluorescence implique la réduction des transporteurs d'électrons, telle que la quinone secondaire ( $Q_B$ ), le *pool* de plastoquinone, le cytochrome b<sub>6</sub>f et la plastocyanine, tandis que la phase I-P reflète la réduction des récepteurs d'électrons sur le côté accepteur du PSI (Govindjee *et al.*, 2001).

L'étude de la cinétique de la fluorescence transitoire de la chlorophylle *a* peut être évaluée par une analyse multiparamétrique, appelé JIP-test, qui a été développée par Strasser *et al.* (2004). Ces paramètres calculés caractérisent la structure et l'activité photochimique des échantillons photosynthétiques. Certains de ces paramètres déterminés par le modèle JIP-test sont liés à l'étape thermique de la fluorescence, parce que ces paramètres sont en corrélation avec l'activité du PSI (Tsimilli-Michael et Strasser, 2008).

Valeurs brutes	
$F_1 = F_{50  \mu s} = F_o$	Intensité de fluorescence initiale
$F_2 = F_{100  \mu s} = F_L$	Intensité de fluorescence à 100 µs
$F_3 = F_{300 \ \mu s} = F_K$	Intensité de fluorescence à 300 µs
$F_4 = F_{2 ms} = F_J$	Intensité de fluorescence à 2 ms
$F_5 = F_{30 ms} = F_1$	Intensité de fluorescence à 30 ms
$F_P = F_{tFmax} = F_M$	Intensité de fluorescence maximale
Rapports de fluorescence	
Fo/ FM	
$F_V/F_o = (F_M - F_o)/F_o$	
$dV/dt_o = 4 \cdot (F_{300\mu s} - F_o)/(F_M - F_o)$	Pente à l'origine de la courbe de fluorescence variable relative à $F_{300 \ \mu s}$
$dV_G/dt_o = 20 \cdot (F_{100\mu s} - F_o)/(F_M - F_o)$	Pente à l'origine de la courbe de
	fluorescence variable relative à F <sub>100 µs</sub>
$V_J = (F_{2ms} - F_o)/(F_M - F_o)$	Fluorescence variable relative à J à 2 ms
$V_1 = (F_{30ms} - F_o)/(F_M - F_o)$	Fluorescence variable relative à I à 30 ms
Rendement d'activité	
$TR_{o}/ABS = 1 - F_{o}/F_{M} = F_{V}/F_{M} = \phi_{Po}$	Rendement quantique de photochimie primaire
$ET_o/TR_o = 1-V_J = \psi_o$	Rendement de l'énergie piégée conservée dans le transport d'électron au-delà de Q <sub>A</sub>
$ET_o/ABS = (1 - F_o/F_M)(1 - V_J) = \varphi_{Eo}$	Rendement de l'énergie absorbée conservée dans le transport d'électron au-delà de Q <sub>A</sub>
$(ABS-TR_o)/ABS = F_o/F_M$	Rendement de l'énergie dissipée entre la capture et l'absorption.
Index de performance (PI)	
$PI = [\gamma_0/(1-\gamma_0)].[\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})].[\psi_0/(1-\psi_0)]$	Détermine le potentiel redox d'un système

Tableau 2.1 Liste de quelques paramètres tirés du JIP-test (Strasser et al., 2004).

L'index de performance est un paramètre qui nous donne d'information utile et quantitative de la fluorescence chlorophyllienne au sujet de l'état physiologique des plantes et de leur énergie vitale.

#### Où:

 $\gamma_0$  = représente le rapport des chlorophylles de RC et de toute la chlorophylle de PSII.  $\gamma_0/(1-\gamma_0)$  = sont estimés par le JIP-test en tant qu'égal au rapport des centres de réaction et de l'absorbance (RC/ABS). Par conséquent:

$$\gamma_{o}/(1-\gamma_{o}) = Chl_{RC}/Chl_{antenne}$$
 (2.1)

$$RC/ABS = [(F_{2ms} - F_{50\mu s})/4 \cdot (F_{300\mu s} - F_{50\mu s})] \cdot F_V/F_M$$
(2.2)

D'abord, l'équation 2.2 nous montre la contribution au PI dû au RC,  $\psi_0$  (= 1-V<sub>J</sub>) est la fraction des électrons transportés au-delà de Q<sub>A</sub> par exciton (état lié d'un électron et d'un trou d'électrons) qui est emprisonné par les centres de réaction (RC) de PSII, duquel l'énergie d'un exciton emprisonné est employée pour le transport d'électron au-delà de la Q<sub>A</sub> (Oukarroum, 2007).

Dans ce travail et pour évaluer les effets des NPs en questions sur le rendement photosynthétique de *C. reinhardtii*, nous avons procédé à un essai de toxicité dans les mêmes conditions citées dans les tests ci-dessus. Pour ce faire, un inoculum de 25 mL a été ajouté ( $10^6$  cellules/mL) dans les Eerlenmeyers. Puis la microalgue est exposée à différentes concentrations de NPs pendant 72 heures, ensuite, on a mesuré la fluorescence de la chlorophylle *a in vivo*. Pour chaque mesure, la quantité de chlorophylle totale utilisée est de 10 µg. En effet, sur la base des études précédentes, cette quantité est suffisante pour détecter un signal de la fluorescence. Il est à noter que nous avons procédé au préalable à la mesure de la quantité de la chlorophylle totale des algues pour chaque souche.

Un volume minimal de 10 mL de souches d'algues (correspondant à 5  $\mu$ g de chlorophylle) est filtré sur fibres de verre (filtre Millipore 2.0  $\mu$ m, Fisher Scientifics, #AP200 1300) pour mesurer la fluorescence de la chlorophylle *a in vivo*. Les analyses ont été faites après une adaptation à l'obscurité pendant 30 minutes pour que les transporteurs d'électrons soient complètement oxydés. Après l'adaptation des algues à l'obscurité, les filtres sont placés dans les porte-échantillons de l'appareil, où les algues sont exposées à une faible lumière verte d'environ 3500  $\mu$ mol de photons m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>.

L'intensité de la fluorescence, pour la transition O-J-I-P, a été déterminée à 50  $\mu$ s, 2 ms et 30 ms, et le rendement maximum de la fluorescence a été évalué sous un flash saturé de 6 s.

Les résultats de la cinétique de fluorescence transitoire ont été déterminés avec le logiciel du PEA Handy. Ce logiciel extrait les valeurs fondamentales mesurées du signal de fluorescence de la chlorophylle du photosystème II. La définition du  $F_0$  est la fluorescence minimale qui, en niveau physiologique, correspond au niveau de fluorescence atteint lorsque  $Q_A$  (quinone *a*, accepteur primaire d'électrons du PSII) est complètement oxydée. La définition de  $F_m$  correspondant à la fluorescence maximale lorsque la  $Q_A$  est entièrement réduite (Figure 2.5).

La cinétique de l'émission de fluorescence de la chlorophylle a été mesurée avec un fluorimètre portable PEA Handy (Plant Efficiency Analyzer, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, Royaume-Uni) composant un système de diodes électroluminescentes (LED), en employant un flash de 6 s d'intensité à environ 3500  $\mu$ mol de photons m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>., qui émet une lumière rouge de longueur d'onde maximale de 650 nm. Les mesures ont été effectuées 0, 24 et 72 heures après l'exposition des microagues à différentes concentrations 0, 1, 10 et 100 mg/L d'AgNPs et de TiO<sub>2</sub>NPs.

Ensuite, pour savoir le volume nécessaire de cellules d'algues pour la filtration, nous avons réalisé le calcul à l'aide de la concentration de chlorophylle a et b, selon méthode de Ritchie (2006), et les données obtenues par la méthode spectrophotométrique de Lichtenthaler (1987) démontrées ci-dessous, et la teneur totale en chlorophylle a été présentée en  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

Pour l'extraction totale de la chlorophylle, 1 ml de suspension d'algue a été centrifugé à 900 RPM pendant 10 min. Après, le culot a été récupéré et nous avons éliminé le surnageant pour ensuite suspendre de nouveau le culot dans 1 mL de méthanol à 80% à 65 °C dans un bain-marie pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, nous avons mesuré l'absorbance pour chaque échantillon à 652,4 nm, 665,2 nm et 750 nm. Puis nous avons calculé la quantité totale de chlorophylle a+b (µg/mL) à l'aide de l'équation suivante (Lichtenthaler, 1987):

Y (
$$\mu$$
g/mL) = (24.93 (A652.4 - A750) + 1.44 (A665.2 - A750) (vol.de méthanol/vol.de culture d'algue)  
(2.3)

### 2.12 Viabilité cellulaire

L'analyse de la viabilité cellulaire implique l'utilisation d'outils pour qualifier et quantifier les cellules « vivantes », c'est-à-dire les cellules métaboliquement actives dans la culture (Rogero *et al.*, 2000). La viabilité cellulaire est donc un moyen de mesurer l'effet toxique d'un polluant, d'où l'importance de l'analyser. Cette technique a été appliquée aux algues vertes *C. reinhardtii* de type sauvage (WT) et aux algues mutantes dépourvues de paroi cellulaire (CWI5) lorsque les cellules sont exposées aux NPs d'Ag et de TiO<sub>2</sub>.

Il existe d'autres techniques qui permettent d'évaluer la viabilité des cellules comme la cytométrie en flux. Mais dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé la spectroscopie en lecture de plaque à fluorescence pour évaluer la viabilité des cellules d'algues, car cette technique est une méthode robuste et facile d'accès. Nous avons utilisé le marqueur de CMFDA (5-chlorométhylfluoresceine diacétate, Molecular Probes, USA).



**Figure 2.6** Réaction moléculaire du CMFDA avec les estérases et les groupements thiols protéiques, adaptée de Vincent (2006).

Cette molécule dérivée de chlorométhylfluoresceine peut pénétrer librement à travers la membrane des cellules vivantes (Mayer *et al.*, 1997; Oukarroum *et al.*, 2007; Vincent, 2006). À partir du moment où cette molécule pénètre dans la cellule, une estérase ira convertir le CMFDA par hydrolyse en un composant fluorescent qui émettra une fluorescence visible sous lumière UV (Regel *et al.*, 2002). Ensuite, une fois que les groupes fonctionnels du chlorométhyle du CMFDA ont réagi avec les groupements thiols sur les protéines et les peptides par glutathions (Figure 2.6), il est possible de déterminer la quantité de cellules vivantes (viables), car les cellules mortes n'ont pas d'activité estérase (Vincent, 2006).

Chaque échantillon exposé aux NPs d'Ag et de  $TiO_2$  (et le témoin) est traité avec 5 mM de FDA par1 ml d'échantillon à analyser. Un temps d'incubation de 30 min à l'obscurité est nécessaire à la réaction. La fluorescence est mesurée en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm. Toutes les données de fluorescence ont été recueillies en utilisant un lecteur de plaque à fluorescence (FI/UV), Tecan, Infinite M200.

# 2.13 Détermination d'espèces réactives de l'oxygène

La formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) est mesurée à l'aide de l'indicateur en perméabilité de cellules 2-7-dichlorodihydro diacétate de fluorescéine (H<sub>2</sub>DCFDA). Le principe de la méthode pour la détection de ROS est basé sur la capacité du H2DCFDA à traverser les membranes directement, du fait qu'il est un composant apolaire. Une fois dans les cellules, il réagit avec les estérases pour donner un composé polaire qui reste bloqué dans la cellule, le 2-7-dichlorodihydro fluorescéine (H2DCF). Ce dernier va réagira avec les ROS et les peroxydases pour former un composé fluorescent, le 2-7-dichloro fluorescéine (DCF), qui servira d'indicateur pour l'analyse indirecte des ROS. C'est cette fluorescence que nous pouvons analyser, car elle est relative à la formation de ROS. La longueur d'onde d'excitation se situe à 485 nm et celle d'émission à 530 nm. Dans le contexte de la mise en évidence de la production de ROS via la photo-catalyse, il est indispensable d'extraire le matériel enzymatique pour effectuer la réaction entre la sonde et les ROS, et la réaction sera analysée avec le fluorimètre. Chaque échantillon exposé aux NPs d'Ag et de TiO<sub>2</sub> (et le témoin) a été traité avec 5 mM de H<sub>2</sub>DCFDA par 1 ml d'échantillon à tester. Un temps d'incubation de 30 min à l'obscurité est nécessaire pour la réaction. Toutes les données de fluorescence ont été recueillies en utilisant un lecteur de plaque à fluorescence (Tecan, Infinite M200) tel que décrit dans une étude précédente (Oukarroum et al., 2013).

#### 2.14 Concentration d'oxyde de Titane et d'argent

La concentration d'Ag et Ti totaux a été mesurée par spectromètre de masse à quadripôle avec ionisation à plasma 1100/Agilent 7500c, (ICP-MS, Agilent) à l'Institut des Sciences de la Mer de l'Université du Québec à Rimouski (UQAR). Nous avons utilisé la méthode basée sur l'équilibre de la densité telle que décrite par Perreaut *et al.* 

(2012). Pour suivre cette méthodologie, nous avons préalablement conditionné nos échantillons en préparant une solution gradient de saccharose de différentes concentrations (20%, 40%, 60%, 80%, 100% et 120%). Puis, 3 mL de chaque solution ont été placés dans les tubes de centrifugation Beckman à une inclinaison de 30° à partir de la concentration la plus élevée, ce qui forme différentes couches de densité et qui aidera la séparation de NPs lors de la centrifugation. Pour la centrifugation, après les essais de toxicité (36h d'exposition), 50 mL de chaque échantillon ont été prélevés et centrifugés. Le culot formé est mis au-dessus de la solution gradient de saccharose pour être tout de suite centrifugé à 1000 rpm pendant 20 min dans une centrifugeuse 5810R Eppendorf (Mississauga, ON, CA). Après la centrifugation, les cellules d'algues et les NPs sont séparées et décantées en culot au fond du tube en deux couches visibles. La couche au-dessus, formée d'algues, a été récupérée à l'aide d'une pipette pasteur et filtrée avec un papier-filtre de 0,45 µM. Ensuite, le papier-filtre a été lavé trois fois avec 10 mL d'une solution d'acide éthylène-diamine-tétraacétique à 10 mM pour éliminer les restes de NPs collés à la paroi cellulaire des algues ou sur les filtres. Pour les calculs de poids sec, les filtres ont été séchés séparément à 95 °C dans une étuve, pendant 24 h, avant et après la filtration. Enfin, les filtres et les milieux de culture utilisés comme blanc ont été placés dans des fioles en téflon lavées à l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 10%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% et l'eau nanopure) (Perreault, 2012).

Pour la digestion en vue d'une analyse ICP-MS, nous avons ajouté 1 mL de HNO<sub>3</sub> et 1 mL de  $H_2O_2$ . Les fioles avec bouchon ont été déposées dans un bain d'eau à 90 °C jusqu'à digestion complète (environ 1h30). Pendant la digestion, les fioles ont été ouvertes régulièrement pour laisser échapper le gaz formé. Après l'hydrolyse, les échantillons ont été transférés dans un tube d'essai et on y a ajouté 5 mL d'eau nanopure pour une dilution à 10% de HNO<sub>3</sub> (dilution 9 :10). Les échantillons ont été refermés avec de la paraffine, puis gardés au réfrigérateur jusqu'au moment d'effectuer les analyses par ICP-MS (Chokouadeu, 2016; Séguin-Heine, 2013).

## 2.15 La spectrométrie de masse ICP-MS

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse instrumentale rapide, utilisée pour la séparation d'espèces ioniques en fonction de son rapport masse/charge (m/z). Sa capacité d'identification est utilisée pour des ions inorganiques simples et des molécules complexes. Celle méthodologie d'analyse peut être utilisée à la fois dans le cadre d'une analyse qualitative ou d'une analyse quantitative. De plus, l'ICP-MS offre la possibilité d'analyser simultanément plusieurs éléments chimiques dans des concentrations de l'ordre du ng L<sup>-1</sup>, et de fournir une grande précision. En résumé, le principe de fonctionnement de cette technique combine à la fois une torche à plasma (Inductif Coupled Plasma, ICP) utilisée pour la ionisation des constituants et un spectromètre de masse (MS) utilisé pour l'identification de ces ions. Dans ce travail, l'ICP-MS nous a permis de quantifier les métaux totaux d'Ag et de Ti dans le milieu de culture et dans la biomasse des algues, à partir des étapes essentielles de la méthode: l'introduction et la nébulisation de l'échantillon, l'ionisation, la phase de séparation en masse et enfin la détection.

L'ICP-MS se compose de cinq parties principales à savoir:

- 1. un système d'introduction d'échantillon, généralement nébuliseur;
- une source d'ions, dans ce cas le plasma (ICP) qui est une source de haute température qui favorise l'ionisation;
- l'interface qui favorise la focalisation des ions, soit le cône de prélèvement et le skimmer;
- 4. un système d'analyseur de masse (quadripôle);
- 5. un système de détection d'ions (un détecteur multiplicateur d'électrons).

#### 2.16 Principes de base de la RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique découverte en 1946 par les chercheurs Felix Bloch et Edward Purcell, où ils ont montré que les noyaux des atomes absorbaient un rayonnement électromagnétique dans un champ magnétique (B) intense. Pour cela, ils ont observé les signaux d'absorption de radiofréquence (RF), notamment de l'eau et de la cire. En 1952, ils ont remporté le prix Nobel de physique pour cette découverte. Actuellement, la RMN est utilisée pour l'identification des mélanges et la détermination de la structure de molécules, des plus simples aux plus complexes, tels que les polymères ou bio-polymères (Hayki, 2011). Elle est aussi utilisée pour des études cinétiques de réactions chimiques et également dans des applications industrielles telles que la surveillance de réactions pour des analyses quantitatives de rendement et ce, sans avoir recours à des prétraitements ou tout type de séparation physique entre les échantillons (Toukach et Ananikov, 2013). De plus, une des possibilités les plus intéressantes offertes par la RMN est l'étude dynamique avec une capacité à sonder les mouvements moléculaires sur une gamme de temps très large, à l'échelle atomique (Arnold *et al.*, 2015; Marcotte, 2014)

#### 2.16.1 Généralités de la RMN

La RMN exploite une caractéristique de certains noyaux, soit le spin, qui existe seulement si A ou Z est impair. La spectroscopie de RMN est due à l'interaction des noyaux atomiques avec un rayonnement électromagnétique en présence d'un champ magnétique, où l'énergie est absorbée ou émise en fonction de l'équation de Planck:

$$\Delta E = hv \tag{2.4}$$

où :

- $\Delta E$  = Différence d'énergie entre les états initial et final
- $h = \text{Constante de Planck} (6,626068 \times 10^{-34} \text{m}^2 \text{.kg.s}^{-1})$
- v = Fréquence d'irradiation (Hz)

Cette fréquence d'irradiation est appliquée comme une impulsion de radiofréquence.

On peut se représenter 6 spins d'un noyau comme tournant autour d'un axe avec un moment angulaire de spin. Le moment angulaire de spin est exprimé par le nombre quantique de spins (I), ce qui détermine le nombre de valeurs possibles de spin donné pour un noyau. Selon la théorie quantique, la composante du moment angulaire est quantifiée et possède un module et une direction. Le noyau a 2I+1 états discrets, et la composante du moment angulaire de ces états dans une direction quelconque auront des valeurs I, I-1, I-2 ... -I. Par un noyau de spin I =  $\frac{1}{2}$ , en présence d'un champ magnétique, il existe donc deux niveaux d'énergie où les spins séparés peuvent se disposer en faveur ou contre le champ magnétique, et qui seront différemment peuplés par les spins. Ces niveaux ont une énergie différente dans le champ magnétique. Cette séparation des niveaux d'énergie dans un champ magnétique (B<sub>0</sub>) est appelée effet Zeeman (Figure 2.7):



**Figure 2.7** Représentation des niveaux d'un noyau d'énergie avec  $I = \frac{1}{2}$  quand ils sont exposés au champ B<sub>0</sub> (Marcotte, 2014).

La différence d'énergie entre ces deux niveaux peut être calculée par l'équation 2.5.

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \tag{2.5}$$

Où:

 $\gamma$  = rapport gyromagnétique

 $B_0 = Champ magnétique$ 

La distribution de la population de spins entre l'état fondamental et l'état excité est donnée par la distribution de Boltzmann (Équation 2.6).

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \tag{2.6}$$

Où:

 $N_{\beta}$  = population au niveau d'énergie plus élevée

 $N_{\alpha}$  = Population dans le niveau inférieur

k = constante de Boltzmann (1,3806 x  $10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>)

T= température (K)

Dans les conditions expérimentales habituelles, on constate que la différence d'énergie est très faible entre les états, ce qui se traduit par seulement un petit excès de la population dans l'état d'énergie plus faible ( $\alpha$ ). Cette différence de population se traduit par une magnétisation résultante (M<sub>0</sub>), qui est la somme vectorielle de tous les moments magnétiques ( $\mu$ ) précessant autour de B<sub>0</sub> (équation 2.7).

$$M_0 = \Sigma \mu \tag{2.7}$$

En conséquence de la faible différence de la population, la technique RMN, tout en étant un outil puissant d'élucidation structurale au niveau moléculaire, est de faible sensibilité.

Le spin nucléaire a une conséquence analogue à une charge électrique en rotation: le moment magnétique nucléaire  $(\vec{\mu})$ . Ce moment est orienté dans l'axe de spin et est proportionnel au moment angulaire de spin  $(\vec{I})$ . La constante de proportionnalité (appelée rapport gyromagnétique) relie le moment angulaire de spin au moment magnétique nucléaire; cette constante a des valeurs différentes pour chaque type (équation 2.8):

$$\mu = \gamma I \tag{2.8}$$

La RMN se produit quand un noyau de moment magnétique non nul est placé dans un champ magnétique externe (B<sub>0</sub>), résultant en une interaction entre le  $\vec{\mu}$  et le B<sub>0</sub> qui entraîne un mouvement de précession des spins autour de la direction de B<sub>0</sub> de fréquence angulaire ( $\omega_0$ ), connue comme la fréquence de Larmor (Figure 2.8). Cette fréquence est proportionnelle au champ magnétique B<sub>0</sub> et au rapport gyromagnétique (équation 2.9).

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad \text{ou} \quad \nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$
 (2.9)

Elle correspond à la fréquence de résonance du noyau étudié.



**Figure 2.8** Représentation de la précession des spins dans le champ magnétique  $B_0$  (Marcotte, 2014).

Le comportement de la magnétisation dans un champ magnétique peut être décrit par le vecteur représenté par les coordonnées x, y et z, où la direction z est celle de l'aimantation ( $M_0$ ) alignée sur le champ magnétique  $B_0$  à l'équilibre.



Figure 2.9 Magnétisation résultante après application d'une impulsion à 90°

L'application d'une impulsion de radiofréquences est équivalente à l'application d'un champ magnétique B<sub>1</sub>. Pendant l'application de B<sub>1</sub> le vecteur de magnétisation (M<sub>0</sub>) qui était aligné suivant la direction +Z, soufre une impulsion qui conduit le vecteur hors de l'équilibre et le fait tourner autour de l'axe des y. Simultanément, la distribution de population de Boltzmann est changée en raison des transitions entre les niveaux  $\alpha$  et  $\beta$ . L'aimantation résultante est appelée M<sub>0</sub>. L'angle entre l'axe z et Mz varie proportionnellement à la durée d'impulsion de haute fréquence appliquée à l'échantillon et à l'amplitude de B<sub>1</sub> (équation 2.11)(Marcotte, 2014):

$$\theta = \gamma B_1 t_p \tag{2.10}$$

Où:

 $\theta$  = Angle entre l'aimantation dans l'axe z

t<sub>p</sub> = durée de l'impulsion de Rf

 $B_1$  = intensité du champ de Rf

Après l'application de l'impulsion, les spins nucléaires ont tendance à revenir à leur état initial d'équilibre, avant de passer de nouveau à la précession autour de  $B_0$ . La

décroissance du signal jusqu'à l'état d'équilibre est détectée et connue comme signal de précession libre, FID (*Free Induction Decay*).

Le processus par lequel les spins reviennent à l'équilibre ( $M_z=M_0$  et  $M_{XY}=0$ ) est appelé relaxation. Elle implique deux processus distincts et simultanés: la relaxation longitudinale ( $T_1$ ), qui décrit le retour à l'équilibre le long de la direction z, et la relaxation transversale ( $T_2$ ), qui décrit le retour à l'équilibre dans le plan XY.

#### 2.16.2 Relaxation Longitudinale

La relaxation longitudinale est caractérisée par une décroissance exponentielle de premier ordre dont la constante de temps est appelée  $R_1 \left(\frac{1}{T_1}\right)$ . C'est une mesure de la durée de vie moyenne des noyaux dans l'état d'énergie plus élevée. Cette mesure de temps dépend du rapport gyromagnétique du noyau et *peut* être fortement affectée par la mobilité du réseau. En effet, pour atteindre l'équilibre, une interaction est nécessaire entre le système de spin et le réseau. Le transfert d'énergie se produit grâce à la présence de moments magnétiques oscillants, produits entre autres par des mouvements de vibration et de rotation des molécules avec des fréquences voisines de la fréquence de Larmor qui sont donc en mesure d'absorber cette énergie. Ce processus est aussi connu sous le nom de relaxation spin-réseau. Par conséquent si la mobilité augmente, les fréquences de vibration et de rotation de se produir et, par conséquent, diminue la valeur de T<sub>1</sub> (Marcotte, 2014; Pochapsky, 2007).

La technique la plus couramment utilisée pour mesurer le  $T_1$  est la séquence dite d'inversion-recouvrement illustré à la figure 2.10. Dans cette technique, le retournement de l'aimantation se produit par une impulsion de 180°. On attend après la récupération de l'aimantation pendant une période de temps donnée ( $\tau$ ) pour que se
produise la relaxation. Comme il y a aimantation seulement le long de Z, tout le processus de relaxation sera purement longitudinal. Pour mesurer la valeur de l'aimantation longitudinale  $M_z$  ( $\tau$ ), nous appliquons une impulsion de 90°. La croissance de M<sub>0</sub>, de + M<sub>0</sub> à -M<sub>0</sub> dépend du temps de relaxation T<sub>1</sub> et de  $\tau$  (équation 2.12).

$$M_z(\tau) - M_0 = -2M_0 \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_c}\right)$$
 (2.11)

Où:

 $M_z(\tau) =$  Valeur d'aimantation longitudinale après un temps  $\tau$ 

 $M_0$  = Aimantation résultante ou aimantation d'équilibre

 $\tau$  = Temps entre les impulsions

 $T_1$  = Temps de relaxation longitudinale

d<sub>1</sub>= recyclage Temps



**Figure 2.10** Représentation de la séquence d'impulsion utilisée dans la technique d'inversion-recouvrement.  $d_1$  = temps de répétition entre deux accumulations successives;  $\tau$  = le délai d'incrémentation;  $t_1$  = temps d'acquisition

On effectue une série de mesures en faisant varier  $\tau$  (figure 2.110)

Les valeurs  $T_1$  sont calculées en portant en graphique les valeurs expérimentales d'intensité (I) pour différentes valeurs de  $\tau$  grâce à l'équation 2.13.

$$I(\tau) = I(\infty) \left[ 1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_1}\right) \right]$$
(2.12)

Où:

 $I(\tau) =$  Intensité signe sur un temps de  $\tau$ .

 $I(\infty)$  = Intensité proportionnelle à l'équilibre d'aimantation mesurée.



**Figure 2.11** Évolution temporelle de l'aimantation longitudinale du spectre <sup>1</sup>H d'échantillons d'acide gras avec variable  $\tau$ .

Pour des mesures de  $T_1$ , il est crucial d'identifier correctement l'intensité (ou l'aire) pour chaque valeur de pic. L'acquisition de plusieurs FID est importante afin d'augmenter le rapport signal sur bruit.

# 2.16.3 Méthodes utilisées pour augmenter le signal et la résolution des spectres en RMN de l'état solide.

Les échantillons utilisés en RMN de l'état solide sont « normalement » des solides poly-cristallins ou amorphes et les spectres obtenus sont larges et de faible intensité en raison de la faible abondance naturelle des isotopes actifs en RMN. Les signaux sont aussi élargis à cause de l'anisotropie des interactions des spins dans l'état solide. Les spectres résultants sont appelés spectres de poudre. Cependant, il existe des techniques

pour éliminer l'effet de l'anisotropie et ainsi obtenir des spectres de haute résolution. Dans les sections suivantes, nous décrirons les techniques de RMN à haute résolution qui ont été utilisées dans ce travail.

#### 2.16.4 Rotation à l'angle magique (MAS)

Cette expérience a été proposée dans le but d'éliminer les interactions anisotropes. Les spectres traduisent donc uniquement la moyenne isotrope de ces interactions. En effet, il est possible d'annuler l'effet de la dépendance orientationnelle  $(3\cos^2\theta-1)$  des interactions dipolaires, quadripolaires (au premier ordre) et de déplacement chimique, simplement en effectuant une rotation rapide de l'échantillon à des vitesses de l'ordre de la dizaine de kHz autour d'un angle de 54.7° par rapport au champ magnétique (Peersen et Smith, 1993)



**Figure 2.12** Principe de la rotation à l'angle magique. L'angle magique est 54,7°, compris entre le champ magnétique externe et l'axe d'un échantillon en rotation.

En effet, l'analyse des interactions, autant dipolaires magnétiques que des interactions d'anisotropie de déplacement chimique, dépendent du facteur ( $3\cos^2\theta$ -1). Pour chacune d'elles,  $\theta$  représente l'angle entre  $\overrightarrow{B_0}$  et l'axe z des systèmes des axes principaux du

tenseur de chacune de ces interactions. Prenons comme exemple un échantillon qui produit des interactions dipolaires magnétiques hétéronucléaires. Le champ local de dipôle magnétique produit par le noyau 1 dans le site du noyau 2 le long de la direction z, est directement proportionnel à l'équation  $(3\cos^2\theta-1)$  qui décrit l'interaction dipolaire magnétique. Si ce terme était nul, les champs dipolaires locaux le seraient aussi (aucune interaction). Lorsque l'angle est de  $\theta = 54,7^{\circ}$ , connu comme l'angle magique (d'où MAS, Magic Angle Spinning), les termes en  $3\cos^2\theta-1$  s'annulent. La position de la raie obtenue correspond au déplacement chimique isotrope ( $\delta_{iso}$ ) et fournira de l'information sur l'environnement chimique du noyau (Séguin-Heine, 2013).

## 2.16.5 Polarisation croisée (Cross Polarisation, CP)

La technique de polarisation croisée-CP, vient atténuer le problème de la faible abondance naturelle de noyaux rares et leur faible réceptivité. L'effet de la CP est de provoquer une augmentation de l'aimantation des noyaux rares de type <sup>13</sup>C grâce aux noyaux abondants proches et de  $\gamma$  élevé comme le <sup>1</sup>H. Le rapport signal/bruit peut en théorie être amélioré par un facteur  $\gamma_H/\gamma_C \approx 4$  par exemple pour le couple <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (Marcotte, 2014).

Le transfert de polarisation du noyau abondant (*I*) au noyau rare (*S*) est favorable thermodynamiquement. Le contact « thermique » entre les deux noyaux est établi lorsque la condition de Hartmann-Hahn,  $\gamma_H B_H = \gamma_C B_C$  est satisfaite par l'application de champs de RF  $B_H$  et  $B_C$  aux noyaux *I* et S simultanément. Pour résumer, lorsque les deux systèmes de spins présentent les mêmes fréquences angulaires  $\omega_I (=\gamma B_I)$ , conditions obtenues en ajustant l'intensité  $B_I$  du champ de radio-fréquences qui est appliqué, les conditions de Hartmann-Hahn sont satisfaites et le transfert de polarisation est fonctionnel. Voir l'illustration de la séquence d'impulsions sur la figure 2.13 (Marcotte, 2014; Séguin-Heine, 2013).



**Figure 2.13** Séquence d'impulsions d'une expérience CP en <sup>13</sup>C avec découplage de protons.

La technique de RMN d'impulsion directe (*direct pulse*, DP) est la plus simple séquence en RMN. Il s'agit d'appliquer une impulsion de RF sur les noyaux à mesurer. L'impulsion de 90° sur le noyau d'intérêt fournit un maximum de signal. Cette expérience peut être répétée en attendant un délai de recyclage cinq fois plus important que le plus long  $T_1$  dans l'échantillon pour assurer que tous les signaux du spectre soient retournés à l'équilibre. Ainsi, l'intensité des signaux peut être utilisée pour quantifier la fraction des spins qui contribuent à chacun d'eux.



Figure 2.14 Séquence d'impulsions avec excitation directe et découplage hétéronucléaire.

#### CHAPITRE III

# ÉTUDE DE TOXICITÉ INDUITE PAR DES NANOPARTICULES D'ARGENT ET D'OXYDE DE TITANE CHEZ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII (AVEC ET SANS PAROI CELLULAIRE)

Il y a un consensus croissant selon lequel la caractérisation des nanoparticules est un élément essentiel de l'évaluation de la toxicité dans les systèmes biologiques (Hood, 2004). La caractérisation appropriée des tests de suspensions est un paramètre important pour s'assurer que les résultats soient reproductibles et que les données obtenues constituent une base pour mieux comprendre comment les propriétés des nanoparticules peuvent influencer la détermination des effets toxicologiques.

#### 3.1 Caractérisation de NPs d'Ag et TiO<sub>2</sub> et des microalgues en milieu cellulaire

La caractérisation des NPs est extrêmement importante pour les études toxicologiques, mais réaliser une caractérisation complète est normalement complexe, coûteuse et rare, à cause du nombre de méthodologies requises. Dans ce travail nous avons mesuré les la tailles et la charge de surface des NPs, car ces analyses sont considérées comme essentielles dans les études en nanotoxicologie. De plus, il a été possible de déterminer la stabilité des solutions et de la taille des agglomérats identifiés dans l'échantillon.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les NPs et les micro-algues. Pour ce faire, nous avons d'abord utilisé le Pz enfin de déterminer les charges des NPs, en appliquant dans la solution un courant électrique qui permet de déterminer la charge de surface. Le Pz a été déterminé en faisant la moyenne des dix lectures sur le même

échantillon. Les valeurs trouvées pour les deux NPs de l'étude et les cellules d'algues *C. reinhardtii* avec et sans paroi cellulaire sont présentées dans le Tableau 3.1.

**Tableau 3.1** Potentiel zeta des NPs d'argent, d'oxyde de titane et des deux types de microalgues Chlamydomonas reinhardtii.

	AgNPs (10 mg/L)	TiO <sub>2</sub> NPs (10 mg/L)	C. reinhardtii WT	C. reinhardtii CW15
Pz (mV)	-34 ± 3	-13 ± 3	-17 ± 4	$-5,3 \pm 0,3$

La valeur trouvée pour la suspension de NP TiO<sub>2</sub> était -13 mV dans le milieu de culture Minimum Tris, le qualifiant de suspension instable (voir Tableau 2.1) causant l'agglomération en raison de la faible valeur de Pz. On sait que, selon une plus grande valeur absolue de Pz, il est probable que la suspension soit stable du fait que les particules chargées se repoussent et cette force doit surmonter la tendance naturelle de l'agglomération. Selon une étude réalisée par Ji et al. (Ji et al., 2010), les Pz pour les TiO<sub>2</sub>NPs ont des valeurs négatives d'environ -10 mV pour différents dispersants ou milieu de culture, ce qui confirme les résultats présentés ici. Le Pz de la suspension avec les NPs d'argent a également été mesuré et a été comparé aux NPs de TiO2. Le Pz obtenu est négatif et la valeur est de -34 mV (Tableau 3.1), comme dans des études présentées par Oukarroum et al. (2013). Aussi, des études précédentes montrent que les suspension d'AgNPs par rapport à la suspension de TiO<sub>2</sub>NPs sont plus stables selon le milieu (Cupi et al., 2016). Enfin, nous avons mesuré le Pz des microalgues WT et CW15 dans l'optique de comparer les charges entres les deux souches. Ceci nous a confirmé la différence de valeurs entre les algues qui est de -17 mV pour les algues avec paroi et -5,3 mV pour les algues sans paroi. De plus, ces résultats nous ont démontré que les algues WT sont plus stables, donc plus de charges sur la paroi cellulaire que les souches CW15.

Dans un second temps nous avons déterminé les tailles des NPs en utilisant le *Dynamic Light Scattering* (DLS) dont la technique est basée sur le mouvement brownien des particules en solutions, comme dans l'analyse précédente, mais sans application de courant dans les solutions tel que montré à la figure 3.1. Les échantillons analysés ont indiqué que, lorsque les mêmes NPs d'Ag et TiO<sub>2</sub> ont été mises en suspension dans un milieu de culture, il y avait une agglomération d'un diamètre équivalent à 872 nm et à 850 nm respectivement tel que les agglomérats trouvés près des cellules algales de *C. reinhardtii* observés par TEM (Figure 3.3).

Des études précédentes de Ji et al. (2010) montrent que les NPs de TiO<sub>2</sub> en suspension dans un milieu de culture cellulaire sans agents dispersants avaient des tailles d'agglomérats qui variaient de 770 nm à 1052 nm en fonction du type de milieu, compatibles avec celles de notre étude (Ji et al., 2010). Par contre Oukarroum et al. (2013) ont pu observer que, dans le milieu de culture utilisé pour effectuer des tests toxicologiques et pour la croissance cellulaire des algues vertes Chlorella vulgaris, la taille moyenne des NPs d'Ag trouvée dans le milieu à une concentration de 10 mg/L était de 110 nm à 449 nm. La différence entre ces valeurs et celles trouvées dans notre étude dépend du type du milieu de culture. En analysant nos résultats et en les comparant avec ceux de la littérature, on peut dire que les variations de la taille des NPs peuvent se produire selon la composition du milieu de culture qui peut aussi interférer dans les agrégations de NPs (Park et al., 2013). Aussi lorsque les NPs entrent en contact avec le liquide, elles acquièrent une charge électrique sur leur surface, ce qui affecte la distribution d'ions dans le voisinage, augmentant la concentration de contre-ions à côté de la surface. Cela peut faciliter l'agglomération de ces NPs (Cheng et al., 2011). De plus, généralement la taille mesurée par DLS est plus grande que la dimension réelle, car elle se rapporte au rayon hydrodynamique. Le logiciel de cet instrument utilisé calcule directement les diamètres. En outre, avec la technique de DLS, les particules plus grosses ont plus de poids dans les résultats, car il y a plus de diffusion de lumière, même en quantité franchement plus faible par rapport aux NPs de plus petites tailles.



**Figure 3.1** Distribution de la taille des nanoparticules d'Ag et  $TiO_2$ , préparées en milieu de culture Minimum-Tris. Suspension Stock de 10 mg/L préparée et soumise aux ultrasons pendant 2 min à l'aide d'un sonicateur avant utilisation.



**Figure 3.2** Microphotographie optique utilisée pour observer les changements morphologiques algaux des *Chlamydomonas reinhardtii* exposées à une concentration de 10 mg/L de NPs d'Ag et TiO<sub>2</sub> pendant 72h. (A): le contrôle, cellules *Wild-Type* (WT) non exposées; (D): le contrôle, cellules mutantes (CW15) non exposées; (B): cellules WT exposées avec NPs d'Ag; (E) cellules CW15 exposées avec d'Ag; (C): cellules WT exposées avec TiO<sub>2</sub>; (F) cellules CW15 exposées avec NPs de TiO<sub>2</sub>.

Les résultats obtenus en microphotographie optique ont démontré que les effets des NPs d'Ag et TiO<sub>2</sub> sur *C. reinhardtii* sont très différents pour les souches WT et CW15, comme par exemple l'agrégation des microalgues. Les cultures d'algues ont été exposées à 10 mg/L de NPs pendant 72 h et ont créé la formation d'agrégats de cellules par rapport au témoin (0 mg/L) (Figure 3.2). Nous avons noté ici que les plus grands agrégats ont été observés dans les souches WT ayant une paroi cellulaire exposée à 10 mg/L, probablement à cause des NPs restées collées sur la paroi cellulaire et les particules chargées qui se repoussent les unes les autres et peuvent faciliter l'agglomération de ces cellules.

## 3.2 Changements cellulaires en présence des NPs

Les interactions des AgNPs et des TiO<sub>2</sub>NPs sur les cellules des *C. reinhardtii* ont été observées par microscopie électronique à transmission (TEM) afin de vérifier les changements morphologiques et les interactions des NPs avec la paroi cellulaire. Les résultats d'analyse par microscopie électronique à transmission (TEM) peuvent être vus sur la Figure 3.3. Les images ont montré que des cellules non exposées ont des formes ovales d'environ 6,5 mm de longueur et de 4,0 mm de largeur et ont des structures plus organisées (Figures 3.3 A et B). Les noyaux et les nucléoles sont grands, suggérant une activité intense avec de nombreux ribosomes non structurés et des complexes de Golgi visibles. Les cellules exposées aux NPs de TiO<sub>2</sub> devenaient plus grandes, soit d'environ 8,0 mm de longueur et de 5,3 mm de largeur, mais demeuraient moins bien structurées que les cellules cultivées sans addition de NPs (Figure 3.3 – B et C). Les mitochondries ont été observées et démontraient des traces plus petites de plastogeobules (lipides) que la normale dans le chloroplaste. De plus, le cytoplasme semblait s'éloigner de la paroi cellulaire formant des villosités. Les cellules traitées avec les AgNPs apparaissaient également plus grandes, soit environ 9,0 mm de

longueur sur 6,5 mm de largeur, et de la même manière que dans les expositions avec de TiO<sub>2</sub>NPs, il y avait des structures désordonnées présentes dans le cytosol (Figure 3.3 E et F).



**Figure 3.3** Microscopie électronique des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* exposées à 10 mg/L de NPs pendant 72h. (A): le contrôle, cellules Wild-Type (WT) non exposées; (D): le contrôle, cellules mutantes (CW15) non exposées; (B) : cellules WT exposées avec NPs d'Ag; (E) cellules CW15 exposées avec d'Ag; (C) : cellules WT exposées avec TiO<sub>2</sub>; (F) cellules CW15 exposées avec NPs de TiO<sub>2</sub>. Abréviations: <u>Am</u>, l'amidon; <u>N</u>, noyau; <u>Pyr</u>, pyrenoïde; Vc, vacuole; <u>NPs</u>, nanoparticules.

Les Figures 3.3 A et D montrent des détails des pyrénoïdes et des grains d'amidon dans les cellules de contrôle. Le pyrénoïde y est entouré de grains d'amidon bien construits. Certains thylakoïdes traversent les grains et entrent dans le pyrénoïde. Les grains d'amidon du chloroplaste sont nombreux, bien formés et sont de grande taille. Dans les cellules exposées aux NPs, les pyrénoïdes semblent avoir augmenté en taille. Les grains d'amidon étaient visiblement altérés, plus petits, plus minces et moins nombreux que chez les témoins.

Lorsque les algues ont été exposées à des NPs, de grands agglomérats composés de cellules d'algue et de NPs ont pu être observés (Figure 3.3). L'agglomération s'est révélée plus importante dans la culture cellulaire exposée aux AgNPs qui présentaient plus d'agglomérats de plus grande taille que la culture cellulaire exposée à des  $TiO_2NPs$ . Ces résultats sont en analogie aux résultats précédents obtenus par la micrographie optique (Figure 3.1) et par DLS (Figure 3.2).

Quant à l'action des NPs sur les algues, les images ont montré que la paroi cellulaire des *C. reinhardtii* sert de barrière protectrice à l'entrée des contaminants dans les algues et de site primaire d'interaction pour les NPs, qui sont biocompatibles avec les principaux composants formés par la paroi cellulaire: les glucides et des protéines (habituellement les glycoprotéines et polysaccarides) (Singh *et al.*, 2009; Sunil, 2009). Aussi, les groupements anioniques abondants des fonctions acide carboxylique présentes dans les pectines et les glycoprotéines ont une grande affinité pour les NPs (Collard et Matagne, 1990). Cependant, malgré cette première barrière, les NPs se retrouvent aussi l'intérieur des cellules, via les canaux calciques, les canaux de la famille ZIP (zrt-irt likeprotein) et des transporteurs de métaux divalents (DMT) (Rosakis et Köster, 2004; Vincent, 2006). De plus, les interactions entre les algues et les NPs peuvent varier selon la différence de composition de la paroi cellulaire, la biodisponibilité des NPs et la charge de surface sur ces particules (Farre *et al.*, 2009). Ainsi, une hypothèse a été avancée que seulement les petites NPs inférieures à 20 nm peuvent plus facilement rentrer dans la paroi cellulaire, car les pores de la paroi ont

une taille de 5 nm à 20 nm (Hoober, 1989). De plus, contrairement à d'autres organismes unicellulaires comme les bactéries, les cellules eucaryotes sont capables d'invagination (endocytose et phagocytose) (Navarro *et al.*, 2008). Enfin, la réactivité des NPs sur les algues peut avoir un impact négatif sur les enzymes photosynthétiques des algues, conduisant à une diminution de la teneur totale en chlorophylle comme le montrent les analyses suivantes (section 3.4) et les dommages à la paroi cellulaire.

#### 3.3 Analyses par spectroscopie d'absorption atomique (ICP-MS)

En général, l'un des mécanismes qui causent la toxicité des NPs est la grande solubilité d'Ag et Ti, comme l'ont expliqué Jin *et al.* (2010) (Ji *et al.*, 2010). Une analyse a été réalisée par spectroscopie d'absorption atomique à plasma (ICP-MS) pour les deux échantillons. Les valeurs trouvées pour la concentration total d'Ag et Ti dans le milieux en suspension à 0, 1, 10 et 100 mg/L et respectivement pour la bioaccumulation de NPs dans les microalgues sont représentés sur les Figures 3.4 et 3.5.



**Figure 3.4** Quantification de métaux totaux de l'Ag et du Ti dans le milieu de culture minimum-TRIS par ICP-MS. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

Grâce à cette technique, il a été possible de quantifier la concentration totale de l'Ag et du Ti dans les deux suspensions d'essai utilisées comme point de départ pour la caractérisation des NPs et les tests de toxicité. Ces analyses ont été réalisées car la solubilité de ces métaux peut influencer fortement la réponse cytotoxique des organisme d'essai (Navarro *et al.*, 2008). De ces résultats sur la figure 3.4, il a été possible de comparer les métaux solubles à différentes concentrations dans le milieu de culture et observer que les valeurs d'AgNPs solubles augmentent selon la concentration de la solution traitée par rapport au contrôle. En revanche, pour les TiO<sub>2</sub>NPs, les valeurs augmentent puis stagnent aux environs de 30 ng/L, en accord avec la littérature qui a démontré leur relative insolubilité (Brunner *et al.*, 2006). Concentration

Les plantes et algues, en général, sont très sensibles à la toxicité de ces métaux, démontrant un trouble métabolique et une inhibition de la croissance lorsque exposés à des concentrations légèrement supérieur à la normale (Fernandes et Henriques, 1991). De plus, des études précédentes ont démontré que les ions de ces métaux augmentent la sensibilité des niveaux de photo inhibition pour la lumière et génèrent un stress oxydatif en concurrence avec d'autres métaux comme micronutriments essentiels. Dans les organismes photosynthétiques le stress oxydatif causé par l'exposition à ces métaux est l'effet toxique le plus significatif (Navarro *et al.*, 2008).

La bioaccumulation des NPs de  $TiO_2$  d'Ag à l'intérieur des cellules de *C. reinhardtii* a été analysée quantitativement par ICP-MS. Une importante absorption de ces métaux a été observée (Figure 3.5).



**Figure 3.5** Quantification des métaux totaux de l'Ag et du Ti dans la biomasse des microalgues par ICP-MS après une exposition de 100 mg/L. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

**Tableau 3.2** Comparaison de la concentration intracellulaire d'Ag et de Ti (ng/mg) entre les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* (WT et CW15).

Contrôle	Contrôle	CW15 [Ti]	WT [Ti]	CW15 [Ag]	WT [Ag]
CW15	WT	(ng/mg)	(ng/mg)	(ng/mg)	(ng/mg)
0,0	0,0	25	> 9	3	< 10

Ces résultats montrent que lorsque les NPs sont exposés sur les *C. reinhardtii* (WT et CW15), il y a une augmentation significative de la concentration en métaux par rapport à l'échantillon contrôle. La bioaccumulation des Ti et Ag dans les algues WT est proche, d'environ 9 ng/mg et 10 ng/mg respectivement. Pour les algues CW15 la bioaccumulation de Ti et Ag est très différente, d'environ 25 ng/mg et 3 ng/mg respectivement. Cette réponse peut représenter la bioaccumulation de ces éléments par les *C. reinhardtii* qui peuvent bio-accumuler des métaux comme démontré par des études précédents (Perreault *et al.*, 2014). Sachant que les micros algues sans paroi peuvent plus facilement absorber des petites NPs par rapport aux WT avec paroi (Nabeshi *et al.*, 2010), cela expliquerait que les TiO<sub>2</sub>NPs qui sont un peu plus petites que les AgNPs (Figure 3.1) soient plus bioaccumulées dans les CW15.

Les résultats de TEM (Figure 3.3) montrent une grande présence de TiO<sub>2</sub>NPs dans les cellules des microalgues, par contre une faible présence d'AgNPs (Figure 3.3). Ainsi, les effets inhibiteurs démontrés sur les algues en présence des AgNPs pourraient être expliqués par des ions d'Ag libérés dans le milieu de culture et par la formation de gros agglomérats pouvant réduire la lumière disponible pour les cellules d'algues, et ainsi inhiber leur croissance (Brunner *et al.*, 2006). D'après Matsumura *et al.* (2006), la libération des ions d'argent était responsable de la toxicité des nanoparticules d'argent, car ces derniers interagissent avec les groupements thiols des protéines provoquant ainsi une inactivation des enzymes (Matsumura *et al.* 2003).

Il faut aussi noter que, les conditions du milieu de culture, comme le pH, la température peut avoir été favorisée par la distribution de taille des NPs (Oukarroum *et al.*, 2012). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Oukarroum *et al.*, 2014), qui a démontré l'importance de comprendre la stabilité colloïdale et la solubilité des nanoparticules en suspension pour l'écotoxicologie.

Ainsi, le transport de ces solutés vers les cellules se fait à travers le processus de diffusion. Typiquement, le soluté est transporté dans la cellule sous sa forme ionique soluble dans le milieu. D'abord il existe des études qui démontrent que le paroir cellulaire des plantes n'absorbe pas de grandes nanoparticules. En revanche, ils absorbent les ions solutés métalliques libérés par la nanoparticule en solution. De plus, dans la littérature il n'y a pas toujours de consensus quant à leur biodisponibilité de ces NPs par rapport à ses pouvoir toxique (Leclerc et Wilkinson, 2014).

#### 3.4 Détermination de la chlorophylle totale

Cette méthodologie a été réalisée par la méthode de spectrophotométrie de (Lichtenthaler, 1987). Ces paramètres ont été utilisés comme un indicateur de physiologique des cellules algales.

L'exposition des deux souches des *C. reinhardtii* WT et CW15 aux NPs d'Ag et de  $TiO_2$  (Figure 3.6) induit une diminution significative de la teneur en chlorophylle (Chl) (en microgrammes par millilitre) dans la culture d'algues suite à 72 h d'exposition à 23°C. D'abord, en analysant ces résultats nous avons observé que:

 Le contenu en chlorophylle est plus affecté par les AgNPs que par les TiO<sub>2</sub> et ce, pour les deux souches;

- 2. Avec les AgNPs, l'effet est équivalent sur les deux souches à toutes les concentrations testées;
- 3. Les TiO<sub>2</sub>NPs ont un effet moins marqué sur les CW15 que sur les WT;
- 4. Lorsque que la concentration des NPs est augmentée nous observons une forte inhibition du contenu en Chl totale dans *C. reinhardtii* (WT et CW15) tel que démontré sur la figure 3.6 et comparé sur la variation relative (tableau 3.3).



**Figure 3.6** Diminution de la teneur en chlorophylle totale chez *Chlamydomonas* reinhardtii (WT et CW15) exposées aux NPs d'Ag (A) et de TiO<sub>2</sub> (B) pendant 72 h  $(n=03) \pm SD$ . Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

**Tableau 3.3** Comparaison du contenu en chlorophylle totale entre les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* (WT et CW15) avec aux NPs (résultats obtenus par calculs de variation relative).

Concentration (mg/L)	WT AgNPs		CW15 AgNPs	WT TiO2NPs		CW15 TiO2NPs
1	82%	<	88%	62%	>	20%
10	93%	>	84%	63%	>	44%
100	96%	>	93%	96%	>	40%

En comparant les résultats obtenus sur la figure 3.6, nous pouvons constater un changement déjà à une concentration de 1 mg/L, en accord avec la littérature (Chen *et al.*, 2012b; Oukarroum *et al.*, 2012). D'après Oukarroum *et al.* (2012), les algues d'eau douce et marine ont démontré une forte sensibilité aux AgNPs causant une forte inhibition du contenu en Chl totale. La diminution de Chl dans *C. reinhardtii* WT et CW15 traitées avec les NPs d'Ag à 1 mg/L est de 82% et 88% respectivement par rapport au témoin (p <0,05). À 10 mg/L, elle a diminué de 93% et 84% et pour 100 mg/L, ils sont de 96% et 93%. Pour les microalgues traitées avec les NPs de TiO<sub>2</sub>, la teneur en chlorophylle aussi a été touchée. Les diminutions à 1 mg/L ont été de 62% et 20% par rapport au témoin (p <0,05). À 10 mg/L elle a diminué de 63% et 44% et pour 100 mg/L de 96% et 40%.

Enfin, entres les deux souches WT et CW15, nous avons aussi remarqué des résultats très diffèrents entre souches en exposition aux NPs. En effet, en comparant ces résultats obtenus pour les souches exposées aux  $TiO_2NPs$ , nous avons noté deseffets à 1 mg, et surtout à 100 mg. En revanche, les souches exposées aux AgNPs nous ont montré des résultats très semblables à différentes concentrations, auquelles les souches ont montré être plus touchées par la toxicité des NPs avec une grosse diminution de la chlorophylle totale.

# 3.5 La cinétique rapide et polyphasique de l'émission de fluorescence chlorophyllienne

Dans cette étude, la fluorescence chlorophyllienne a été mesurée comme un indicateur de l'état physiologique des cellules algales par le bais de l'état du transfert d'électrons dans l'appareil photosynthétique. Cet outil développé par Strasser *et al.* (1995) caractérise la structure et l'activité photochimique des échantillons photosynthétiques.

Les deux souches de *C. reinhardtii* traitées ou non traitées ont montré une courbe O-J-I-P avec les différentes étapes transitoires. Suite à l'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> (Figure 3.7) et aussi aux NPs d'Ag (Figure 3.8) à différentes concentrations l'effet inhibiteur pour les différentes concentrations de NPs a été mesuré et le changement de la cinétique polyphasique OJIP mesuré. Il faut une concentration de 100 mg/L pour observer un effet inhibiteur du transport des électrons. Spécialement par Ag, car en cette concentration plus élevée, il apparaît que la chaine du transport d'électrons est perturbée. D'après nos résultats, l'effet toxique de AgNPs est plus grand que celui des TiO<sub>2</sub>NPs (une diminution drastique des phases J-I et I-P de la courbe OJIP), alors que les TiO<sub>2</sub>NPs semblent ne pas avoir effet sur la cinétique OJIP des deux souches étudiées.

Ceci est confirmé aussi par l'analyse des paramètres  $F_V/F_M$  et PI. En effet une forte diminution du  $F_V/F_M$  et PI est observée dans les deux souches exposées aux AgNPs comparativement à l'effet des TiO<sub>2</sub>NPs. Ceci confirme des résultats précédents sur l'effet très toxiques des AgNPs quand ces dernières sont en contact aves les plantes aquatiques (Oukarroum *et al.*, 2013; Oukarroum *et al.*, 2012). Le rendement maximal de la photochimie du PSII primaire  $\varphi_{Po}$  ( $F_V/F_M$ ) est affecté uniquement par les AgNPs à 100 mg/L. La baisse de  $F_V/F_M$  a été remarquée par rapport au contrôle (Figure 3.9) pour les deux *C. reinhardtii* (WT et CW15). En concentration de 100 mg/L d'AgNPs, ( $F_V/F_M$ ) a une diminution de 74% et 83%, respectivement, pour WT et CW15 par rapport au contrôle (0 mg/L). En revanche, pour les microalgues à la même concentration de TiO<sub>2</sub>  $F_V/F_M$  on n'observe une diminution que de 8% et 14%, respectivement pour WT et CW15 par rapport au contrôle (0 mg/L).

En résumé, les AgNPs perturbent l'activité photosynthétique des algues étudiées et par conséquent affectent leur base de synthèse de l'énergie (ATP et NADPH) nécessaire à l'ensemble des processus physiologiques. En plus de l'effet sur l'activité photosynthétique par une perturbation de la chaîne du transfert d'électron, la

diminution de la teneur en Chl dans les algues peut affecter la conversion de l'énergie lumineuse dans le transport photosynthétique d'électrons et par conséquent changer la montée rapide de fluorescence de la Chl *a*.



**Figure 3.7** Changement de la fluorescence transitoire J-I-P, lorsque *Chlamydomonas reinhardtii* WT (A) et CW15 (B) ont été exposées à 0, 1, 10 et 100 mg/L de TiO<sub>2</sub>NPs (n=5)  $\pm$  l'écart type.

**Tableau 3.4** Résultats de la fluorescence transitoire sur les deux souches deChlamydomonas reinhardtii (CW15 et WT).

AgNPs (mg/L)	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	
Chiamyaomonas reinnaratii CW15	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	
Chlamydomonas reinhardtii WT	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	

A)

B)



**Figure 3.8** Changement de la fluorescence transitoire J-I-P, lorsque *Chlamydomonas reinhardtii* WT (A) et CW15 (B) ont été exposées à 0, 1, 10 et 100 mg/L de nanoparticules d'Ag (n=5)  $\pm$  l'écart type.

**Tableau 3.5** Résultats de la fluorescence transitoire sur les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* (CW15 et WT).

TiO <sub>2</sub> NPs (mg/L)	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L		
Chlamydomonas reinhardtii CW15	Pas d'effet	Pas d'effet	Effet inhibiteur		
Chlamydomonas reinhardtii WT	Pas d'effet	Pas d'effet	Effet inhibiteur		

77



**Figure 3.9** Changement quantique maximal du rendement photochimique primaire  $(F_V / F_M)$  pour *C. reinhardtii* WT (bleu) et CW15 (rouge) avec chacune des NPs.

### 3.6 Le changement de ROS et viabilité cellulaire

L'exposition de la culture des algues aux NPs d'Ag et  $TiO_2$  induit une augmentation de concentrations intracellulaires en ROS qui peut entraîner des dommages toxicologiques. La formation accrue de ROS et la viabilité cellulaire, évaluées par l'indicateur de fluorescence diacétate de fluoresceine (FDA), a révélé une

augmentation de ROS après un traitement de 72 h d'exposition des algues à 0, 1, 10 et 100 mg/L de NPs d'Ag, pour les deux souches de *C. reinhardtii* WT et CW15 (Figure 3.10).



**Figure 3.10** Changement de ROS/Viabilité cellulaire dans les algues *Chlamydomonas reinhardtii* exposées à des nanoparticules d'Ag et TiO<sub>2</sub> pendant 72h. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

Concentration WT (mg/L) AgNPs			CW15 AgNPs	WT TiO <sub>2</sub> NPs		CW15 TiO <sub>2</sub> NPs	
1	69%	<	80%	50%	>	0%	
10	74%	<	78%	70%	>	38%	
100	88%	<	90%	74%	>	36%	

**Tableau 3.6**Comparaison de l'augmentation intracellulaire en ROS entre les deuxsouches de Chlamydomonas reinhardtii (WT et CW15).

Les résultats obtenus sur le (Tableau 3.5), démontrent des effets très différents entre les deux souches WT et CW15. Par exemple, une concentration de 10 mg/L de l'exposition d'AgNPs a induit une augmentation de 74% et de 78% de ROS, respectivement sur les souches WT et CW15, par rapport au témoin (p <0,05) sur lequel les souches de CW15 ont été constatées être plus sensibles aux effets d'AgNPs. De plus, les souches exposées aux AgNPs ont démontré plus d'effets que les souches exposées aux TiO<sub>2</sub>NPs. Par contre, les souches WT exposées aux TiO<sub>2</sub>NPs semblent être plus sensibles aux TiO<sub>2</sub>NPs qu'aux AgNPs, puisque l'augmentation de ROS n'a atteint que 70% et 38% à 10 mg/L par rapport au témoin (p <0,05). En résume, les résultats ont eu la même tendance que Chl totale.

En somme, les résultats nous ont démontré que les AgNPs et TiO<sub>2</sub>NPs affectent les processus métaboliques essentiels des algues par dénaturation des protéines, par le blocage des groupes fonctionnels et par un déplacement des métaux essentiels. Des changements dans la conformation de molécules actives peuvent être responsables de la désintégration des cellules et de l'intégrité des membranes des organelles. Au cours de la contamination par les NPs, les algues répondent aux ROS, stimulant la production et l'activation d'enzymes telles que le superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase. Une concentration de NPs plus élevée que la normale peut conduire à une augmentation des ROS, ainsi qu'à des altérations irréversibles sur les cellules à une échelle intolérable, comme la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire.

En outre, à un pH bas, les NPs dissoutes peuvent pénétrer la membrane et accroître la toxicité (Das *et al.*, 2009).

# 3.7 Analyses des microalgues par RMN

Nous avons réalisé des études par RMN du <sup>13</sup>C sur des cellules intactes, dans le but d'évaluer la perturbation membranaire sur les deux différentes souches de *C*. *reinhardtii* avec et sans paroi (WT et CW15) pour 10 mg/L des NPs d'Ag et de TiO<sub>2</sub>. Nous avons choisi cette concentration, car elle induisait moins de mortalité cellulaire. Dans cette étude, les cellules des microalgues ne sont pas extraites, respectant ainsi l'intégrité des microalgues.

D'abord, pour effectuer les expériences de RMN-ES, nous avons enrichi les microalgues au <sup>13</sup>C, en utilisant un marquage isotopique avec du bicarbonate de sodium marqué au <sup>13</sup>C, NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> (section 2.2), dans le but de minimiser la durée des expériences et la dégradation des cellules. Les microalgues ont été cultivées à 20 °C pendant 10 jours sous traitement continu d'illumination et prélevées à la phase exponentielle (4 x 10<sup>6</sup> cellules / mL). Un rendement total de 200-250 mg/L de poids sec a été obtenu pour chaque souche. Les cellules ont été rincées trois fois avec de l'eau nanopure pour éliminer toutes les traces de NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> résiduelles, et transférées dans un rotor de RMN-MAS par centrifugation (<3000 rpm). Toutes les expériences de RMN ont été effectuées à 18 °C avec un spectromètre Bruker Avance III-HD de 400 MHz (Milton, Ontario, Canada) pour l'état solide.

Pour les analyses de RMN du <sup>13</sup>C en solution, tous les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Varian Inova Unity 600 (Agilent, Santa Clara, États-Unis). Pour les analyses des extraits lipidiques de *C. reinhardtii*, nous avons préparé les échantillons avec 1 g d'extraits lipidique mélangé avec 1 ml chloroforme-deutérié, puis nous les avons transférés dans un tube RMN de 5 mm. Aussi, pour aider l'attribution des pics, les extraits lipidiques ont été comparés à des échantillons de TAG de qualité chimique et de DHA de qualité chimique (Sigma Aldrich D2534, Mississauga, ON, Canada).

Tous les spectres 1D ont été enregistrés avec impulsion directe et MAS à 10 kHz. Un total de 280 k points a été acquis avec un délai d'échantillonnage de 5 s et un délai de recyclage de 20 ms, en utilisant 2048 scans. Les spectres ont été traités avec une correction automatique de la ligne de base et une multiplication exponentielle de 25 Hz. Les spectres ont été aussi traités en utilisant le logiciel MNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espagne) et référenciés par les pics caractéristiques CH<sub>3</sub> de l'acide gras (FA) à 14,17 ppm (Chauton *et al.*, 2004) et tel que proposé par Arnold *et al.* (2015).

#### 3.7.1 Attribution spectrale et effets des NPs

La figure 3.11 montre le spectre de RMN <sup>13</sup>C des extraits lipidiques de *C. reinhardtii*. Les travaux de différents groupes de recherche nous ont aidé à attribuer les déplacements chimiques des principaux constituants des algues *C. reinhardtii* (Arnold *et al.*, 2015; Beal *et al.*, 2010). Les structures des principaux constituants d'acides gras, tels que TAG, ainsi que celles des lipides prédominants, tels que MGDG et DGDG, pour les algues sont montrées à la Figure 1.8. D'abord, nous avons réalisé les attributions des pics de TAG et de DHA. Puis nous les avons comparés avec les extraits lipidiques des *C. reinhardtii*. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences de RMN du carbone <sup>13</sup>C. Ce travail préliminaire nous a permis de comparer nos résultats avec ceux déjà décrits dans la littérature (Arnold *et al.*, 2015; Beal *et al.*, 2010).



**Figure 3.11** Spectres NOE-DP <sup>13</sup>C des extraits lipidiques de *Chlamydomonas reinhardtii* par RMN en solution. Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et le nombre de scans pour chaque expérience est de 2048 pour une durée de 3h.

**Tableau 3.7** Attribution spectrale des acides gras TAG et DHA par RMN de l'étatliquide.

Triglycéryltrioléate (TAG)						Acide docosahéxaénoique (DHA)					
Gro	Groupe fonctionnel (ppm)		Groupe	fonctionnel	(ppm)						
Carbone		C'	<sup>13</sup> C	Н	Carbone		<sup>13</sup> C	Н			
1'	Tri-Gly (CH <sub>2</sub> )		62.2	4.1	C1	C=0	179.0	11 11			
2'	Tri-Gly (CH)		69.0	5.2	C2	CH <sub>2</sub>	34.0	2.4			
3'	Tri-Gly (CH <sub>2</sub> )		62.3	4.3	C3	CH <sub>2</sub>	22.5	2.4			
C1	C=0	173.0	173.4		C4	HC=CH	129.6	5.4			
C2	CO-CH <sub>2</sub>	34.3	34.2	2.3	C5	HC=CH	127.5	5.4			
C3	CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	25.0	25.0	1.6	C6	CH <sub>2</sub>	25.6	2.9			
C4	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C7	HC=CH	128.0	5.4			
C5	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C8	HC=CH	128.3	5.4			
C6	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C9	CH <sub>2</sub>	25.6	2.9			
C7	CH2		29.1-30.0	1.27-1.33	C10	HC=CH	128.2	5.4			
C8	CH2-HC=CH Allyle	27.3	27.3	2.0	C11	HC=CH	128.3	5.4			
C9	HC=CH	130.2	130.2	5.3	C12	CH <sub>2</sub>	25.6	2.9			
C10	HC=CH	129.8	129.8	5.3	C13	HC=CH	128.1	5.4			
C11	CH2-HC=CH Allyle	27.3	27.3	2.0	C14	HC=CH	128.1	5.4			
C12	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C15	CH <sub>2</sub>	25.6	2.9			
C13	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C16	HC=CH	127.9	5.4			
C14	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C17	HC=CH	128.6	5.4			
C15	CH <sub>2</sub>		29.1-30.0	1.27-1.33	C18	CH <sub>2</sub>	25.6	2.9			
C16	CH <sub>2</sub> (w3)		32.4	1.3	C19	HC=CH	127.0	5.3			
C17	CH <sub>2</sub> (w2)		22.8	1.3	C20	HC=CH	131.9	5.4			
C18	CH3 (w1)		14.2	0.8	C21	CH <sub>2</sub>	20.5	2.1			
E. SALT					C22	CH <sub>3</sub>	14.3	1.0			

La figure 3.12 montre les spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup>C pour chaque souche *in vivo* de *C. reinhardtii* WT et CW15.

Dans un premier temps, nous avons comparé les deux souches avant l'ajout des NPs, car nous nous attendions à avoir des différences dues à l'absence d'une paroi cellulaire chez CW15. Sur les spectres <sup>13</sup>C très bien résolus, on peut distinguer cinq principales régions spectrales : les groupes carbonyles, les carbone oléfiniques, les anomères, le galactosyle/glycérol et les longues chaînes aliphatiques d'atomes de carbone.

L'identification des pics des algues a été facilitée par les attributions de pics réalisées dans ces travaux sur les acides gras TAG et DHA ainsi que par des comparaisons de spectres des algues WT et CW15 antécédentes (Arnold *et al.* 2015).



**Figure 3.12** Spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup>C MAS avec impulsion directe et MAS de 10 kHz *in vivo* pour les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* marquées au <sup>13</sup>C : WT (en noir) et CW15 (en rouge).

La Figure 3.12 montre les spectres de RMN au <sup>13</sup>C en polarisation directe (DP) pour les deux souches des microalgues étudiées. Dans les deux cas, des résonances sont détectées dans des régions correspondant aux acides gras et aux protéines: des chaînes latérales aliphatiques (0-40 ppm), des C $\alpha$  protéiques (40-60 ppm), des C-O dans des carbohydrates (60 à 80 ppm), des doubles liaisons (125-135 ppm), des régions d'amide et de carbonyle (160-180 ppm). Les résonances correspondant au C $\zeta$  de l'arginine (158 ppm), des carbones anomériques C1 dans les glucides (environ 100 ppm) ont aussi été détectées. Des résonances des sucre sont été détectées dans les intervalles suivants: 90-112 ppm pour les carbones anomériques (C1), 70-80 ppm pour les carbones cycliques (C2-5) et 60-70 ppm pour le carbone C6. Les pics ont été facilement observés dans ces régions. Des différences entre les algues WT et CW15 ont été observées pour les lipides au niveau du glycérol, probablement dues à l'absence de la paroi cellulaire des CW15. En effet, vu que normalement des TAGs sont emmagasinés dans des gouttelettes lipidiques localisées dans le cytoplasme des microalgues (absentes dans les CW15), donc il y a moins de stockage lipidique à l'intérieur des souches CW15.



**Figure 3.13** Spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup>C avec impulsion directe et MAS de 10 kHz *in vivo* pour les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* marquées au <sup>13</sup>C : A) WT et B) CW15 exposées (rouge) et non exposées (noir) aux AgNPs 10 mg/L pendant 72 h.
La Figure 3.13 montre les spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup>C avec impulsion directe et MAS à 10 kHZ pour les souches WT et CW15 de *C. reinhardtii* exposées ou non aux AgNPs. Pour la souche WT, nous avons constaté seulement des changements mineurs, au niveau des sucres, suite à l'exposition aux AgNPs. Les algues avec paroi semblent ne pas avoir été dramatiquement affectées aux NPs, à l'exception peut-être des glycoprotéines et polysaccarides de la paroi. Ceci est indique par les changement visibles dans la région de sucres à 50-80 ppm et 100 ppm. Nous savons que différentes étapes composent l'interaction des NPs avec la paroi cellulaire chez les algues, jusqu'à atteindre la membrane plasmique. La paroi représente la première barrière protectrice qui empêche la contamination dans les compartiments intracellulaires, comme nous l'avons vu sur les images TEM (section 3.2). De plus, cette paroi qui enveloppe le cytoplasme est principalement composée de glycoprotéines et des polysaccharides, lesquels fournissent une résistance structurale à la paroi cellulaire.

Par contre les résultats observés pour les algues CW15 sont plus impressionnants. En analysant les spectres RMN-ÉS <sup>13</sup>C, nous avons remarqué de grands changements d'intensité sur les pics attribués aux carbonyles (~ 175 ppm). Des changements sont également observés au niveau de la région du glycérol trioléate (50-80 ppm). Les souches mutantes CW15 ne possèdent qu'une couche de paroi mince, analogue à la paroi externe W7. Dans ce cas, les NPs sont plus susceptibles de pénétrer dans les algues CW15, causant des changements structurels et intracellulaires (Monk *et al.*, 1983).

Bien que nous trouvions que ces résultats soient incohérents, si nous nous basons sur le fait que la paroi sert de couche protectrice à la microalgue, nous pourrions aussi supposer que les effets devraient être plus importants sur les algues avec paroi, car des études précédentes ont démonté que la présence de la paroi cellulaire favorise l'adsorption des ions métalliques sur les *C. reinhardtii* (Kola *et al.*, 2004; Macfie et Welbourn, 2000). Notons que l'adsorption de ces métaux est due à l'interaction

ionique, aux liaisons hydrogène et la déshydratation de groupes polaires avec les polysaccharides de la membrane. D'abord, quand il existe plus d'ions métalliques contenus sur la surface de la cellule, plus grand est l'effet de la toxicité, ce qui entraine une plus grosse diminution de la croissance cellulaire.



**Figure 3.14** Spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup>C avec impulsion directe et MAS 10kHz *in vivo* pour les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* marquées  $au^{13}C : A$ ) WT et B) CW15 exposées (rouge) et non exposées (noir) aux TiO<sub>2</sub>NPs 10 mg/L pendant 72 h.

La Figure 3.14 montre les spectres de RMN-ÉS du <sup>13</sup>C avec impulsion directe et MAS à 10 kHZ pour les souches WT et CW15 de C. reinhardtii exposées aux TiO<sub>2</sub>NPs. Contrairement aux résultats précédents avec les expositions des AgNPs, nous avons remarqué un effet beaucoup plus important des TiO<sub>2</sub> sur les WT que sur les CW15 ce qui est incohérent en basant sur le résultat des analyses d'ICP-MS qui montrent moins de Ti accumulé dans la WT que dans la CW15. Les TiO<sub>2</sub> semblent montrer plus d'interactions que les AgNPs, avec la paroi cellulaire. Analysant les spectres de WT, nous avons observé de gros changements d'intensité sur les pics attribués aux carbonyles (~175 ppm). Les changements de signal des carbonyles pourraient être explicables par la peroxydation des lipides par l'agrégation qui cause l'effet couronne des NPs sur la paroi des C. reinhardtii (Chen et al., 2012b). Des changements sont également observés au niveau de la région du triglycérol (50-80 ppm), des doubles liaisons (125-135 ppm) et des chaînes latérales aliphatiques (0-40 ppm). En outre, comme hypothèse, nous croyons que ces changements sont peut-être liés à la dégradation et la diminution de la chlorophylle (Abraham et Rowan, 1991), ce qui est cohérent par rapport à notre résultat montré sur la (Section 3.4), car en terme de masse chlorophyllienne, les algues de C. reinhardtii peuvent avoir environ 19% de leur masse sèche ( $\sim 10^9$  cellules) (Harris, 2001) et nous avons constaté alors un effet net sur la chlorophylle totale des algues en exposition aux NPs.

Les microalgues avec paroi ont été affectées directement par les  $TiO_2NPs$ , comme en témoignent les gros changements d'intensité sur tout le spectre. Ces résultats peuvent être expliqués par la biodisponibilité des  $TiO_2NPs$ , par la charge de surface de ces NPs, ainsi que par leur taille (Farre *et al.*, 2009), facilitant leur passage endocytotique à l'intérieur de la cellule (traversant la membrane plasmique), et y occasionnant des dommages irréversibles (Navarro *et al.*, 2008). En outre, ceci cause l'inhibition de la croissance cellulaire, la peroxydation des lipides, la dérégulation de l'expression de gènes, l'inhibition de la photosynthèse, des troubles de la cyto-ultrastructure et l'agrégation des NPs sur la surface cellulaire. De plus, les effets sur les protéines

causés par la liaison des NPs sur la paroi et ainsi que la rupture de cette dernière conduisent à l'extrusion des lipides et des glucides.

Par contre, les résultats obtenus par RMN sur les algues CW15 montrent un effet mineur des TiO<sub>2</sub>NPs. Nous observons un petit changement d'intensité au niveau lipidique, ce qui est plus cohérent si nous comparons ces résultats avec ceux qui précèdent, où les protéines membranaires seraient affectées par les TiO<sub>2</sub>NPs, car les microalgues mutantes sont presque dépourvues de paroi cellulaire et il est connu que la présence de la paroi cellulaire favorise l'adsorption d'ions métalliques chez *C. reinhardtii*, causant des dommages intracellulaires. En outre, nous savons que les souches WT possèdent une paroi qui représente la première barrière protectrice qui empêcherait la contamination dans les compartiments intracellulaires, donc il y aurait plus d'interaction sur la surface des cellules, dont les liaisons de NPs sur les protéines membranaires. De plus, les effets hydrophobes de la surface peuvent affecter également les interactions entre les NPs et la paroi cellulaire à plusieurs niveaux, comme la capacité de pénétrer la membrane lipidique et leur liaison avec des protéines. Aussi, généralement les NPs hydrophiles sont plus toxiques que les hydrophobes à cause de leur capacité à pénétrer dans les membranes cellulaires (Perreault, 2012).

## 3.7.2 Viabilité cellulaires lors des analyses de MAS

Les analyses de MAS et le marquage des algues aux <sup>13</sup>C présentées dans ce travail ainsi que le gain en sensibilité ont l'avantage d'assurer moins de risques de dégradation des échantillons, pendant le long temps d'acquisition. De plus, l'utilisation de la MAS peut devenir essentielle dans les caractérisations des algues *in vivo* pour déterminer les effets toxicologiques et les interactions membranaires par des contaminants. Afin de vérifier si la rotation à 10 kHz affecte la viabilité cellulaire et induit l'éclatement de la paroi, des mesures ont été effectuées après 1h, 2h et 24h d'expériences de RMN en MAS et les culots d'algues ont été vérifiés par microphotographies optiques algales. Les résultats obtenus (Figures 3.15) montrent que la MAS n'a pas d'effet majeur sur la viabilité des cellules.



**Figure 3.15** Microphotographies optiques algales de souches de *Chlamydomonas reinhardtii* WT, prises après l'expérience de RMN en MAS et statique: (A) 1h, (B) 2h et (C) 24h.

### 3.7.2 Mesures de temps de relaxation

Grâce à la résolution des spectres RMN-ÉS du <sup>13</sup>C, il est possible de déterminer le temps de relaxation spin-réseau (T<sub>1</sub>) de chaque région spectrale. Les résultats de ces mesures pour les souches contrôles (WT) et (CW15) sont présentés au tableau 3.8, et comparés au tableau après exposition aux AgNPs et TiO<sub>2</sub>NPs.

Attribution	Déplacement chimique (ppm)	C. reinhardtii WT (T <sub>1</sub> /ms)	<i>C. reinhardtii</i> CW15 (T <sub>1</sub> /ms)	
C=0	175	0,73	1,18	
Arginine	157,6	0,81	1,21	
C=C	128	0,69	0,63	
Anomérique C1	101	0,66	1,13	
C4 Glycides/Glycérol	72,6	0,65	0,85	
Gal/Glycérol	61,4	0,40	0,59	
Aliphatiques	40,1	0,53	0,64	
Aliphatiques	30,1	0,49	0,46	
Aliphatiques	14,7	0,78	1,24	

**Tableau 3.8** Mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C des souches WT et CW15 de *Chlamydomonas reinhardtii* par RMN-ÉS

Les résultats pour la mesure de  $T_1$  au tableau 3.8 suggèrent une dynamique probablement plus rapide des glycoprotéines et lipides pour les algues WT. Si on postule que les signaux proviennent principalement de la paroir cellulaire, la dynamique plus lente des CW15 serait cohérent avec une plus grand rigidité membranaire.



**Figure 3.16** Mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C des souches WT et CW15 de *Chlamydomonas reinhardtii* par RMN-ÉS, en absence (vert) ou en présence (gris) de NPs d'Ag et TiO<sub>2</sub> pendant 72 h. Les expériences ont été réalisées en triple exemplaire et les résultats sont présentés comme la moyenne avec écart-type.

Attribution	Déplacement chimique (ppm)	<i>C. reinhardtii</i> WT (T <sub>1</sub> /ms)	<i>C. reinhardtii</i> WT + AgNPs (T <sub>1</sub> /ms) 1,24	
C=0	175	*0,73		
Arginine	157,6	*0,81	1,35	
C=C	128	0,69	0,62	
Anomérique C1	101	*0,66	1,25	
C4 Glycides/Glycérol	72,6	0,65	0,64	
Gal/Glycérol	61,4	0,40	0,48	
Aliphatiques	40,1	0,53	0,62	
Aliphatiques	30,1	0,49	0,52	
Aliphatiques	14,7	*0,78	1,29	

**Tableau 3.9** Mesure des  $T_1$  des  ${}^{13}$ C des souches de Chlamydomonas reinhardtii WTen présence d'AgNPs par RMN-ÉS.

\* Les écarts les plus significatifs sont signalés par une astérisque

**Tableau 3.10** Mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C des souches de *Chlamydomonas reinhardtii* CW15 en présence d'AgNPs par RMN-ÉS.

Attribution	Déplacement chimique (ppm)	C. reinhardtii CW15	<i>C. reinhardtii</i> CW15 + AgNPs 1,21 1,21	
C=0	175	1,18		
Arginine	157,6	1,21		
C=C	128	0,63	0,65	
Anomérique C1	101	1,13	1,01	
C4 Glycides/Glycérol	72,6	0,85	0,78	
Gal/Glycérol	61,4	0,59	0,53	
Aliphatiques	40,1	0,64	0,56	
Aliphatiques	30,1	0,46	0,52	
Aliphatiques	14,7	1,24	1,24	

Attribution	Déplacement chimique (ppm)	C. reinhardtii WT + AgNPs (T <sub>1</sub> /ms)	C. reinhardtii WT +TiO2NPs (T <sub>1</sub> /ms)	
C=0	175	*0,73	1,24	
Arginine	157,6	*0,81	1,12	
C=C	128	0,69	0,61	
Anomérique C1	101	*0,66	1,18	
C4 Glycides/Glycérol	72,6	0,65	0,64	
Gal/Glycérol	61,4	0,40	0,51	
Aliphatiques	40,1	0,53	0,59	
Aliphatiques	30,1	0,49	0,45	
Aliphatiques	14,7	*0,78	1,41	

**Tableau 3.11** Mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C des souches de *Chlamydomonas reinhardtii* WT en présence de TiO<sub>2</sub>NPs par RMN-és.

\* Les écarts les plus significatifs sont signalés par un astérisque

**Tableau 3.12** Mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C des souches de *Chlamydomonas reinhardtii* CW15 en présence de TiO<sub>2</sub>NPs par RMN-ÉS.

Attribution	Déplacement chimique (ppm)	<i>C. reinhardtii</i> CW15 (T <sub>1</sub> /ms)	C. reinhardtii CW15 + TiO <sub>2</sub> NPs (T <sub>1</sub> /ms)	
C=0	175	1,18	1,21	
Arginine	157,6	1,21	1,00	
C=C	128	0,63	0,56	
Anomérique C1	101	1,13	1,08	
C4 Glycides/Glycérol	72,6	0,85	0,69	
Gal/Glycérol	61,4	0,59	0,58	
Aliphatiques	40,1	0,64	0,53	
Aliphatiques	30,1	0,46	0,45	
Aliphatiques	14,7	1,24	1,35	

L'ensemble des résultats pour les mesures de T<sub>1</sub> (Figure 3.16) indiquent que la dynamique des glycoprotéines et oligosaccharides présents dans la paroi cellulaire de *C. reinhardtii* WT ainsi que des squelettes glycérol ont été différemment affectés en présence d'AgNPs. En analysant les résultats rapportés au tableau 3.9, nous remarquons que les régions correspondant aux acides gras et aux C aliphatiques à (14,7 ppm) ont été affectées par rapport au contrôle, avec T<sub>1</sub>= 0,78s et T<sub>1</sub>= 1,24s; les

carbones anomériques C1 dans les glucides à (101 ppm), avec  $T_1$ = 0,66s et  $T_1$ = 1,25s; les C $\zeta$  de l'arginine à (157,6 ppm), avec  $T_1$ = 0,81s et  $T_1$ = 1,35s et les régions d'amide et de carbonyle à (175 ppm), avec  $T_1$ = 0,73s et  $T_1$ = 1,24s. Ceci pourrait être expliqué par une perte de mobilité des lipides et protéines de la paroi cellulaire en présence de NPs. En revanche, les résultats de  $T_1$  (Figure 3.16) indiquent que la dynamique des constituants de *C. reinhardtii* CW15 n'ont pas été significativement affectés par la présence de nanoparticules d'AgNPs ni par les TiO<sub>2</sub>NPs, comme montré aux Tableau 3.10 et 3.12.

Les résultats obtenus pour *C. reinhardtii* WT en exposition aux TiO<sub>2</sub>NPs ont aussi démontré des effets similaires à ceux des AgNPs. Sur les résultats présentés sur le tableau 3.11, nous pouvons constater que les régions correspondant aux C aliphatiques à (14,7 ppm) ont été affectées par les NPs, avec  $T_1=0,78s$  et  $T_1=1,41s$ , de même que les carbones anomériques C1 dans les glucides à (101 ppm), avec  $T_1=0,66s$  et  $T_1=$ 1,18s, les C $\zeta$  de l'arginine à (157,6 ppm), avec  $T_1=0,81s$  et  $T_1=1,12s$  et surtout les régions d'amide et de carbonyle à (175 ppm), avec  $T_1=0,73s$  et  $T_1=1,24$  s. Ces résultats pourraient aussi être expliqués par les mêmes motifs que les résultats précédents sur les expositions aux AgNPs.

Notons aussi que, malgré ces barres d'erreur obtenues lors de cette expérience sur la mesure de  $T_1$ , nous avons eu de la difficulté à obtenir une meilleure interprétation critique de notre résultat, car l'écart-type était trop élevé. D'abord, il est très difficile d'évaluer l'application de cette méthode pour déterminer les effets du temps de relaxation membranaire, car les limites d'erreur ne sont pas évidentes et les différences observées par les mesures de  $T_1$  pour certaines régions sont relativement faibles. Cependant, selon ces résultats, nous lançons les hypothèses que les limites d'erreur très élevées sont liées aux changements de mobilité membranaire et causées par la dégradation des cellules ou par les activités biologiques de la cellule, comme les divisions cellulaires en cours d'expérience.

D'abord, pour mieux comprendre ces résultats, nous avons utilisé les calculs de variation relative de la mesure de  $T_1$  représentés sur l'équation 3.1 et ces résultats sont comparés entre les deux souches WT et CW15 sans exposition aux NPs, comme présenté à la figure 3.17 et au tableau 3.13, avec l'exposition aux AgNPs (Figure 3.18) et (Tableau 3.14) et avec l'exposition aux TiO<sub>2</sub>NPs (Figure 3.19) et (Tableau 3.15) respectivement. D'abord, cette équation nous a permis d'observer et de comparer plus facilement les variations et les effets vus sur la dynamique entre les souches avec et sans expositions aux NPs.

$$\frac{\Delta}{X_{reference}} = \Delta_{Relative} = \frac{(\text{Expérimental (Chlamy+NPs)}-\text{Théorique(Contrôle)})}{\text{Théorique (Contrôle)}} \times 100$$

(3.1)



**Figure 3.17** Écart relatif de la mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C entre les deux souches WT et CW15 de *Chlamydomonas reinhardtii* par RMN-ÉS. Avec paroi WT (bleu) sans paroi CW15 (rouge) sans exposition aux NPs.

Groupe fonctionnel	Peak location (ppm)	<i>C. reinhardtii</i> WT	Différence	<i>C. reinhardtii</i> CW15
C=0	175	39%	<	63%
Arginine	157,6	33%	<	49%
C=C	128	10%	>	9%
Anomérique C1	101	42%	<	72%
C4 Glycides/Glycérol	72,6	23%	<	30%
Gal/Glycérol	61,4	32%	<	48%
Aliphatiques	40,1	17%	<	20%
Aliphatiques	30,1	6%	>	6%
Aliphatiques	14,7	37%	<	60%

**Tableau 3.13** Comparaison de la différence relative de la mesure de  $T_1$  entre les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* (WT et CW15) sans exposition aux NPs.



**Figure 3.18** Écart relatif de la mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C entre les deux souches WT (bleu) et CW15 (rouge) de *Chlamydomonas reinhardtii* par RMN-ÉS en présence d'AgNPs pendant 72h.

Tableau 3.14 Comparaison de la différe	nce relative de la mesure de T1 entre les deux
souches de Chlamydomonas reinhardtii (	WT et CW15) en présence d'AgNPs.

Groupe fonctionnel	Peak location (ppm)	C. reinhardtii WT + Ag	Différence	C. reinhardtii CW15 + Ag
C=0	175	*70%	>	2%
Arginine	157,6	*65%	>	0,3%
C=C	128	10%	>	3%
Anomérique C1	101	*89%	>	8%
C4 Glycides/Glycérol	72,6	2%	<	8%
Gal/Glycérol	61,4	*21%	>	13%
Aliphatiques	40,1	16%	>	14%
Aliphatiques	30,1	7%	<	11%
Aliphatiques	14,7	*66%	>	10%

\* Les écarts les plus significatifs sont signalés par un astérisque



**Figure 3.19** Écart relatif de la mesure des  $T_1$  des <sup>13</sup>C entre les deux souches WT (bleu) et CW15 (rouge) de *Chlamydomonas reinhardtii* par RMN-ÉA en présence de TiO<sub>2</sub>NPs pendant 72h.

**Tableau 3.15** Comparaison de la différence relative de la mesure de  $T_1$  entre les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* (WT et CW15) en présence de TiO<sub>2</sub>NPs.

Groupe fonctionnel	Peak location (ppm)	C. reinhardtii WT + TiO <sub>2</sub>	Différence	C. reinhardtii CW15 + TiO <sub>2</sub>
C=0	175	* 71%	.>	2%
Arginine	157,6	*27%	>	17%
C=C	128	12%	<	12%
Anomérique C1	101	*79%	>	5%
C4 Glycides/Glycérol	72,6	1%	<	19%
Gal/Glycérol	61,4	*28%	>	1%
Aliphatiques	40,1	11%	<	17%
Aliphatiques	30,1	8%	<	15%
Aliphatiques	14,7	*82%	>	9%

\* Les écarts les plus significatifs sont signalés par un astérisque

Dans un premier temps, comme illustré à la figure 3.17, nous avons comparé les changements relatifs entre WT et CW15 sans exposition aux NPs, lesquels nous avons confirmé les différences réelles entre les deux souches. Dans un second temps, nous avons remarqué des effets très différents entre les deux souches WT et CW15 avec et sans paroi. Noté que les calcules statique précédant ont été déterminé a l'aide de l'équation 3.1.

La figure 3.18, nous avons comparé la différence relative de la mesure de  $T_1$  entre les deux souches de *C. reinhardtii* (WT et CW15) en exposition aux AgNPs, où nous avons observé des résultats très impressionnants. En analysant ces résultats rapportés sur le tableau 3.14, nous avons observé que:

- les chaines aliphatiques à 14,7 ppm ont une variation relative de 66% (WT) et 10% (CW15).
- les carbones anomériques C1 dans les glucides à 101 ppm ont une variation de 89% (WT) et 8% (CW15).
- les Cζ de l'arginine à 157,6 ppm ont une variation de 65% (WT) et 0,3% (CW15).
- les régions d'amide et de carbonyle à 175 ppm, ont une variation de 70% (WT) et 2% (CW15).

Ces données aident à illustrer les résultats décrits précédemment. Les algues WT avec paroi ont été plus touchées aux AgNPs que les algues CW15. Ceci suggère de plus les fortes interactions probablement au niveau de la membrane cellulaire.

Enfin, dans le troisième cas, comme illustré à la figure 3,19, nous avons comparé la différence relative de  $T_1$  entre les deux souches de *C. reinhardtii* (WT et CW15) en exposition aux TiO<sub>2</sub>NPs. En analysant ces résultats rapportés sur le Tableau 3.15, nous avons observé que:

- les chaines aliphatiques à 14,7 ppm ont une variation relative de 82% (WT) et 9% (CW15).
- les galactoses/glycérol à 61,4 ppm ont une variation de 28% (WT) et 1% (CW15).
- 3. les carbones anomériques C1 dans les glucides à 101 ppm ont une variation de 79% (WT) et 5% (CW15).
- les Cζ de l'arginine à 157,6 ppm ont une variation de 27% (WT) et 17% (CW15).
- 5. les régions d'amide et de carbonyle à 175 ppm, ont une variation de 71% (WT) et 2% (CW15).

Ici encore, ces résultats appuient les précédents qui montrent clairement que les algues WT avec paroi ont été plus touchées aux TiO<sub>2</sub>NPs que les algues CW15. Ceci suggère que les fortes interactions avec les NPs s'effectueraient avec la paroi.

En résumé, nous avons confirmé l'effet apporté sur les souches WT en exposition aux NPs au niveau des carbonyles, de l'arginine, des doubles liaisons, des carbones anomériques et des carbones aliphatiques. En outre, des études précédentes ont montré que les NPs peuvent avoir des liaisons hydrogènes, des interactions ioniques et causant la déshydratation de groupes polaires, comme les polysaccharides dans la membrane cellulaire, ce qui peut expliquer aussi nos résultats (Ma et Lin, 2013). En revanche, les souches absentes de paroi n'ont pas démontré d'effets significatifs en exposition aux AgNPs et aux TiO<sub>2</sub>NPs. Donc, les résultats de la mesure de T<sub>1</sub> suggèrent le rôle important de la paroi dans l'interaction. Notons enfin, que ces résultats sont encore très préliminaires et que nous devons réaliser plus d'expériences pour en savoir plus sur l'effet de la dynamique membranaire des cellules *in vivo* et leur interaction avec les contaminants.

# CHAPITRE IV

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette recherche avait pour but d'évaluer les effets toxiques de NPs d'Ag et TiO<sub>2</sub> sur deux espèces de microalgues de *C. reinhardtii* WT et CW15. Les différentes techniques exploitées afin de bien mener cette étude étaient la mesure du potentiel zêta, la microscopie électronique en transmission, le microscope optique, la fluorescence chlorophyllienne, la viabilité cellulaire, la détermination d'espèces réactives d'oxygène, la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif et la résonance magnétique nucléaire. Ces techniques nous ont permis d'accéder à la caractérisation de nanoparticules et de microalgues, de réaliser des analyses de toxicité et d'identifier de façon préliminaire les perturbations des algues à l'échelle moléculaire.

Les clichés des algues traitées obtenues par TEM ont montré que les nanoparticules en contact avec un milieu diluant comme le Minimum-Tris ont tendance à s'agglomérer. Ainsi, la TEM permet de mettre en évidence le phénomène d'interférence des NPs directement sur l'état d'agglomération dans le milieu. Les résultats de potentiel Zêta pour les NPs de TiO<sub>2</sub> ont montré que cette suspension est plus instable par rapport aux NPs d'Ag. Cette instabilité et la différence de taille de 21 nm pour les NPs TiO<sub>2</sub> et 50 nm pour les NPs d'Ag peuvent être directement liées aux résultats obtenus dans les tests de toxicité, par exemple, la concentration soluble de NPs intracellulaire qui peut interférer directement avec la viabilité des cellules, diminuer la contenu chlorophyllien et une augmenter les ROS. Un des mécanismes qui causent la toxicité des NPs est la

grande solubilité des ions Ag (Matsumura *et al.*, 2003). Cette libération accrue s'explique par la grande surface et la réactivité des NPs d'Ag. D'ailleurs, les résultats d'ICP-MS ont déterminé qu'il y a plus de TiO<sub>2</sub> dans les CW15 que dans le WT, mais plus d'Ag dans les WT que dans les CW15. D'un autre côté, les images de microscopie nous ont permis de suivre la morphologie et la taille des cellules en présence de NPs. En effet, des clichés ont montré que des cellules non exposées ont des formes ovales d'environ 6,5 nm de longueur et 4,0 nm de largeur et ont des structures plus organisées que les cellules exposées aux NPs de TiO<sub>2</sub> et d'Ag, et qu'elles devenaient plus grandes et moins bien structurées que les cellules cultivées sans addition de NPs. Ceci peut être expliqué par le fait que, dans les cellules exposées aux NPs, les pyrenoïdes semblent avoir augmenté en taille, car les grains d'amidon étaient visiblement altérés, plus petits, plus minces et moins nombreux que chez les témoins.

Au-delà des informations fournies par la TEM et le Pz, les mesures de la viabilité cellulaire, de la formation de ROS et de la fluorescence transitoire O-J-I-P ont confirmé les effets toxiques d'AgNPs et de TiO<sub>2</sub>NPs. En effet, ces résultats ont montré que les NPs étaient capables d'interagir avec *C. reinhardtii* alors que de gros agrégats étaient observés. Par la quantification de Chlorophylle et de ROS, ont montrés un effet important d'Ag sur les deux souches, un effet plus faible de du TiO<sub>2</sub> sur WT, et un effet encore plus faible sur CW15. L'exposition du *C. reinhardtii* WT et CW15 aux NPs d'Ag et de TiO<sub>2</sub> ont montré une diminution significative de la teneur en chlorophylle (en microgrammes par millilitre) dans la culture d'algues après 72h d'exposition à 23°C. Cette observation traduit la sensibilité des algues aux nanoparticules TiO<sub>2</sub> et particulièrement aux NPs d'Ag, puisque l'augmentation de la concentration de NPs induit une forte inhibition du contenu en chlorophylle, une diminution de la viabilité cellulaire, une augmentation des ROS et l'accumulation de NPs sur la paroi. Pour la fluorescence transitoire de la courbe OJIP, nous pouvons conclure que l'effet toxique de AgNPs est plus grande que celui des TiO<sub>2</sub>NPs,

(diminution drastique des phases J-I et I-P de la courbe OJIP), les AgNPs à une concentration de 100 mg/L perturbent l'activité photosynthétique des algues étudiées et par conséquent affectent leur base de synthèse de l'énergie (ATP et NADPH) nécessaire à l'ensemble des processus physiologiques.

Les techniques d'analyse précédentes nous ont permis de mettre en évidence la sensibilité des NPs ciblées sur les algues. Mais la compréhension de ces phénomènes à l'échelle moléculaire nous permettra d'apporter plus de détails par RMN à l'état solide du <sup>13</sup>C à haute résolution et des mesures de relaxation (T<sub>1</sub>). Les résultats obtenus sont essentiels pour confirmer les effets toxiques de NPs, et ce, pour un certain nombre de raisons, notamment pour la suivante. Les résultats de relaxation  $(T_1)$  indiquent que les lipides présents dans la paroi cellulaire de C. reinhardtii WT en présence de nanoparticules d'Ag et TiO<sub>2</sub> sont très différents de ceux des mutants CW15 et du contrôle. Les résultats montrent que les algues WT avec paroi ont été plus touchées par NPs que les algues CW15. Ceci confirme les fortes interactions et les changements de la dynamique moléculaire apportés par les NPs sur la membrane cellulaire. En outre, avons aussi observé des effets, dans la région des carbones anomériques, sur les chaines aliphatiques, sur le carbonyle et sur l'arginine, avec un temps de relaxation plus élevé. En plus, les spectres de RMN-ÉS ont montré une forte diminution de l'intensité des pics sur la région lipidique qui peut, peut-être, être expliquée par la dégradation des lipides ou des effets de l'agrégation aux NPs sur les algues, où nous avons remarqué une disparition d'un pic complet dans la région des carbones anomériques à 101 ppm. Cette observation confirme l'influence des nanoparticules (NPs) et traduit leurs effets négatifs sur les algues de C. reinhardtii comme une baisse des signaux sur le carbonyle C=O causée potentiellement par la peroxydation des lipides qui a un effet potentiel sur les microalgues (Chen et al., 2012a).

Dans ce projet, l'utilisation des *C. reinhardtii* sans et avec paroi a été très importante pour cibler les sites (régions) d'interaction des NPs et faire une étude comparative de

la perturbation de ces NPs. Les spectres nous ont permis de faire l'hypothèse que les NPs d'Ag et de  $TiO_2$  affectent la mobilité des protéines de la paroi cellulaire des microalgues aquatiques. Ces modifications pourraient avoir de graves conséquences sur la structure et le fonctionnement des communautés végétales aquatiques.

En résumé, nous avons conclu que:

- par ICP-MS qu'il y a plus de TiO<sub>2</sub> dans les CW15 que dans le WT, mais plus d'Ag dans les CW15;
- par la quantification de la chlorophylle et des ROS, qu'il y a un effet important de l'Ag sur les deux souches, un effet plus faible du TiO<sub>2</sub> sur WT, et un effet encore plus faible sur CW15;
- par l'intensité des pics sur les résultats de la RMN, que seulement l'effet du TiO<sub>2</sub> sur les algues WT a été conséquent;
- par les temps de relaxation lors de la mesure de T<sub>1</sub> par RMN, que les deux types de NPs ont pour effet d'augmenter les T<sub>1</sub> des souches WT, alors que les T<sub>1</sub> de souches CW15, déjà élevés, n'augmentent pas plus sous l'effet des NPs;
- que les algues WT avec paroi ont été plus touchées par la présence de nanoparticules;
- que les deux nanoparticules utilisées ont montré leurs effets toxiques pour les microalgues.

D'ailleurs, quelques contradictions apparentes entre les différents résultats obtenus dans ce travail peuvent être expliquées du fait que les techniques utilisées sont complètement différentes. Auparavant, il faut noter que nous avons utilisé deux différents types de NPs sur deux différentes souches de microalgues (une sauvage et une sans paroi), pour lesquelles nous avons constaté différents effets. Ces résultats parfois contradictoires sont aussi causés par la spécificité des différents indicateurs de toxicité par les microalgues envers ces nanoparticules et leurs différentes propriétés physicochimiques. De plus, les techniques utilisées ne s'intéressent pas toujours à la même région de la microalgue. Cependant, ces méthodes complémentaires ont été utilisées dans l'optique de répondre à quelques questions sur la toxicité des NPs sur les microalgues, avant d'être analysées par RMN. Cette dernière fut utilisée pour évaluer les mécanismes d'action au niveau moléculaire et pour mieux comprendre le rôle de la paroi cellulaire lors de l'interaction avec les NPs. Au-delà de ceci, quelques nuances sont aussi remarquées entre les différents résultats de la RMN car nous ne pouvons toujours pas lier les résultats de toxicité avec les résultats obtenus par RMN. D'abord, l'action des NPs au niveau biologique n'est pas complètement élucidée car plusieurs facteurs sont impliqués dans la toxicité des NPs. Par conséquence, nous suggérons des travaux complémentaires tel que décrit ci-dessous.

Ce projet nous a permis d'améliorer nos connaissances sur la toxicité des nanoparticules étudiées. Vu que les NPs d'oxyde de titane et d'argent sont largement utilisées dans la vie courante, les connaissances acquises dans ce projet suscitent beaucoup de questions quant à l'impact des contaminants dans le milieu aquatique. De plus, ce projet incite la communauté scientifique à développer de nouvelles techniques d'analyse, à l'exemple de la RMN, permettant d'évaluer la toxicité des contaminants sur les systèmes biologiques du milieu aquatique. Plus spécifiquement, nous envisageons dans un futur proche de:

- Déterminer le profil lipidique des deux souches par spectrométrie de masse-MS avant et après exposition aux contaminants. Cette technique permettra de corréler éventuellement les changements d'intensité de pics observés en RMN et de confirmer une forte diminution de la production de lipides.
- Étudier l'interaction par RMN-ÉS des nanoparticules d'Ag et TiO<sub>2</sub> avec des vésicules multilamellaires (MLVs) d'extraits lipidiques de *C. reinhardtii*. En effet, la quantité de lipides extraits des cellules de *C. reinhardtii* peut être de 18 à 24 mg de lipides par gramme de poids sec (~10<sup>9</sup> de cellule), et ceci est intéressant pour la préparation des MLVs.

Enfin, nous envisageons d'étudier d'autres types de contaminants, comme l'atrazine, un pesticide qui est utilisé en agriculture pour éliminer et combattre les mauvaises herbes et qui peut facilement contaminer les réseaux aquatiques et les organismes vivants. Cette étude nous permettra de suivre également leur impact sur les communautés végétales aquatiques et d'établir une liste comparative (fiche signalétique) des différents contaminants de la vie courante.

#### BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, R.J. et Rowan, A. (1991). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll. Boca Raton, FL : CRC Press, 797-834.
- Arnold, A.A., Genard, B., Zito, F., Tremblay, R., Warschawski, D.E. et Marcotte, I. (2015). Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by (1)(3)C solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta*, 1848(1 Pt B), 369-377.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M. et Paknikar, K.M. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett*, 179(2), 93-100.
- Baun, A., Sorensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N.B. et Koch, C.B. (2008). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60). *Aquat Toxicol*, 86(3), 379-387.
- Beal, C.M., Webber, M.E., Ruoff, R.S. et Hebner, R.E. (2010). Lipid analysis of *Neochloris oleoabundans* by liquid state NMR. *Biotechnol. Bioeng.*, 106(4), 573-583.
- Benn, T.M. et Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ Sci Technol*, 42(11), 4133-4139.
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G. et Curtis, A.S. (2004). Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25(23), 5405-5413.
- Blinova, M.I., Iudintseva, N.M., Nikolaenko, N.S., Potokin, I.L., Raykhtsaum, G., Pitkin, M. et Pinaev, G.P. (2010). The cultivation of cells on the porous titanium implants with the different structure. *Tsitologiia*, 52(10), 835-843.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J. et Hofmann, M.C. (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci*, 88(2), 412-419.
- Bridges, C.C. et Zalups, R.K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204(3), 274-308.

- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V. et Donaldson, K. (2001). Sizedependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol*, 175(3), 191-199.
- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A. et Stark, W.J. (2006). In Vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 40(14), 4374-4381.
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L. et Schlager, J.J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B*, 112(43), 13608-13619.
- Chauton, M.S., Størseth, T.R. et Krane, J. (2004). High-resolution magic angle spinning nmr analysis of whole cells of chaetoceros muelleri (bacillariophyceae) and comparison with 13c-nmr and distortionless enhancement by polarization transfer 13C-NMR analysis of lipophilic extracts1. *Journal of Phycology*, 40(3), 611-618.
- Chen, L., Zhou, L., Liu, Y., Deng, S., Wu, H. et Wang, G. (2012a). Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO2) on Chlamydomonas reinhardtii. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 155-162.
- Chen, L., Zhou, L., Liu, Y., Deng, S., Wu, H. et Wang, G. (2012b). Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO<sub>2</sub>) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 84(0), 155-162.
- Chen, X. et Schluesener, H.J. (2008). Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol Lett*, 176(1), 1-12.
- Cheng, Y., Yin, L., Lin, S., Wiesner, M., Bernhardt, E. et Liu, J. (2011). Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(11), 4425-4432.
- Cheung, C.C., Zheng, G.J., Li, A.M., Richardson, B.J. et Lam, P.K. (2001). Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, Perna viridis. *Aquat Toxicol*, 52(3-4), 189-203.

- Cho, M., Chung, H., Choi, W. et Yoon, J. (2004). Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO2 photocatalytic disinfection. *Water Res*, 38(4), 1069-1077.
- Chokouadeu Youmssi, D.V. (2016). Étude du rôle des ions métalliques dans la formation et les propriétés mécaniques des fibres de byssus pour le développement de matériaux biomimétiques.
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. et Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 17(5), 326-343.
- Collard, J.M. et Matagne, R.F. (1990). Isolation and genetic analysis of Chlamydomonas reinhardtii strains resistant to cadmium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2051-2055. PMC.
- Courchesne, N.M., Parisien, A., Wang, B. et Lan, C.Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*, 141(1-2), 31-41.
- Cupi, D., Hartmann, N.B. et Baun, A. (2016). Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of Daphnia magna under guideline testing conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 144-152.
- Das, B.K., Roy, A., Koschorreck, M., Mandal, S.M., Wendt-Potthoff, K. et Bhattacharya, J. (2009). Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Res*, 43(4), 883-894.
- Davey, P.T., Hiscox, W.C., Lucker, B.F., O'Fallon, J.V., Chen, S. et Helms, G.L. (2012). Rapid triacylglyceride detection and quantification in live micro-algal cultures via liquid state <sup>1</sup>H NMR. *Algal Res.*, 1(2), 166-175.
- Desai, P., Patlolla, R.R. et Singh, M. (2010). Interaction of nanoparticles and cellpenetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol Membr Biol*, 27(7), 247-259.
- Domingos, R.F., Baalousha, M.A., Ju-Nam, Y., Reid, M.M., Tufenkji, N., Lead, J.R., Leppard, G.G. et Wilkinson, K.J. (2009). Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ Sci Technol*, 43(19), 7277-7284.

- Drobne, D. (2007). Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. Arh Hig Rada Toksikol, 58(4), 471-478.
- Elliott, D.W. et Zhang, W.X. (2001). Field assessment of nanoscale bimetallic particles for groundwater treatment. *Environ Sci Technol*, 35(24), 4922-4926.
- Farre, M., Gajda-Schrantz, K., Kantiani, L. et Barcelo, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem*, 393(1), 81-95.
- Federici, G., Shaw, B.J. et Handy, R.D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 84(4), 415-430.
- Fenoll, J., Flores, P., Hellin, P., Hernandez, J. et Navarro, S. (2014). Minimization of methabenzthiazuron residues in leaching water using amended soils and photocatalytic treatment with TiO2 and ZnO. *J Environ Sci (China)*, 26(4), 757-764.
- Fernandes, J.C. et Henriques, F.S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. [journal article]. *The Botanical Review*, 57(3), 246-273.
- Fujiwara, K., Suematsu, H., Kiyomiya, E., Aoki, M., Sato, M. et Moritoki, N. (2008). Size-dependent toxicity of silica nano-particles to Chlorella kessleri. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 43(10), 1167-1173.
- Gatti, A.M. et Rivasi, F. (2002). Biocompatibility of micro- and nanoparticles. Part I: in liver and kidney. *Biomaterials*, 23(11), 2381-2387.
- Gilmor, A.M., Itoh, S. et Govindjee. (2000). Global spectral-kinetic analysis of room temperature chlorophyll a fluorescence from light-harvesting antenna mutants of barley. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1402), 1371-1384.
- Govindjee, G. (2004). Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht*, 1-42.
- Grassian, V.H., O'Shaughnessy, P.T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J.M. et Thorne, P.S. (2008). Titanium Dioxide Nanoparticles: Grassian et al. Respond. *Environmental Health Perspectives*, 116(4), A152-A153. PMC.

- Gu, H., Xu, K., Xu, C. et Xu, B. (2006). Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem Commun (Camb)*(9), 941-949.
- Gupta, S.M. et Tripathi, M. (2011). A review of TiO2 nanoparticles. *Chinese Science Bulletin*, 56(16), 1639.
- Hanaor, D., Michelazzi, M., Leonelli, C. et Sorrell, C.C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO 2. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(1), 235-244.
- Hara, K., Zhao, Z.G., Cui, Y., Miyauchi, M., Miyashita, M. et Mori, S. (2011). Nanocrystalline electrodes based on nanoporous-walled WO3 nanotubes for organic-dye-sensitized solar cells. *Langmuir*, 27(20), 12730-12736.
- Harris, E.H. (2001). Chlamydomonas as a model organism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 52, 363-406.
- Hayki, N. (2011). Synthèse et caractérisation de nouveaux polymères obtenus à partir de l'éthylcétène. Rouen, INSA.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. et Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. *Chemosphere*, 71(7), 1308-1316.
- Hoet, P.H., Bruske-Hohlfeld, I. et Salata, O.V. (2004). Nanoparticles known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*, 2(1), 12.
- Hoober, J.K. (1989). The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Elizabeth H. Harris. Academic Press, San Diego, CA, 1989. xiv, 780 pp., illus. \$145. Science, 246(4936), 1503-1504.
- Hood, E. (2004). Nanotechnology: looking as we leap. *Environ Health Perspect*, 112(13), A740-749.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T. et Schlager, J.J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*, 19(7), 975-983.
- Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E.M., Godwin, H., Nel, A.E. et Zink, J.I. (2010). Dispersion and stability

optimization of TiO2 nanoparticles in cell culture media. *Environ Sci Technol*, 44(19), 7309-7314.

- Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E.M.V., Godwin, H., Nel, A.E. et Zink, J.I. (2010). Dispersion and Stability Optimization of TiO(2) Nanoparticles in Cell Culture Media. *Environmental science & technology*, 44(19), 7309-7314. *PMC*.
- Jung, W.K., Kim, S.H., Koo, H.C., Shin, S., Kim, J.M., Park, Y.K., Hwang, S.Y., Yang, H. et Park, Y.H. (2007). Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric. *Mycoses*, 50(4), 265-269.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J. et Lead, J.R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology* and Chemistry, 27(9), 1825-1851.
- Kola, H., Laglera, L.M., Parthasarathy, N. et Wilkinson, K.J. (2004). Cadmium adsorption by Chlamydomonas reinhardtii and its interaction with the cell wall proteins. *Environmental Chemistry*, 1(3), 172-179.
- Lafont, U. (2009). Oxydes de titane mésoporeux: synthèse, caractérisation et modification de surface. université, Montpellier.
- Larese, F.F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M. et Maina, G. (2009). Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 255(1-2), 33-37.
- Leclerc, S. et Wilkinson, K.J. (2014). Bioaccumulation of Nanosilver by Chlamydomonas reinhardtii—Nanoparticle or the Free Ion? *Environmental Science & Technology*, 48(1), 358-364.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D. et Alvarez, P.J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res, 42*(18), 4591-4602.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S. et Hu, Q. (2010). Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng*, *12*(4), 387-391.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.

- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D. et Stark, W.J. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol*, 39(23), 9370-9376.
- Lindahl, M., Yang, D.H. et Andersson, B. (1995). Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem*, 231(2), 503-509.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggard, T., Flanagan, M.B., Lynch, I., Elia, G. et Dawson, K. (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*, 5(9), 7503-7509.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A. et Hermes-Lima, M. (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish Carassius auratus during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 280*(1), R100-107.
- Ma, S. et Lin, D. (2013). The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization. *Environ Sci Process Impacts*, 15(1), 145-160.
- Ma, S. et Lin, D. (2013). The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization.. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(1), 145-160.
- Macfie, S.M. et Welbourn, P.M. (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae). *Arch Environ Contam Toxicol*, 39(4), 413-419.
- Malkin, R. et Niyogi, K. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants, eds. Buchanan, BB, Gruissen, W. & Jones, RL (Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD), 568-628.
- Marcotte, I. (2014). Notes du cours CHI-7180 Méthodes d'analyses spectroscopiques avancées Montréal, Université du Québec à Montréal.
- Mayer, P., Cuhel, R. et Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 31(10), 2525-2531.
- Mazzola, L. (2003). Commercializing nanotechnology. *Nature biotechnology*, 21(10), 1137-1143.

- Minko, I., Holloway, S.P., Nikaido, S., Carter, M., Odom, O.W., Johnson, C.H. et Herrin, D.L. (1999). Renilla luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in Chlamydomonas. *Mol Gen Genet*, 262(3), 421-425.
- Monk, B.C., Adair, W.S., Cohen, R.A. et Goodenough, U.W. (1983). Topography of Chlamydomonas: fine structure and polypeptide components of the gametic flagellar membrane surface and the cell wall. [journal article]. *Planta*, 158(6), 517-533.
- Mussgnug, J.H., Wobbe, L., Elles, I., Claus, C., Hamilton, M., Fink, A., Kahmann, U., Kapazoglou, A., Mullineaux, C.W., Hippler, M., Nickelsen, J., Nixon, P.J. et Kruse, O. (2005). NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Cell*, 17(12), 3409-3421.
- Na, K., Bum Lee, T., Park, K.H., Shin, E.K., Lee, Y.B. et Choi, H.K. (2003). Selfassembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. *Eur J Pharm Sci*, 18(2), 165-173.
- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Yamashita, T., Yamashita, K., Yoshida, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Imazawa, T., Itoh, N., Tsunoda, S. et Tsutsumi, Y. (2010). Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie*, 65(3), 199-201.
- Nagarajan, R.H., T.A. (2008). Nanoparticles: synthesis, stabilization, passivation and functionalization. Washington,dc: American Chemical Society, p.449, 2008. *Washington,dc: American Chemical Society*, 449.
- Nagaya, S., Kawamura, K., Shinmyo, A. et Kato, K. (2010). The HSP terminator of Arabidopsis thaliana increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol*, 51(2), 328-332.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H. et Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372-386.
- Navarro, E.P., Flavio, Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L. et Behra, R. (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to Chlamydomonas reinhardtii. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959-8964.

- Nguyen, A.V., Thomas-Hall, S.R., Malnoe, A., Timmins, M., Mussgnug, J.H., Rupprecht, J., Kruse, O., Hankamer, B. et Schenk, P.M. (2008). Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Eukaryot Cell*, 7(11), 1965-1979.
- O'Brien, R.W., Midmore, B.R., Lamb, A. et Hunter, R.J. (1990). Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions.. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 90(0), 301-312.
- Oberdörster, G.M., A.; Donaldson, K.; Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K.; Cater, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D., Olin, S.; Warheit, D.; Yang, H. (2005). Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. *Particle Fibre Toxico, 2*, 1-8.
- Oukarroum, A. (2007). Vitalité des plantes d'orge (" Hordeum vulgare" L.) en conditions de stress hydrique et thermique analysée par la fluorescence chlorophyllienne. University of Geneva.
- Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L. et Dewez, D. (2013). Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant Lemna gibba. *Environ Toxicol Chem*, 32(4), 902-907.
- Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G. et Strasser, R.J. (2007). Probing the responses of barley cultivars (Hordeum vulgare L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 438-446.
- Oukarroum, A., Polchtchikov, S., Perreault, F. et Popovic, R. (2012). Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, Chlorella vulgaris and Dunaliella tertiolecta. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19(5), 1755-1762.
- Oukarroum, A., Samadani, M. et Dewez, D. (2014). Influence of pH on the Toxicity of Silver Nanoparticles in the Green Alga Chlamydomonas acidophila. [journal article]. *Water, Air, & Soil Pollution, 225*(8), 2038.
- Panyam, J., Sahoo, S.K., Prabha, S., Bargar, T. et Labhasetwar, V. (2003). Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm*, 262(1-2), 1-11.
- Park, K., Tuttle, G., Sinche, F. et Harper, S.L. (2013). Stability of citrate-capped silver nanoparticles in exposure media and their effects on the development of

embryonic zebrafish (Danio rerio). Archives of pharmacal research, 36(1), 125-133. PMC.

- Park, S.T., Lim, K.T., Chung, Y.T. et Kim, S.U. (1996). Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology*, 17(1), 37-45.
- Peersen, O.B. et Smith, S.O. (1993). Rotational resonance NMR of biological membranes. Concepts in Magnetic Resonance, 5(4), 303-317.
- Pelkmans, L. et Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. Traffic, 3(5), 311-320.
- Perreault, F. (2012). Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec, Canada), . Doctorat en sciences de l'environnement.
- Perreault, F., Samadani, M. et Dewez, D. (2014). Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of Lemna gibba L. *Nanotoxicology*, 8(4), 374-382.
- Pochapsky, T.C.P.S.S. (2007). *NMR for physical and biological scientists*. New York : Garland science.
- Poole, C.P. et Owens, F.J. (2003). Introduction to Nanotechnology. : John Wiley & Sons.
- Popov, A.P., Haag, S., Meinke, M., Lademann, J., Priezzhev, A.V. et Myllyla, R. (2009). Effect of size of TiO(2) nanoparticles applied onto glass slide and porcine skin on generation of free radicals under ultraviolet irradiation. J Biomed Opt, 14(2), 021011.
- Prasad, M.N., Drej, K., Skawinska, A. et Strzalka, K. (1998). Toxicity of cadmium and copper in Chlamydomonas reinhardtii wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). *Bull Environ Contam Toxicol*, 60(2), 306-311.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A. et Posewitz, M.C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell*, 9(4), 486-501.
- Raillard, C., Hequet, V., Le Cloirec, P. et Legrand, J. (2004). Comparison of different TiO2 photocatalysts for the gas phase oxidation of volatile organic compounds. *Water Sci Technol*, 50(4), 241-250.

- Regel, R.H., Ferris, J.M., Ganf, G.G. et Brookes, J.D. (2002). Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquat Toxicol*, 59(3-4), 209-223.
- Rogero, S.O., Higa, O.Z., Saiki, M., Correa, O.V. et Costa, I. (2000). Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicol In Vitro*, 14(6), 497-504.
- Rosakis, A. et Köster, W. (2004). Transition metal transport in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii—genomic sequence analysis. *Research in Microbiology*, 155(3), 201-210.
- Samadani, M. (2014). Étude comparative des effets de l'accumulation intracellulaire du cadmium chez les algues Chlamydomonas reinhardtii et Chlamydomonas acidophila Université du Québec à Montréal, Mémoire, Montréal (Québec, Canada). Maîtrise en chimie.
- Sayes, C.M. et Warheit, D.B. (2008). An in vitro investigation of the differential cytotoxic responses of human and rat lung epithelial cell lines using TiO2 nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology*, 5(1), 15-29.
- Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Schlager, J.J., Dai, L. et Hussain, S.M. (2008). Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels? *Nanotechnology*, 19(23), 235104.
- Schulte, P.A. et Salamanca-Buentello, F. (2007). Ethical and scientific issues of nanotechnology in the workplace. *Cien Saude Colet*, 12(5), 1319-1332.
- Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., van Aerle, R. et Tyler, C.R. (2010). Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicol Sci*, 115(2), 521-534.
- Séguin-Heine, M.-O. (2013). Étude de la teneur en métaux, des propriétés mécaniques, de la structure et de la dynamique moléculaire des fibres de byssus de la moule en relation avec son environnement. Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec, Canada). Maîtrise en chimie.
- Singh, S.K., Shrivastava, S., Nayak, M.K., Sinha, A.S., Jagannadham, M.V. et Dash, D. (2009). Stabilization of protein by biocompatible nanoparticles of silver. *Journal of Bionanoscience*, 3(2), 88-96.

- Stirbet, A. et Govindjee. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B*, 104(1-2), 236-257.
- Strasser, R.J. (1992). The Fo and the OJIP fluorescence rise in higher plants and algae. Dans *Regulation of Chloroplast Biogenesis* (p. 423-426) : Springer.
- Strasser, R.J. et Srivastava, A. (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and photobiology*, 61(1), 32-42.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. et Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. Dans Papageorgiou, G. C. et Govindjee (dir.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (p. 321-362). Dordrecht : Springer Netherlands.
- Sunil K. Singh, e.a. (2009). Stabilization of Protein by Biocompatible Nanoparticles of Silver. *Bionanoscience*, Vol.3, 1–9.
- Tachan, Z., Hod, I., Shalom, M., Grinis, L. et Zaban, A. (2013). The importance of the TiO2/quantum dots interface in the recombination processes of quantum dot sensitized solar cells. *Phys Chem Chem Phys*, 15(11), 3841-3845.
- Toukach, F.V. et Ananikov, V.P. (2013). Recent advances in computational predictions of NMR parameters for the structure elucidation of carbohydrates: methods and limitations. *Chemical Society Reviews*, 42(21), 8376-8415.
- Vincent, M. (2006). Études des effets toxiques des ions métalliques du cadmium sur la formation et l'activité des photosystèmes chez l'algue unicellulaire Chlamydomonas reinhardtii. niversité du Québec à Montréal, Montréal (Québec, Canada). Maîtrise en chimie.
- Walker, P.A., Kille, P., Hurley, A., Bury, N.R. et Hogstrand, C. (2008). An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish. *Toxicol Appl Pharmacol*, 230(1), 67-77.
- Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S. et Landsiedel, R. (2009). Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO(2) and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate Daphnia magna. *Chemosphere*, 76(10), 1356-1365.