

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'EFFET DE L'EDTA SUR LA TOXICITÉ DES NANOPARTICULES
D'ARGENT CHEZ LA PLANTE AQUATIQUE *Lemna minor*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
CINDY ELIANA RAMIREZ PEREIRA

JUIN 2019

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.10-2015). 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

Pour commencer, je dois remercier mon directeur de thèse, David Dewez, qui m'a choisi pour faire partie de son groupe de recherche, qui a cru en mes capacités et qui m'a permis de développer mon projet de maîtrise sous sa supervision. Je lui remercie pour le soutien, les connaissances fournies et la confiance que vous m'avez accordée. Son expérience dans le domaine de la nanotoxicologie m'a permis de connaître un domaine très intéressant de la chimie actuelle.

Mes sincères remerciements à mes collègues Venus Esmaeli et Vahid Ghashamsham pour m'avoir appris les techniques et la dynamique du laboratoire. Aussi à Samira et Souleiman qui ont travaillé en parallèle avec leurs travaux de recherche et avec qui j'ai échangé des expériences et des connaissances qui ont enrichi notre processus. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre présence et les moments partagés. C'était très agréable de travailler avec vous.

J'exprime ma gratitude à M. Gwenaël Chamoulaud, directeur technique de Nanoqam, qui m'a formé à gérer les équipements que j'utilise lors de mes recherches et qui a répondu calmement et patiemment à mes questions.

Je remercie également sincèrement toute ma famille pour son soutien, en particulier mon mari Fernando, qui m'a accompagné tout au long de ce processus et m'a apporté son soutien dans les moments de faiblesse. À mes parents, sans qui rien de tout cela ne serait possible. Mon père Rafael et ma mère Monica, qui malgré la distance, m'ont toujours motivé pour atteindre mes rêves. Merci pour les bonnes valeurs, l'éducation et le soutien continu que vous m'avez offert. Je remercie également mes

frères et mes neveux, car ils sont une raison de continuer à se battre. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est aussi la leur.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xiv
RÉSUMÉ	xv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1 CHAPITRE I NANOPARTICULES	4
1.1 Les nanomatériaux.....	4
1.1.1 Classification des nanomatériaux.....	5
1.2 Les nanoparticules (NPs).....	5
1.2.1 Nanotoxicologie	8
1.3 Nanoparticules d'argent (NPs-Ag)	9
1.3.1 Les NPs-Ag dans l'environnement	12
1.3.2 Toxicité des NPs-Ag	15
1.4 Caractérisation des NPs	18
1.4.1 Le diamètre hydrodynamique	19
1.4.2 Le potentiel Zêta	21
2 CHAPITRE II EDTA.....	25
2.1 Utilisation de l'EDTA.....	26
2.2 L'EDTA dans l'environnement	26
2.3 L'EDTA et les métaux.....	28
2.3.1 Les NPs-Ag et l'EDTA	31
3 CHAPITRE III LA PLANTE AQUATIQUE <i>LEMNA MINOR</i>	33
3.1 <i>Lemna minor</i> dans le milieu naturel	33
3.2 <i>Lemna minor</i> comme modèle de laboratoire	36

4	CHAPITRE IV MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
4.1	Préparation du matériel.....	37
4.2	Espèces végétales.....	37
4.2.1	Le milieu de culture 20X AAP.....	39
4.3	Préparation de solutions de NPs-Ag.....	40
4.3.1	Solution mère des NPs-Ag.....	40
4.3.2	Solutions de NPs-Ag à tester.....	41
4.4	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules.....	42
4.4.1	Analyse de la taille de particule	42
4.4.2	Charge de surface	43
4.4.3	Solubilité	43
4.5	Exposition des plantes	45
4.5.1	Mesures et déterminations analytiques	46
4.5.2	Analyses statistiques	49
5	CHAPITRE V RÉSULTATS ET DISCUSSION	50
5.1	Caractérisation des NPs-Ag.....	50
5.1.1	Force ionique du milieu de culture.....	50
5.1.2	Le diamètre hydrodynamique	51
5.1.3	Potentiel ζ	53
5.1.4	Solubilité des NPs-Ag.....	57
5.2	Test de croissance de <i>Lemna minor</i>	60
5.2.1	Apparence des plantes.....	60
5.2.2	Nombre de fronds.....	66
5.2.3	Nombre de plantes.....	69
5.2.4	Poids frais.....	69
5.2.5	Poids sec.....	72
5.2.6	Taux de croissance spécifique.....	74
5.2.7	Bioaccumulation	76

5.2.8	Pourcentage d'inhibition	79
5.3	Discussion générale	81
	CONCLUSION	85
	ANNEXE A COURBE D'ÉTALONNAGE POUR DÉTERMINER LA SOLUBILITÉ DE L'ION Ag+ PAR ICP-OES	87
	ANNEXE B COURBE D'ÉTALONNAGE POUR LA BIOACCUMULATION D'Ag+ DÉTERMINÉE PAR ICP-OES	88
	RÉFÉRENCES.....	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Échelle comparative des tailles de particules (adapté de https://euon.echa.europa.eu/general-information)	4
Figure 1.2 Classification des nanomatériaux a) 0-D, NPs-Au; b) 1-D, fibres polymériques; c) 2-D, pellicules polymériques; d) 3-D, super-réseau obtenu par autoassemblage de NPs-Au (adapté de Gutierrez, 2012).....	5
Figure 1.3 Solutions aqueuses de NPs-Au de différentes tailles de particules. (adapté de http://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/)	6
Figure 1.4 Divers états et configurations de particules à l'état sec et dispersées dans des liquides (adapté de Jiang et al., 2009).....	7
Figure 1.5 La coupe de Lycurgus. À gauche la lumière réfléchiée et à droite la lumière transmise (d'après http://www.thehistoryblog.com/archives/26724)	10
Figure 1.6 Les analyses de bases de données sont réparties selon (a) les domaines de recherche et (b) les pays/régions (d'après Quang Huy et al., 2013)	11
Figure 1.7 Interactions, réactions et transformations de NPs dans les systèmes aquatiques. OM matière organique, f et f ^o groupes fonctionnels (adapté de Delay et al., 2012)	17
Figure 1.8 Comparaison de la densité de lumière diffusée et de la taille entre les grosses et les petites particules (adapté de Malvern Instruments, 2018).....	19
Figure 1.9 Valeurs de potentiel ζ pour des solutions stables et instables.....	22
Figure 1.10 Double couche électrique d'une particule dans un liquide (adapté de https://www.fbioyf.unr.edu.ar).....	23

Figure 2.1 Structure chimique de l'EDTA (d'après https://en.wikipedia.org/wiki/Ethylenediaminetetraaceticacid/media/File:EDTA.svg)	25
Figure 2.2 Combinaison métal-EDTA formant un chélate (d'après https://es.wikipedia.org/wiki/Agente_quelante)	28
Figure 2.3 Chélate formé par des ions argent et l'EDTA, $[Ag-EDTA]^{3-}$ (d'après Mertinez-Andrade et al., 2018)	31
Figure 2.4 Possibilité d'agrégation ou désagrégation des NPs-Ag avec l'addition d'EDTA (Adapté de Mohd Omar et al., 2014)	32
Figure 3.1 Lemna minor (Photographie prise par Ramirez, E., 2018).....	34
Figure 3.2 Eutrophisation d'un corps d'eau par Lemna minor (d'après Danin, 2018)	35
Figure 4.1 Culture de plante aquatique <i>Lemna minor</i>	38
Figure 4.2 Préparation de la solution mère de NPs-Ag dans le milieu de culture 20X AAP.....	40
Figure 4.3 Schéma fonctionnel de l'instrumentation ICP-OES (Siva Sai Kiran B, 2017)	44
Figure 4.5 Exposition des plantes <i>Lemna minor</i> aux NPs-Ag	46
Figure 4.6 Methodologie employée pour la digestion des plantes Lemna minor	48
Figure 5.1 L'influence de la force ionique sur le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel ζ des NPs-TiO ₂ (d'après Jiang et al., 2009).	51
Figure 5.2 Diamètre hydrodynamique des NPs-Ag pour des solutions de 1 mg/L (a) et 10 mg/L (b) d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP. Les effets de l'EDTA ne sont pas statistiquement significatifs.	53
Figure 5.3 Potentiel ζ des solutions de 0,01 à 10 mg/L de NPs-Ag avec différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP (n=3).	56
Figure 5.4 Solubilisation des Ag ⁺ dans les solutions de NPs-Ag de 1 et 10 mg/L avec différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP.....	59

Figure 5.5 Plantes de Lemna minor traitées à 0; 1 et 10 mg/L d'EDTA, après 7 jours d'exposition.....	61
Figure 5.6 Plantes de Lemna minor à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 0,01 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).....	62
Figure 5.7 Plantes de Lemna minor à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 0,1 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).....	63
Figure 5.8 Plantes de Lemna minor à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 1 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).	64
Figure 5.9 Plantes de Lemna minor à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 10 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).....	65
Figure 5.10 Nombre de frondes de Lemna minor à 7 jours d'exposition aux solutions de NPs-Ag (0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L) et à l'EDTA (0; 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives (n=3).....	68
Figure 5.11 Nombre de plantes exposées dans les milieux de culture 20X AAP avec l'EDTA (0; 1 et 10 mg/L) et les NPs-Ag (0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L). Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives (n=3).	70
Figure 5.12 Poids frais de plantes de Lemna minor dans les milieux de culture 20X AAP avec 0; 1 et 10 mg/L d'EDTA, exposées à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives (n=3).....	71
Figure 5.13 Poids sec (mg) des plantes de Lemna minor incubées dans les milieux de culture 20X AAP avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA et exposées à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives (n=3).....	73

- Figure 5.14** Taux de croissance spécifique (j^{-1}) des plantes de *Lemna minor* exposées à 0 (a) ; 1 (b) et 10 (c) mg/L d'EDTA et à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives (n=3). 75
- Figure 5.15** Superposition des courbes des taux de croissance spécifique (j^{-1}) des plantes de *Lemna minor* incubées dans les milieux de culture 20X AAP avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA et exposées à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. 76
- Figure 5.16** Bioaccumulation de l'Ag total ($\text{mg} \times 10^{-3} / \text{mg}$ de poids sec) chez les plantes exposées aux solutions de NPs-Ag (0,01 (a) ; 0,1 (b) ; 1 (c) et 10 (d) mg/L) et d'EDTA (0; 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP (n=3). 78
- Figure 5.17** Pourcentage d'inhibition chez les plantes exposées aux solutions de NPs-Ag (0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP sans ou avec l'EDTA (0 (a) ; 1 (b) et 10 (c) mg/L). Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives (n=3). 80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 Concentrations environnementales prédites de NPs-Ag hautement produites et utilisées dans trois voies majeures de l'environnement.....	14
Tableau 4-1 Conditions d'incubation utilisées pour la culture de Lemna minor.....	38
Tableau 4-2 Composition du milieu de culture 20X AAP.....	39
Tableau 4-3 Conditions expérimentales pour le test.....	42
Tableau 5-1 Diamètre hydrodynamique moyen (nm) et indice de polydispersité (Pdi) des solutions de NPs-Ag dans milieu de culture 20X AAP avec EDTA à 0 ; 1 et 10 mg/L.....	52
Tableau 5-2 Fraction soluble d'Ag ⁺ (mg/L) libérée après 7 jours par des suspensions de NPs-Ag dans le milieu de culture 20X AAP.....	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

BSA	Albumine de sérum bovine
DLS	Dynamic Light Scattering
EDTA	Acid éthylènediaminetétracétique
ICP-OES	Spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif
j	Jour
K_f	Constante de formation
LCDE	Loi canadienne sur la protection de l'environnement
LDE	Laser Doppler Electrophoresis
LDV	Laser Doppler Velocimetry
NPs	Nanoparticules
NPs-Ag	Nanoparticules d'argent
NPs-Au	Nanoparticules d'or
OECD	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PALS	Phase Analysis Light Scattering
Pdi	Indice de polydispersité
Ppb	Parties par milliard
Ppm	Parties par million
RLS	Diffusion de la lumière par résonance

U	Mobilité électrophorétiques
ε	Permittivité électrique du milieu
ζ	Potentiel Zêta

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

%	pourcentage
µg	microgramme
µm	micromètre
cm	centimètre
g	gramme
h	heure
L	litre
lux	éclairage
M	molaire
m ²	mètre carré
mg	milligramme
mm	millimètre
nm	nanomètre
°C	degrés centigrades
ppb	parties par billion
ppm	parties par million
s	seconde
µE	microeinstains

RÉSUMÉ

Les effets inhibiteurs des nanoparticules d'argent (Ag-NP) sur la croissance des lentilles d'eau ont été démontrés dans des études antérieures. L'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) est un ligand organique qui n'est pas naturellement dans l'environnement. Il est rejeté comme déchet après l'utilisation de produits de consommation où il a la fonction d'être un agent de chélation. Bien que l'EDTA ne soit pas une substance toxique pour les êtres vivants en tenant compte des concentrations connues dans l'eau, elle pourrait en quelque sorte modifier l'effet toxique des métaux, dans ce cas, des nanoparticules d'Ag. La caractérisation physico-chimique des nanoparticules a été faite avec des concentrations d'Ag de 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L et d'EDTA de 1 et 10 mg/L dans le milieu de croissance 20X AAP. Les nanoparticules d'Ag ont formé des agrégats au bout de 7 jours avec un diamètre beaucoup plus grand que celui en poudre. Le potentiel z des suspensions a montré une instabilité éventuellement causée par la valeur élevée de la force ionique du milieu de culture. Une légère augmentation de l'intensité des valeurs a été observée dans la solution avec 10 mg/L d'EDTA. La solubilité des nanoparticules a été minimale et inchangée avec la présence de l'EDTA. L'effet de l'EDTA sur la toxicité des nanoparticules d'Ag sur la croissance a été étudié selon la ligne directrice 221 de l'OCDE avec les mêmes conditions de caractérisation physico-chimique. Les nanoparticules d'argent ont démontré une toxicité significative à 10 mg/L. Les effets de l'EDTA sur la toxicité des nanoparticules d'argent ont varié selon les conditions expérimentales.

Mots clés : Nanoparticules d'argent, EDTA, croissance, *Lemna minor*, bioaccumulation,

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Actuellement, les nanoparticules (NPs) sont omniprésentes dans les systèmes aquatiques environnementaux et techniques (Delay et Frimmel, 2012), elles comprennent des matériaux avec des diamètres entre 1 et 100 nm et sont largement utilisées dans l'industrie moderne, en raison de la série de propriétés physico-chimiques que leur taille leur confère. Les risques liés à la libération de nanomatériaux dans l'environnement au cours de leur fabrication, utilisation et élimination des produits ont augmenté proportionnellement dû à la forte expansion des nanotechnologies.

Une attention considérable a été portée aux nanoparticules d'argent (NPs-Ag), qui sont l'une des NPs les plus largement utilisées pour agir comme agents antibactériens dans les revêtements biocides, les shampooings, les savons et les dentifrices, donc c'est normal que le niveau de NPs-Ag dans les eaux usées soit significatif. Selon des études rapportées, il est démontré que l'Ag a une toxicité élevée chez plusieurs organismes dans sa forme ionique ou dissoute, cette toxicité d'argent (Ag) a été exploitée sous la forme de NPs-Ag (Gubbins *et al.*, 2011).

Les propriétés de l'Ag, en tant que bactéricide, ont été utilisées pour la commercialisation de suspensions d'Ag colloïdales comme « compléments pour la santé » (Fabrega *et al.*, 2011). Cependant, il existe des effets indésirables chez les humains et chez tous les êtres vivants. Une exposition élevée aux composés d'Ag peut provoquer une argyrie, une coloration grise permanente de la peau bleutée et d'autres effets toxiques tels que : des dommages au foie et aux reins ; des irritations aux yeux, de la peau, des voies respiratoires et du tractus intestinal ; et des changements

défavorables dans les cellules sanguines (Prabhu et Poulouse, 2012). Bien qu'il n'y ait aucune preuve indiquant que les NPs-Ag affectent les êtres humains par leur utilisation dans les produits de consommation, il est probable que des produits contenant des NPs-Ag produisent de l'argent dissous (Ag^+) et des rejets de NPs-Ag dans l'environnement (Benn et Westerhoff, 2008; Geranio *et al.*, 2009), qui sont susceptibles de subsister et de se bioaccumuler.

Normalement, la chimie de l'environnement affecte l'interaction des ions métalliques avec plusieurs ligands, ce qui se produit également avec les ions d'Ag, influençant leur biodisponibilité et leur toxicité (Adams et Kramer, 1998). L'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) est une substance chimique qui n'est pas naturellement dans l'environnement et qui est principalement utilisé comme agent de chélation ou de conservation dans des produits de nettoyage, des cosmétiques, des médicaments, dans les agents échangeurs d'ions, les produits pour automobiles, le traitement de l'eau, l'emballage alimentaire et les produits antiparasitaires ; ainsi comme dans des produits pour la production d'encre d'imprimerie, les peintures et revêtements. Bien que l'EDTA ne soit pas une substance toxique pour les êtres vivants en fonction des concentrations dans l'eau, elle pourrait en quelque sorte modifier l'effet toxique des métaux, car elle forme des composés complexes avec eux comme ligand (Rodea-Palomares, I. *et al.*, 2009) .

L'objectif principal de ce projet de recherche a été d'étudier les effets de l'EDTA sur la toxicité des NPs-Ag dans la plante aquatique *Lemna minor*. En tenant compte de la caractérisation des NPs dans le milieu de culture, les effets toxiques ont été mesurés par l'évaluation de la croissance de la biomasse et la bioaccumulation d'Ag dans la plante après une exposition de 7 jours. La plante aquatique *Lemna minor* est une espèce végétale qui représente un organisme aquatique approprié pour les études toxicologiques, car il a été démontré qu'elle est très sensible à l'effet toxique des polluants, provoquant l'inhibition des processus photosynthétiques et de la croissance

de la biomasse (Wang, Wuncheng, 1991). Sous des conditions contrôlées de laboratoire, la toxicité des NPs-Ag et l'effet de l'EDTA ont été évalués selon les « *Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Lemna sp. test d'inhibition de la croissance* » (OCDE, 2006). La caractérisation physico-chimique des NPs-Ag a été faite dans le milieu et avec différentes concentrations d'EDTA. La bioaccumulation d'Ag dans les plantes a été déterminée par ICP-OES. Le but de ce projet consiste à contribuer aux connaissances fondamentales pour une meilleure compréhension de l'effet produit par les chélateurs tel que l'EDTA sur la toxicité des NPs, en l'occurrence de l'Ag en utilisant des organismes aquatiques comme *Lemna minor*.

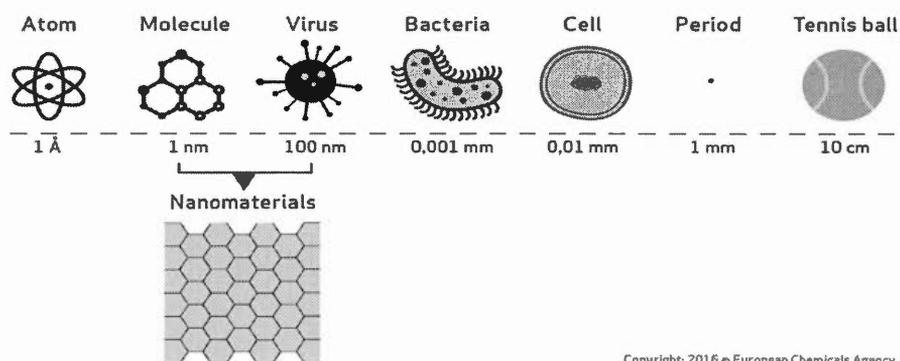
Ce mémoire est constitué de cinq chapitres. Le premier chapitre, décrit les NPs-Ag, leur présence dans l'environnement, leur toxicité et leur propriétés physico-chimiques, tel que le diamètre hydrodynamique, le potentiel Z et la solubilité. Ensuite, dans le deuxième chapitre, l'EDTA et sa présence dans l'environnement sont décrits. Le troisième chapitre discute en détail des organismes modèles qui ont été utilisés pour réaliser les bioessais. L'avant-dernier chapitre explique les approches méthodologiques qui ont été employées. Finalement, les résultats du projet sont présentés dans le dernier chapitre.

1 CHAPITRE I

NANOPARTICULES

1.1 Les nanomatériaux

Les nanomatériaux sont une variété de matériaux émergents, dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nm (figure 1.1). Celles-ci constituent une transition entre les molécules et les atomes, et un matériau solide aux dimensions volumétriques (en vrac). Les matériaux de l'ordre du micromètre ont des caractéristiques similaires à celles propriétés d'un solide en vrac, alors que les nanomatériaux, en raison de leur taille réduite à quelques nanomètres, ont des propriétés qui diffèrent de manière significative des matériaux avec des dimensions plus grandes.



Copyright: 2016 © European Chemicals Agency

Figure 1.1 Échelle comparative des tailles de particules (adapté de <https://euon.echa.europa.eu/general-information>)

1.1.1 Classification des nanomatériaux

Les nanomatériaux peuvent être classés en quatre types en fonction du nombre de dimensions qui sont de l'ordre du nanomètre (nm), comme indiqué sur la figure 1.2 : a) les matériaux de dimension zéro : trois dimensions sont situées dans le régime du nanomètre, comme les NPs, b) d'une dimension ayant une longueur variable conservant une dimension dans le régime du nanomètre comme des nanofils et des nanotubes ; c) les zones à deux dimensions de taille indéfinie conservent leur épaisseur de l'ordre de 1 à 100 nm, comme dans le cas de films minces d) et de trois dimensions, où les matières solides en trois dimensions sont formées par des unités nanométriques (Gutierrez, 2012).

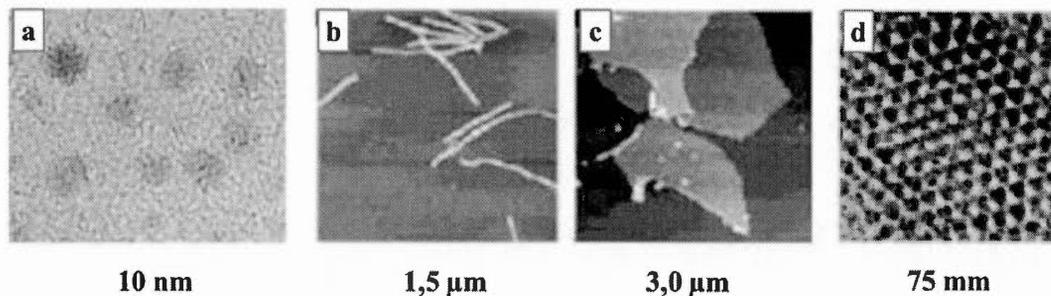


Figure 1.2 Classification des nanomatériaux a) 0-D, NPs-Au; b) 1-D, fibres polymériques; c) 2-D, pellicules polymériques; d) 3-D, super-réseau obtenu par autoassemblage de NPs-Au (adapté de Gutierrez, 2012).

1.2 Les nanoparticules (NPs)

Les NPs ont existé pratiquement depuis toujours et depuis l'antiquité certaines civilisations les ont utilisées en tirant parti de leurs propriétés optiques et médicinales.

Les Égyptiens utilisaient des NPs-Au pour préserver la santé et la jeunesse (actuellement, elles servent pour le traitement de l'arthrite). D'autres civilisations, en plus de les utiliser à des fins de guérison, les ont également employées comme colorants pour les porcelaines. Malgré son usage précoce, ce n'est qu'en 1857 que Faraday a mené une recherche sur la synthèse et les propriétés des colloïdes d'or (Au) (Paciotti *et al.*, 2004). Jusqu'à nos jours, différentes études ont été conduites sur la synthèse, la caractérisation et la manipulation des particules de petite taille. Un contrôle approprié de leurs propriétés peut stimuler de nouvelles connaissances scientifiques ainsi que des innovations technologies ou à l'amélioration de celles qui sont déjà existantes (C. N. R. Rao, 2006).

Les particules métalliques aux dimensions nanométriques sont de grand intérêt pour leurs propriétés inhabituelles. Un électron dans un métal a un libre parcours moyen de 10-100 nm à température ambiante, donc, à mesure que la particule métallique réduit sa taille, des changements significatifs dans son comportement peuvent être observés (Riley *et al.*, 2004). En fait, comme montre la figure 1.3, lorsque des NPs-Au d'un diamètre d'environ 100 nm ou moins sont suspendues dans des milieux transparents, elles apparaissent en rouge (et non en doré) ; et les NPs-Au d'un diamètre de 3 nm ne sont plus « nobles » et non réactives, mais peuvent catalyser des réactions chimiques (Haiss *et al.*, 2007).

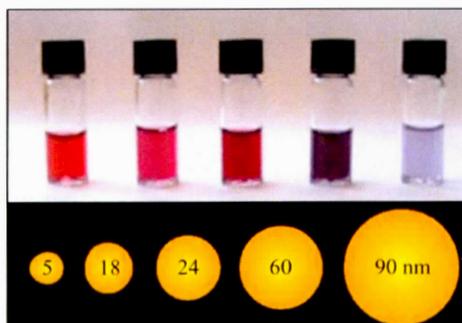


Figure 1.3 Solutions aqueuses de NPs-Au de différentes tailles de particules. (adapté de <http://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>)

Les NPs peuvent être regroupées pour former de plus grandes structures appelées agrégats ou agglomérats (figure 1.4). Dans les agglomérats, l'union entre les non-particules est réalisée au moyen de forces relativement faibles, telles que les liaisons de type van der Waals, par des forces de tension de surface électrostatiques. Dans les agrégats, en revanche, les liaisons entre les particules sont produites avec des liaisons plus fortes qui empêchent leur redispersion par des moyens mécaniques. Dans les agglomérés, la surface spécifique résultante est semblable à la somme de la surface spécifique des composants séparément. Par contre, dans les agrégats, la surface spécifique formée est inférieure à la somme des surfaces spécifiques des composants qui se rejoignent (Jiang *et al.*, 2009).

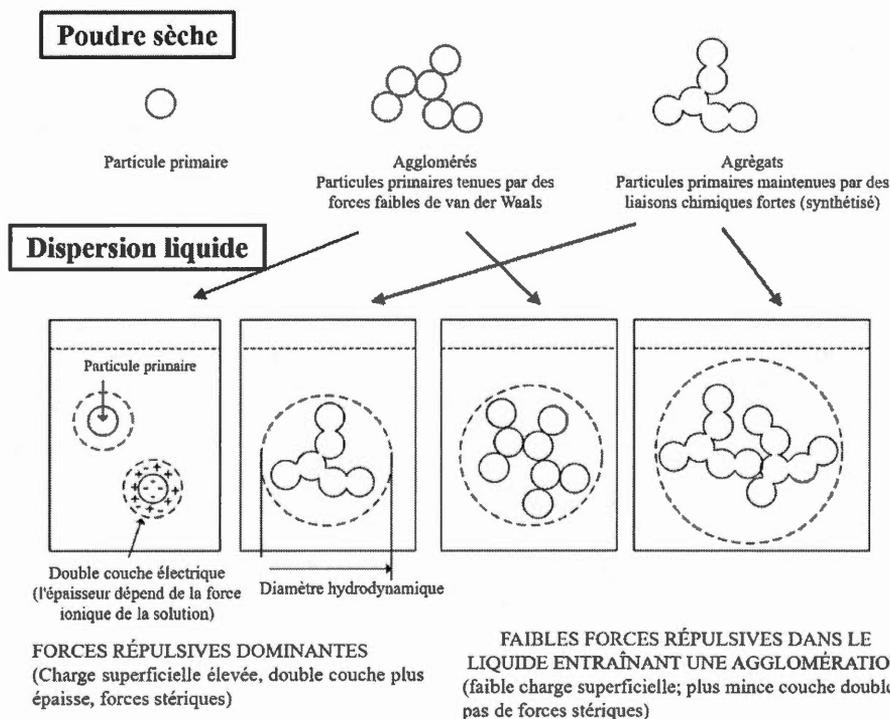


Figure 1.4 Divers états et configurations de particules à l'état sec et dispersées dans des liquides (adapté de Jiang *et al.*, 2009)

1.2.1 Nanotoxicologie

Actuellement, les propriétés améliorées des NPs et le progrès de la nanotechnologie a donné lieu à de nombreuses et nouvelles applications utiles dans l'électronique, les produits chimiques, la protection de l'environnement et la médecine biologique (Yah *et al.*, 2012), ainsi comme à la fabrication d'un grand nombre de produits de consommation avec des NPs. Cependant, des facteurs importants pour expliquer la toxicologie de ces matériaux, comme les voies d'absorption, le transport, la distribution et l'interaction avec les systèmes biologiques du corps, sont encore inconnus. Pour obtenir des informations sur leur comportement dans des milieux environnementaux complexes, des méthodes appropriées de séparation et de détermination des NPs-Ag sont fortement demandées (Yu *et al.*, 2013). Alors, les nanoparticules sont considérées comme un risque émergent qui doit être étudié en profondeur. Les différences dans les propriétés des NPs peuvent présenter des risques inconnus pour la santé humaine et d'autres espèces. Les études réalisées pour les particules plus grandes ne peuvent pas être extrapolées à la toxicité des NPs, car la toxicité d'une substance avec 1 micron de diamètre de particule est différente de la toxicité des particules (de la même substance) ayant seulement un diamètre de 10 nm. En fait, il est possible que les mécanismes de défense des organismes ne réagissent pas de manière adéquate en présence de ces particules, car ses caractéristiques sont encore inconnues (Yang *et al.*, 2005).

En raison de la petite taille des NPs, le pourcentage d'atomes qui se trouvent sur la surface est beaucoup plus grand. Cette caractéristique se traduit par une réactivité élevée et, en général, plus une substance est réactive, plus elle est toxique. Le fait d'augmenter la concentration des NPs n'augmente pas nécessairement l'effet toxique produit. Selon des études toxicologiques (*in vitro* et *in vivo*) faites jusqu'ici, la tendance générale dans certains cas, est que quand il y a une plus grande concentration de nanoparticules, elles ont tendance à s'agglomérer; ce qui peut diminuer leur

biodisponibilité et donc leur toxicité relative. Cela montre que certains concepts traditionnels de toxicologie doivent être modifiés pour leur application en nanotoxicologie. Des propriétés telles que la forme, la taille et la structure de surface des nanoparticules sont des facteurs fondamentaux pour déterminer leur toxicité (Oberdörster *et al.*, 2005).

En matière environnementale, il n'y a pas assez de données sur la quantité des NPs rejetés dans les écosystèmes aquatiques et leur influence sur les êtres vivants. Alors, il existe un besoin urgent d'informations supplémentaires sur les risques écologiques des NPs métalliques (Afifi *et al.*, 2016). Récemment, plusieurs études ont montré leur intérêt pour examiner la toxicité des NPs. Certaines de ces études ont prouvé la toxicité des NPs, telle que les oxydes métalliques pour les bactéries, les cellules humaines, les rongeurs et les milieux aquatiques (Lin et Xing, 2007).

1.3 Nanoparticules d'argent (NPs-Ag)

Pendant des siècles, la synthèse de particules d'Ag de taille nanométrique a été réalisée, bien qu'elle n'ait pas été intentionnelle. La coupe de bronze Lycurgus du 4^e siècle apr. J.-C. (figure 1.5) est le premier exemple connu. Dans cette tasse, le verre coloré diffuse la lumière verte et transmet la lumière rouge, car il contient un alliage des NPs métalliques d'environ 70 nm (70 % d'argent et 30 % d'or) (Barber, D. J. et Freestone, 1990). En Espagne, il existe de nombreux exemples de décorations céramiques à lustre du XII^e siècle, un type de décor dans lequel des nanoparticules d'argent et d'autres métaux ont été utilisés pour produire un effet de brillance métallique à la surface de celles-ci. Dans le cas spécifique du lustre doré, ceci a été fait par un mélange de pièces de couleur ocre rouge, oxyde de cuivre et d'argent.



Figure 1.5 La coupe de Lycurgus. À gauche la lumière réfléchie et à droite la lumière transmise (*d'après* <http://www.thehistoryblog.com/archives/26724>)

Le développement des nanomatériaux d'Ag s'est inspiré des exemples historiques décrits ci-dessus. En raison du grand nombre d'applications dans différents domaines, la communauté scientifique et l'industrie ont accordé une attention particulière au sujet de recherche des NPs-Ag. Les produits contenant des NPs-Ag constituent le groupe le plus important (55,4 %) de tous les produits de consommation à base de nanobases disponibles sur le marché en mars 2011 (Rejeski *et al.*, 2011). La figure 1.6 montre, pour l'année 2012, le pourcentage d'investigations sur les NPs-Ag par domaine et les pays où ces enquêtes sont menées. La chimie et la science des matériaux sont maintenant les champs de recherche les plus importants des NPs-Ag et la Chine a le plus d'articles publiés sur les NPs-Ag (Quang Huy *et al.*, 2013). Les NPs-Ag ont été largement utilisés dans la biomédecine, les biocapteurs, la catalyse, les produits pharmaceutiques, la conductivité électrique, la photonique, comme substrats pour la Spectroscopie Raman à surface améliorée en raison de l'existence de plasmons de surface (Nasrollahzadeh *et al.*, 2014), ainsi qu'en optique, en détection, en peinture et en cosmétique, grâce à la découverte de ses nombreuses propriétés sous forme nanométrique (Chen, X. et Schluesener, 2008; Schluesener et Schluesener, 2013).

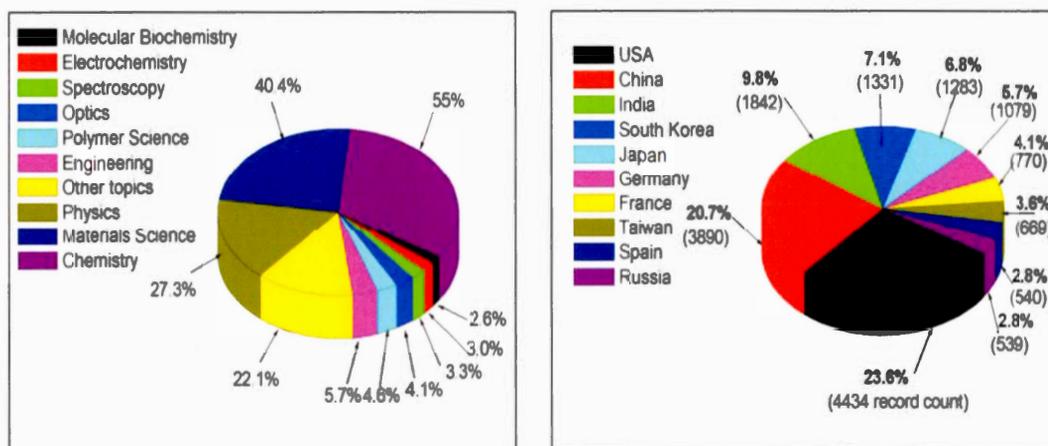


Figure 1.6 Les analyses de bases de données sont réparties selon (a) les domaines de recherche et (b) les pays/régions (*d'après Quang Huy et al., 2013*)

Les ions d'Ag et les NPs-Ag ont des propriétés antibactériennes qui ont été fortement étudiées. Les NPs-Ag sont utilisées, par exemple, dans le secteur de la santé pour réduire les infections en les ajoutant aux bandages, aux cathéters et aux dispositifs médicaux ; dans le secteur sportif et d'autres textiles, ils sont ajoutés aux lessives et déodorants, où les NPs-Ag réduisent les odeurs produites par les bactéries (Hartemann *et al.*, 2014). Les fibres de coton avec NPs-Ag présentaient une activité antibactérienne élevée contre *Escherichia coli* (Chen, Chuh-Yean et Chiang, 2008; Yeo *et al.*, 2003), et bien que les ions d'Ag aient également cet effet antibactérien, selon Morones *et al.* le mécanisme de l'activité inhibitrice des NPs-Ag est différent du mécanisme des ions d'Ag (Morones *et al.*, 2005). Une perturbation complète de la membrane bactérienne a été mise en évidence au bout de quelques minutes au contact avec des concentrations nanomolaires de NPs-Ag. Il a été proposé que la grande surface disponible pour les interactions génère la grande efficacité de NPs-Ag (Raffi *et al.*, 2007). Cette haute efficacité est également produite dans les ions d'Ag, mais sous des concentrations micromolaires (Lok *et al.*, 2006).

Les NPs-Ag ont également été utilisés dans les capteurs à l'échelle nanométrique en raison de leurs propriétés électrochimiques qui offrent des temps de réponse plus rapide et des limites de détection plus faibles (Hahm et Lieber, 2004). Les nanoparticules d'Ag préparées révèlent une activité catalytique plus rapide que celle des ions d'Ag (Bindhu et Umadevi, 2015). D'après Nasrollahzadeh *et al.*, les NPs-Ag sont l'un des catalyseurs les plus généraux et les plus actifs décrits à ce jour pour la synthèse des urées N-monosubstituées (Nasrollahzadeh *et al.*, 2014).

Les propriétés optiques des NPs-Ag sont dues à leur taille, à leur forme et à l'environnement dans lequel elles se trouvent ; ces caractéristiques influencent la fréquence et la largeur de la surface des bandes d'absorption de Plasmon (Kelly *et al.*, 2003). Dans les NPs-Ag, la couleur intense est provoquée par la résonance de surface de Plasmon, qui correspond à l'oscillation collective des électrons libres dans la bande de conduction, provoquée par l'interaction avec un champ électromagnétique (Kazim *et al.*, 2011; Niitsoo et Couzis, 2011). Par exemple, des nanoclusters, composés de 2 à 8 atomes d'Ag, pourraient constituer la base d'un nouveau type de stockage de données optiques. De plus, les émissions fluorescentes pourraient également être utilisées dans les marqueurs biologiques et les écrans électroluminescents (Díez et Ras, 2011; Hu *et al.*, 2016).

1.3.1 Les NPs-Ag dans l'environnement

Comme conséquence de l'utilisation généralisée des NPs-Ag, les préoccupations pour l'environnement et pour la santé humaine ont augmenté. Il est prévu qu'une quantité importante de NPs-Ag se dépose en tant que déchet dans les écosystèmes aquatiques, avec des effets négatifs possibles dus à leurs propriétés antibactériennes (Sun, Tian Yin *et al.*, 2014). En plus, l'industrie des NPs-Ag a considérablement augmenté ces dernières années, avec une production mondiale estimée à 55 tonnes/an (Piccinno *et al.*, 2011). En réponse à cette préoccupation, une coalition de consommateurs défenseurs de la santé et de l'environnement a déposé une

requête légale en 2008 auprès de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, en exigeant que l'agence utilise son autorité pour arrêter la vente de plus de 260 produits de consommation contenant des versions nanométriques d'Ag (Miao *et al.*, 2010).

Les concentrations environnementales estimées de NPs-Ag ont été signalées dans plusieurs études (Tableau 1-1) dans des plages allant de 8×10^{-7} à 320 ng/L dans les eaux de surface, de $1,78 \times 10^{-3}$ à 42,5 ng/L et de 1,55 à 14 mg/kg, respectivement dans les effluents et les boues des stations de traitement des eaux résiduelles. La concentration d'Ag dans les eaux de surface (intervalle ng/L) peut provenir du lessivage naturel et des effluents miniers et industriels. Les boues d'épuration pourraient être la principale source d'entrée des NPs-Ag dans l'environnement, bien que les sédiments, les effluents des eaux usées et du sol puissent également contribuer à la contamination environnementale de NPs-Ag (Nam *et al.*, 2014). Il convient de noter que ces valeurs sont parfois calculées en contemplant toutes les espèces du matériau (par exemple, NPs de Ag_2S , Ag^+ et Ag) et d'autres fois simplement en considérant la forme prédominante attendue (Maurer-Jones *et al.*, 2013). L'augmentation prévue de la production des NPs-Ag et de déchets augmenteront de manière significative les valeurs de PEC dans les eaux de surface dans un avenir proche et entraîneront un risque environnemental accru (Fabrega *et al.*, 2011; Massarsky *et al.*, 2014).

Tableau 1-1 Concentrations environnementales prédites de NPs-Ag hautement produites et utilisées dans trois voies majeures de l'environnement.

Voie d'accès à l'environnement	Concentration	Référence
Eau de surface	0,0008 µg/L	(Mueller et Nowack, 2008)
	1-10 µg/L	(Klaine <i>et al.</i> , 2008)
	0,764 ng/L (Europe)	(Gottschalk <i>et al.</i> , 2009)
	0,116 ng/L (USA)	
	40-320 ng/L	(Blaser <i>et al.</i> , 2008)
	0,66 ng/L	(Sun, Tian Yin <i>et al.</i> , 2014)
	0,002 ng/L (Europe)	(Dumont <i>et al.</i> , 2015)
Effluents des stations de traitement des eaux résiduelles	1.78 à 4.27 µg/L (eaux usées communes – USA)	(Shafer <i>et al.</i> , 1998)
	24 – 105 µg/L (usines recevant des charges d'Ag élevées provenant de rejets industriels – USA)	
	42,5 ng/L (Europe)	(Gottschalk <i>et al.</i> , 2009)
	21 ng/L (USA)	
	2-18 µg/L	(Blaser <i>et al.</i> , 2008)
Boue des stations de traitement des eaux résiduelles	1,68 mg/Kg (Europe)	(Gottschalk <i>et al.</i> , 2009)
	1,55 mg/Kg (USA)	
	2 – 14 mg/Kg	(Shafer <i>et al.</i> , 1998)

Une fois les NPs-Ag libérés, la stabilité colloïdale affecte dans une large mesure la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité des NPs dans tout écosystème. La stabilité

colloïdale dépend de nombreux facteurs tels que le type d'agent d'enrobage, les conditions environnementales, le pH, la force ionique et la composition de l'électrolyte de fond (Badawy *et al.*, 2010). Il a été récemment signalé que la force ionique, le pH et le type ionique étaient à l'origine de modifications de la charge de surface et du potentiel d'aggrégation des suspensions de NPs-Ag susceptibles de dominer l'environnement (Badawy *et al.*, 2010; Yang, Yaning *et al.*, 2019). Par exemple, Chambers *et al.* indiqué que les conditions de plus grande force ionique amélioraient l'agglomération de NPs-Ag (Chambers *et al.*, 2014). Cette agglomération affecte les résultats de toxicité, ce qui a un impact significatif sur la réponse des microorganismes (Jiang *et al.*, 2009).

1.3.2 Toxicité des NPs-Ag

Les études qui montrent l'impact négatif des NPs-Ag sur l'environnement et probablement sur les êtres humains, sont très récurrentes et ont fait l'objet de recherches en cours ces dernières années. Les risques potentiels de toxicité des NPs-Ag ont été documentés avec de nombreux modèles. Par exemple, la toxicité a été observée chez les micro-organismes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) (Raffi *et al.*, 2007; Rodea-Palomares, I. *et al.*, 2009; Sotiriou et Pratsinis, 2010; Zheng *et al.*, 2018; Zille *et al.*, 2015), dans des cellules de mammifères (Sun, Xia *et al.*, 2016), dans des poisson (*poisson zèbre*, *oreochromis niloticus*) (Afifi *et al.*, 2016; Asharani *et al.*, 2008; Lacave *et al.*, 2016), chez les invertébrés (*Caenorhabditis elegans*) (Luo *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2010), chez les plantes aquatiques (*Lemna gibba*, *Lemna minor*) (Gubbins *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Oukarroum *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2018) et terrestres (*Lolium multiflorum*) (Yin *et al.*, 2011), chez les algues (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*) (Miao *et al.*, 2010; Oukarroum *et al.*, 2012), dans la Levure (Ivask *et al.*, 2014) et dans les cellules humaines (les kératinocytes de la peau, fibroblastes du poumon et cellules de glioblastome) (AshaRani *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010).

En général, la toxicité des NPs-Ag s'explique par la libération d'ions d'Ag, mais il n'est pas encore clair si les NPs-Ag sont une cause directe d'une augmentation de la toxicité. Les NPs-Ag ont moins de 100 nm et contiennent entre 20 et 15 000 atomes d'Ag (Bao *et al.*, 2015), ce qui pourrait expliquer en partie cette augmentation de la toxicité. Cela a été rapporté dans des études antérieures avec des algues et d'autres plantes supérieures (Navarro *et al.*, 2008 a, b; Stampoulis *et al.*, 2009). Cependant, Gubbins *et al.* ont présenté des preuves que l'effet toxique de l'Ag provenant de la dissolution des NPs-Ag ne peut pas expliquer entièrement l'effet toxique des NPs-Ag, car la mesure de l'Ag dissous dans leur solution d'exposition était moins de 1 % de l'Ag total. Bien qu'il soit également possible que la présence de plantes dans le système améliore la libération des NPs-Ag par Ag^+ ou que les NPs-Ag prisées fournissent une source d'ions Ag^+ (Gubbins *et al.*, 2011).

D'autre part, Yin *et al.*, dans leur étude avec *Lolium multiflorum* (herbe commune), ont montré que les NPs-Ag stabilisées avec de la gomme arabique perturbaient plus fortement la croissance de la plante que la même dose d'Ag ajoutée sous forme d' AgNO_3 . Par conséquent, ils ont mis en évidence un effet spécifique des nanoparticules qui ne pourrait pas être expliqué par l' Ag^+ dissous, en concluant que l'atteinte aux cellules et l'inhibition de la croissance peuvent être directement liées au comportement des nanoparticules (Yin *et al.*, 2011), ce qui implique la transformation dans les milieux biologiques et environnementaux, comme l'oxydation de surface, la libération d'ions d'Ag et l'interaction avec les macromolécules biologiques (Nam *et al.*, 2014), en raison de conditions environnementales différentes. La figure 1.7 montre les interactions, réactions et transformations possibles des NPs dans les écosystèmes aquatiques.

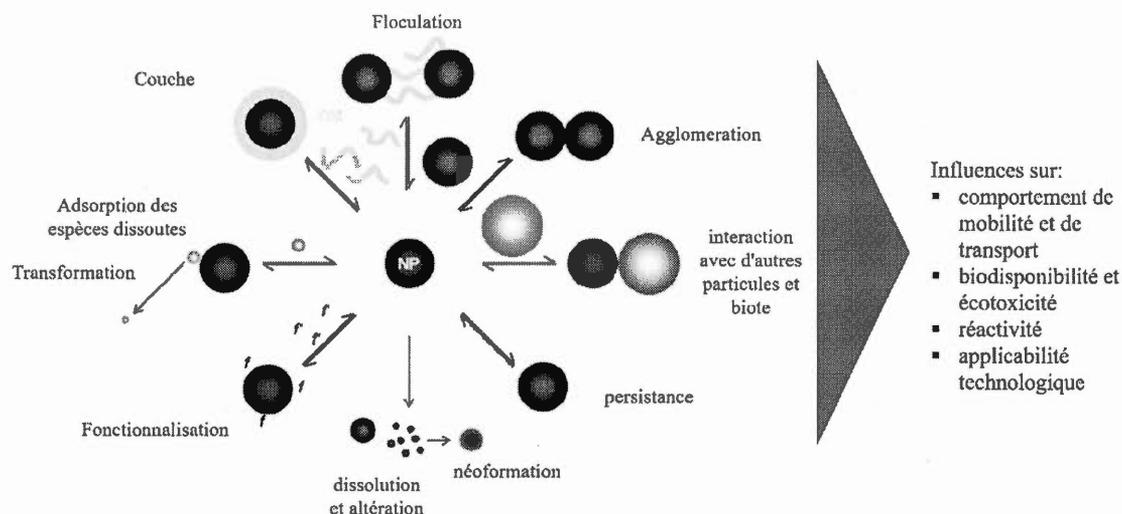


Figure 1.7 Interactions, réactions et transformations de NPs dans les systèmes aquatiques. OM matière organique, f et f' groupes fonctionnels (adapté de Delay *et al.*, 2012)

Yang *et al.*, dans leur étude de l'influence de la force ionique sur la toxicité des NPs-Ag chez *C. elegans*, montrent que la quantité d'Ag dissous était la plus faible dans le milieu nutritif présentant la toxicité la plus élevée. Cela indique que la quantité d'Ag dissous ne correspond pas nécessairement à la toxicité grave des NPs-Ag. (Yang, Yaning *et al.*, 2019). Tandis que d'autres études ont montré que la toxicité produite par les NPs-Ag varie en fonction de la taille des particules (Ahn *et al.*, 2014). Il existe des preuves suggérant que les NPs-Ag plus petites sont plus toxiques que les NPs plus grandes. Par exemple, Liu *et al.* ont constaté que les NPs-Ag de 5 nm étaient plus toxiques pour les cellules humaines que les NPs-Ag de 20 et 50 nm (Liu *et al.*, 2010). Et une étude précédente de l'équipe de Yang a également montré que les NPs-Ag à 25 nm étaient plus toxiques pour *C. elegans* à travers la chaîne alimentaire que les NPs-Ag à 75 nm. Ils ont aussi montré que les NPs-Ag peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et provoquer une toxicité pour les organismes supérieurs, ce qui suggère

qu'ils sont nocifs pour les écosystèmes (Luo *et al.*, 2016). Il a été signalé, de la même façon, que différents milieux de dispersion modifiaient la toxicité des NPs-Ag dans les cellules hépatiques humaines et les cellules intestinales de poisson (Minghetti et Schirmer, 2016; Xue *et al.*, 2016). Cupi *et al.* ont montré que des pH différents dans le milieu d'exposition influent sur le comportement et la toxicité des NPs-Ag sur *Daphnia magna* (Cupi *et al.*, 2016). Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la toxicité des NPs-Ag est principalement due à la libération d'ions d'Ag à partir des NPs, aux interactions à l'interface des cellules avec les NPs et/ou à une toxicité spécifique des particules (Yang, Yaning *et al.*, 2019).

1.4 Caractérisation des NPs

La caractérisation des propriétés des NPs-Ag est indispensable pour déterminer leur potentiel de toxicité et garantir que les résultats sont reproductibles et significatifs. Un ensemble important de propriétés à prendre en compte dans les études toxicologiques a été identifié, notamment la taille, l'état de dispersion, la charge de surface, la forme, la composition chimique, la surface et la chimie de surface (Jiang *et al.*, 2009). La caractérisation des nanoparticules dans le test biologique est essentielle, car des modifications physicochimiques potentielles (l'agglomération et la variation de la charge de surface) peuvent se produire en solution. Ces changements peuvent avoir un impact significatif sur les réponses toxicologiques (Powers *et al.*, 2007). Par exemple, la taille des nanoparticules influence leurs interactions avec les systèmes biologiques. L'agglomération dans les dispersions et les distributions de taille hydrodynamique des nanoparticules peuvent être altérées par un léger changement de la charge de surface de la particule.

1.4.1 Le diamètre hydrodynamique

Pour déterminer la taille des particules et l'indice de polydispersité (Pdi), la diffusion dynamique de la lumière (DLS pour son acronyme en anglais « Dynamic Light Scattering ») est utilisée. Le DLS est une technique physico-chimique que sert pour caractériser la distribution des tailles de particules dans une suspension (Foord *et al.*, 1970). La diffusion dynamique de la lumière prend en compte la variation de l'intensité de la dispersion dans le temps. La lumière laser disperse les particules en suspension dans toutes les directions possibles. Si une direction est séparée, les faisceaux de lumière diffusés par différentes particules interfèrent les uns avec les autres et une intensité de dispersion donnée est obtenue. Les positions relatives des particules fluctuent constamment entre elles, en raison du mouvement brownien, qui entraîne également des modifications dans les conditions d'interférence et de l'intensité de la dispersion elle-même. L'accélération de la variation de l'intensité de la dispersion indique que les particules se déplacent rapidement (petites particules). Au contraire, les variations les plus lentes correspondent à des particules lentes (grandes), comme le montre la figure 1.8.

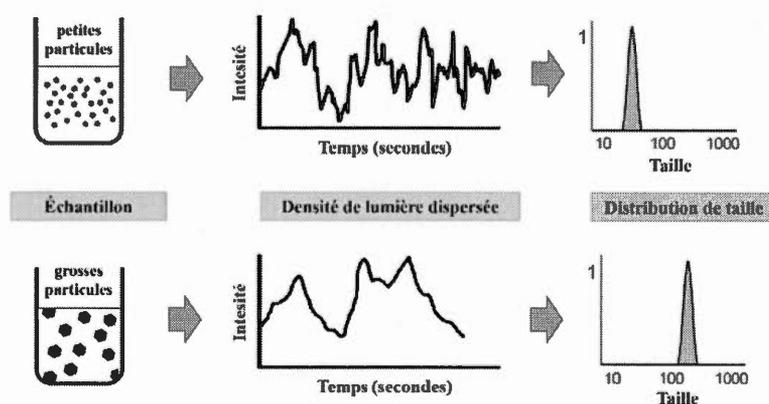


Figure 1.8 Comparaison de la densité de lumière diffusée et de la taille entre les grosses et les petites particules (*adapté de Malvern Instruments, 2018*).

L'échantillon reste en suspension sous une lumière dynamique. Le terme « dynamique » fait référence à la « vibration » des particules qui composent l'échantillon, mais ne désigne pas le mouvement de l'échantillon dans son ensemble. Le DLS est une technique utile pour évaluer les interactions macromoléculaires et détecter la formation d'agrégats en solution (Kadima *et al.*, 1991).

En DLS, la corrélation des fluctuations temporaires de l'intensité de la lumière diffusée est calculée pour déterminer l'intensité du coefficient de diffusion moyen pondéré (m^2/s), D , des particules. Le diamètre hydrodynamique moyen, d_p , peut être estimé à partir du coefficient de diffusion en utilisant l'équation de Stokes-Einstein :

$$d_p = kT/3\pi\mu D$$

Où k est la constante de Boltzmann (J/K), T est la température absolue (K) et μ la viscosité du milieu (kg/m s). Le diamètre hydrodynamique est le diamètre d'une sphère ayant le même coefficient de diffusion que les particules. Une distribution de taille est requise pour décrire la dispersion, car plusieurs particules de tailles différentes sont normalement présentes dans la solution. En ajustant la courbe de corrélation à une forme exponentielle multiple, il est possible de déterminer l'intensité de la distribution de taille (Jiang *et al.*, 2009).

Selon Powers *et al.*, la taille des particules peut influencer considérablement sur la manière dont un organisme réagit à l'exposition, notamment dans les domaines suivants :

- ✓ La taille peut contrôler où et comment le corps réagit aux particules après l'exposition.
- ✓ La taille peut influencer sur la capacité d'un organisme à éliminer les particules étrangères.

- ✓ La taille peut être un facteur dans la destination finale des particules qui ne sont pas éliminées (translocation, accumulation)
- ✓ La taille des particules peut influencer les mécanismes directs et l'étendue de la toxicité (cytotoxicité, nécrose et mutagénicité)
- ✓ La taille affecte directement le rapport surface/masse (surface spécifique) et peut avoir des effets dramatiques sur la réactivité de surface et la solubilité des systèmes de particules (Powers *et al.*, 2007).

1.4.2 Le potentiel Zêta

Le potentiel zêta est une propriété des nanomatériaux qui mesure le potentiel électrocinétique dans les systèmes colloïdaux, il est généralement désigné par la lettre grecque zeta (ζ). Cette propriété est liée à la charge de surface des nanoparticules et estime l'ampleur de la répulsion ou de l'attraction entre elles, par conséquent, elle peut être utilisée pour évaluer sa stabilité et le degré d'agrégation dans la suspension (Khoshnevisan et Barkhi, 2015).

Si une valeur absolue élevée du potentiel ζ est obtenue, les nanoparticules auront tendance à se repousser et la solution ou la dispersion résisteront à l'agrégation, en se stabilisant électriquement. Cependant, si les nanoparticules ont des valeurs du potentiel ζ faibles, elles finiront par flocculer, car il n'y a pas de force pour les arrêter. Comme le montre la figure 1.9, la ligne de démarcation entre les suspensions stables et les instables est établie entre +30 mV et -30 mV (Malvern Instruments Ltd., 2013). Cette stabilité des dispersions dépend de l'équilibre entre les charges électrostatiques répulsives dans la particule colloïdale et les forces attractives de van der Waals (Lopes *et al.*, 1999). Un potentiel positif est fortement recommandé pour favoriser

l'internalisation des nanoparticules dans les membranes cellulaires pour des applications biologiques.

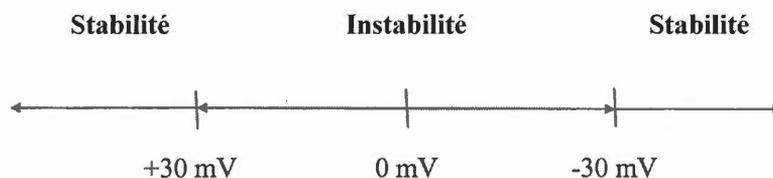


Figure 1.9 Valeurs de potentiel ζ pour des solutions stables et instables.

Le potentiel ζ est calculé par la mobilité électrophorétique dans la dispersion, qui correspond au mouvement d'une particule chargée vers l'électrode de polarité opposée, après l'application d'un champ électrique. La technique est connue sous le nom d'électrophorèse laser Doppler (LDE) ou de vélocimétrie Doppler (LDV). La lumière diffusée des particules en mouvement se déplacera en fréquence lorsqu'un faisceau laser traverse l'échantillon soumis à l'électrophorèse. La mobilité électrophorétique ($\text{m}^2/\text{V s}$), U , peut être déterminée en mesurant le décalage de fréquence, compte tenu de la longueur d'onde du laser et de l'angle de diffusion. Le potentiel ζ peut être calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant l'équation de Smoluchowski :

$$\zeta = \mu U / \varepsilon$$

où ε est la permittivité électrique du milieu ($\text{C}^2/\text{N m}^2$) (Lyklema, 2003). Il convient de noter que le potentiel ζ quantifie la magnitude de la charge électrique dans la double couche, c'est-à-dire que c'est le point où la couche diffuse et celle de Stern sont réunies. Il ne s'agit pas exactement du potentiel de surface (charge de surface) ni du potentiel électrique de Stern dans la double couche. Cependant, le potentiel ζ est

souvent le seul moyen disponible pour la caractérisation des propriétés de la double couche, car elle détermine les forces entre les particules (Jiang *et al.*, 2009).

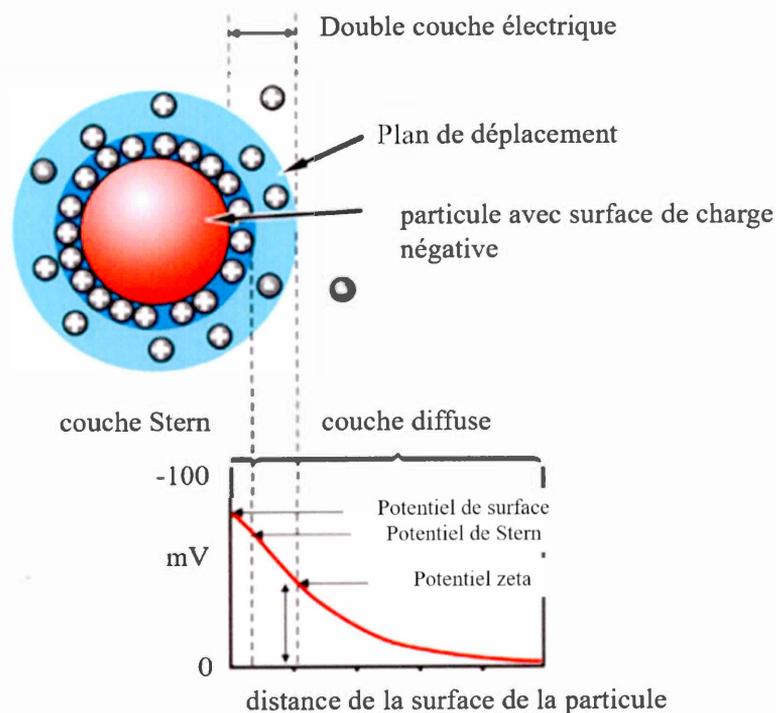


Figure 1.10 Double couche électrique d'une particule dans un liquide (*adapté de <https://www.fbioyf.unr.edu.ar>*)

Les valeurs de potentiel ζ dépendent des conditions chimiques de la surface des particules et du dispersant. De petites modifications du pH ou de la concentration entraînent des modifications du potentiel ζ . La théorie LDE explique une réduction de l'épaisseur de la double couche diffuse en augmentant la force ionique. Cela permet une plus grande interaction entre particules entraînant une augmentation du niveau d'agrégation et du potentiel de sédimentation des particules (Badawy *et al.*, 2010). Jiang

et al. a rapporté qu'en augmentant la force ionique d'une solution de NPs-TiO₂, la taille des particules agrégées était multipliée par 50 fois après 5 min (Jiang *et al.*, 2009). Dans la même étude, en modifiant le pH de la solution, il y avait un changement significatif de la charge de surface des particules et, par conséquent, du diamètre hydrodynamique (Jiang *et al.*, 2009).

2 CHAPITRE II

EDTA

L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est un acide organique fort (environ 1000 fois plus puissant que l'acide acétique) et ne semble pas être trouvé naturellement. Il a une haute affinité pour les ions alcalino-terreux et les ions de métaux lourds. Cette grande affinité aboutit généralement à la formation de complexes hexadentates grandement stables et solubles. Il coordonne les métaux lourds de manière réversible grâce à quatre positions acétate et deux positions amino (figure 2.1), formant des complexes cycliques non ioniques coordonnés (chélates), solubles dans l'eau et pratiquement indissociables.

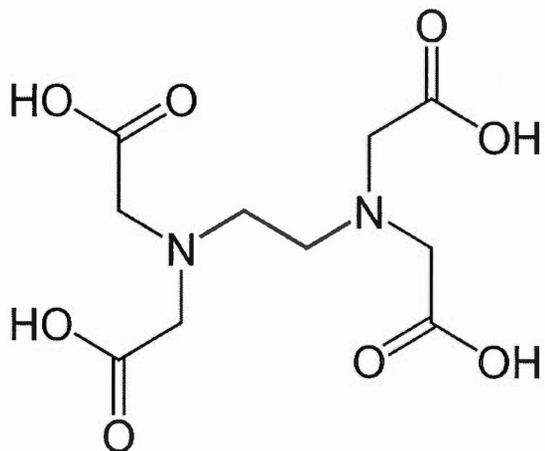


Figure 2.1 Structure chimique de l'EDTA (*d'après* <https://en.wikipedia.org/wiki/Ethylenediaminetetraaceticacid/media/File:EDTA.svg>)

2.1 Utilisation de l'EDTA

La capacité de l'EDTA de développer des complexes est utilisée commercialement pour favoriser ou inhiber les réactions chimiques, en fonction de l'application (EPA, 2004). Il est employé depuis plus de 50 ans pour fournir aux plantes des micronutriments dans le sol et la culture hydroponique. L'EDTA a commencé à être utilisé comme agent chélateur pour l'assistance des processus de phytoextraction à la fin des années 1980 et au début des années 1990 (Evangelou *et al.*, 2007). Actuellement, les agents chélateurs, tels que l'EDTA, sont largement utilisés comme réactifs d'extraction pour la décontamination des métaux lourds, en raison de leur forte capacité de chélation des métaux et de leur faible coût (Martínez *et al.*, 2006), modifiant la spéciation naturelle des métaux et influant sur leur biodisponibilité (Kari et Giger, 1996; Schowanek *et al.*, 1996).

L'EDTA est largement utilisé dans les détergents ménagers, l'industrie photographique, la production de métal, la pharmacie, l'industrie textile, la fabrication du papier, l'alimentation et l'agriculture. Les usines de pâtes et papiers utilisent l'EDTA pour inactiver les ions métalliques qui catalysent la décomposition de l'eau de Javel (Kari et Giger, 1996; Sillanpää et Sihvonen, 1997). En 2011, l'EDTA et ses sels dérivés ont été produits au Canada en quantités allant de 100 à 10 000 Kg et importés au pays en quantités allant de 100 à 10 000 000 Kg (Gouvernement du Canada, 2018).

2.2 L'EDTA dans l'environnement

L'EDTA est rejeté dans l'environnement principalement dans les eaux usées domestiques par l'utilisation de savons, de détergents et d'autres produits de nettoyage ; et dans les effluents industriels résultant du blanchiment des textiles et du papier, du traitement du matériel photographique et du nettoyage industriel des tuyaux et des systèmes de réservoirs. L'EDTA est également libéré lors de l'enfouissement des

produits de consommation qui en contiennent. Les détergents sont probablement la principale source d'EDTA dans les eaux usées domestiques. Ils représentent environ 100 parties par milliard (ppb) de la concentration totale d'EDTA dans les flux d'eaux usées moyens et avec quantités plus petites provenant probablement d'aliments et autres produits de consommation (EPA, 2004) .

Même si les concentrations environnementales d'EDTA ne sont pas toxiques pour les mammifères, l'EDTA suscite des préoccupations quant à son potentiel de mobilisation de métaux lourds toxiques dans les boues d'épuration et les boues d'épuration (Kari et Giger, 1996). L'EDTA est présent dans l'eau de rivière à une concentration plus élevée que tout autre composé organique identifié et, comme il n'est pas biodégradable, il est persistant dans l'environnement (Nowack et VanBriesen, 2005). Les effets systémiques, étudiés en laboratoire, n'ont pas été observés à des concentrations inférieures à 1000 mg/kg par jour (Environnement Canada, 2018) . Cependant, certains effets toxiques de l'EDTA sont considérés comme liés aux carences en métaux, notamment une carence en zinc, dû à la chélation avec EDTA (EPA, 2004).

Les concentrations d'EDTA n'ont pas été mesurées dans les eaux canadiennes, les sols ou la poussière. Les effluents des usines de traitement des eaux usées aux États-Unis et en Europe ont été estimés avec des niveaux d'EDTA compris entre 26 et 1700 µg/L (Gouvernement du Canada, 2018; Barber *et al.*, 2015; Sillanpaa et Sihvonen, 1997) . La concentration d'EDTA dans les eaux de surface en Europe est généralement inférieure à 70 µg/L, mais peut atteindre 900 µg/L (OMS 2004 ; OECD 2004c ; Gouvernement du Canada, 2018). D'après les résultats présentés à l'article 71 de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement de 1999 (LCPE), les concentrations estimées dans les eaux de surface du Canada indiquent que les substances du groupe EDTA sont inférieures à ce qui correspond à la valeur recommandée par l'OMS (Environnement Canada, 2018).

Dans les écosystèmes aquatiques, l'EDTA pourrait chélater les ions de métaux lourds ; par conséquent, il resterait plus d'ions de métaux dans les solutions au lieu d'être adsorbés par les organismes (Wan Ngah et Hanafiah, 2008).

2.3 L'EDTA et les métaux

L'EDTA est un chélateur qui peut être combiné avec pratiquement tous les métaux du tableau périodique. Des chélates de métaux neutres ou anioniques sont obtenus avec des ions de métaux divalents ou trivalents. La constante de stabilité de l'EDTA avec l'ion métallique détermine l'efficacité de l'EDTA en tant que chélate. Le pH, le rapport molaire du chélate à l'ion métallique et la présence d'ions métalliques concurrents capables de former des complexes avec l'EDTA, peuvent affecter le potentiel de chélation (Plumb *et al.*, 1950). Les constantes de stabilité varient considérablement selon les complexes métal-EDTA, et tout métal capable de former un complexe fort avec l'EDTA déplace au moins partiellement un autre métal (FAO/WHO, 2000).

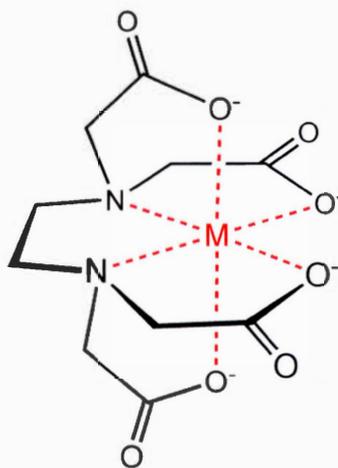


Figure 2.2 Combinaison métal-EDTA formant un chélate (*d'après* https://es.wikipedia.org/wiki/Agente_quelante)

La réaction entre l'ion métallique et l'EDTA s'écrit généralement comme suit :



Cette réaction se déplacera à gauche dans les solutions acides, tandis que dans les solutions basiques elle se déplacera à droite pour former des complexes stables. Cependant, dans les solutions fortement acides, les ions métalliques trivalents et tétravalents peuvent former des complexes stables avec l'EDTA en raison de leur charge élevée.

En raison de la facilité de formation et de la stabilité des chélates entre les métaux et l'EDTA, ce dernier est couramment utilisé comme réactif d'extraction pour la décontamination des métaux lourds présents dans les sols, les sédiments et les eaux (Kari et Giger, 1996; Karim et Khan, 2012; Martínez *et al.*, 2006). Cependant, l'élimination efficace des complexes formés dans l'eau reste un défi en raison de sa bonne solubilité et de sa stabilité chimique (Shan *et al.*, 2018).

Dans les écosystèmes aquatiques, la biodisponibilité des métaux est fortement affectée par la spéciation d'un métal dans un environnement spécifique. Les substances chélatantes de sources naturelles (acides humiques et fulviques) ou anthropiques (EDTA ou polyphosphates) peuvent modifier les concentrations de métaux biodisponibles dans l'environnement, soit directement en diminuant la concentration en ions métalliques libres, soit indirectement par le biais d'effets synergiques ou antagonistes (Rodea-Palomares, I. *et al.*, 2009). Malgré que la plupart des études aient montré que la toxicité est généralement une fonction de l'ion métallique libre, cette espèce étant généralement la plus biodisponible (Campbell, P. G. C., 1995), de nombreux autres rapports ont prouvé que la réponse toxique n'est pas toujours conforme au modèle des ions libres et que les complexes organiques et/ou les

complexes inorganiques d'hydroxydes ou de carbonates peuvent également présenter une certaine toxicité pour les organismes cibles.

Pour les raisons susmentionnées, l'effet de l'EDTA sur la toxicité des métaux lourds a été étudié dans différents organismes. Par exemple, la régulation de la toxicité de l'EDTA sur la survie, la croissance, la fixation du carbone et l'activité de la nitrogénase chez la bactérie *Nostoc muscorum* du nickel et de l'argent a été évaluée. Dans cette étude, l'EDTA protège la fixation du carbone. Cependant, il n'était pas aussi efficace contre la toxicité de l'Ag (Rai et Raizada, 1985). Des études ont également été menées sur la toxicité de différents métaux sur différentes bactéries (*Escherichia coli*, *cyanobacterium Anabaena sp.*), démontrant que les interactions compétitives entre les cellules vivantes et les ligands ainsi que l'état physiologique de l'organisme doivent être davantage prises en compte (Campbell, C. D. et al., 2000; Rodea-Palomares, I. et al., 2009). L'effet de l'EDTA sur la toxicité du chrome chez le crabe marin intertidal (*Petrolisthes laevigatus*) a également été évalué, et aucune différence significative n'ayant été constatée entre les échantillons traités à l'EDTA et les échantillons non traités (Urrutia et al., 2008). Ma et al., ont examiné l'accumulation, l'assimilation et l'inhibition de la croissance du même métal dans l'algue *Scenedesmus subspicatus*, en présence d'EDTA et d'acide fulvique. Dans leurs résultats, ils ont montré que l'EDTA et l'acide fulvique pourraient tous deux réduire la toxicité du Cu dans les algues en empêchant son absorption par la paroi cellulaire de l'algue (Ma et al., 2003). Dans les plantes aquatiques (*Lemna minor*, *Lemna trisulca* et *Ceratophyllum demersum*), l'effet de l'EDTA sur des métaux tels que le plomb, le cadmium, le chrome, le cuivre et le zinc a été étudié. L'effet antagoniste observé de l'EDTA suggère que ce qui détermine l'absorption et la toxicité des métaux est l'activité de l'ion libre et non la concentration totale des métaux (Dirilgen, 1998; Huebert, Dave et M. Shay, 1992; Huebert, David B. et al., 1993; Saygideger et Dogan, 2004).

2.3.1 Les NPs-Ag et l'EDTA

L'EDTA réagit dans un ratio 1 : 1 avec les ions d'Ag, formant le complexe [Ag-EDTA]³⁻ (figure 2.3). La constante de stabilité du chélate formé avec l'ion Ag⁺ est 2,1 x10⁷.

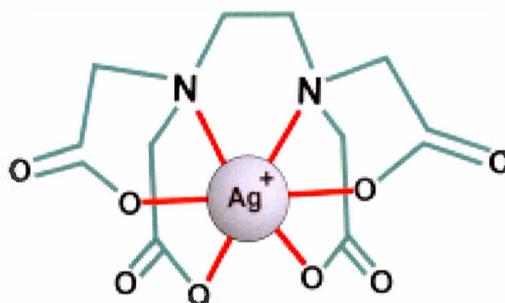


Figure 2.3 Chélate formé par des ions argent et l'EDTA, [Ag-EDTA]³⁻ (d'après Mertinez-Andrade *et al.*, 2018)

L'agrégation et la sédimentation des NPs-Ag résultent d'une forte réactivité due à la relation surface-volume. Ce phénomène peut être inhibé lorsque les particules sont protégées par un agent couvrant qui assure la stabilité colloïdale par répulsion électrostatique ou stérique. Il y a une forte probabilité que les NPs-Ag non revêtu et stabilisé électrostatiquement soient instables dans divers environnements, tels que les décharges, les eaux usées, les sols, les surfaces et les eaux souterraines (Badawy *et al.*, 2010). L'EDTA peut agir comme agent de couverture et stabiliser les NPs-Ag, car leur surface reste chargée négativement et acquiert une double couche électrostatique en présence de contre-ions. Cette double couche fournit une force de répulsion qui permet au colloïde d'Ag d'être stable en solution aqueuse. (Creighton *et al.*, 1979; Pan *et al.*, 2007; Wang, Chien C. *et al.*, 2009). L'EDTA peut aussi contrôler la taille des particules, car les ions Ag⁺ se lient aux fractions négatives de l'EDTA. Lorsque la concentration en EDTA augmente, la stabilité des nanoparticules peut être affectée par

une solution oxydante qui augmente avec une concentration inférieure en NPs-Ag (Martinez-Andrade *et al.*, 2018). La diminution du pH et de la quantité d'O₂ dans la solution peut également affecter la stabilité de la solution, affectant plus rapidement les plus petites NPs (Bian *et al.*, 2011; Lok *et al.*, 2007). Selon les résultats présentés par Martinez-Andrade *et al.*, les concentrations faibles ou élevées de NPs-Ag ne modifient pas la capacité de chélation de l'EDTA à différentes périodes de traitement (Martinez-Andrade *et al.*, 2018).

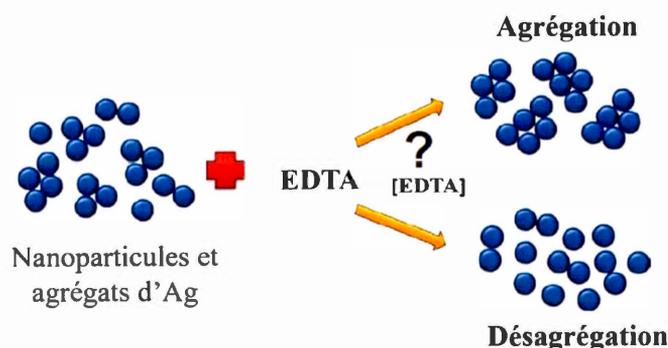


Figure 2.4 Possibilité d'agrégation ou désagrégation des NPs-Ag avec l'addition d'EDTA (*Adapté de Mohd Omar et al.*, 2014)

L'EDTA a été utilisé pour fonctionnaliser NPs-Ag en améliorant ses propriétés. Par exemple, Wang *et al.*, les ont synthétisés pour les utiliser comme capteurs pour la détermination des nitrates (Wang, Chien C. *et al.*, 2009); Pan *et al.*, proposent la préparation de nanoparticules de Ag₂S avec l'EDTA pour améliorer les intensités de la technique de diffusion de la lumière par résonance (RLS) afin de détecter l'albumine de sérum bovin (BSA) à des niveaux de nanogram (Pan *et al.*, 2007); et Martinez-Andrade *et al.*, ont évalué la capacité de chélation et d'antimicrobien d'une nouvelle modification de 17% de l'EDTA avec des NPs-Ag (Martinez-Andrade *et al.*, 2018). Cependant, l'effet de l'EDTA sur la toxicité des NPs-Ag n'a pas encore été étudié.

3 CHAPITRE III

LA PLANTE AQUATIQUE *Lemna minor*

3.1 *Lemna minor* dans le milieu naturel

La plante aquatique *Lemna minor*, plus connue sous le nom de lentille d'eau, est l'un des macrophytes flottants qui occupent diverses zones des écosystèmes aquatiques. Il est fréquent de les observer dans les lagunes ou dans les zones de faible débit dans les rivières et les ruisseaux (Roldan, 1992). Cette espèce est originaire d'Illinois (États-Unis) et est largement répandue dans le monde entier, à l'exception des déserts secs et des régions polaires froides.

Lemna minor est une plante angiosperme (plantes à fleurs), monocotylédone, appartenant à la famille des *Lemnaceae* ; elle consiste en un corps rond et légèrement ovale, appelé une fronde. Les frondes sont petites, ne dépassant généralement pas 10 mm, mais ont tendance à adhérer les unes aux autres en formant des couches épaisses (Latour *et al.*, 2015). Dans son corps végétatif, la tige et les feuilles ne sont pas différenciées, ce qui correspond à une forme taloïde. Elle a une structure verte plate et une seule racine blanche de 2 cm de long (rarement plus) se développe près du centre de la face inférieure du talus (Arroyave, 2004; EOL, 2018). Cette racine est mince et blanche avec une pointe habituellement obtuse. À la base de la racine, il y a une courte gaine cylindrique. Elle flotte dans l'eau à cause des nombreuses petites bulles d'air qui s'y sont formées. Rarement, une seule petite fleur d'environ 1 mm est produite. C'est

l'une des plus petites espèces d'angiospermes existant dans le royaume des plantes (Raven *et al.*, 1971) (Figure 3.1).

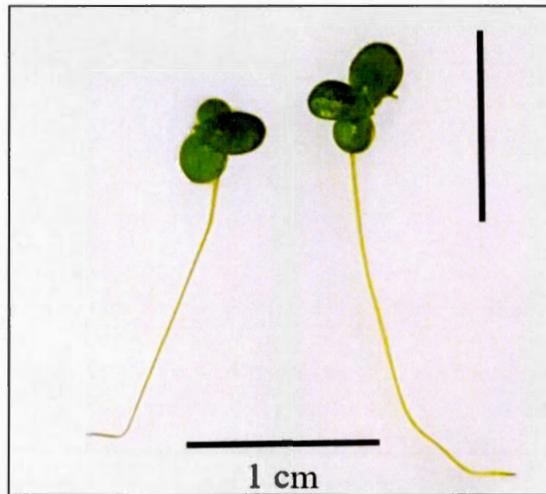


Figure 3.1 *Lemna minor* (Photographie prise par Ramirez, E., 2018)

La forme de reproduction la plus commune est asexuée par bourgeonnement. Sur les bords basaux, se développe un petit bouton qui crée une nouvelle plante qui se sépare de la plante progénitrice. Cependant, il est courant de trouver les plantes agrégées formant des groupes de 2 à 4 individus.

Le développement de la plante peut être effectué dans une large plage de températures, allant de 5 °C à 30 °C, avec une croissance adéquate entre 15 °C et 18 °C. Il s'adapte bien à toutes les conditions d'éclairage. Zones calmes riches en nutriments (azote et phosphates). Il tolère une large plage de pH, l'optimum étant compris entre 4,5 et 7,5 (Rook, 2002).

Les plantes de *Lemna minor* peuvent rapidement recouvrir la surface des corps d'eau où elles se trouvent et empêcher le passage de la lumière en inhibant la croissance

d'autres organismes photosynthétiques, car il s'agit d'une espèce flottante à croissance rapide. Cet enrobage peut, par exemple, réduire le risque de propagation d'algues et les processus d'eutrophisation correspondants dans les corps d'eau lenticques (Parr *et al.*, 2002). Cependant, la plante de *Lemna* en tant que telle peut également générer une eutrophisation (figure 3.2), il est donc important de mettre en œuvre des mesures de contrôle. *Lemna minor* est considéré comme une bonne source de protéines, raison pour laquelle elle a été utilisée dans l'alimentation humaine et animale (Appenroth *et al.*, 2017; De Beukelaar *et al.*, 2019; Zetina-Córdoba *et al.*, 2013). Elle contient également une grande quantité d'amidon qui, lorsqu'il est fermenté, peut être employé pour la production d'éthanol, de butanol, de biodiesel, etc. dans le cadre d'initiatives d'énergie propre (Gusain et Suthar, 2017). De plus, elle a été utilisée comme outil de phytoremédiation en raison de sa capacité à absorber les contaminants de l'eau (Ali *et al.*, 2016; Sekomo *et al.*, 2012; Verma et Suthar, 2015).



Figure 3.2 Eutrophisation d'un corp d'eau par *Lemna minor* (d'après Danin, 2018)

3.2 *Lemna minor* comme modèle de laboratoire

L'utilisation des plantes aquatiques comme bioindicateurs est un outil irremplaçable pour la recherche écologique. Actuellement, des études en laboratoire et sur le terrain ont fourni des informations importantes sur la capacité des plantes aquatiques à agir comme bioindicateurs de la qualité de l'environnement (Ferrat *et al.*, 2003).

La plante aquatique *Lemna minor* est utilisée dans les études de la qualité de l'eau pour surveiller les métaux lourds et d'autres polluants, car, comme d'autres macrophytes aquatiques vasculaires, elle peut accumuler de manière sélective certaines substances chimiques présentes dans les écosystèmes (Kovacs *et al.*, 1984; Salt *et al.*, 1995). Les lentilles d'eau ont des propriétés physiologiques (taille réduite, taux de multiplication élevés et propagation végétative) qui en font un système de test idéal (Radic *et al.*, 2011). De plus, le test d'inhibition de la croissance est simple, sensible et économique. Ce type d'analyse a été recommandé par les agences d'État des États-Unis et par l'Organisation Internationale de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), qui ont affirmé que la lentille d'eau est plus sensible aux herbicides et aux métaux lourds qu'aux produits chimiques industriels ((EPA), 2004). Ce guide de test est conçu pour évaluer la toxicité de substances pour les plantes aquatiques d'eau douce du genre *Lemna* (lentille d'eau). Le guide est construit sur les directives précédemment publiées (Hillman, 1961; Landolt, 1986; Wang, Wuncheng, 1986; Wang, Wuncheng, 1990), avec des modifications de ces méthodes basées sur des recherches et consultations récentes. Le test a été validé par un test international. Ce guide décrit les tests de toxicité portant sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, qui ont tous deux fait l'objet d'études approfondies et sont soumis aux normes mentionnées ci-dessus (OCDE, 2006).

4 CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du développement et de la réalisation de ce projet de recherche.

4.1 Préparation du matériel

Tout le matériel, y compris les flacons d'échantillonnage, utilisé pour la présente étude a été lavé avec du savon neutre, par la suite immergé dans HNO₃ (Sigma-Aldrich) dilué à 10% et rincé plusieurs fois avec de l'eau Milli-Q provenant d'un système de purification de Millipore ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$, TOC $\leq 2 \text{ mg/L}$ filtre 0.22 μm). Le matériel a été réservé uniquement pour la détermination de l'argent.

4.2 Espèces végétales

Dans cette étude, les travaux expérimentaux ont été réalisés à partir des cultures des plantes aquatiques *Lemna minor* ou lentille d'eau (figure 4.1), fournies par le Centre Saint-Laurent d'Environnement Canada. Cette espèce végétale représente un organisme aquatique approprié pour les études toxicologiques, car il a été démontré qu'elle est très sensible à l'effet toxique des polluants provoquant l'inhibition des processus photosynthétiques et de la croissance de la biomasse (Wang, Wuncheng,

1991). En plus, ces plantes peuvent être facilement et rapidement cultivées dans des conditions contrôlées de laboratoire.



Figure 4.1 Culture de plante aquatique *Lemna minor*
(Photographie prise par Ramirez, E., 2018)

Les cultures stocks de *Lemna minor* ont été maintenues sous conditions contrôlées dans le milieu nutritif 20X AAP, qui est recommandé selon l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) dans les « Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. *Lemna sp.* test d'inhibition de la croissance » (OCDE, 2006). La culture a été maintenue en acclimatation dans le milieu nutritif pendant deux semaines avec renouvellement du milieu tous les 5 jours.

Les conditions d'incubation contrôlées pendant toute l'expérience étaient les suivantes :

Tableau 4-1 Conditions d'incubation utilisées pour la culture de *Lemna minor*.

CONDITIONS	
Température	24 ± 2 °C
Cycle de lumière	16h lumière/ 8h obscurité
Intensité de lumière	85 - 135 uE/m ² .s (6500-10000 lux) (Tubes fluorescents blancs, Sylvania GroLux F36W)
pH	6,5 ± 0,2

4.2.1 Le milieu de culture 20X AAP

Le milieu de culture a été préparé en laboratoire selon la formulation indiquée dans le tableau 4.2 (OCDE, 2006).

Tableau 4-2 Composition du milieu de culture 20X AAP

Solution mère	Substance	Concentration dans le milieu (mg/L)
A1	NaNO ₃	510
	MgCl ₂ .6H ₂ O	240
	CaCl ₂ .H ₂ O	90
A2	MgSO ₄ .7H ₂ O	290
A3	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	30
B	H ₃ BO ₃	3,7
	MnCl ₂ .4H ₂ O	8,3
	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,2
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O*	6
	ZnCl ₂	66 µg/L
	CoCl ₂ .6H ₂ O	29 µg/L
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	145 µg/L
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,24 µg/L
C	NaHCO ₃	300

* L'EDTA a été retiré de la composition du milieu de culture préparé afin de ne pas affecter la concentration du même composant testée dans le projet.

Au départ, les 5 solutions mères ont été préparées dans de l'eau nanopure, à l'aide de réactifs de qualité chimique. Par la suite, 20 ml de chaque solution mère ont été prélevés et 850 ml d'eau nanopure ont été ajoutés. Le pH a été ajusté avec HCl 0,5 M à 6,5 et 1 mL de buffer MOPs Acid sulphinique 4-morpholinepropane (Bio Basic Canada Inc. Pureté >99%) à 490 g/L a été additionné pour le contrôler. Le volume a été ajusté à 1 L avec de l'eau nanopure. Finalement, le milieu de culture a été filtré sur une membrane de 0,22 µm (Millipore) dans un récipient stérile (OCDE, 2006).

4.2.1.1 Force ionique du milieu

La force ionique du milieu de culture 20X AAP a été calculée avec le logiciel Visual Minteq 3.1 (*téléchargé de <https://vminteq.lwr.kth.se/download/>*)

4.3 Préparation de solutions de NPs-Ag

4.3.1 Solution mère des NPs-Ag

La solution mère a été préparée de la poudre de NPs-Ag achetée à MTI Corporation (<http://www.mtixtl.com/nanopowdersa-z.aspx>). Selon le fabricant, le diamètre des NPs-Ag était de 50 nm, la pureté était de 99,9% et la surface spécifique était de 5 à 10 m²/g. Au début, 10 mg de poudre de NPs-Ag ont été pesés dans une balance analytique (Mettler Toledo AB135—S/FACT) et dissous dans 25 ml du milieu de culture 20X AAP. La suspension a été soniquée pendant 2 minutes à l'aide d'un ultrasonicateur (sonde 1/4") (Fisher Scientific, Waltham1, Massachusetts, É.U.) à une amplitude de 30%, pour homogénéiser les nanoparticules. En suite, une concentration nominale de 200 mg/L a été obtenue avec l'addition de milieu de culture jusqu'à un volume final de 50 ml (figure 4.2).

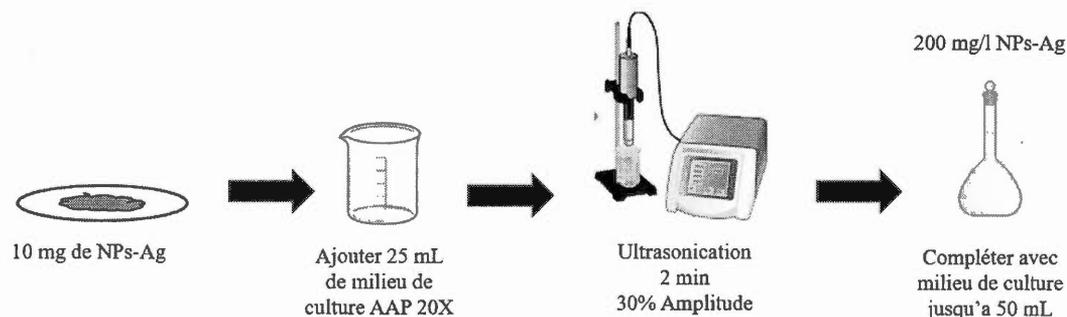


Figure 4.2 Préparation de la solution mère de NPs-Ag dans le milieu de culture 20X AAP.

4.3.2 Solutions de NPs-Ag à tester

Les solutions à tester étaient des suspensions avec quatre différentes concentrations de NPs-Ag, préparées dans des milieux de culture avec deux concentrations distinctes d'EDTA. Chaque essai comprenait des contrôles consistant en le milieu nutritif et 10 colonies de *Lemna minor*, dans les mêmes conditions environnementales, mais sans NPs-Ag.

Les concentrations d'Ag choisies étaient 0.01, 0.1, 1 et 10 mg/L, elles ont déjà été testées et ont montré des effets toxiques sur la croissance des lentilles d'eau (Oukarroum *et al.*, 2013) et elles sont réalistes pour les milieux aquatiques. Une solution mère d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique, Anachemia Canada mc., Canada) a été préalablement préparée à une concentration de 200 mg/L dans chaque milieu de culture. Lors de l'exposition, le volume adéquat de la solution mère d'EDTA est ajouté pour obtenir les concentrations de 1 et 10 mg/L. Les concentrations d'EDTA choisies sont des concentrations proches de la concentration d'EDTA recommandée pour la préparation du milieu de culture (6 mg/L), car il n'existait pas de rapport précis sur la quantité d'EDTA présente dans les eaux naturelles du Canada (Environnement Canada, 2018).

Les solutions ont été préparées pour 3 séries représentant 15 conditions expérimentales différentes, qui sont décrites dans le tableau 4.3.

Tableau 4-3 Conditions expérimentales pour le test.

Condition	EDTA	NPs-Ag
1	0 mg/L	0 (Temoin)
2		0,01 mg/L
3		0,1 mg/L
4		1 mg/L
5		10 mg/L
6	1 mg/L	0 (Temoin)
7		0,01 mg/L
8		0,1 mg/L
9		1 mg/L
10		10 mg/L
11	10 mg/L	0 (Temoin)
12		0,01 mg/L
13		0,1 mg/L
14		1 mg/L
15		10 mg/L

4.4 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

La caractérisation des nanoparticules en suspension, telles que la taille, la charge de surface et le degré d'agglomération est nécessaire pour les études de toxicité. Dans cette étude, le rôle de facteurs importants, tels que la force ionique et la chimie de surface des particules qui contrôlent la dispersion des nanoparticules, a été examiné.

4.4.1 Analyse de la taille de particule

La taille hydrodynamique des dispersions de nanoparticules a été caractérisée avec un Analyseur de Taille de Particules (DLS Malvern Zetasizer Nano S90), 7 jours après la dispersion dans la solution nutritive dans des conditions d'exposition (sans plante). Pour chaque condition expérimentale les mesures ont été réalisées en triplicata.

4.4.2 Charge de surface

La charge de surface ou potentiel Zêta des nanoparticules a été mesurée à l'aide d'un Analyseur de Potentiel Zêta/Taille de Particules (BrookHaven Instrument Corp., ZetaPlus/BI-PALS), 7 jours après la dispersion dans la solution nutritive dans des conditions d'exposition (sans plante). Les suspensions ont été placées dans une cuvette en plastique dans lequel un couvercle avec des électrodes a été introduit. La mobilité électrophorétique des suspensions colloïdales chargées a été déterminée en utilisant la diffusion de la lumière par analyse de phase dans Le NanoBrook ZetaPALS. (<https://www.brookhaveninstruments.com/nanobrook-zetapals-potential-analyzer>). Pour chaque condition expérimentale, les mesures ont été réalisées en triplicata.

4.4.3 Solubilité

La solubilité d'Ag dans les solutions a été mesurée par spectrométrie d'émission à plasma à couplage inductif (ICP-OES), une technique qui convient bien à l'analyse élémentaire, car elle est très sensible pour les concentrations au niveau des traces et aux faibles variations de concentration (Brennan *et al.*, 2009).

Les suspensions de nanoparticules ont été préparées et incubées dans des conditions d'exposition pendant 7 jours. Après l'exposition, elles ont été centrifugées dans une centrifugeuse Sorvall ST 16R (Thermo scientific) à 12 000 g pendant 30 min, le surnageant a été recueilli et les échantillons ont été filtrés à travers une membrane de 0,22 µm (Millipore) pour éliminer toute la matière particulaire restante (Perreault *et al.*, 2014). Les concentrations d'Ag solubles ont été mesurées dans un Spectromètre d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES, Agilent Technologie, 5100), avec un nébuliseur en verre concentrique et une chambre de pulvérisation double passe en verre cyclonique. Le débit de gaz auxiliaire (Ar), le débit de gaz porteur (Ar) et le débit de gaz plasmagène (Ar) étaient respectivement de 1,0, 1,0 et 12 L/min et la longueur d'onde utilisée était de 328,068 nm. Pour chaque condition expérimentale

les mesures ont été réalisées en triplicata. La figure 4.3 montre le schéma fonctionnel de l'instrumentation ICP-OES. Les informations ont été traitées par le ICP Expert software. Le système ICP-OES Agilent 5100, est conçu pour traiter les échantillons plus rapidement, utiliser moins de gaz sans compromettre les performances dans les échantillons les plus difficiles (Agilent Technologies, 2014). (Bozich *et al.*, 2014) (Bozich *et al.*, 2014) (Bozich, Lohse, Torelli *et al.*, 2014)

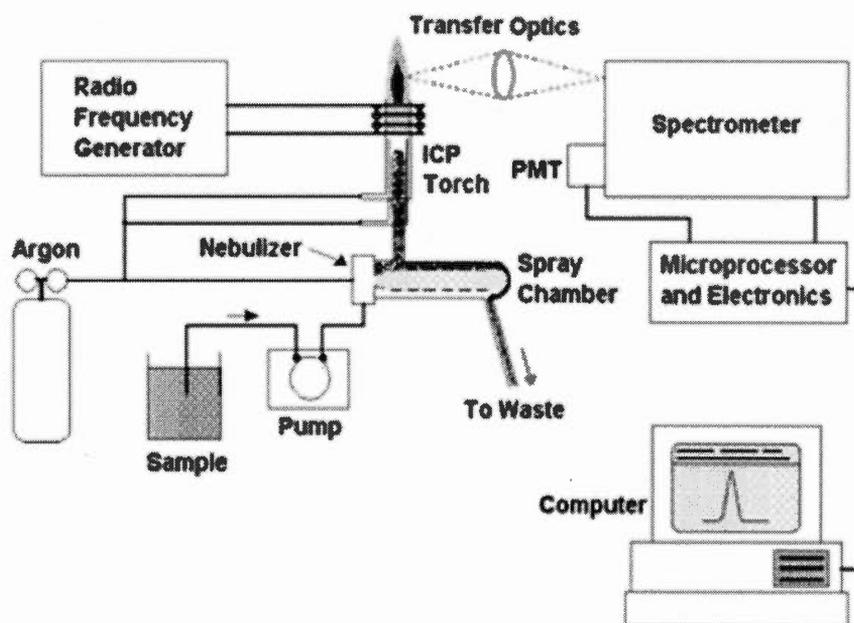


Figure 4.3 Schéma fonctionnel de l'instrumentation ICP-OES (Siva Sai Kiran B, 2017)

4.4.3.1 Courbe d'étalonnage

Des solutions étalonnées d'Ag ont été préparées à partir d'une solution Standard de 1000 ppm (Solution standard d'argent pour ICP - Sigma Aldrich) à des concentrations de 0.01, 0.1, 1, 3, 5, 8 et 10 ppm. Toutes les solutions ont été stockées à température ambiante. Le blanc contenait 10 mL du milieu nutritif et 1 mL de HNO₃. Elle montre la relation entre la variation de l'intensité de l'émission en fonction des différentes concentrations de solutions étalons (*voir Annexe A*).

4.5 Exposition des plantes

Pour l'exposition des plantes, le test standard d'inhibition de la croissance de la lentille d'eau proposé par l'OCDE (2006) a été utilisé comme ligne directrice avec quelques modifications. Dans les conditions optimales de croissance, un échantillon a été prélevé de la culture mère pour tester chacune des 15 conditions expérimentales. Les plantes utilisées pour l'essai ont été choisies avec soin, car elles pourraient représenter une influence significative sur les résultats du test. Chaque échantillon comprenait 10 plantes (colonies) avec une racine intacte, et ayant chacune 2 frondes (feuilles) clairement visibles et proéminentes sans chlorose et nécrose. Ces expériences ont été effectuées en triplicata pour vérifier la reproductibilité des résultats. Ainsi, nous avons testé en totalité pour chacune des conditions expérimentales, 10 plantes de *Lemna* × 3.

Pour les expériences, des flacons de culture cellulaire Corning® de 225 mL en plastique (préalablement stérilisés) ont été utilisés avec 150 mL de chaque solution d'exposition pour avoir une profondeur minimale de 20 mm. Les récipients ont été fermés tout au long de l'incubation pour éviter l'évaporation et la contamination accidentelle, en permettant l'échange d'air nécessaire (grâce au filtre sur le bouchon). La température ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) et la lumière ($85 - 135 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) ont été contrôlées pendant les 7 jours de l'incubation (Figure 4.4).



Figure 4.4 Exposition des plantes *Lemna minor* aux NPs-Ag
(Photographie par Ramirez, E., 2018)

4.5.1 Mesures et déterminations analytiques

Pour le test de croissance, la principale variable de mesure est le nombre de frondes, mais nous avons aussi mesuré le poids frais, le poids sec et la bioaccumulation d'Ag⁺, car les NPs-Ag pourraient affecter d'autres variables de mesure beaucoup plus que les frondes.

4.5.1.1 Nombre de frondes

Au début et à la fin de l'essai (temps zero et sept jours), le nombre de frondes dans les récipients d'essai a été compté et enregistré, en tenant compte des frondes clairement visibles et proéminentes. Les changements dans le développement des plantes, tels que la taille de la fronde, l'apparence de la nécrose ou de chlorose, la rupture de la colonie ou la perte de flottabilité, ont été notés.

4.5.1.1 Poids frais

Toutes les colonies ont été transférées dans des récipients propres et rincées avec de l'eau distillée. Elles ont été éponnées pour éliminer l'excès d'eau. En suit les colonies

ont été pesées avec une balance analytique (Mettler Toledo AB135—S/FACT) pour obtenir le poids frais.

4.5.1.2 Poids sec

Après la mesure du poids frais, toutes les colonies (les fragments de racine ont été inclus) ont été transférées à des tubes à essai pré-pesés, puis séchées à 120 °C pendant 24h dans un four (Fisher Isotemp Oven, Senior modèle). Le lendemain, les tubes contenant les colonies séchées ont été pesés à nouveau et le poids sec a été calculé en soustrayant le poids du tube vide.

4.5.1.3 Taux de croissance moyen

Cette variable de réponse est calculée sur la base des changements dans les logarithmes du nombre de frondes dans le temps (exprimés par jour) chez les témoins et dans chaque groupe de traitement, en utilisant la formule suivante (OCDE, 2006) :

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

Où :

μ_{i-j} : taux de croissance spécifique moyen du moment i à j

N_i : nombre de frondes dans le récipient d'essai ou de contrôle au temps i (temps initial)

N_j : nombre de frondes dans le récipient d'essai ou de contrôle au temps j (temps final)

t : période de temps de i à j

La valeur moyenne pour le taux de croissance a été calculée pour chaque groupe de traitement et groupe témoin.

4.5.1.4 Pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_r) a été calculé pour chaque concentration testée selon la formule suivante (OCDE, 2006):

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

Où:

μ_C : valeur moyenne pour μ dans le contrôle

μ_T : valeur moyenne pour μ dans le groupe de traitement

4.5.1.5 Bioaccumulation

La méthodologie employée pour déterminer la bioaccumulation des NPs-Ag dans les plantes a été développée à partir de Li *et al.* (Li *et al.*, 2013). Dans les tubes où le poids sec a été mesuré, la biomasse des plantes déshydratées a été digérée avec 2 ml d'acide nitrique, HNO_3 67-70 % (Optima grade, Fisher Chemical), à une concentration finale de 10 %. Pour accélérer la digestion, les tubes ont été chauffés à 60 °C dans un bain de sable pendant 45 min. Ensuite, 500 μL de H_2O_2 (30 %) (Caledon Laboratories LTD., Georgetown, Ont., Canada) ont été ajoutés pour compléter la digestion de la biomasse. Le processus s'est poursuivi sur une période de 6 h à 90 °C dans un bain de sable. La figure 4.5 illustre les différentes étapes de cette méthodologie.

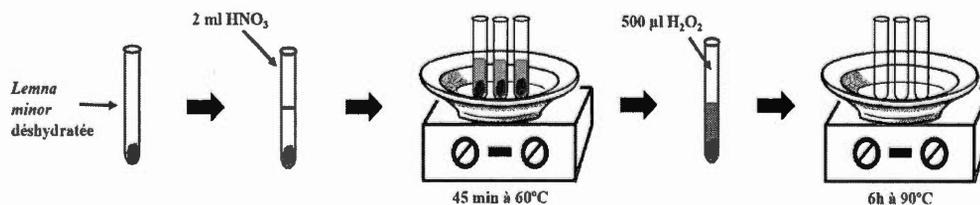


Figure 4.5 Methodologie employée pour la digestion des plantes *Lemna minor*

Pour l'analyse à l'ICP-OES, les échantillons ont été dilués avec de l'eau Nanopure à un volume final de 10 mL.

Pour la courbe d'étalonnage, les solutions standard d'Ag⁺ préparées précédemment pour mesurer la solubilité ont été utilisées (0.01, 0.1, 1, 3, 5, 8 et 10 mg/L). Elle montre la relation de la variation de l'intensité du signal en fonction des différentes concentrations des solutions étalons (*voir Annexe B*).

4.5.2 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Le test d'analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) a été effectué avec le logiciel GraphPad prism 5. Le post-hoc test employé a été le test Tukey Honestly Significant. Les résultats où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérés comme significatifs.

5 CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus suite à l'application des protocoles. La première partie présente les résultats associés à la caractérisation des NPs-Ag en utilisant le diamètre hydrodynamique (DLS) et la mobilité électrophorétique (potentiel z), avec des instruments de mesure tel que le Malvern Zetasizer, aussi comme la détermination de la solubilité des NPs-Ag dans le milieu de culture 20X AAP. Ce chapitre montre les résultats associés au test de croissance de *Lemna minor* après l'exposition aux NPs-Ag, afin de mesurer leur toxicité. Une dernière section conclut ce chapitre avec la présentation des résultats associés à la bioaccumulation d'Ag avec cette plante aquatique. L'ensemble des résultats présente les effets de toutes les variables testées: La concentration des NPs-Ag et la concentration de l'EDTA.

5.1 Caractérisation des NPs-Ag

5.1.1 Force ionique du milieu de culture

La caractérisation des NPs-Ag a été réalisée avec les suspensions préparées dans le milieu nutritif 20X AAP, avec différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L). Ce milieu de culture est largement utilisé pour les tests toxicologiques standards de croissance avec la lentille d'eau. Le milieu de culture correspond à un mélange de sels métalliques (Na, Mg, Ca, K, Mn, Fe, Zn, Co, Cu), d'acide borique et d'EDTA à certaines concentrations. La variété des espèces chimiques présentes dans

le milieu nutritif et leurs différentes concentrations génèrent une force ionique de $0,0199 M$, déterminée avec le logiciel Visual Minteq 3.1. Le milieu de culture utilisé a une force ionique élevée par rapport aux autres milieux qui ont été utilisés dans des études avec *Lemna*. Par exemple, le milieu *Swedish Standard*, qui est un autre milieu recommandé par l'OCDE, a une force ionique de $3.24 \times 10^{-3} M$ (OCDE, 2006), et celle décrite par Frankart *et al.* (Frankart *et al.*, 2002) avec une valeur de $4,25 \times 10^{-3} M$ (Oukarroum *et al.*, 2013). Cela pourrait directement affecter l'agrégation des NPs (Jiang *et al.*, 2009; Gubbins *et al.*, 2011). La figure 5.1 montre l'influence de la force ionique sur deux des principaux aspects de la caractérisation des NPs, le diamètre hydrodynamique et le potentiel ζ (Jiang *et al.*, 2009). Par conséquent, il est important d'évaluer la toxicité des NPs avec différentes compositions de milieu employées dans les bioessais de toxicité afin de déterminer l'effet de la force ionique.

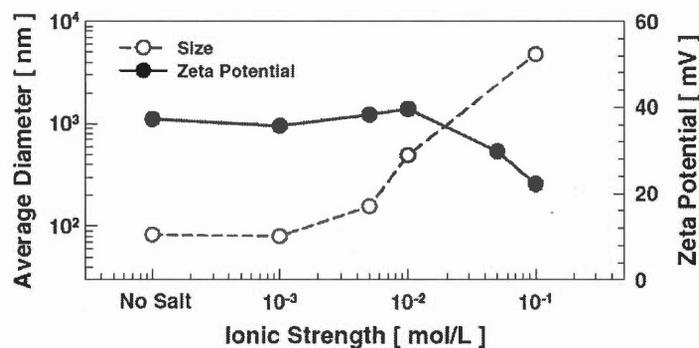


Figure 5.1 L'influence de la force ionique sur le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel ζ des NPs-TiO₂ (d'après Jiang *et al.*, 2009).

5.1.2 Le diamètre hydrodynamique

Le diamètre hydrodynamique a été mesuré pour les solutions de NPs-Ag à des concentrations de 1 et 10 mg/L. Compte tenu du fait que la taille initiale des nanoparticules était de 50 nm (comme indiqué par MTI Corporation), il y avait une augmentation drastique du diamètre hydrodynamique dans toutes les solutions après 7

jours d'incubation, atteignant jusqu'à 2496 nm dans la solution avec 10 mg/L de NPs-Ag et en absence d'EDTA (tableau 5-1). Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration de NPs provoque la formation d'agglomérats. Par contre, la figure 5.2 montre que, pour les deux concentrations de NPs-Ag analysées, une réduction de la taille des particules a été obtenue dans les solutions préparées avec 10 mg/L d'EDTA par rapport aux conditions sans EDTA. Cependant, selon les statistiques effectuées, il ne s'agit pas d'une variation significative et, en fonction de la taille moyenne des particules obtenue, il se produit également une formation d'agglomérats (figure 5.2). Suite à la mesure de la taille des particules, l'indice de polydispersité (Pdi) a également été obtenu, représentant la distribution de taille d'une population de particules (Malvern Instruments, 2013). Les Pdi élevés dans les solutions analysées (tableau 5-1) suggèrent que les populations de particules étaient polydispersées. L'augmentation du diamètre hydrodynamique et du Pdi indique une instabilité des NPs-Ag dans le milieu 20X AAP. Des valeurs de polydispersité similaires ont été obtenues lors de la caractérisation d'une suspension de NPs-TiO₂ dans les milieux de culture recommandés pour le test de croissance de *Lemna sp.* (Li *et al.*, 2013). Cela indique une relation directe entre le comportement des particules et la force ionique du milieu de culture. Par conséquent, les écarts types du diamètre hydrodynamique sont aussi importants (Oukarroum *et al.*, 2013).

Tableau 5-1 Diamètre hydrodynamique moyen (nm) et indice de polydispersité (Pdi) des solutions de NPs-Ag dans milieu de culture 20X AAP avec EDTA à 0 ; 1 et 10 mg/L.

NPs-Ag (mg/L)	EDTA (mg/L)	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Indice de polydispersité (Pdi)
1	0	1778,37	0,895
	1	2386,04	0,904
	10	1961,63	0,814
10	0	2496,02	0,848
	1	1919,89	0,859
	10	1146,93	0,932

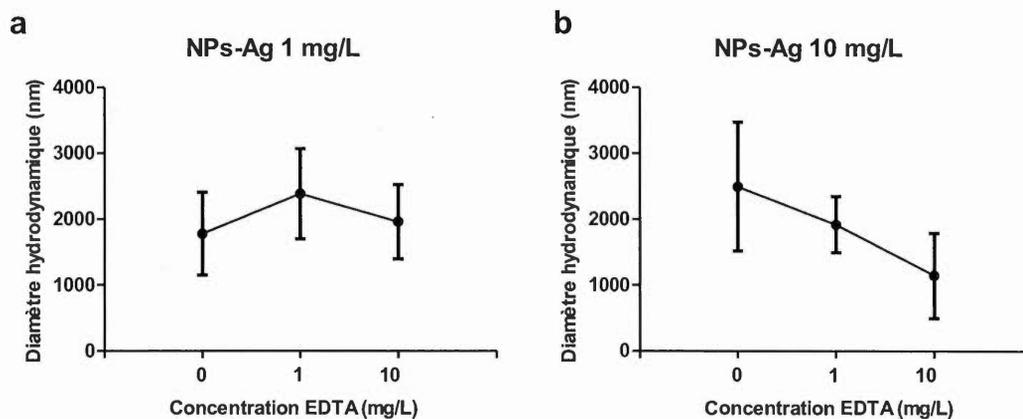


Figure 5.2 Diamètre hydrodynamique des NPs-Ag pour des solutions de 1 mg/L (a) et 10 mg/L (b) d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP. Les effets de l'EDTA ne sont pas statistiquement significatifs.

5.1.3 Potentiel ζ

La figure 5.3 montre que les potentiels ζ de toutes les solutions expérimentales contenant les NPs-Ag ne dépassaient pas -20 mV, indiquant une instabilité des propriétés physicochimiques des NPs-Ag en solution. Une des causes principales de cette instabilité est la force ionique du milieu de culture qui va provoquer la formation d'agglomérats. Une force ionique importante entraîne normalement une diminution de l'intensité du potentiel ζ dans les colloïdes stabilisés électrostatiquement. Donc, ce qui explique la formation d'agglomérats parce que la répulsion électrostatique est réduite (Badawy *et al.*, 2010). Dans l'étude réalisée par Oukarroum *et al.*, le potentiel ζ a été mesuré pour une suspension de 1 mg/L de NPs-Ag dans le milieu de culture (force ionique 4.25×10^{-3} M), et elle était de $-34,74 \pm 2,15$, montrant ainsi une stabilité des NPs en suspension causée par une plus forte répulsion électrostatique (Oukarroum *et al.*, 2013). D'autre part, Gubbins *et al.*, ont obtenu des potentiels ζ de -7.8 ± 7 mV, en utilisant le milieu de culture de Steinberg (OCDE, 2006) qui a une force ionique élevée.

Les auteurs ont conclu "que leur milieu de culture ne convient pas aux expériences d'écotoxicologie de l'espèce *Lemna minor* pour les NPs-Ag dispersés et nécessite quelques modifications car, si les conditions standard du milieu sont utilisées, la dose et la nature du toxique changent dû à l'agrégation et à la sédimentation" (Gubbins *et al.*, 2011). Je suis en accord avec leur interprétation parce que leur milieu de culture affecte la charge des NPs pour être proche de zéro, provoquant une formation élevée d'agglomérats. Leur milieu de culture favorise ainsi la sédimentation et limite grandement la toxicité provenant de la solubilité des NPs (les ions Ag^+). Ce milieu ne peut être utilisé que pour tester le potentiel toxique des agglomérats des NPs-Ag uniquement. D'autre part, il est important d'effectuer des bioessais de toxicité des NPs avec différents milieux pour caractériser les effets de la force ionique sur les propriétés chimiques et toxicologiques des NPs en solution aqueuse. Dans cette étude, le milieu de culture 20X AAP du protocole standard des tests de toxicité sur la croissance de la lentille d'eau a été utilisé pour estimer les effets de l'EDTA sur les propriétés physico-chimiques et toxicologiques des NPs-Ag en solution aqueuse.

Les résultats des potentiels ζ des solutions de 0,01 - 0,1 et 1 mg/L de NPs-Ag montrent une légère augmentation de l'intensité des valeurs causée par 10 mg/L d'EDTA par rapport à la condition sans EDTA (0 mg/L), indiquant que cette concentration d'EDTA entraîne une légère diminution de l'instabilité des solutions de NPs. Cette interprétation des résultats est renforcé par des études dans lesquelles l'EDTA a été utilisé pour fonctionnaliser les NPs-Ag, améliorant ainsi sa stabilité et ses propriétés bactéricides (Martinez-Andrade *et al.*, 2018). Plus généralement, d'autres études ont montré que l'addition d'EDTA ou de ligands organiques à des solutions de nanoparticules métalliques augmentait l'intensité de leur potentiel ζ du fait de la formation de complexes (Gu *et al.*, 2009; Mohd Omar *et al.*, 2014; Wang, Long-Fei *et al.*, 2015). Cependant, les solutions de NPs-Ag à 10 mg/L ont des potentiels ζ similaires (de -12,54 à -14,48 mV) lorsque exposées à des concentrations de 0, 1 et 10 mg/L

d'EDTA. Cela peut s'expliquer par le fait que la concentration d'EDTA dans les solutions n'est pas suffisante pour stabiliser cette concentration élevée de NPs-Ag, en tenant compte aussi que, dans le milieu de culture, coexistent d'autres cations qui peuvent aussi être stabilisés par l'EDTA (voir la composition du milieu de culture dans le matériel et méthodes).

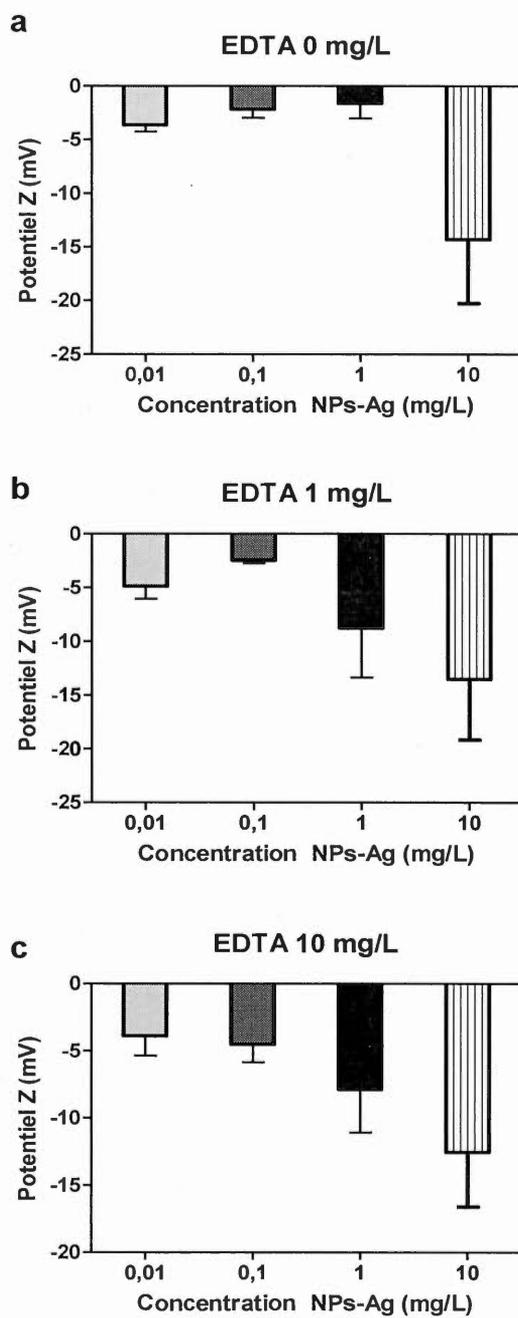


Figure 5.3 Potentiel ζ des solutions de 0,01 à 10 mg/L de NPs-Ag avec différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP (n=3).

5.1.4 Solubilité des NPs-Ag

Il est connu que les agents chélatants tels que l'EDTA peuvent augmenter la solubilité des métaux en solution par rapport à un système sans ligand. La formation d'un complexe entre un métal spécifique et un ligand comme l'EDTA est déterminée par la concentration des autres métaux présents dans le milieu ainsi que par la constante de stabilité du complexe métal-ligand (Nowack, 2002). L'argent fait partie des métaux qui ont une bonne affinité avec l'EDTA, et sa constante de formation (K_f) du complexe $[\text{Ag}(\text{EDTA})]^{3-}$ est de $2,1 \times 10^7$. D'après les résultats obtenus, les NPs-Ag ont une faible solubilité et la méthodologie employée n'a pas permis de déterminer leur concentration dans la solution de 0,01 mg/L de NPs-Ag et dans deux des solutions de 0.1 mg/L, probablement à cause d'une faible concentration d' Ag^+ soluble dans le milieu. Les valeurs étaient inférieures à la limite de détection de l'appareil, soit 0,004 mg/L. Les solutions de 1 et 10 mg/L de NPs-Ag possèdent une solubilité similaire pour les différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L), donc l'EDTA n'a pas eu un effet significatif sur la solubilité des NPs-Ag (tableau 5-2 et figure 5.4.). Probablement, la raison est que les concentrations d'EDTA testées étaient proches de la valeur qui était ajoutée (6 mg/L) au milieu de culture pour contrôler la disponibilité des métaux, tel que le fer. Donc, tous les métaux ou les ions présents en grande concentration entrent aussi en compétition pour se lier à l'EDTA dans le milieu nutritif 20X AAP, limitant la solubilisation des NPs-Ag. Aussi, nous avons obtenu de grandes valeurs d'écart-type dans la plupart des solutions, ce qui est évident d'après les potentiels ζ mesurés précédemment.

Tableau 5-2 Fraction soluble d'Ag⁺ (mg/L) libérée après 7 jours par des suspensions de NPs-Ag dans le milieu de culture 20X AAP.

EDTA mg/L	NPs-Ag mg/L	Ag mg/L
0 mg/L	0,1 mg/L	ND
	1 mg/L	8,2 ($\pm 0,0094$) 10^{-3}
	10 mg/L	1,39 ($\pm 0,0124$) 10^{-2}
1 mg/L	0,1 mg/L	ND
	1 mg/L	9,4 ($\pm 0,0125$) 10^{-3}
	10 mg/L	1,32 ($\pm 0,0118$) 10^{-2}
10 mg/L	0,1 mg/L	3,2 ($\pm 0,0069$) 10^{-3}
	1 mg/L	9,1 ($\pm 0,0114$) 10^{-3}
	10 mg/L	1,2 ($\pm 0,0109$) 10^{-2}

Les interactions entre les NPs-Ag et l'EDTA n'ont pas été précédemment étudiées, et il est difficile d'expliquer les mécanismes susceptibles de favoriser la solubilité de ces NPs. Les résultats obtenus indiquent que l'EDTA n'affectent pas la solubilité des NPs-Ag. Cela peut s'expliquer par la structure chimique de ces NPs-Ag (liaisons covalentes) qui rend difficile la libération des Ag⁺ en solution, même en présence d'EDTA. De plus, la force ionique du milieu favorise la formation d'agglomérats, ce qui réduit la surface de contact des NPs-Ag et limite les interactions avec les molécules d'EDTA.

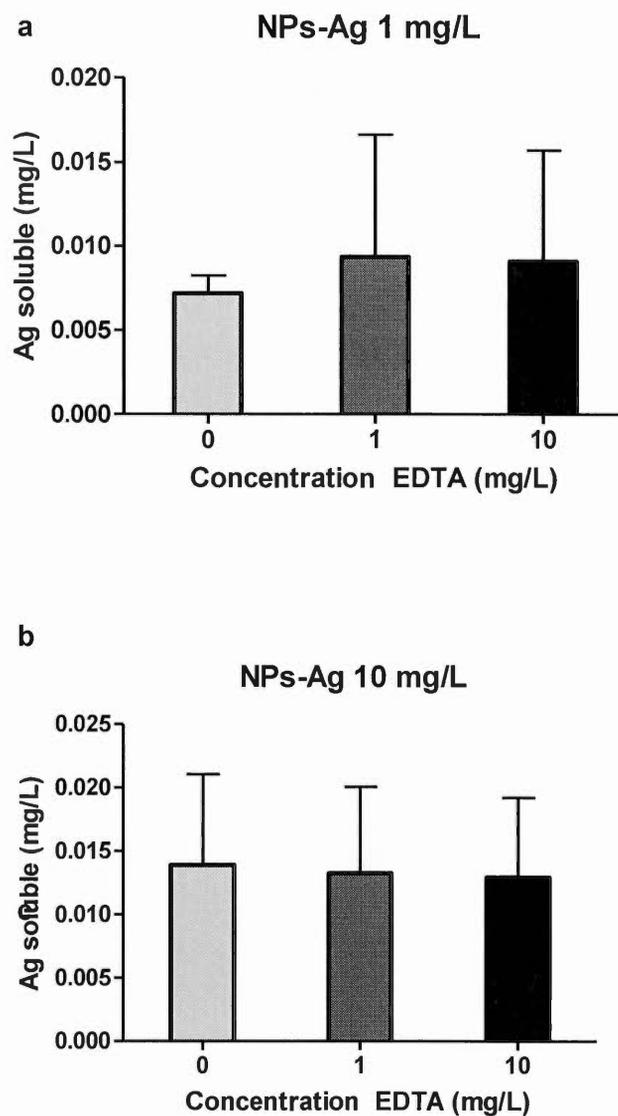


Figure 5.4 Solubilisation des Ag^+ dans les solutions de NPs-Ag de 1 et 10 mg/L avec différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP.

5.2 Test de croissance de *Lemna minor*

5.2.1 Apparence des plantes

Sept jours après le début de l'incubation des plantes, des changements qualitatifs significatifs ont été observés sous plusieurs des conditions expérimentales par rapport aux témoins. Les changements comprenaient la chlorose, le raccourcissement des racines et la séparation des colonies.

La figure 5.5 montre les témoins utilisés dans cette étude ; ceux-ci correspondent au milieu de culture 20X AAP avec trois concentrations différentes d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) et sans NPs-Ag. Le témoin contenant de l'EDTA à une concentration de 10 mg/L (à droite) préserve la coloration verte des plantes, tandis que ceux contenant 0 et 1 mg/L d'EDTA (au centre et à gauche) présentent une chlorose. La chlorose est le jaunissement du tissu foliaire causé par le manque de chlorophylle, ce qui peut être dû à une carence nutritionnelle, liée à la disponibilité des métaux pour la plante (Siddiqui et al., 2015). Cette disponibilité est régulée par l'EDTA dans le milieu de culture. Ainsi, dans les échantillons en absence ou à faible concentration de ce ligand, les métaux présents sont disponibles dans des proportions inadéquates. De même façon, les racines des plantes de *Lemna* ont une plus grande longueur lorsque la concentration en EDTA est de 10 mg/L. Des caractéristiques similaires sont mises en évidence chez les plantes dans les conditions expérimentales contenant des concentrations de NPs-Ag à des concentrations de 0,01 à 1 mg/L, comme indiqué sur les figures 5,6; 5.7 et 5,8. Cependant, les plantes exposées à la plus forte concentration de NPs-Ag (10 mg/L) (figure 5.9) présentaient une chlorose pour les trois concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) et les racines étaient mutilées. Les plantes ont conservé de petites racines ne dépassant pas les 5 mm de long, alors que la racine normale chez *Lemna minor* pouvait atteindre jusqu'à 2 cm de longueur. Cela pourrait

indiquer qu'il existe un effet toxique plus évident sur les plantes de *Lemna minor* lorsque la concentration de NPs-Ag est de 10 mg/L.

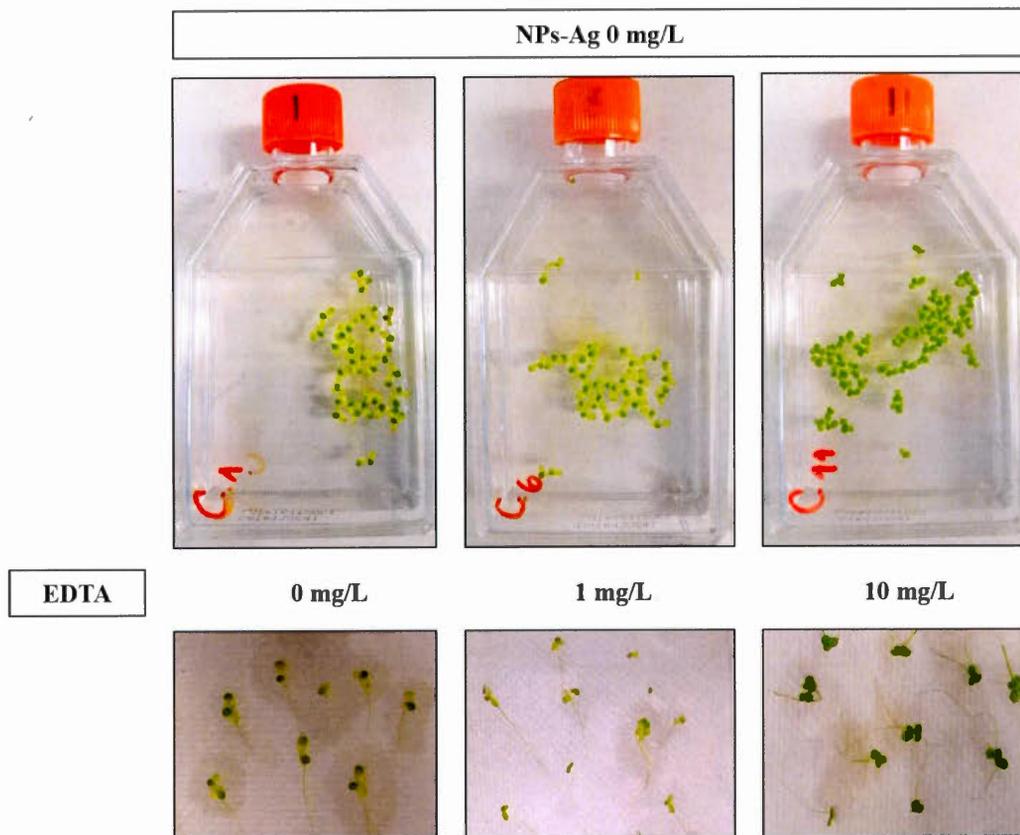


Figure 5.5 Plantes de *Lemna minor* traitées à 0; 1 et 10 mg/L d'EDTA, après 7 jours d'exposition.

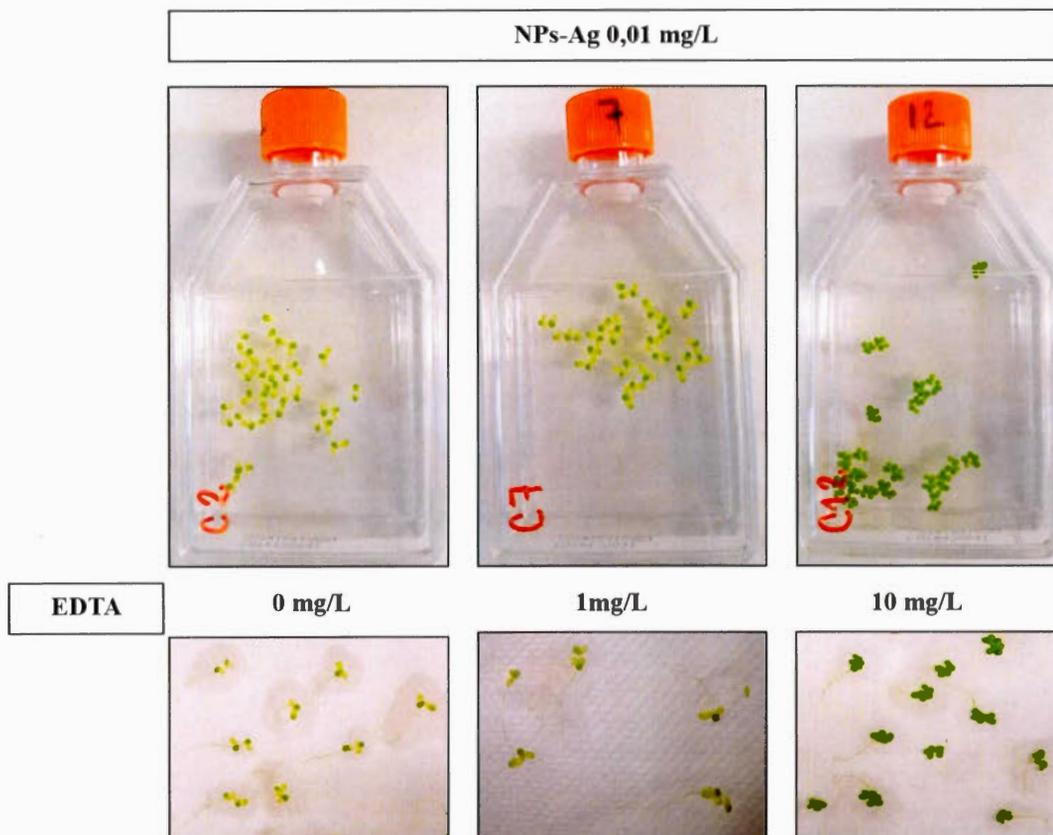


Figure 5.6 Plantes de *Lemna minor* à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 0,01 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).

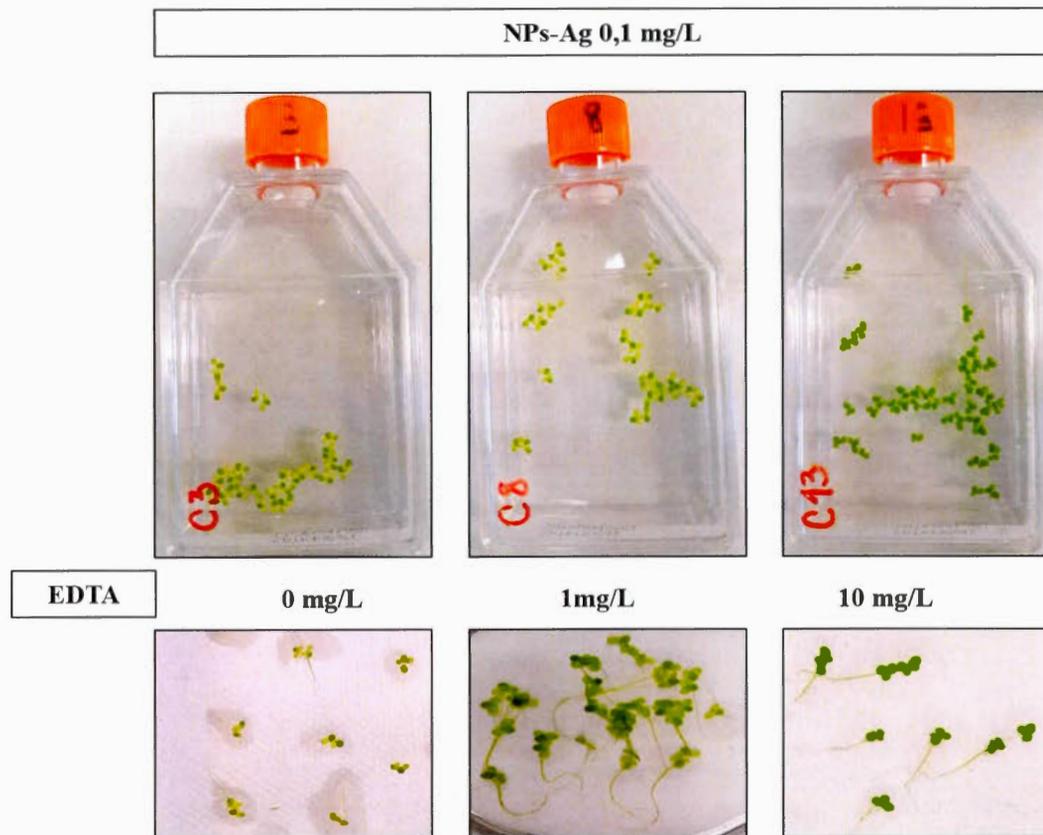


Figure 5.7 Plantes de *Lemna minor* à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 0,1 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).

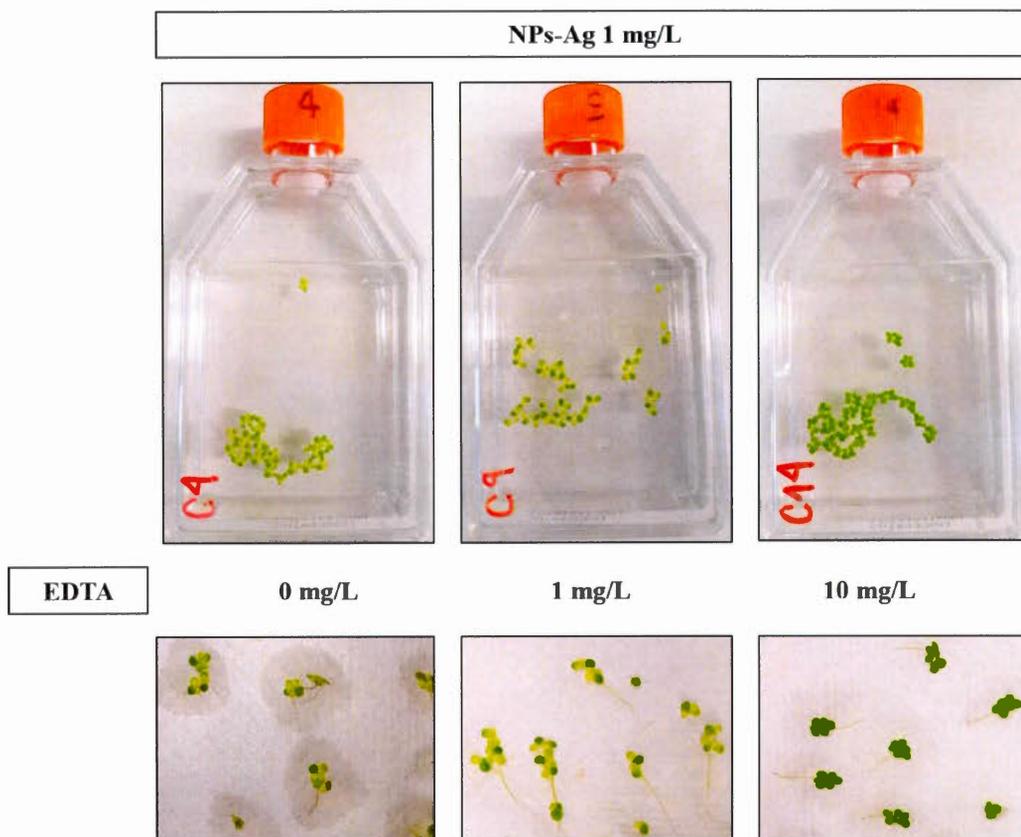


Figure 5.8 Plantes de *Lemna minor* à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 1 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).

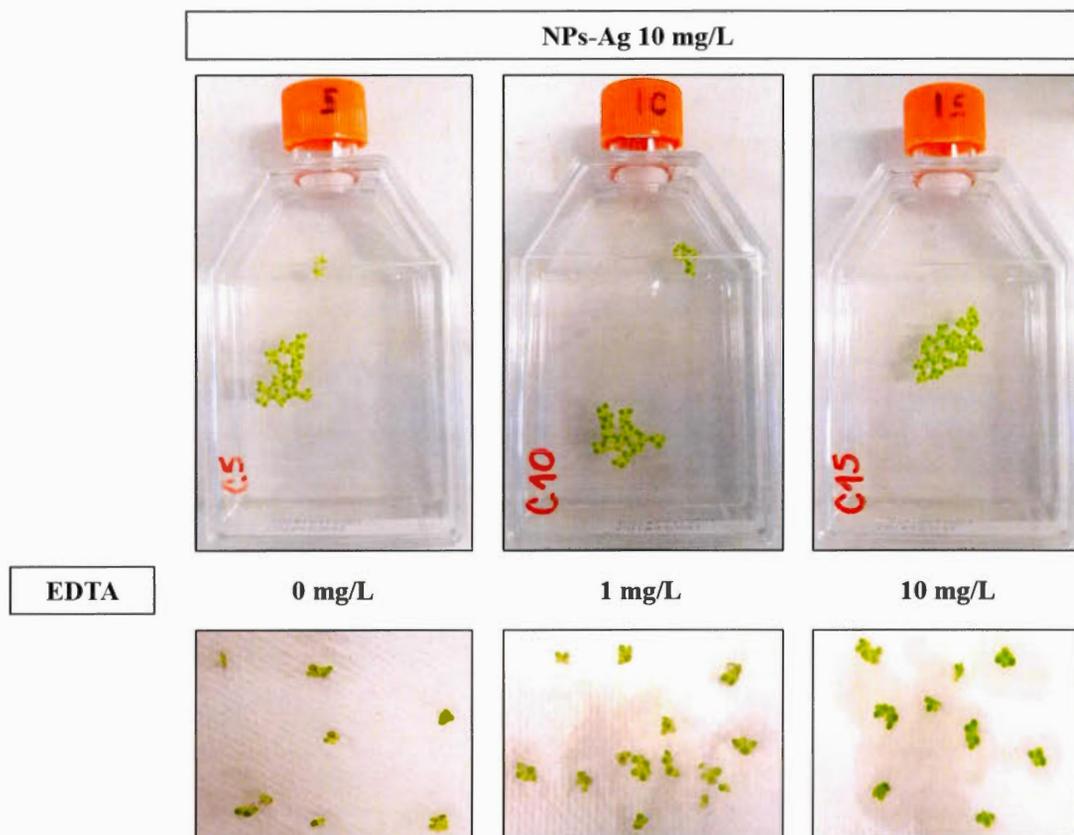


Figure 5.9 Plantes de *Lemna minor* à 7 jours d'exposition. Conditions d'expositions : 10 mg/L de NPs-Ag avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA (de gauche à droite).

5.2.2 Nombre de frondes

Au début de l'expérience, 10 plantes de *Lemna minor* ayant chacune 2 frondes (20 frondes par contenant) ont été prélevées de la culture mère pour chaque condition d'exposition. Le nombre de frondes a été compté 7 jours après le début de l'incubation dans les solutions d'exposition aux différentes concentrations de NPs-Ag et d'EDTA. Le nombre de frondes dans les échantillons reste presque constant dans les solutions contenant les NPs-Ag, lorsque la concentration en EDTA est de 0 et 1 mg/L. Cependant, lorsque la concentration d'EDTA est de 10 mg/L (figure 5.10), le nombre de frondes augmente considérablement (la différence significative est présentée par les astérisques dans le tableau joint à chaque graphique). Dans les échantillons ne contenant pas de NPs-Ag, le nombre de frondes augmente de 20 % et 70 %, lorsque la concentration en EDTA est respectivement de 1 mg/L et 10 mg/L, par rapport au milieu de culture sans EDTA. Tandis que dans les échantillons présentant la concentration la plus élevée de NPs-Ag (10 mg/L), l'augmentation n'est que de 1,25 et 20 % entre ces mêmes solutions. Ceci indique que la présence d'EDTA est indispensable dans le processus de croissance de *Lemna minor* et cause une diminution de l'effet toxique des NPs-Ag.

Des études antérieures sur la toxicité de NPs-Ag chez les plantes aquatiques (*Lemna gibba*, *Lemna minor*) montrent que la toxicité des NPs-Ag dépend de leur concentration d'exposition (Dewez *et al.*, 2018; Oukarroum *et al.*, 2013). D'autre part, d'autres travaux parlent de plages de concentrations dans lesquelles les NPs-Ag sont plus toxiques. Par exemple, Gubbins *et al.*, précisent que les NPs-Ag de 20 à 100 nm présentent une toxicité aiguë à des concentrations de 5 µg/L mais diminuent lorsque la concentration est de 160 µg/L (Gubbins *et al.*, 2011). Pour Ucuncu *et al.*, les concentrations de NPs-Ag comprises entre 8 et 32 µg/L sont plus toxiques que celles de 96 et 128 µg/L (Ucuncu *et al.*, 2014). Cependant, dans toutes les études, les propriétés des NPs-Ag (diamètre, surface) et les conditions d'exposition (milieu de

culture, concentration du milieu de culture, durée, pH) étaient différentes, de sorte que nous ne pouvons pas comparer convenablement des résultats. Par contre, il est évident que les conditions du milieu vont affecter les propriétés chimiques des NPs, et par conséquent les interactions et la toxicité des NPs avec les plantes aquatiques de *Lemna*.

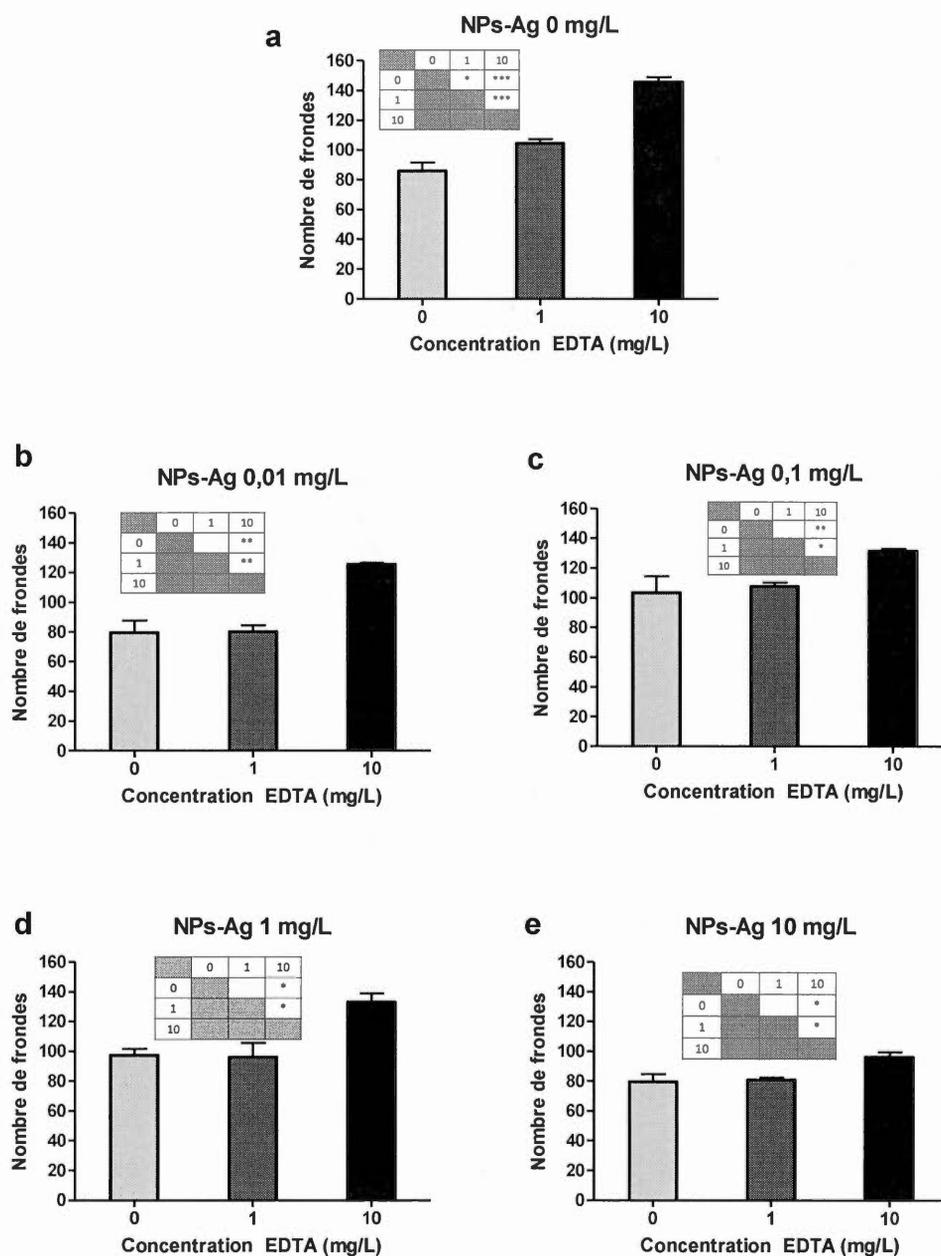


Figure 5.10 Nombre de frondes de *Lemna minor* à 7 jours d'exposition aux solutions de NPs-Ag (0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L) et à l'EDTA (0; 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieure à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives ($n=3$).

5.2.3 Nombre de plantes

Au début de l'essai, 10 plantes ont été placées dans chaque conteneur expérimental. Le nombre de plantes de *Lemna minor* a été compté après 7 jours d'exposition. Les résultats montrent bien que les milieux contaminés avec 10 mg/L de NPs-Ag induisent une diminution significative du nombre de plantes par rapport au témoin et aux autres concentrations de NPs-Ag (0,01 ; 0,1 et 1 mg/L) (figure 5.11). De plus, la concentration d'EDTA n'a pas eu d'effet sur le nombre de plantes lorsque la concentration de NPs-Ag était de 10 mg/L. Dans des conditions d'EDTA de 0 ; 1 et 10 mg/L, il y a eu une diminution de 47 %, 48 % et 62 %, respectivement par rapport aux témoins (0 mg/L de NPs-Ag). Pour les concentrations plus faibles de NPs-Ag, il n'y a pas eu de différences significatives par rapport aux contrôles, probablement à cause de la faible solubilité et du processus d'agglomération (comme cela a été indiqué pour la caractérisation des NPs) qui ont diminué la disponibilité des NPs pour les plantes de *Lemna minor* et donc leur effet toxique. De plus, les résultats montrent que l'EDTA induit une stimulation de la croissance des plantes aux concentrations d'exposition de 0 à 1 mg/L de NPs-Ag.

5.2.4 Poids frais

Le poids frais a été mesuré après 7 jours d'exposition, et les résultats sont cohérents avec le nombre de plantes. On observe une diminution significative du poids frais des plantes exposées à 10 mg/L de NPs-Ag (Figure 5.12). De plus, la concentration en EDTA de 10 mg/L cause une stimulation de la croissance en poids frais aux concentrations d'exposition de 0 à 1 mg/L de NPs-Ag. Cependant, le poids frais est une variable de mesure non fiable, car le pourcentage d'humidité restant dans les plantes peut ne pas toujours être le même. Il est donc déconseillé de déterminer le taux de croissance et le pourcentage d'inhibition à partir de cette variable (OCDE, 2006).

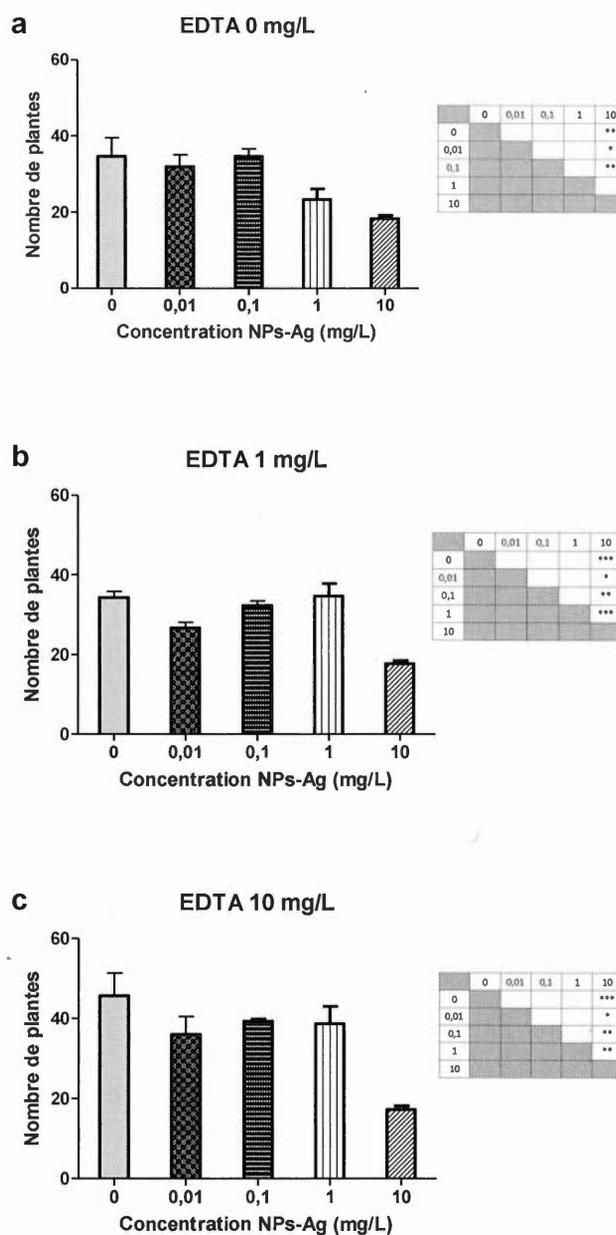


Figure 5.11 Nombre de plantes exposées dans les milieux de culture 20X AAP avec l'EDTA (0; 1 et 10 mg/L) et les NPs-Ag (0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L). Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives ($n=3$).

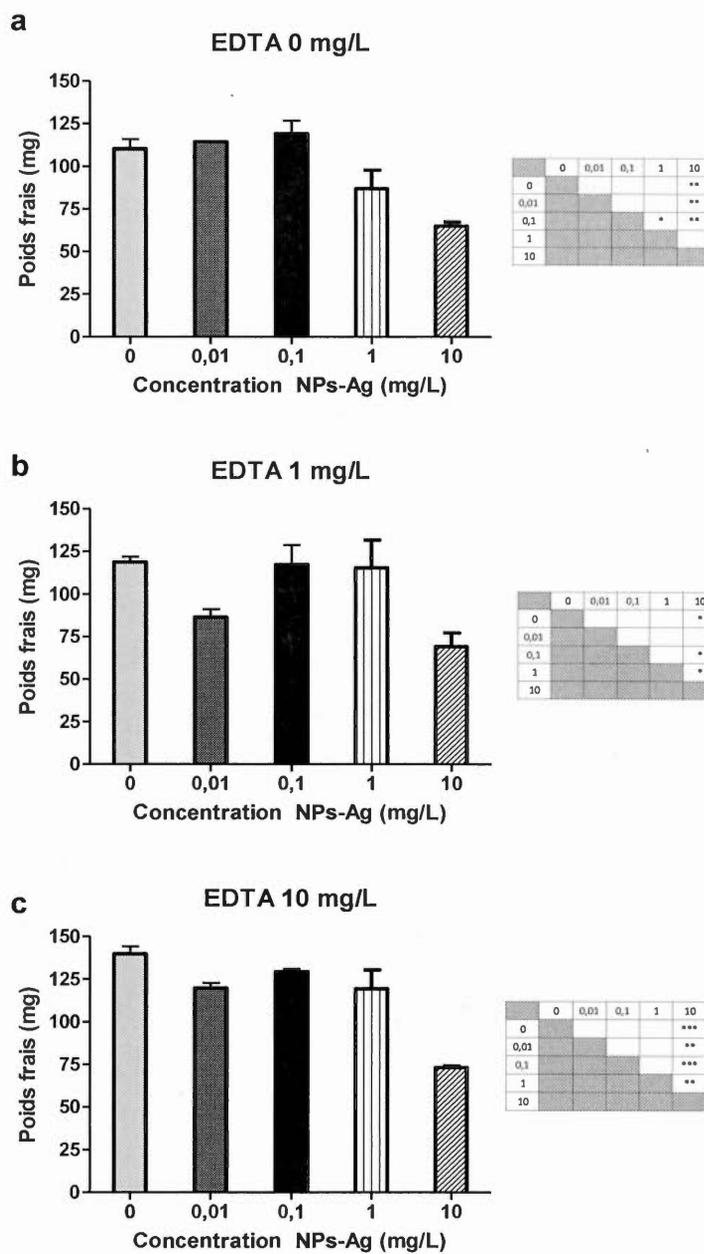


Figure 5.12 Poids frais de plantes de *Lemna minor* dans les milieux de culture 20X AAP avec 0; 1 et 10 mg/L d'EDTA, exposées à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives ($n=3$).

5.2.5 Poids sec

Pour déterminer le poids sec, au septième jour d'exposition aux NPs-Ag, les plantes de *Lemna minor* ont été pesées après une déshydratation (24 heures dans le four à 120 °C). Les résultats obtenus (figure 5.13) montrent des différences significatives dans le poids des plantes sèches lorsque exposées à 10 mg/L de NPs-Ag, en accord avec les résultats des variables de mesure analysées précédemment (nombre de frondes et poids frais). Pour les solutions préparées dans le milieu de culture contenant 10 mg/L d'EDTA, on observe une différence significative pour le poids des plantes déshydratées et exposées à une concentration de 10 mg/L de NPs-Ag, qui a été réduit de 38 % par rapport au témoin. Les résultats de poids sec montrent aussi que l'EDTA (1 et 10 mg/L) induit une stimulation de la croissance des plantes aux concentrations d'exposition de 0 à 1 mg/L de NPs-Ag.

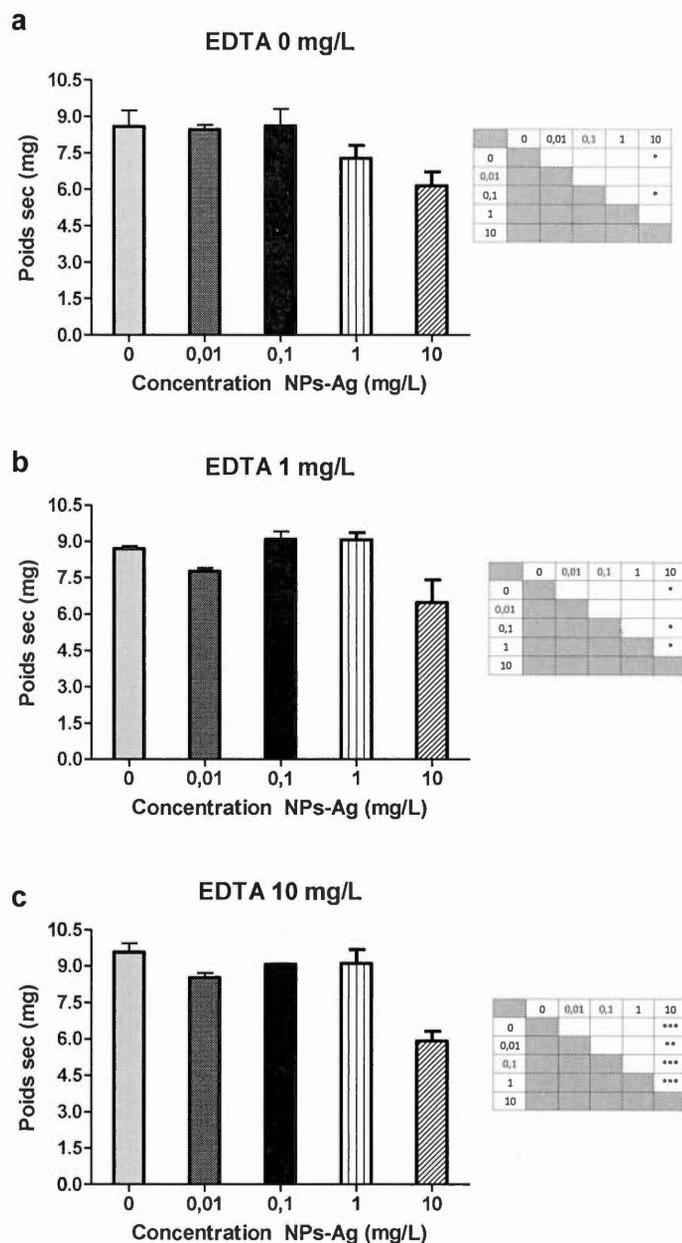


Figure 5.13 Poids sec (mg) des plantes de *Lemna minor* incubées dans les milieux de culture 20X AAP avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA et exposées à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives ($n=3$).

5.2.6 Taux de croissance spécifique

Le taux de croissance spécifique (TCS) a été déterminé à partir du nombre de frondes parce que les effets des NPs-Ag étaient les plus significatifs en comparaison avec les poids frais et secs. Selon nos résultats (figure 5.14), les plantes incubées dans les milieux de culture avec des concentrations d'EDTA de 0 et 1 mg/L ne présentaient pas de variation significative du taux de croissance sous les différentes concentrations de NPs-Ag. Par contre, les plantes incubées dans le milieu de culture avec de l'EDTA à 10 mg/L présentaient des augmentations du taux de croissance pour des plantes exposées à des concentrations de NPs-Ag (0 ; 0,01 ; 0,1 et 1 mg/L) (figure 5.15). Ces résultats suggèrent que l'EDTA a eut un effet antagoniste sur la toxicité des NPs-Ag dans ces conditions expérimentales. Cela peut s'expliquer par le fait que les interactions des molécules d'EDTA avec les agrégats de NPs-Ag n'ont pas favorisé la solubilisation de ces derniers, limitant ainsi la biodisponibilité des NPs-Ag et des Ag^+ avec les plantes. De plus, ces résultats montrent la nécessité d'avoir une concentration d'EDTA dans le milieu de culture artificiel (6-10 mg/L) pour permettre la solubilisation et la biodisponibilité des éléments métalliques traces servant de nutriments pour les plantes. Cette dernière explication semble être la plus plausible, puisque les plantes dans la condition expérimentale sans EDTA montrent un taux de croissance plus faible que celles exposées à 10 mg/L d'EDTA (sans traitement aux NPs-Ag) (figure 5.15). Sous ces conditions de déficience en EDTA (0 et 1 mg/L), les écart-types élevés des données indiquent une forte instabilité chimique du milieu causant un stress physiologique non uniforme chez les plantes testées. Ceci peut également expliquer les variations observées chez les plantes traitées aux NPs-Ag. Lorsque les plantes ont été exposées à 10 mg/L de NPs-Ag, le taux de croissance a montré une diminution significative par rapport au témoin, seulement sous une concentration d'exposition à l'EDTA de 10 mg/L (figure 5.14). Ces résultats indiquent clairement que l'EDTA n'a eut aucun effet (antagoniste ou additif) sur la toxicité de 10 mg/L de NPs-Ag.

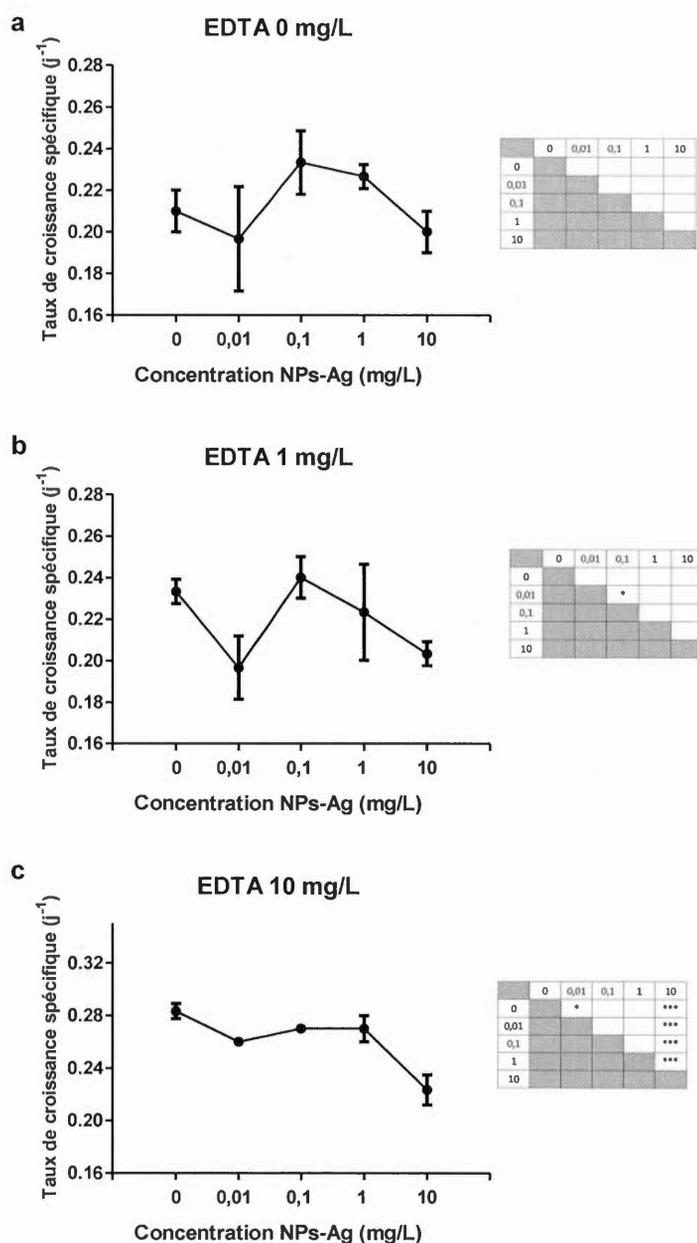


Figure 5.14 Taux de croissance spécifique (j^{-1}) des plantes de *Lemna minor* exposées à 0 (a) ; 1 (b) et 10 (c) mg/L d'EDTA et à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieur à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives ($n=3$).

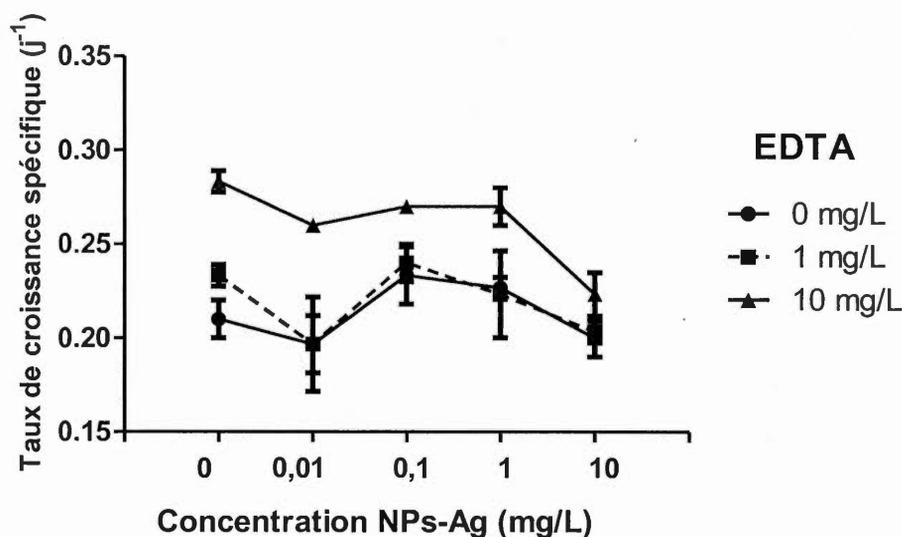


Figure 5.15 Superposition des courbes des taux de croissance spécifique (j^{-1}) des plantes de *Lemna minor* incubées dans les milieux de culture 20X AAP avec 0 ; 1 et 10 mg/L d'EDTA et exposées à 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag.

5.2.7 Bioaccumulation

L'accumulation de l'Ag dans les plantes de *Lemna minor* exposées aux NPs-Ag dans les milieux de culture avec différentes concentrations d'EDTA a été analysée quantitativement en mesurant la teneur totale en Ag (Figure 5.16) à l'aide d'un ICP-OES. La méthode employée et l'analyse par ICP-OES ont été suffisamment précises pour quantifier la bioaccumulation en Ag. Les plantes contrôles ne présentaient aucune trace d'Ag accumulé dans la biomasse. Lorsque les plantes ont été exposées aux différentes concentrations de NPs-Ag (0,1 - 10 mg/L), une accumulation significative d'Ag a été constatée à 10 mg/L de traitement aux NPs-Ag.

Les résultats montrent que l'accumulation de l'Ag dans la biomasse augmentait avec la concentration d'exposition des NPs-Ag dans le milieu. Ces résultats indiquent

que la quantité absorbée d'Ag dans la biomasse des plantes de *Lemna minor* est dépendante de la quantité des NPs-Ag en suspension dans la solution aqueuse, comme cela a été montré par l'étude de Oukarroum *et al.* (2013) en utilisant la plante aquatique *Lemna gibba*. Ainsi, la bioaccumulation a été la plus élevée chez les plantes traitées à 10 mg/L de NPs-Ag, et cela permet d'expliquer le degré de toxicité observé pour cette condition expérimentale. En ce qui concerne l'effet de différentes concentrations d'EDTA, il existe seulement une faible variation de la bioaccumulation d'Ag chez les plantes incubées dans le milieu avec 1 mg/L d'EDTA. Pour les autres conditions, il n'y avait pas de changements significatifs ($p < 0,05$), ce qui indique que l'EDTA n'a pas eut d'effet sur la biodisponibilité et l'absorption des NPs-Ag et des Ag^+ . En fait, cette interprétation concorde avec nos résultats obtenus concernant l'effet non significatif de l'EDTA sur la solubilisation des NPs-Ag.

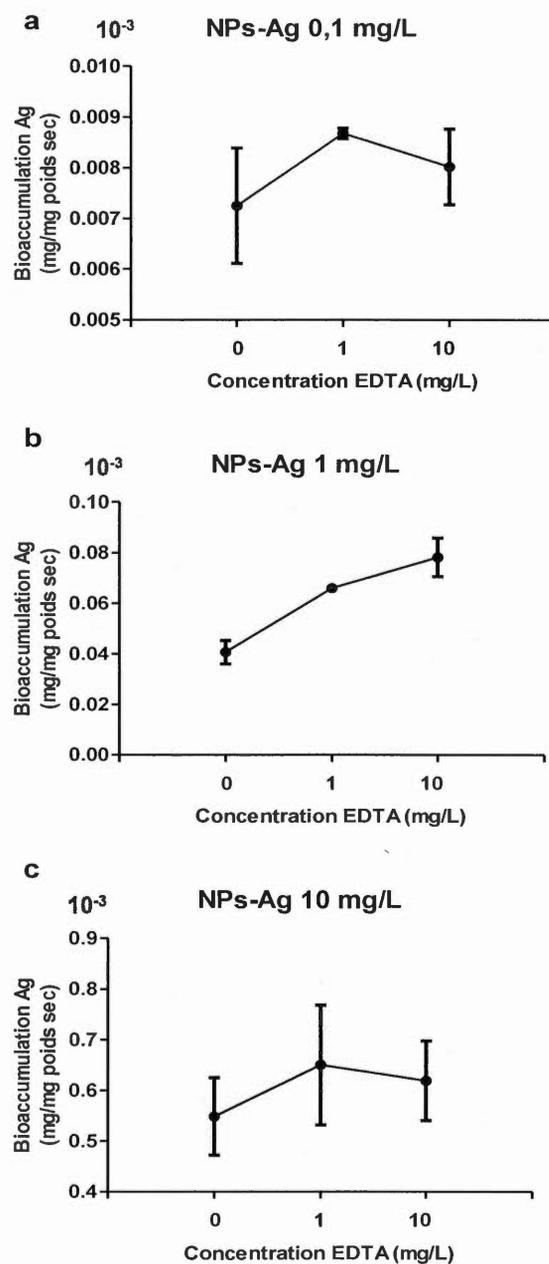


Figure 5.16 Bioaccumulation de l'Ag total ($\text{mg} \times 10^{-3} / \text{mg}$ de poids sec) chez les plantes exposées aux solutions de NPs-Ag (0,01 (a) ; 0,1 (b) ; 1 (c) et 10 (d) mg/L) et d'EDTA (0; 1 et 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP ($n=3$).

5.2.8 Pourcentage d'inhibition

L'effet inhibiteur des NPs-Ag sur le taux de croissance des plantes *Lemna minor* a été évalué en pourcentage d'inhibition en utilisant le nombre de frondes après 7 jours d'exposition. La figure 5.17 montre qu'aux concentrations les plus élevées de NPs-Ag (10 mg/L), le taux de croissance a diminué de 5, 15 et 21 % par rapport à leur contrôle dans les milieux de culture contenant de l'EDTA à 0; 1 et 10 mg/L, respectivement. Cependant, des variations significatives ont été obtenues uniquement dans les milieux de culture contenant de l'EDTA à 1 et 10 mg/L. De plus, compte tenu du fait que le pourcentage d'inhibition peut varier en fonction de la variable de mesure utilisée pour la déterminer, les poids frais et sec ont également été utilisés. Cependant, les valeurs se sont avérées similaires de celles obtenues à partir du nombre de frondes. Il est important de faire remarquer que les pourcentages d'inhibition obtenus ne permettent pas de déterminer la EC_{50} . Cette valeur a été estimée dans d'autres études, comme par exemple pour Oukarroum *et al.* (2013) : Dans l'intervalle des concentrations de NPs-Ag compris entre 0,01 et 10 mg/L, la valeur de la EC_{50} sur la croissance des plantes basée sur le nombre de frondes était de 9,36 ($\pm 2,36$) mg/L. Par contre, pour Naumann *et al.* (2007), les résultats de la EC_{50} pour *Lemna minor* exposé à l'Ag ionique sont de 43 μ g/L. Les valeurs de EC_{50} rapportées par Naumann *et al.* sont similaires à ceux rapportés par Gubbins *et al.* pour les NPs-Ag (Gubbins *et al.*, 2011). Dans les deux cas rapportés, les valeurs de EC_{50} sont inférieures aux concentrations utilisées dans la présente étude. Chez *Lemna gibba*, l'inhibition de la croissance se montre pour une EC_{50} de 4,5 g/L (Perreault *et al.*, 2014), une concentration beaucoup plus élevée que les précédentes. Cependant, lorsqu'il s'agit de conditions différentes d'exposition, telles que le milieu de culture, il est nécessaire de prendre en compte des propriétés telles que la force ionique et le pH. Celles-ci modifient le comportement des NPs et, comme l'indique la caractérisation des NPs-Ag présentée à la section 5.1 du présent chapitre, la formation de gros agglomérats se produit dans toutes nos conditions d'exposition.

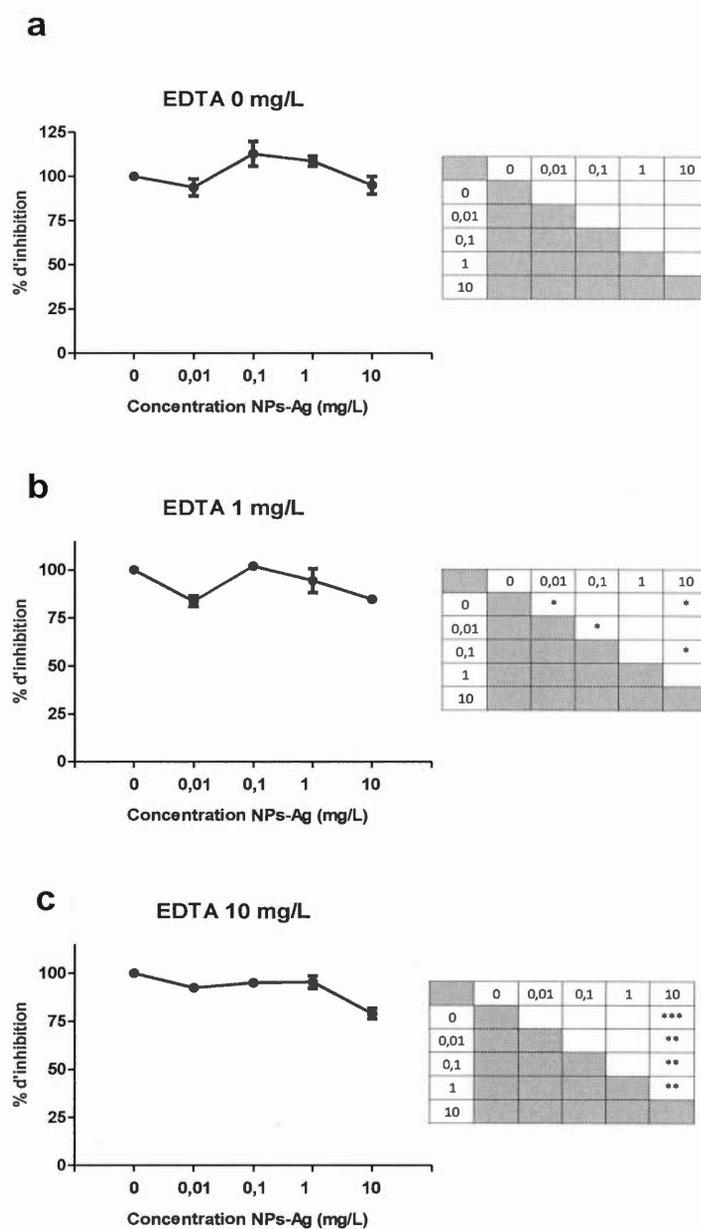


Figure 5.17 Pourcentage d'inhibition chez les plantes exposées aux solutions de NPs-Ag (0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 mg/L) dans le milieu de culture 20X AAP sans ou avec l'EDTA (0 (a) ; 1 (b) et 10 (c) mg/L). Les différences entre les traitements d'EDTA et la condition de contrôle où p était inférieure à 0,1 (*), à 0,05 (**), et 0,01 (***) ont été considérées comme significatives ($n=3$).

5.3 Discussion générale

Grâce aux recherches précédentes, il est bien connu que les NPs-Ag représentent un risque imminent pour l'environnement. Les effets toxiques ont été démontrés chez des organismes tels que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, des cellules de mammifères, le poisson-zèbre, *Oreochromis niloticus*, *Caenorhabditis elegans*, *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Lolium multiflorum*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*, entre autres (Raffi et al., 2007 ; Asharani et al., 2008 ; Rodea-Palomares, I. et al., 2009 ; Meyer et al., 2010 ; Sotiriou et Pratsinis, 2010 ; Yi Miao et al., 2010 ; Gubbins et al., 2011 ; Kim et al., 2011 ; Oukarroum et al., 2012 ; Oukarroum et al., 2013 ; Ivask et al., 2014 ; Zille et al., 2015 ; Sun, Xia et al., 2016 ; Afifi et al., 2016 ; Lacave et al., 2016 ; Luo et al., 2017 ; Pereira et al., 2018 ; Zheng et al., 2018). Il a été démontré que les effets toxiques sont généralement attribués à la solubilisation des ions libres provenant des NPs-Ag (Navarro et al., 2008 a, b ; Stampoulis et al., 2009). Cependant, certains effets peuvent également être attribuables aux propriétés spécifiques en fonction de la taille nanométrique des NPs, telles que la possibilité de traverser la membrane biologique qui est différente des ions (Miao et al., 2010) ou d'être adsorbé à la surface cellulaire (Zeyons et al., 2009). L'agglomération et l'agrégation des NPs-Ag est apparemment un effet commun d'interaction dans différents solvants (Perreault et al., 2012), qui est dans notre cas le milieu de culture 20X AAP. La toxicité est dépendante de l'agrégation, ce qui a été observée dans d'autres études avec *Daphnia magna*, étant donné que la taille de l'agrégation peut provoquer une différence dans les interactions avec les cellules au sein de l'organisme en affectant la surface de la particule disponible, ainsi comme l'absorption des particules dans les cellules (Bozich et al., 2014).

Dans notre étude, l'exposition des plantes *Lemna minor* aux NPs-Ag dans des milieux de culture présentant différentes concentrations d'EDTA (0, 1 et 10 mg/L) a montré des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 4,5 à 21 % par rapport aux témoins,

et dans certaines conditions avec un nombre de frondes supérieur aux témoins pouvant atteindre jusqu'à 12 %. L'effet inhibiteur des NPs-Ag a été le plus important et significativement déterminé sous un traitement de 10 mg/L. La caractérisation des NPs-Ag a montré qu'ils avaient subi des modifications de leurs propriétés chimiques dans le milieu de culture 20X AAP. Ces modifications se sont manifestées par l'instabilité des suspensions, montrant des potentiels ζ compris entre -1,62 et -8,74 mV pour les conditions de 0,01 ; 0,1 et 1 mg/L de NPs-Ag, et de -12,54 à -14,28 mV pour des suspensions contenant 10 mg/L de NPs-Ag. Cette instabilité a également été visible par le diamètre hydrodynamique et la polydispersité des NPs-Ag en suspension. La taille des nanoparticules a augmenté de manière significative 7 jours après la préparation des suspensions dans le milieu de culture, passant de 50 nm (poudre) à des tailles comprises entre 1146 et 2496 nm en moyenne. L'augmentation de la taille des NPs-Ag est démontré par la formation d'agrégats, car malgré l'utilisation de méthodes physiques (ultrasonication et agitation), il n'était pas possible de les séparer, démontrant une forte cohésion entre les particules (Jiang et al., 2009). Des tailles de particules similaires en suspensions de NPs-TiO₂ ont été rapportées par Li et al. (2013), 24 heures après leur préparation dans des milieux de culture recommandés par l'OCDE. Ils ont montré que leurs conditions expérimentales (dont la composition du milieu) causaient de l'aggrégation et de la sédimentation modifiant la toxicité des NPs-TiO₂ dispersés (Li et al., 2013). Dans l'objectif d'effectuer une évaluation toxicologique complète, il est important de tester différentes conditions de milieu aqueux afin de déterminer comment les changements des propriétés chimiques des NPs peuvent modifier le mécanisme et le degré de toxicité des NPs en solution. Dans cette présente étude, le milieu de culture 20X AAP du protocole standard des tests de toxicité sur la croissance de la lentille d'eau a été utilisé pour estimer le potentiel toxique des agglomérats en suspension des NPs-Ag. C'est une approche tout aussi valable pour les études toxicologiques avec les NPs.

Selon notre étude, la taille des particules aux deux concentrations analysées présentait une diminution minimale (non significative), lorsque la concentration en EDTA était de 10 mg/L. De même, selon des travaux antérieurs, l'ajout d'EDTA à des suspensions de NPs-CuO et de NPs-Fe₃O₄ ne diminuait pas le diamètre hydrodynamique et n'augmentait pas significativement l'intensité du potentiel ζ (Canuel, 2017). De plus, la solubilité des NPs-Ag n'a pas été affectée par les concentrations testées d'EDTA. Les conditions dans lesquelles la solubilité a été mesurée (0,01, 1 et 10 mg/L de NPs-Ag) présentaient des concentrations d'Ag⁺ similaires, quelles que soient les variations de l'EDTA dans le milieu de culture. Pour les suspensions préparées en absence d'EDTA, des concentrations en Ag⁺ soluble de 0,004 ; 0,0082 et 0,0139 mg/L ont été mesurées dans des conditions d'exposition respectives de 0,1 ; 1 et 10 mg/L de NPs-Ag. Cependant, dans l'étude menée par Oukarroum et al. (2013), les concentrations en Ag⁺ étaient de 0,00087 ; 0,0102 et 0,150 mg/L pour les mêmes concentrations de NPs-Ag (Oukarroum et al., 2013). À cause que la fraction soluble d'Ag⁺ était faible dans cette étude rapportée et la nôtre, il est fort probable que l'accumulation d'Ag intracellulaire provient directement des NPs, entraînant des effets de toxicité cellulaire, comme l'indiquent l'apparence de chlorose et la diminution de la croissance des plantes.

Dans notre étude, la chlorose se manifestait chez les plantes exposées à 0,01 ; 0,1 et 1 mg/L de NPs-Ag, lorsque la concentration en EDTA dans le milieu de culture était très faible (1 mg/L) ou nulle (0 mg/L), et chez les plantes exposées à 10 mg/L de NPs-Ag sous les trois conditions EDTA (0, 1 et 10 mg/L). La toxicité des NPs métalliques a déjà été associée à la chlorose (Tripathi et al., 2017 ; Wang et al., 2013), en provoquant des modifications de l'ultrastructure et de la morphologie des cellules, ainsi que la diminution de certains pigments photosynthétiques chez *Lemna punctata* (Lalau et al., 2015). Pour Pereira et al. (2018), la chlorose était présente chez les plantes de *Lemna minor* exposées à 300 µg/L de NPs-Ag durant 7 jours, et les plantes mouraient après 14 jours (Pereira et al., 2018). Dans notre étude, la chlorose a diminué

chez les plantes incubées dans des milieux de culture contenant 10 mg/L d'EDTA, ce qui indique une action antagoniste du ligand sur la toxicité des NPs-Ag. Cette concentration d'EDTA a aussi stabilisé le milieu de culture en rendant biodisponible les éléments métalliques traces servant de nutriments pour les plantes.

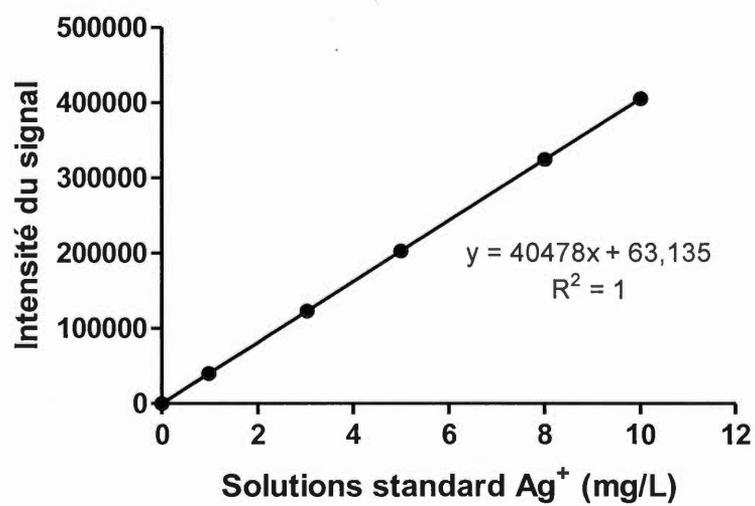
La croissance des plantes de *Lemna minor*, déterminée dans la présente étude, a montré une diminution significative sous une exposition à 10 mg/L de NPs-Ag par rapport au témoin. Cependant, seulement pour le nombre de frondes, des différences significatives ont été observées dans les milieux de culture contenant 10 mg/L d'EDTA par rapport aux milieux de culture sans EDTA. Chez les plantes incubées avec 10 mg/L d'EDTA, il y avait une augmentation du nombre de frondes dans toutes les conditions d'exposition aux NPs-Ag, mettant ainsi en évidence une diminution de l'effet des NPs-Ag sur les plantes *Lemna minor* avec l'addition d'EDTA. Ce postulat a été renforcé avec la détermination des taux de croissance (TCS) dans lesquels des valeurs plus élevées ont été obtenues chez les plantes incubées dans le milieu de culture avec 10 mg/L d'EDTA. Contrairement à d'autres études, les effets des NPs-Ag sur *Lemna minor* ont été relativement modestes, probablement en raison de la formation d'agrégats moins solubles et biodisponibles pour les plantes. La formation d'agrégats s'est produite en raison de l'augmentation de la force ionique et de la diminution de la répulsion électrostatique. L'extension de cette agrégation est régie par le pH, la force ionique et la nature des électrolytes (Navarro et al., 2008; Kim et al., 2010). De plus, la bioaccumulation de l'Ag dans les plantes était dépendante de la concentration d'exposition des NPs-Ag, et permet d'expliquer en partie la toxicité des NPs-Ag. Cependant, les différentes concentrations d'EDTA n'ont eut aucun effet sur la bioaccumulation de l'Ag.

CONCLUSION

L'objectif général de ce projet était de déterminer l'effet de l'EDTA sur la toxicité des NPs-Ag chez la plante aquatique *Lemna minor*. Les NPs-Ag ont été caractérisés en fonction des propriétés physico-chimiques telles que le diamètre hydrodynamique, le potentiel ζ et leur solubilité dans le milieu de culture 20X AAP, dans le but d'évaluer l'effet de l'EDTA sur ces propriétés. Cette étude montre que les paramètres environnementaux ont une influence importante sur les propriétés physicochimiques des NPs-Ag. Ces propriétés déterminent la biodisponibilité des NPs et leur effet toxique sur les organismes aquatiques. Par exemple, la force ionique du milieu de culture 20X AAP a entraîné la formation d'agrégats rendant les NPs moins biodisponibles, et cela a limité considérablement les interactions et l'effet de l'EDTA sur les NPs. Pour des études toxicologiques futures utilisant les lentilles d'eau, il est intéressant d'utiliser un milieu de culture avec une force ionique très inférieure à 0,019 M. L'évaluation toxicologique des NPs doit prendre en compte la composition chimique du milieu test pour déterminer le mécanisme de toxicité des NPs avec différents organismes aquatiques. De plus, cette étude a montré que l'EDTA n'avait pas d'effet significatif sur la solubilité des NPs-Ag, et que l'absence d'EDTA entraînait un effet de carence en éléments nutritifs chez les plantes. Finalement, notre étude a démontré que la concentration la plus élevée de NPs-Ag causait une toxicité significative sur la croissance des plantes, ce qui explique l'apparition de chlorose. Ainsi, on suggère deux mécanismes de toxicité : 1- L'absorption et la bioaccumulation des NPs-Ag; 2- L'adhérence d'agrégats de NPs-Ag à la surface des plantes, affectant les processus photosynthétiques et l'absorption des éléments nutritifs.

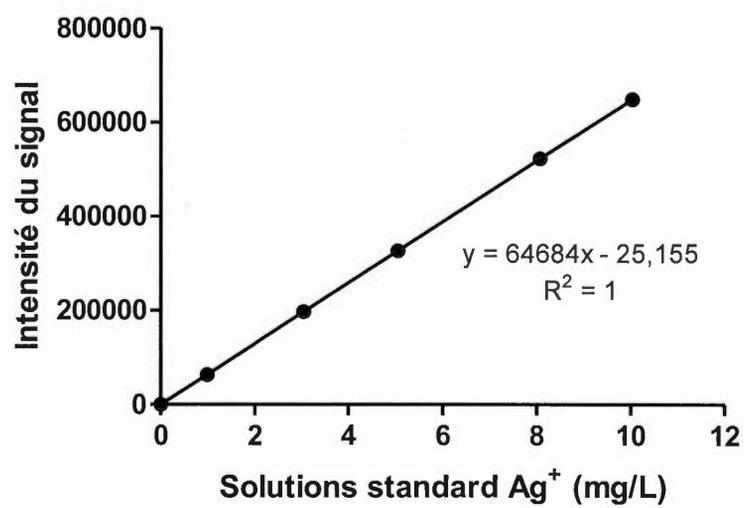
Les résultats de ce travail contribuent à l'avancement des connaissances sur le comportement des NPs-Ag en solution aqueuse, et à l'acquisition d'une meilleure compréhension des interactions entre les paramètres environnementaux et les NPs dans le but de prévoir leurs effets dans le milieu aquatique. Il faut poursuivre les études de caractérisations chimiques et toxicologiques des NPs puisqu'ils représentent un risque de toxicité pour l'environnement en affectant le développement normal des organismes aquatiques et en altérant les écosystèmes.

ANNEXE A

COURBE D'ÉTALONNAGE POUR DÉTERMINER LA SOLUBILITÉ DE
L'ION Ag^+ PAR ICP-OES

ANNEXE B

COURBE D'ÉTALONNAGE POUR LA BIOACCUMULATION D'Ag⁺
DÉTERMINÉE PAR ICP-OES



RÉFÉRENCES

- Adams, N. W. H., et Kramer, J. R. (1998). Reactivity of Ag⁺ ion with thiol ligands in the presence of iron sulfide. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 625-629.
- Afifi, M., Saddick, S., et Abu Zinada, O. A. (2016). Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23, 754-760.
- Agilent Technologies (2014) Sistema ICP-OES Agilent 5100. Especificaciones Consulté le 24 octobre 2018, sur <https://www.agilent.com>
- Ahn, J.-M., Eom, H.-J., Yang, X., Meyer, J. N., et Choi, J. (2014). Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 108, 343-352.
- Ali, Z., Waheed, H., Kazi, A. G., Hayat, A., et Ahmad, M. (2016). *Duckweed*: An efficient hyperaccumulator of heavy metals in water bodies. In *Plant Metal Interaction*, P. Ahmad Elsevier. 411-429.
- Appenroth, K.-J., Sree, K. S., Böhm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., et Jahreis, G. (2017). Nutritional value of duckweeds (*Lemnaceae*) as human food. *Food Chemistry* 217, 266-273.
- Arroyave, M. d. P. (2004). La lenteja de agua (*Lemna minor*): una planta acuática promisoría. *EIA* 1, 33-38.
- AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., et Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279-290.
- Asharani, P. V., Yi Lian, W., Zhiyuan, G., et Suresh, V. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102.
- Avinoam Danin (2018) Flora of Israel online. Consulté le 10 octobre 2018, sur <http://flora.org.il/en/plants/LEMMIN/>

- Badawy, A. M. E., Luxton, T. P., Silva, R. G., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., et Tolaymat, T. M. (2010). Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science & Technology* 44, 1260-1266.
- Bao, H., Yu, X., Xu, C., Li, X., Li, Z., Wei, D., et Liu, Y. (2015). New toxicity mechanism of silver nanoparticles: promoting apoptosis and inhibiting proliferation. *Public Library of Science* 10 (3).
- Barber, D. J., et Freestone, I. C. (1990). An investigation of the origin of the colour of the *Lycurgus cup* by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry* 32, 33-45.
- Barber, L. B., Loyo-Rosales, J. E., Rice, C. P., Minarik, T. A., et Oskouie, A. K. (2015). Endocrine disrupting alkylphenolic chemicals and other contaminants in wastewater treatment plant effluents, urban streams, and fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions. *Science of The Total Environment* 517, 195-206.
- Benn, T. M., et Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology* 42, 4133-4139.
- Bian, S.-W., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T., et Grassian, V. H. (2011). Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of Humic Acid. *Langmuir* 27, 6059-6068.
- Bindhu, M. R., et Umadevi, M. (2015). Antibacterial and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles. *Spectrochimica (Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy)* 135, 373-378.
- Blaser, S. A., Scheringer, M., MacLeod, M., et Hungerbühler, K. (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of The Total Environment* 390, 396-409.
- Bozich, J. S., Lohse, S. E., Torelli, M. D., Murphy, C. J., Hamers, R. J., et Klaper, R. D. (2014). Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Science: Nano* 1, 260-270.
- Brennan, R. G., Rabb, S. A., Holden, M. J., Winchester, M. R., et Turk, G. C. (2009). Potential primary measurement tool for the quantification of DNA. *Analytical Chemistry* 81, 3414-3420.

- C. N. R. Rao, A. M., Anthony K. Cheetham (2006). The chemistry of nanomaterials: Synthesis, properties and applications. John Wiley & Sons.
- Campbell, C. D., Hird, M., Lumsdon, D. G., et Meeussen, J. C. (2000). The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*. *Chemosphere* 40, 319-325.
- Campbell, P. G. C., ed. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. John Wiley and Sons (New York).
- Canada, S. (2017). Ébauche d'évaluation préalable. Groupe de l'EDTA et de ses sels In, E.e.C.c. Canada, ed. (Gouvernement du Canada).
- Canuel, E. (2017) Effet de la salinité et de l'EDTA sur la toxicité des nanoparticules de magnétite et d'oxyde de cuivre chez *Artemia salina*, *chlamydomonas reinhardtii* et *chlamydomonas Euryale*. Mémoire, Université du Québec à Montréal.
- Chambers, B. A., Afrooz, A. R., Bae, S., Aich, N., Katz, L., Saleh, N. B., et Kirisits, M. J. (2014). Effects of chloride and ionic strength on physical morphology, dissolution, and bacterial toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Science & Technology*. 48, 761-769.
- Chen, C.-Y., et Chiang, C.-L. (2008). Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Materials Letters* 62, 3607-3609.
- Chen, X., et Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* 176, 1-12.
- Creighton, J. A., Blatchford, C. G., et Albrecht, M. G. (1979). Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 75, 790-798.
- 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. *Ecotoxicol Environ Saf* 127, 144-152.
- De Beukelaar, M. F. A., Zeinstra, G. G., Mes, J. J., et Fischer, A. R. H. (2019). Duckweed as human food. The influence of meal context and information on duckweed acceptability of Dutch consumers. *Food Quality and Preference* 71, 76-86.

- Delay, M., et Frimmel, F. H. (2012). Nanoparticles in aquatic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 583-592.
- Dewez, D., Goltsev, V., Kalaji, H. M., et Oukarroum, A. (2018). Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Current Plant Biology* 16, 15-21.
- Díez, I., et Ras, R. H. A. (2011). Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale* 3, 1963-1970.
- Dirilgen, N. (1998). Effects of pN and crelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor*. *Chemosphere* 37, 771-783.
- Dumont, E., Johnson, A. C., Keller, V. D. J., et Williams, R. J. (2015). Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters – Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution. *Environmental Pollution* 196, 341-349.
- Encyclopedia of life EOL (2018) *Lemna minor*. Consulté le 09 octobre 2018, sur <http://eol.org/pages/1142162/details>
- Environmental Protection Agency (EPA) (2004) Focus group decision document for tolerance reassessment of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and its salts [PDF] P. Office of Prevention, and Toxic Substances États-Unis.
- Evangelou, M. W. H., Ebel, M., et Schaeffer, A. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68, 989-1003.
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S., et Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* 37, 517-531.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (2000) Calcium Disodium EDTA. In: Toxicological evaluation of some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour treatment agents, acids and bases.
- Ferrat, L., Pergent-Martini, C., et Roméo, M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 65, 187-204.
- Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E., et Peacocke, A. R. (1970). Determination of diffusion coefficients of *Haemocyanin* at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of Scattered Laser Light. *Nature* 227, 242.

- Frankart, C., Eullaffroy, P., et Vernet, G. (2002). Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. *Ecotoxicol Environ Saf* 53, 439-445.
- Geranio, L., Heuberger, M., et Nowack, B. (2009). The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science & Technology* 43, 8113-8118.
- Gouvernement du Canada (2018) Évaluation préalable finale pour le Groupe de l'EDTA et de ses sels. Consulté le 14-09-18, sur <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/evaluation-substances-existantes/evaluation-prealable-edta-sels.html>
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., et Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology* 43, 9216-9222.
- Gu, Y.-Y., Yeung, A. T., Koenig, A., et Li, H.-J. (2009). Effects of chelating agents on zeta potential of cadmium-contaminated natural clay. *Separation Science and Technology* 44, 2203-2222.
- Gubbins, E. J., Batty, L. C., et Lead, J. R. (2011). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution* 159, 1551-1559.
- Gusain, R., et Suthar, S. (2017). Potential of aquatic weeds (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* and *Eichhornia* sp.) in biofuel production. *Process Safety and Environmental Protection* 109, 233-241.
- Gustafsson, Jon Petter (2018) Visual Minteq. Consulté le 28 août 2017, sur <https://vminteq.lwr.kth.se/download/>
- Gutierrez, C. (2012). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto Nuclear*, 24-29.
- Hahn, J.-i., et Lieber, C. M. (2004). Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors. *Nano Letters* 4, 51-54.
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., et Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry* 79, 4215-4221.

- Hartemann, P., Hoet, P., Proykov, A., Fernandes, T., Baun, A., Jong, W. D., Filser, J., Hensten, A., Kneuer, C., Jean-YvesMaillard, *et al.* (2014). Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. 18, 122-123.
- Hillman, W. S. (1961). The Lemnaceae, or Duckweeds: A Review of the Descriptive and Experimental Literature. *Botanical Review* 27, 221-287.
- Hu, D., Lin, J., Jin, S., Hu, Y., Wang, W., Wang, R., et Yang, B. (2016). Synthesis, structure and optical data storage properties of silver nanoparticles modified with azobenzene thiols. *Materials Chemistry and Physics* 170, 108-112.
- Huebert, D., et M. Shay, J. (1992). The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca* L. Vol 22 Environmental Contamination and Toxicology.
- Huebert, D. B., Dyck, B. S., et Shay, J. M. (1993). The effect of EDTA on the assessment of Cu toxicity in the submerged aquatic macrophyte, *Lemna trisulca* L. *Aquatic Toxicology* 24, 183-194.
- Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., *et al.* (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *Public Library of Science* 9, 102-108.
- Jiang, J., Oberdörster, G., et Biswas, P. J. J. o. N. R. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 77-89.
- Kadima, W., McPherson, A., Dunn, M. F., et Journak, F. (1991). Precrystallization aggregation of insulin by dynamic light scattering and comparison with canavalin. *Journal of Crystal Growth* 110, 188-194.
- Kari, F. G., et Giger, W. (1996). Speciation and fate of ethylenediaminetetraacetate (EDTA) in municipal wastewater treatment. *Water Research* 30, 122-134.
- Karim, M. A., et Khan, L. I. (2012). Enhancement of electrokinetic decontamination with EDTA. *Environmental Technology* 33, 2291-2298.
- Kazim, S., Pflieger, J., Procházka, M., Bondarev, D., et Vohlídal, J. (2011). Colloidal systems of silver nanoparticles and high-regioregular cationic polythiophene with ionic-liquid-like pendant groups: Optical properties and SERS. *Journal of Colloid and Interface Science* 354, 611-619.

- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., et Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B* 107, 668-677.
- Khoshnevisan, K., et Barkhi, M. (2015). Zeta potential. (Tehran, Iran) Institute of Agricultural Biotechnology.
- Kim, E., Kim, S.-H., Kim, H.-C., Lee, S. G., Lee, S. J., Jeong, S. W. J. T., et Sciences, E. H. (2011). Growth inhibition of aquatic plant caused by silver and titanium oxide nanoparticles. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 3, 1-6.
- Klaine, S., J J Alvarez, P., Batley, G., Fernandes, T., Handy, R., Lyon, D., Mahendra, S., McLaughlin, M., et R Lead, J. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1825-1851.
- Kovacs, M., Nyary, I., et Toth, L. (1984). The microelement content of some submerged and floating aquatic plants. *Acta botanica hungarica* 30, 173-185.
- Lacave, J. M., Retuerto, A., Vicario-Parés, U., Douglas, G., Miriam, O., Miren, P. C., et Amaia, O. (2016). Effects of metal-bearing nanoparticles (Ag, Au, CdS, ZnO, SiO₂) on developing zebrafish embryos. *Nanotechnology* 27, 325102.
- Lalau, C. M., Mohedano, R. d. A., Schmidt, É. C., Bouzon, Z. L., Ouriques, L. C., dos Santos, R. W., da Costa, C. H., Vicentini, D. S., et Matias, W. G. (2015). Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma* 252, 221-229.
- Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). Vol. 2, Vol. 1 Vol. 2, Vol. 1. (Zürich) Geobotanisches Institut der ETH.
- Latour, C. D., Urazarv, A. K., et Pond, A. L. (2015). Dispersing agents prevent negative impact of oil on uptake of zinc by duckweed (*Lemna minor*). *Journal of Emerging Investigators* 1-8.
- Li, L., Sillanpää, M., Tuominen, M., Lounatmaa, K., et Schultz, E. (2013). Behavior of titanium dioxide nanoparticles in *Lemna minor* growth test conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88, 89-94.
- Lin, D., et Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150, 243-250.

- Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., Cui, L., Zhou, Q. F., Yan, B., et Jiang, G. B. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* 4, 319-330.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P., Chiu, J.-F., et Che, C.-M. (2007). Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12, 527-534.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P. K.-H., Chiu, J.-F., et Che, C.-M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5, 916-924.
- Lopes, M. A., Monteiro, F. J., Santos, J. D., Serro, A. P., et Saramago, B. (1999). Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research* 45, 370-375.
- Lu, W., Senapati, D., Wang, S., Tovmachenko, O., Singh, A. K., Yu, H., et Ray, P. C. (2010). Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chemical Physics Letters* 487, 92-96.
- Luo, X., Xu, S., Yang, Y., Li, L., Chen, S., Xu, A., et Wu, L. (2016). Insights into the ecotoxicity of silver nanoparticles transferred from *Escherichia coli* to *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* 6, 36465.
- Luo, X., Xu, S., Yang, Y., Zhang, Y., Wang, S., Chen, S., Xu, A., et Wu, L. (2017). A novel method for assessing the toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 168, 648-657.
- Lyklema, J. (2003). Electrokinetics after Smoluchowski. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 222, 5-14.
- Ma, M., Zhu, W., Wang, Z., et Witkamp, G. J. (2003). Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 63, 221-228.
- Martinez-Andrade, J. M., Avalos-Borja, M., Vilchis-Nestor, A. R., Sanchez-Vargas, L. O., et Castro-Longoria, E. (2018). Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment—A novel modification. *Public Library of Science* 13, 1-19.
- Martínez, M., Miralles, N., Hidalgo, S., Fiol, N., Villaescusa, I., et Poch, J. (2006). Removal of lead(II) and cadmium(II) from aqueous solutions using grape stalk waste. *Journal of Hazardous Materials* 133, 203-211.

- Massarsky, A., Trudeau, V. L., et Moon, T. W. (2014). Predicting the environmental impact of nanosilver. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38, 861-873.
- Meyer, J. N., Lord, C. A., Yang, X. Y., Turner, E. A., Badireddy, A. R., Marinakos, S. M., Chilkoti, A., Wiesner, M. R., et Auffan, M. (2010). Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology* 100, 140-150.
- Miao, A.-J., Luo, Z., Chen, C.-S., Chin, W.-C., Santschi, P. H., et Quigg, A. (2010). Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a Freshwater Alga *Ochromonas danica*. *Public Library of Science* 5, e15196.
- Minghetti, M., et Schirmer, K. (2016). Effect of media composition on bioavailability and toxicity of silver and silver nanoparticles in fish intestinal cells (RTgutGC). *Nanotoxicology* 10, 1526-1534.
- Mohd Omar, F., Abdul Aziz, H., et Stoll, S. (2014). Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Science of The Total Environment* 468-469, 195-201.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Alejandra, C., Katherine, H., Juan, B. K., Jose Tapia, R., et Miguel Jose, Y. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346.
- Mueller, N. C., et Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology* 42, 4447-4453.
- Nam, D.-H., Lee, B.-c., Eom, I.-c., Kim, P., Yeo, M.-K. J. M., et Toxicology, C. (2014). Uptake and bioaccumulation of titanium- and silver-nanoparticles in aquatic ecosystems. *Molecular & Cellular Toxicology* 10, 9-17.
- Nasrollahzadeh, M., Babaei, F., Sajadi, S. M., et Ehsani, A. (2014). Green synthesis, optical properties and catalytic activity of silver nanoparticles in the synthesis of N-monosubstituted ureas in water. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 132C, 423-429.
- Navarro, E., Piccapietra, F., 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, 8959-8964.
- Niitsoo, O., et Couzis, A. (2011). Facile synthesis of silver core – silica shell composite nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 354, 887-890.

- Nowack, B. (2002). Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. *Environmental Science & Technology* 36, 4009-4016.
- Nowack, B., et VanBriesen, J. M. (2005). Biogeochemistry of chelating agents. In *Biogeochemistry of Chelating Agents*, American Chemical Society. i-v.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., et Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113, 823-839.
- OCDE (2006). Test No. 221: *Lemna sp.* growth inhibition test. Organisation de coopération et de développement économiques.
- 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*. 32, 902-907.
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., et Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 80-85.
- Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., et Tamarkin, L. (2004). Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Delivery* 11, 169-183.
- Pan, H., Tao, X., Mao, C., Zhu, J.-J., et Liang, F. (2007). Aminopolycarboxyl-modified Ag₂S nanoparticles: Synthesis, characterization and resonance light scattering sensing for bovine serum albumin. *Talanta* 71, 276-281.
- Parr, L. B., Perkins, R. G., et Mason, C. F. (2002). Reduction in photosynthetic efficiency of *Cladophora glomerata*, induced by overlying canopies of *Lemna spp.* *Water research* 36, 1735-1742.
- Pereira, S. P. P., Jesus, F., Aguiar, S., de Oliveira, R., Fernandes, M., Ranville, J., et Nogueira, A. J. A. (2018). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Science of The Total Environment* 618, 1389-1399.
- Perreault, F., Popovic, R., et Dewez, D. (2014). Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. *Environmental Pollution* 185, 219-227.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., et Nowack, B. (2011). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* 14, 1109.

- Plumb, R. C., Martell, A. E., et Bersworth, F. C. (1950). Spectrophotometric determination of displacement series of metal complexes of the sodium salts of C. Acid. *Journal of Physical and Colloid Chemistry* 54, 1208-1215.
- Powers, K. W., Palazuelos, M., Moudgil, B. M., et Roberts, S. M. (2007). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology* 1, 42-51.
- Prabhu, S., et Poulouse, E. K. J. I. N. L. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* 2, 32.
- Quang Huy, T., Van Quy, N., et Anh-Tuan, L. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 4, 033001.
- Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Marijanovic Rajcic, M., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B., et Pavlica, M. (2011). Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 74, 182-187.
- Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T., Akhter, J., Hameed, A., et Hassan, M. (2007). Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. Coli* ATCC-15224. *Journal of Materials Science and Technology* 24, 192-196.
- Rai, L. C., et Raizada, M. (1985). Effect of nickel and silver ions on survival, growth, carbon fixation and nitrogenase activity in « *Nostoc muscorum* »: regulation of toxicity by EDTA and calcium. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 329-337.
- Raven, P., Evert, R., et Eichhorn, S. (1971). *Biology of plants*. (New York) Freeman.
- Rejeski, D. Kulken, T. Pollschuk, P. Pauwels, E. (2011) The project on emerging nanotechnologies. Consulté le 19 novembre 2017, sur http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/
- Riley, D. J., Waggett, J. P., et Wijayantha, K. G. U. (2004). Colloidal bismuth sulfide nanoparticles: a photoelectrochemical study of the relationship between bandgap and particle size. *Journal of Materials Chemistry* 14, 704-708.
- Rodea-Palomares, I., Gonzalez-Garcia, C., Leganes, F., et Fernandez-Pinas, F. (2009a). Effect of pH, EDTA, and anions on heavy metal toxicity toward a bioluminescent cyanobacterial bioreporter. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 477-487.

- Rodea-Palomares, I., González-García, C., Leganes, F., et Fernandez-Piñas, F. (2009b). Effect of pH, EDTA, and anions on heavy metal toxicity toward a *Bioluminescent Cyanobacterial bioreporter*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 57, 477-487.
- Rodea-Palomares, I., González-García, C., Leganes, F., Fernández-Piñas, F. J. A. o. E. C., et Toxicology (2009c). Effect of pH, EDTA, and Anions on Heavy Metal Toxicity Toward a Bioluminescent Cyanobacterial Bioreporter. *Archives of environmental contamination and toxicology* 57, 477.
- Roldan, G. (1992). Fundamentos de limnología tropical. (Antioquia) Universidad de Antioquia.
- Rook, E. (2002). Flora, fauna, earth and sky, The natural history of the northwoods.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., et Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 13, 468-474.
- Saygideger, S., et Dogan, M. (2004). Lead and cadmium accumulation and toxicity in the presence of EDTA in *Lemna minor L.* and *Ceratophyllum demersum L.* *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73, 182-189.
- Schluesener, J. K., et Schluesener, H. J. J. A. o. T. (2013). Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. *Archives of Toxicology* 87, 569-576.
- Schowaneck, D., McAvoy, D., Versteeg, D., et Hanstveit, A. (1996). Effects of nutrient trace metal speciation on algal growth in the presence of the chelator [S,S]-EDDS. *Aquatic Toxicology* 36, 253-275.
- Sekomo, C. B., Rousseau, D. P. L., Saleh, S. A., et Lens, P. N. L. (2012). Heavy metal removal in duckweed and algae ponds as a polishing step for textile wastewater treatment. *Ecological Engineering* 44, 102-110.
- Shafer, M. M., Overdier, J. T., et Armstong, D. E. (1998). Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environmental Toxicology and Chemistry Banner* 17, 630-641.
- Shan, C., Xu, Z., Zhang, X., Xu, Y., Gao, G., et Pan, B. (2018). Efficient removal of EDTA-complexed Cu(II) by a combined Fe(III)/UV/alkaline precipitation process: Performance and role of Fe(II). *Chemosphere* 193, 1235-1242.

- Sillanpää, M., et Sihvonen, M.-L. (1997). Analysis of EDTA and DTPA. *Talanta* 44, 1487-1497.
- Siva Sai Kiran B, R. S. (2017). A review on Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) with a special emphasis on its applications. *Scholars Research Library*, 44-54.
- Sotiriou, G. A., et Pratsinis, S. E. (2010). Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environmental Science & Technology* 44, 5649-5654.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., et White, J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology* 43, 9473-9479.
- Sun, T. Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., et Nowack, B. (2014). Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution* 185, 69-76.
- Sun, X., Shi, J., Zou, X., Wang, C., Yang, Y., et Zhang, H. (2016). Silver nanoparticles interact with the cell membrane and increase endothelial permeability by promoting VE-cadherin internalization. *Journal of Hazardous Materials* 317, 570-578.
- Tripathi, D. K., Shweta, Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., Prasad, S. M., Dubey, N. K., et Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110, 2-12.
- Ucuncu, E., Ozkan, A. D., Kursungoz, C., Ulger, Z. E., Olmez, T. T., Tekinay, T., Ortac, B., et Tunca, E. (2014). Effects of laser ablated silver nanoparticles on *Lemna minor*. *Chemosphere* 108, 251-257.
- Urrutia, C., Rudolph, A., Lermenda, M. P., et Ahumada, R. (2008). Assessment of EDTA in chromium (III-VI) toxicity on marine intertidal crab (*Petrolisthes laevigatus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 526-528.
- Verma, R., et Suthar, S. (2015). Lead and cadmium removal from water using duckweed – *Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alexandria Engineering Journal* 54, 1297-1304.
- Wan Ngah, W. S., et Hanafiah, M. A. K. M. (2008). Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. *Bioresource Technology* 99, 3935-3948.

- Wang, C. C., Luconi, M. O., Masi, A. N., et Fernández, L. P. (2009). Derivatized silver nanoparticles as sensor for ultra-trace nitrate determination based on light scattering phenomenon. *Talanta* 77, 1238-1243.
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J. L., Colvin, V. L., Braam, J., et Alvarez, P. J. J. (2013). Phytostimulation of *Poplars* and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag^+ at sublethal concentrations. *Environmental Science & Technology* 47, 5442-5449.
- Wang, L.-F., Habibul, N., He, D.-Q., Li, W.-W., Zhang, X., Jiang, H., et Yu, H.-Q. (2015). Copper release from copper nanoparticles in the presence of natural organic matter. *Water Research* 68, 12-23.
- Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 11, 1-14.
- Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 52, 7-22.
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air, and Soil Pollution* 59, 381-400.
- Xue, Y., Zhang, T., Zhang, B., Gong, F., Huang, Y., et Tang, M. (2016). Cytotoxicity and apoptosis induced by silver nanoparticles in human liver HepG2 cells in different dispersion media. *Journal of applied toxicology : JAT* 36, 352-360.
- Yah, C. S., Simate, G. S., et Iyuke, S. E. (2012). Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak J Pharm Sci* 25, 477-491.
- Yang, L., et J Watts, D. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters* 158, 122-132.
- Yang, Y., Xu, S., Xu, G., Liu, R., Xu, A., Chen, S., et Wu, L. (2019). Effects of ionic strength on physicochemical properties and toxicity of silver nanoparticles. *Science of The Total Environment* 647, 1088-1096.
- Yeo, S. Y., Lee, H. J., et Jeong, S. H. J. J. o. M. S. (2003). Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *Journal of Materials Science* 38, 2143-2147.
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B. P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J., et Bernhardt, E. S. (2011). More than the Ions: The effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology* 45, 2360-2367.

- Yu, S.-j., Yin, Y.-g., et Liu, J.-f. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15, 78-92.
- Zetina-Córdoba, P., Ortega-Cerrilla, M. E., Ortega-Jiménez, E., Herrera-Haro, J. G., Sánchez-Torres-Esqueda, M. T., Reta-Mendiola, J. L., Vilaboa-Arroniz, J., et Munguía-Ameca, G. (2013). Effect of cutting interval of Taiwan grass (*Pennisetum purpureum*) and partial substitution with duckweed (*Lemna sp. and Spirodela sp.*) on intake, digestibility and ruminal fermentation of *Pelibuey lambs*. *Livestock Science* 157, 471-477.
- Zeyons, O., Thill, A., Chauvat, F., Menguy, N., Cassier-Chauvat, C., Oréar, C., Daraspe, J., Auffan, M., Rose, J., et Spalla, O. (2009). Direct and indirect CeO₂ nanoparticles toxicity for *Escherichia coli* and *Synechocystis*. *Nanotoxicology* 3, 284-295.
- Zheng, X., Wang, J., Chen, Y., et Wei, Y. (2018). Comprehensive analysis of transcriptional and proteomic profiling reveals silver nanoparticles-induced toxicity to bacterial denitrification. *Journal of Hazardous Materials* 344, 291-298.
- Zille, A., Fernandes, M. M., Francesko, A., Tzanov, T., Fernandes, M., Oliveira, F. R., Almeida, L., Amorim, T., Carneiro, N., Esteves, M. F., et Souto, A. P. (2015). Size and aging effects on antimicrobial efficiency of silver nanoparticles coated on polyamide fabrics activated by atmospheric DBD plasma. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7, 13731-13744.